



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

COMPARACIÓN DEL DAÑO EN EMBRIONES OVINOS  
CONGELADOS LENTAMENTE O VITRIFICADOS Y SU POSIBLE  
EFECTO EN LA SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA.

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
PRESENTA:  
**ANA OLIVIA JIMÉNEZ RUIZ**

Tutor: OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA  
Comité Tutoral: MARIO PÉREZ MARTÍNEZ  
SALVADOR ROMO GARCÍA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A Mercedes y Gregorio:

porque no puedo recordar un instante en los últimos años  
en que no haya recibido su apoyo incondicional y sus consejos.

Los amo.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por su apoyo a través de una beca que impulsara mi deseo por desarrollarme en el área de investigación.

A la UNAM, por darme nuevamente cabida en sus aulas como parte suya.

A mi tutor, el Doctor Octavio Mejía Villanueva, por depositar en mi su confianza, por compartir sus conocimientos y dirigirme siempre con paciencia.

A Jesús Núñez Saavedra, director del CEIEPO, quien junto con todo el personal que en ese lugar labora, me otorgaron las facilidades necesarias para la realización del presente trabajo.

Al comité académico, por todas las observaciones hechas en el diseño, ejecución, redacción y revisión del proyecto.

Al personal académico y administrativo del CEIPSA, por su apoyo técnico.

A Javier Hernández Ignacio, por haber participado durante la evaluación morfológica de los embriones y por los comentarios que fortalecieron el proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio de biología de la reproducción de la Facultad de Química de la UNAM, dirigidos por el Dr. Marco Antonio Cerbón y la Dra. Adriana Mendoza, quienes colaboraron con las técnicas de análisis de laboratorio utilizadas y me guiaron siempre con cordialidad.

A la USAI de la Facultad de Química de la UNAM, en particular a Karina Jiménez, quienes me ayudaron con la obtención y análisis de imágenes.

A los miembros del jurado, por las aportaciones hechas para mejorar el presente trabajo.

Al personal que me acompañó en la fase de campo, en especial a César Flores, Martín Villalobos, Dorita, Sheyla, Adrián y Juan.

*Todos somos muy ignorantes, lo que ocurre es que  
no todos ignoramos las mismas cosas.*

*ALBERT EINSTEIN*

## RESUMEN

La criopreservación de tejidos, embriones y gametos tiene importantes aplicaciones científicas y prácticas, pero destaca especialmente en la reproducción asistida y en la creación de bancos de genes. Dos de sus métodos más utilizados: la congelación lenta con glicerol y la vitrificación, logran altas pero inconstantes tasas de supervivencia tras la revitalización. Se ha determinado que la apoptosis tiene una participación activa e indispensable en la embriogénesis, actuando de forma caspasa-dependiente sobretodo en estadios avanzados del embrión y siendo regulado por múltiples estímulos, genes y biomoléculas. A esto se le suma que aunque se han identificado factores que determinan una técnica de criopreservación exitosa, aún se desconocen la proporción del fracaso que es atribuible al estrés que implican los procedimientos señalados, los mecanismos que la median y las sustancias señalizadoras que participan. Para tal efecto embriones ovinos frescos, congelados lentamente o vitrificados en estadio de mórula compacta (7 días de edad) fueron sometidos en 31 bloques aleatorizados a colocación *in situ* de apoptosis y caspasa 3 activa (mediante TUNEL e inmunohistoquímica respectivamente). Se encontró que el índice de muerte celular (DCI) es significativamente mayor en el grupo de congelación lenta ( $58.79 \pm 29.37\%$ ,  $P > 0.05$ ), mas no entre embriones frescos y vitrificados ( $29.46 \pm 36.45\%$  y  $34.15 \pm 34.15\%$  respectivamente  $P > 0.05$ ). En todos los grupos y embriones fue apreciable la actividad de caspasa 3, comprobando la presencia de apoptosis clásica dependiente de caspasas. Se concluye que la congelación lenta constituye una fuente de estrés lo suficientemente importante para aumentar significativamente el DCI, no así la vitrificación, procedimiento que aunque inflige daños por MCP (muerte celular programada) en el embrión, estos no difieren en gran medida del control en fresco. Ello pudiera contribuir a que tal proceso sea más compatible con la supervivencia embrionaria, porque el margen de daño pudiera ser subsanado por las células sobrevivientes.

**Palabras clave:** vitrificación, congelación lenta, criodaño, criopreservación, embriones, apoptosis.

## ABSTRACT

Tissue, embryo and gamete cryopreservation have important scientific and practical applications. They are particularly important in assisted reproduction and cryobanking. Two of their most popular approaches are slow freezing with glycerol and vitrification. Both procedures result in high, yet irregular survival rates after thawing. Apoptosis or programmed cell death is regulated by numerous factors including modulator genes, biomolecules and diverse stimuli. It has been determined that apoptosis has an active and necessary role in embryogenesis, acting in a caspase-dependent way, especially in late stages of the embryo. In addition to apoptosis, several other factors have been identified to be determinant in a successful cryopreservation technique. However, the threshold of failure due to stress, the pathway employed, and the signaling substances that affect the success of the cryopreservation techniques remain unknown. To clarify the effects of some of this factors, fresh, slow frozen and vitrified ovine embryos in compact morulae stage (7 day-old) were randomly allocated in 31 blocks. These embryos were subject to apoptosis and caspase-3 activity *in situ* colocalization, through TUNEL test and immunohistochemistry, respectively. The results indicate that the Death Cell Index (DCI) is significantly higher in the slow freezing group ( $58.79 \pm 29.37\%$ ,  $P > 0.05$ ). However the difference was not significant between the fresh (control) and vitrified groups ( $29.46 \pm 36.45\%$  and  $34.15 \pm 34.15\%$  respectively  $P > 0.05$ ). In all groups and embryos, caspase-3 activity was apparent, ratifying the presence of classic apoptosis caspase-dependent. It is concluded that a) slow freezing constitutes an important source of stress that increases significantly the embryo DCI, and b) vitrification would result in higher survival rates of embryos compared to other methods. This higher differential survival could be the result of a higher proportion of surviving cells after vitrification.

**Keywords:** vitrification, slow freezing, cryodamage, cryopreservation, embryos, apoptosis.

## CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Morfofisiología del embrión ovino en preimplantación.....	6
2.1.1 Cronología del desarrollo temprano del embrión ovino .....	6
2.1.2 Criología del embrión en preimplantación.....	10
2.1.3 Evaluación morfológica del embrión en preimplantación.....	15
2.2 Antecedentes de la criopreservación de embriones.....	18
2.2.1 Factores de variación en los métodos de criopreservación.....	18
2.2.2 Desarrollo histórico de las técnicas de criopreservación.....	21
2.2.3 Particularidades de la congelación lenta con glicerol.....	27
2.2.4 Particularidades de la vitrificación en pajillas de 0.25 cc.....	28
2.3 El papel de la muerte celular programada en la biología del desarrollo...	32
2.3.1 Tipos de muerte celular programada.....	34
2.3.2 Moléculas relevantes que componen la maquinaria apoptótica.....	37
2.4 Evidencia de MCP en embriones en la etapa previa a la implantación.....	46
2.4.1 Métodos de diagnóstico de la muerte celular programada.....	47
2.4.2 Tasas de incidencia espontánea en especies domésticas.....	49
2.4.3 Tasas de incidencia de MCP inducida por criopreservación.....	51
3. OBJETIVOS.....	53
4. HIPÓTESIS.....	53
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	54
6. RESULTADOS.....	62
6.1 Cambios entre los índices de muerte celular programada presentes en embriones criopreservados e intactos.....	62
6.2 Hallazgos morfológicos relacionados con los métodos de criopreservación.....	65
7. DISCUSIÓN.....	68
8. CONCLUSIONES.....	81
9. LITERATURA CITADA.....	82

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Cronología de eventos en el desarrollo temprano en el ovino ( <i>Ovis aries</i> ).....	8
<b>Figura 2.</b> Instrumentos utilizados en la congelación lenta.....	26
<b>Figura 3.</b> Clasificación de los tipos de MCP.....	35
<b>Figura 4.</b> Vías de señalización de los distintos tipos de MCP presentes en la célula.....	38
<b>Figura 5.</b> Esquema del diseño experimental utilizado.....	55
<b>Figura 6.</b> Apariencia de los fluoróforos en el embrión ovino en preimplantación.....	62
<b>Figura 7.</b> Distribución del índice de muerte celular (DCI) en la población de embriones de acuerdo al tratamiento de criopreservación.....	63
<b>Figura 8.</b> Índice de muerte celular(DCI) de acuerdo al tratamiento de criopreservación.	63
<b>Figura 9.</b> Distribución y frecuencia del DCI en embriones ovinos de 6 días de edad.....	64
<b>Figura 10.</b> Actividad de caspasa 3 activa en el embrión ovino de 6 días de edad.....	66
<b>Figura 11.</b> Colocalización de las tinciones sobre los blastómeros embrionario que evidencian MCP clásica.....	66
<b>Figura 12.</b> Presencia de fragmentos nucleares en embriones ovinos criopreservados....	67
<b>Figura 13.</b> Efecto de la vitrificación en la morfología del embrión a su revitalización.....	67



## I INTRODUCCIÓN

Desde hace más de seis décadas, la transferencia de embriones (ET) se ha convertido en una herramienta indispensable en el mejoramiento y comercio de la genética de los animales domésticos en el mundo (Dobrinsky, 1996). Durante este período se han logrado importantes avances en el conocimiento de los procesos implicados en esta técnica como pueden enumerarse la biología del desarrollo, la criobiología, la endocrinología de la gestación y de la reproducción, entre otras disciplinas.

De entre las especies domésticas en las que se ha realizado esta técnica exitosamente, la especie bovina ha sobresalido en cuanto al volumen de procedimientos realizados, resultados satisfactorios y distribución mundial (Massip, 2001). En el período comprendido entre 2000 y 2005, la IETS (International Embryo Transfer Society) reportó que en esa especie, el volumen de embriones transferidos aumentó en un 15.50%, porcentaje del cual la mitad corresponde a embriones criopreservados (Thibier 2001; Thibier 2006). Esto se ha debido a que el panorama pecuario del bovino es uno de los más tecnificados, haciendo posible que se aprovechen las múltiples bondades de la técnica, entre las cuales destacan: la mejora genética de hatos productivos, el intercambio comercial libre de riesgos sanitarios y de aclimatación, la conservación de líneas genéticas, estirpes de interés científico o especies en peligro de extinción y la rápida reproducción de una raza dentro de una localidad (Christensen 1991; Seidel 1991; Schiewe *et al.*, 1995; Guerin 1997; Celestinos y Gatica 2002; McEvoy 2003; Guignot *et al.*, 2006). Por su parte, en la especie ovina la transferencia de embriones se ha adoptado con mayor lentitud, debido al alto costo requerido en su implementación, la inconsistencia en la respuesta superovulatoria y el requisito de realizarla por la vía quirúrgica, suponiendo un mayor riesgo para la valiosa donadora de embriones (Maurer 1978; Buckrell *et al.*, 1989; Christensen 1991; Fahning y García 1992; Schiewe *et al.*, 1995; Ishwar y Memon 1996; Guerin 1997; Cognie 1999; Mazur 2008). Esto influyó para que en el año 2000 se calculara un volumen de transferencias modesto, que osciló entre 5'000 y 10'000, pero que puede resultar prometedor si se compara con la cifra obtenida para 2005, año en que la práctica aumentó en un 150%, acumulando 25'000 embriones transferidos, de los cuales el 50% corresponde a embriones criopreservados (Thibier 2001, Thibier 2006).

Un componente crucial en la ET y responsable del éxito que ha tenido es sin duda la criopreservación (Leibo *et al.*, 1996; Massip 2001). La criopreservación de tejidos, embriones y gametos tiene importantes aplicaciones en la reproducción asistida y en la construcción de bancos de genes (Seidel 1991; Fahning y García 1992; Sakul *et al.*, 1993; Betteridge 1995; Schiewe *et al.*, 1995; Leibo *et al.*, 1996; Naitana *et al.*, 2000; Dhali *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 2008). Esta tecnología permite la disponibilidad de embriones conservados a largo plazo sin necesidad de producirlos al momento de su transferencia, optimizando así las ventajas propias de la ET (Fahning y García 1992; Sakul *et al.*, 1993; Schiewe *et al.*, 1995; Celestinos y Gatica 2002). Tres técnicas de criopreservación han sobresalido, estas son la congelación lenta con glicerol (CL), la congelación lenta con etilenglicol (EG) y la vitrificación. Las dos primeras describen el método más conocido, en que el embrión es expuesto por el suficiente tiempo a bajas concentraciones de crioprotectores e inmediatamente, es sometido a uno de varios patrones de descenso paulatino de la temperatura. La congelación lenta con EG fue diseñada para facilitar su uso a nivel de campo pero que al usar un crioprotector tóxico se dificulta evaluar su desempeño con parámetros distintos a las tasas de fertilidad, por lo que no será contemplada en lo subsecuente. La vitrificación en cambio, ha tomado importancia en los últimos años dada la gran ventaja de no provocar en lo absoluto lesiones celulares debidas a la cristalización y también porque ha derivado en resultados óptimos en estructuras delicadas con las que los otros métodos habían fallado (Maurer 1978; Rall 1987; Fahning y García 1992; Agca *et al.*, 1994; Leibo *et al.*, 1996; Vajta *et al.*, 1998; Dattena *et al.*, 2000; Massip 2001); consiste en deshidratar y enfriar rápidamente células y tejidos complejos, echando mano de las propiedades osmóticas que ejercen altas concentraciones de crioprotectores (Széll y Windsor 1994; Kasai 1996; Vajta *et al.*, 1996a; Martínez *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2002; Cuello *et al.*, 2004a; Horvarth y Seidel 2006). No obstante estas distinciones, el objetivo de ambas estrategias de criopreservación se cumple a través de la formación ordenada de pequeños cristales de hielo dentro de las células sin que estos dañen las membranas y el citoesqueleto de las mismas (Kasai 1996; Meryman 2007). Que ello se efectúe así depende, otra vez en ambos casos, de factores de variación que aún continúan bajo estudio (Pollard y Leibo 1993; Miyake *et al.*, 1993; Pollard y Leibo 1994; Papis *et al.*, 2000; Arav *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Balasubramanian y Rho 2006).

Por muchos años, se consideró que la ruptura de las membranas celulares y el citoesqueleto de una gran proporción de las células que conforman al embrión eran un estrés lo suficientemente fuerte como para interrumpir su incipiente desarrollo (Kanagawa 1978; Schneider y Mazur 1984; Mazur *et al.*, 1991; Széll y Windsor 1994; Dobrinsky 1996; Valcárcel *et al.*, 1997; Holt 2000; Takahashi *et al.*, 2000a; Takahashi *et al.*, 2000b; Mazur y Koshimoto 2005; Balasubramanian y Rho 2006; Mucci *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2007). Esta tesis fue fortalecida cuando se comprobó que en embriones que han sido manipulados traumáticamente, -como ocurre en procedimientos como la transferencia nuclear, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la bipartición o la biopsia química o mecánica-, aumenta la incidencia de apoptosis, de mutaciones incompatibles y de sus efectos detrimentales que pueden desembocar en menor calidad morfológica, potencial de desarrollo inferior, senescencia acelerada e incluso la muerte (Saito *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 1996; Vajta *et al.*, 1996b; Booth *et al.*, 1998; Peura *et al.*, 1999; Dinnyés *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; McEvoy 2003; Makarevich 2005., Xie *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Sin embargo, en cualquiera de los dos tipos de criopreservación contemplados existen serias amenazas al desarrollo distintas al daño físico como son: la presencia de crioprotectores tóxicos, exposición a temperaturas fuera de la zona de confort, deshidratación, exposición a ambientes hiperosmóticos, lipoperoxidación, encogimiento celular e influjo anormal de iones (Holt 2000; Kaidi *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2006). Incluso, se ha comprobado que cualquiera de los métodos de criopreservación en discusión disminuyen la viabilidad del embrión al menos en un 10% al producirse cambios físicos y/o químicos (Sell 1978; Dobrinsky 1996; Martínez *et al.*, 2002; Márquez-Alvarado *et al.*, 2004; Marquez *et al.*, 2005). Sin embargo, ambas técnicas proporcionan una cantidad aceptable de desarrollo una vez revertido el proceso de crioconservación y aunque pueden notarse diferencias entre sus tasas de éxito, estos resultados son imposibles de comparar bajo el contexto de la diversidad de condiciones en que fueron llevadas a cabo o de la variedad de formas en que fueron medidos. Sin considerar el método de análisis, la gran mayoría de la evidencia literaria señala a la vitrificación como el método más efectivo para criopreservar embriones, no importando el grado de criosensibilidad que tenga, esto se atribuye a que al aumentar la velocidad de enfriamiento puede evadirse el criodaño (Pollard y Leibo 1994).

Un modelo muy concurrido para estudiar la vitalidad de un embrión en desarrollo son los patrones de muerte celular/proliferación presentes en el desarrollo inicial de todo organismo vivo. (Dobrinsky 1996; Hipfner y Cohen 2004; Malumbres y Barbacid 2005; Chen *et al.*, 2005; Hernández-Terán *et al.*, 2006; Puzianowska-Kuznicka *et al.*, 2006) La MCP se encarga de eliminar de una forma ordenada las células innecesarias en el organismo ante estímulos programados genéticamente, realizándolo en forma de fagocitosis no inflamatoria y progresiva que involucra una cascada química en que participan proteasas y otras moléculas. La MCP corresponde a un suicidio preparado ante condiciones adversas, o bien, predeterminada genéticamente, que ocurre de acuerdo al tipo celular, su localización y que es regulada por una serie de evocadores intracelulares o extracelulares (Betts y King 2001; Flores-Pérez 2002; Gjørret *et al.*, 2003; Jäättela 2004; Guicciardi *et al.*, 2004; Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007). Desde la introducción del término “apoptosis” (proveniente de las raíces griegas “apo”=separar y “posis”=caer) en 1972 por Kerr, para denominar a la en ese entonces mal nombrada “necrosis” y ahora conocida como MCP, se ha establecido el comité de nomenclatura de la muerte celular, organismo que valiéndose del rastreo molecular ha definido procesos de muerte con diferencias significativas. Así, se han caracterizado tipos de muerte distintos a la MCP clásica o apoptosis tales como la catástrofe mitótica, la autofagia, la MCP tipo necrosis y la MCP tipo apoptosis. Cada tipo de MCP es provocada por diversos estímulos de acuerdo al tipo celular y tienen características morfológicas distintas, indicio de una cascada química diferente, pero comparten los mismos mecanismos bioquímicos, dado que son funciones evolutivamente conservadas y eso hace posible, que en una sola célula expuesta a diferentes estímulos se inicien más de una clase de MCP. (Betts y King 2001; Leist y Jäättela 2001; Flores-Pérez 2002; Jäättela 2004; Saelens *et al.*, 2004; Bröker *et al.*, 2005; Fabian *et al.*, 2005; Fernández-Teherán *et al.*, 2006; Lleo *et al.*, 2007)

Cabe resaltar que el proceso de MCP no esta necesariamente ligado con la muerte del embrión, sino que es un proceso tan activo que se actualiza constantemente de acuerdo a lo que percibe en el ambiente, que generalmente actúa aisladamente en las células programadas para morir y que puede revertirse en algunos casos digiriendo solo una parte de la célula sin que esta muera (Jurisicova *et al.*, 1996; Betts y King 2001; Martinez *et al.*, 2003; Márquez-Alvarado *et al.*, 2004; Marquez *et al.*, 2005; Lleo *et al.*, 2007).

En otros casos, el proceso de apoptosis puede ser iniciado y después interrumpido para reiniciar en forma de necrosis secundaria, o de alguno de los distintos tipos de apoptosis hasta la fecha descritos. Por lo general, la vía más simple de apoptosis es la que suele predominar (Betts y King 2001; Leist y Jäättela 2001; Jäättela 2004; Kroemer 2004; Fabian *et al.*, 2005; Bröker *et al.*, 2005; Lamkanfi *et al.*, 2007). El que la MCP constituya el factor decisivo para la supervivencia o la ruina del embrión dependerá de la magnitud de su incidencia (Betts y King 2001; Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007). Es por ello que, identificar y comprender los procesos celulares y bioquímicos que se llevan a cabo en el desarrollo temprano del embrión criopreservado, podría cobrar particular importancia ante la posibilidad de mejorar los procesos implicados. Es decir, es importante distinguir qué proporción del fracaso tras la criopreservación es atribuible al estrés que implica el procedimiento, al arresto en el ciclo celular asociado a un ambiente subóptimo y/o a la ocurrencia fisiológica durante la embriogénesis. Así mismo, conocer los mecanismos que la median o a las sustancias señaladoras participantes en tales procesos y hasta que punto el daño puede ser revertido por el embrión, podría constituir importantes hallazgos para el acervo del conocimiento sobre el desarrollo temprano de la vida.

Dada la variedad de sustancias participantes y su especificidad ante cada tipo de MCP, se hace necesario acompañar las pruebas de diagnóstico con estudios que las identifiquen bioquímicamente en cuanto a volumen y distribución (Betts y King 2001; Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007). Para determinar la presencia de MCP clásica por la vía efectora de las caspasas se ha elegido la realización de las pruebas de TUNEL y de inmunohistoquímica dirigida a caspasa 3 activa en embriones ovinos completos en suspensión. El razonamiento es que la combinación de estas técnicas muestran cambios morfológicos -fragmentación del ADN en los núcleos TUNELpositivos- y bioquímicos - actividad proteolítica de caspasas- simultáneamente, mientras dan un valor cuantitativo - mediante la cuenta de células TUNEL-positivas y los núcleos totales en el embrión-, y cualitativo -mediante el discernimiento del tipo de MCP presente. La presencia de caspasa 3-activa podría apuntar a la presencia de apoptosis clásica, MCP tipo apoptosis y catástrofe mitótica, mientras que su ausencia señala tipos de muerte independientes de caspasa como la autofagia y MCP tipo necrosis cuando la prueba TUNEL resulta positiva y necrosis cuando es negativa (Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007).



























## II REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Morfo-fisiología del embrión ovino en preimplantación.

2.1.1. Cronología del desarrollo temprano del embrión ovino (*Ovis aries*). El embrión ovino en preimplantación, como el de la mayoría de las especies mamíferas, tiene una conformación tipo llamada de huevo cleidoico o autosuficiente. Tras haber abandonado la forma de ovocito fertilizado al iniciar las divisiones celulares, el embrión ha perdido la cubierta de las células del cúmulus y de la corona radiada para solo ser protegido por una estructura conocida como zona pelúcida (ZP), que es porosa, acelular y compuesta por polímeros de glicoproteínas, cuyos residuos de azúcares y lectinas la diferencian de entre otras especies animales. Esta cubierta con su simpleza cumple funciones importantes: dirige la penetración del espermatozoide debido a la presencia de receptores de superficie especie-específicos, bloquea la poliespermia al generar la despolarización de la membrana y la reacción conocida como endurecimiento de zona, agiliza el transporte del cigoto a través del oviducto y útero maternos al repeler cargas eléctricas opuestas con esas mucosas, además protege al grupo de células que yacen en su interior de agresiones mecánicas, infecciones y de interacciones de gametos inespecíficas de especie hasta el momento de la eclosión. La eclosión es el retiro natural de la ZP debido a su adelgazamiento por el crecimiento del embrión y por acción enzimática endógena, ocurre cuando la elongación del embrión excede el diámetro interno de la misma, señal de que el embrión requiere tener un estrecho contacto con el endometrio materno para su próximo reconocimiento materno e implantación (Betteridge, 1995). En el interior yace el embrión en desarrollo que es separado de la ZP por un espacio ocupado por matriz extracelular proveniente de los gránulos corticales del ovocito conocido como espacio perivitelino (término en alusión a que el citoplasma del ovocito *per se* constituía el vitelo del futuro embrión en desarrollo) y por las membranas celulares de cada una de sus nuevas células. Por otro lado, el espacio perivitelino se encarga de facilitar las divisiones celulares al hidratarse y proporcionar un espacio amplio mientras que también bloquea la poliespermia, atrapando espermatozoides en su interior (Shea 1981; Wassarman 1994; Betteridge 1995).

En función de su desarrollo a través del tiempo, los embriones pueden tener distintos estadios de desarrollo compatibles con la criopreservación, la cronología de sucesos se enumera a continuación. El ovocito recién fertilizado por un espermatozoide de la misma especie es activado al momento que se unen las proteínas de superficie de cada uno de los gametos, entonces se liberan gránulos corticales para evitar la poliespermia, se completa la meiosis II en la mayoría de las especies domésticas y se libera el segundo cuerpo polar, dando paso a la formación de los pronúcleos femenino y masculino que al condensarse en alelos cromosómicos y recombinarse restauran la diploidía e inician una incesante sucesión de divisiones celulares. La división forma entonces dos células hermanas idénticas (24-26 h), luego, al cabo de unas horas cada una se dividirá obteniendo 4 células idénticas (30-36 h), la próxima división resulta en el estadio de 8 células (42-45 h) –momento importante porque coincide con la compactación y la activación del genoma embrionario principal en los ovinos-, mientras la división continúa con lentitud hasta llegar a la fase de mórula: un racimo de 16-32 células o blastómeros para el día 6 post-coito (63-86 h), a este proceso de proliferación celular se le denomina segmentación. En este momento, disminuye la tasa de proliferación en una aparente quiescencia que no es más que un reacomodo celular, una fase de síntesis intracelular que precede a otra frenética división celular cada vez más asincrónica en la que ocurre el monitoreo de la correcta copia del genoma y de las condiciones ambientales para dar el siguiente paso que es la compactación y cavitación. El reacomodo de las células permite un encogimiento del cúmulo que forman mientras que sus secreciones se empiezan a desplazar para formar una sola laguna o blastocele apenas visible en forma de pequeños antros (95 h), a este proceso se le conoce como blastulación (Shea 1981; Wintenberger-Torres y Sevellec 1987; Crosby *et al.*, 1988; Betteridge 1995; Hay-Schmidt *et al.*, 1998; Berdugo y Bueno 2000; Vallejo *et al.*, 2003;). Entonces el número de células aumenta a cientos de blastómeros más pequeños cada vez, que se empiezan a acomodar alrededor del cada vez más grande blastocele, mientras que se establecen los puentes de unión entre las células y se ubican las bombas y canales de iones en la membrana celular, es entonces que se da la división funcional de células más importante en la vida temprana del embrión: las células de la masa celular interna (ICM) y las del trofoectodermo (TE) (Shea 1981; Hay-Schmidt *et al.*, 1998; Fabian 2005; Balasubramanian y Rho 2006). **Figura 1**

## DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO DE LA OVEJA

Ubicación	Día	Horas post-estro	Estadio de desarrollo	Número celular promedio	Diámetro de blastómeros		
Istmo	0-2	24-36	Ovocito	1	117µm		
Istmo	0-2	25-31	1 célula (Cigoto)	1	126µm		
Istmo	1-3	56	2 células	2	126µm		
Unión istmo-ampular	2-3	60	4 células	4	70µm		
Unión istmo-ampular	3-5	72	8-16 células	8-16	46-56µm		
Útero	4-5	96	Mórula temprana 16-32 cel	18-22	30-35µm		
Útero	5-6	120	Mórula 32-64 cel	22-40	30-33µm		
Útero	5-7	144	Mórula compacta	79	30-33µm		
Útero	7-8	168	Blatocisto inicial	103	28-32µm		
Útero	7-9	180	Blastocisto maduro	152	24µm		
Útero	8-10	192	Blastocisto expandido	218	20µm		
Útero	9-11	216	Blastocisto en eclosión	244	16µm		
Útero	9-14	260	Blastocisto desnudo	282 a 1062	12µm		

**Figura 1. Cronología de eventos en el desarrollo temprano en el ovino (*Ovis aries*).**

Modificado de Wintenberger-Torres y Sevellec (1987) y Betteridge (1995)



Aunque para este momento no se ha dado una especialización propiamente dicha, es decir las características morfológicas de las células son exactamente las mismas, la células del TE y la ICM poseen capacidades de secreción independientes, como lo han demostrado diversos estudios de co-transferencia de embriones y vesículas trofoblásticas vacías de rumiantes y ungulados y, que a la fecha mantiene vigente la investigación sobre la producción de interferones y gonadotropinas embrionarias y su efecto en la migración y diferenciación celular. De ese modo, si forma una monocapa de células que separa al espacio perivitelino del blastocele se les denomina células del TE y darán lugar a la placenta, las membranas placentarias: corion y amnios, así como parte del aparato urinario pero, si forman un conglomerado celular rodeado del blastocele que se ubica en un polo, se les nombra ICM y a partir de ella se formará al embrión tras la activación del genoma embrionario y el inicio de la gastrulación y la especialización de tejidos. Incluso, se ha determinado que la aparición de uniones estrechas en las células del TE cuando el embrión alcanza el estadio de blastocisto, impide el libre intercambio entre el fluido uterino y el blastocele, generando un microambiente a la ICM caracterizada por la presencia de proteínas secretadas tanto por las células de la ICM como las del TE. (Gandolfi 1994; Betteridge 1995) Se piensa que el carácter distintivo entre las células de la ICM y el TE se debe a la impronta parental del genoma, ya que a partir de estudios del desarrollo que utilizan el modelo de embriones partenogénicos se ha encontrado que el origen de la placenta se relaciona con el genoma paterno y el genoma materno crea mayormente las células del producto (Berdugo y Bueno 2000). Normalmente las células recurren a su maquinaria de sostén, conocida como citoesqueleto, para modificar su forma, orientación y número de capas celulares, eventos necesarios para originar un nuevo ser acorde con su especie a partir de una célula. El citoesqueleto está principalmente compuesto por filamentos actina que se encuentran en la región del córtex sosteniendo la célula y dándole la forma esférica, mientras que también participan en funciones como la meiosis y la mitosis, la compactación, blastulación y elongación embrionaria y en la asociación con uniones adherentes implicadas en la unión célula-célula (Dobrinsky 1996; Betts y King 2001; Gilbert 2002; Hinchcliffe 2003; Horvarth y Seidel 2006).

Desde su origen el cigoto emite un sinnúmero de señales químicas en constante intercambio, más aún cuando el número de células va en aumento y están en tan cercano contacto. Estas sustancias incluyen proteínas evocadoras, factores de crecimiento, enzimas, hormonas y citocinas que pueden dividirse en 3 grupos: factores autócrinos producidos por el propio embrión para sostener su desarrollo, factores parácrinos excretados por el oviducto para acceder al producto y que en su mayoría constituyen factores de crecimiento, hormonas y proteínas, y por último factores ambientales suspendidos como sustratos, iones y aminoácidos, denotando la interacción de los programas genéticos del cigoto y del aparato reproductivo materno (Gandolfi 1994; Betts y King 2001). La biología básica se ha dedicado durante décadas a enumerarlas y conocer su función en organismos tan simples como *Drosophila spp.*, *C. elegans*, *Xenopus spp.*, entre otros, que son modelos de fácil manutención, de desarrollo externo y corta longevidad. (Mazur *et al.*, 1991; Hipfner y Cohen 2004) Más aún, se carece de información parecida en los embriones criopreservados de especies domésticas, que son más complejas, con un origen filogenético diferente y por tanto un desarrollo inicial algo distinto, y que tienen también una mayor longevidad y mayor edad a la pubertad, haciéndolos modelos de estudio costosos e imprácticos.

2.1.2 Criología del embrión en preimplantación. Los embriones tempranos de muchas especies de aprovechamiento humano pueden ser congelados. Durante tal proceso, las funciones fisiológicas se detienen casi por completo, llámense respiración, crecimiento, división celular o actividad enzimática intercelular. Todo ello ocurre sin que la viabilidad sea alterada o se provoquen cambios genéticos importantes (Schneider y Mazur 1984; Celestinos y Gatica 2002). La gran ventaja de criopreservar embriones versa alrededor de la practicidad, cada embrión puede conservarse por largo tiempo hasta que se presenten las condiciones propicias para ser gestado. Los bancos de germoplasma, optan actualmente por almacenar embriones en lugar de gametos, por dos razones fundamentales: el haber superado la fase de la fertilización con éxito y el disponer de genomas diploides que guardan las características que la selección humana y natural han forjado en la genética animal, esto a pesar de que conservando gametos aún es factible obtener embriones *in vivo* (IVD) o *in vitro*, incluso en el caso de ser inviables mediante el uso de ICSI (Schiewe *et al.*, 1995; Holt 1997; Naitana *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 2008).

Aunque criopreservar embriones de buena calidad no es garantía de desarrollo subsecuente a la reversión del proceso conservador, constituye una buena práctica, ya que siempre traerá mejores resultados que congelar o vitrificar embriones de calidad regular. Además esto permitirá transportarlos y comerciar con ellos sin restricciones sanitarias cuando se trate de embriones con la ZP intacta (calidades buena y excelente) aunque la protección mecánica que esta estructura proporciona no sea del todo indispensable (Massip *et al.*, 1982; Humbolt *et al.*, 1987; Fahning y García 1992; Schiewe *et al.*, 1995; Vajta *et al.*, 1996a; Corselli *et al.*, 2000; Beebe *et al.*, 2000; Khurana y Niemann 2000; Celestinos y Gatica 2002). Lo que si es preciso, es realizar el proceso lo antes posible, sin exceder 12 h (periodo óptimo 4-5 h) desde que están siendo mantenidos en medios enriquecidos, pues después de ese tiempo la viabilidad declina rápidamente (Shea 1981; Fahning y García 1992; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004a).

Debe asumirse que toda célula viva sometida a un proceso de criopreservación es susceptible de sufrir algún grado de daño. El criodaño o daño criogénico es la combinación del daño celular producido por la formación de hielo intracelular y los efectos metabólicos irreversibles resultantes de la exposición de células vivas a frío extremo (temperaturas cercanas a 0°C en un rango de +10 a -5°C) aún en ausencia de hielo (Pollard y Leibo 1994; Horvarth y Seidel 2006; Balasubramanian y Rho 2006; Mazur *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que tanto la congelación lenta como la vitrificación reducen el diámetro de los poros de la ZP de manera irreversible, endureciéndola y afectando la viabilidad, desarrollo y susceptibilidad del embrión *a posteriori* (Mazur *et al.*, 2008). Muchos autores coinciden en que el mayor impacto del criodaño ocurre en la estructura de sostén de la célula, su membrana y organelos entre los -15 y los -16°C, y aunque se eviten los daños producidos por la cristalización, todavía estarían latentes los riesgos asociados a los efectos del estrés osmótico o de la simple exposición a crioprotectores (Rall 1987; Mazur *et al.*, 1991; Pollard y Leibo 1994; Windsor y White 1995; Kasai 1996; Dobrinsky 1996; Holt 1997; Beebe *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; Vallejo *et al.*, 2003; Mucci *et al.*, 2006; Campos-Chillón *et al.*, 2006). A pesar de que en el 25 al 50% de los embriones y ovocitos estos cambios son reversibles, esto puede no ocurrir, lo que constituye una situación precaria debido a las múltiples funciones del citoesqueleto (Dobrinsky 1996; Betts y King 2001; Horvarth y Seidel 2006).

Estudios diferenciales entre estructuras intactas, criopreservadas y expuestas a crioprotectores, muestran que estos últimos por si mismos no son los responsables de la pérdida de la viabilidad celular, aunque si existe una correlación con cambios morfológicos entre los que destacan la alta presencia de vesículas, hinchamiento mitocondrial, degeneración nuclear, desarreglos de microtúbulos y formación anormal de huso mitótico, defectos que se acentúan a temperaturas subcero o a la descongelación. En particular, se ha reportado que el uso de glicerol puede inhibir el sistema Na-K-ATPasa de cuyo correcto funcionamiento depende el mantenimiento del gradiente osmótico celular (Sell 1978; Schneider y Mazur 1984; Schiewe *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1994; Kaidi *et al.*, 2000; Arav *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; Albarracín *et al.*, 2005; Mazur y Koshimoto 2005; Park *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Por su parte, el estrés osmótico puede afectar el estado funcional de los canales de iones, modificando las concentraciones de elementos que fungen como señalizadores, como en el caso del calcio, de cuya concentración adecuada dependen procesos como la despolimerización de los filamentos de actina (Kanagawa 1978; Maurer 1978; Széll y Windsor 1994; Kasai 1996; Meryman 2007).

El estadio de desarrollo determina la toxicidad y permeabilidad a los criopreservadores, estas características aparecen a partir de la fecundación y continúan incrementándose a medida que avanza el desarrollo embrionario, esto se debe a la creciente proporción área/volumen al aumentar el número de células y aunque éstas son cada vez más pequeñas, la superficie que sus membranas celulares comprenden es cada vez mayor (Celestinos y Gatica 2002; Mazur *et al.*, 2008). En general es aceptado que en los embriones de rumiantes, el estadio óptimo para sobrellevar el procedimiento de CL es el de mórula compacta a blastocisto maduro (Shea 1981; Massip *et al.*, 1982; Massip *et al.*, 1987; Miyake *et al.*, 1993; Cocero *et al.*, 2000; Massip 2001; Martínez *et al.*, 2002; Balasubramanian y Rho 2006; Seidel y Walker 2006; Scherzer *et al.*, 2006) mientras que utilizar blastocistos expandidos suele ser detrimental, debido a la cristalización incontrolada del blastocele que daña la adelgazada ZP y el TE, fracturando el embrión y afectando su recuperación osmótica. También se cree que este líquido obstaculiza la entrada ágil de los crioprotectores permeables y que el menor tamaño de los blastómeros en estadios avanzados, afectan la proporción área/volumen que determinan la velocidad de penetración del crioprotector y el tiempo de exposición a los mismos (Schneider y

Mazur 1984; Sakul *et al.*,1993; Duke *et al.*,2004; Kader *et al.*,2007a). No obstante hay estudios que soportan que la criopreservación de estadios muy tempranos suelen llevar a bajas tasas de fertilidad debido a la criosensibilidad provocada por el mayor cúmulo de lípidos en sus células y por tener una menor permeabilidad al glicerol (Maurer 1978; Schneider y Mazur 1984; Fahning y García 1992; Miyake *et al.*,1993; Széll y Windsor 1994; Cocero *et al.*,2000; Massip 2001; Cuello *et al.*,2004b; Mazur *et al.*,2008). Para el caso de vitrificación con el sistema Open pulled straw (OPS) el estadio de opción es el de blastocisto  $\leq 400 \mu\text{m}$ , ya que es más tolerante al criodaño por sus menores reservas lipídicas y porque resisten mejor los cambios osmóticos repentinos (Kaidi *et al.*,2000; Cuello *et al.*,2004b; Campos-Chillón *et al.*,2006); pero cuando se utilizan pajillas de 0.25 cc; EG y/o sacarosa en el medio vitrificante, es más apropiado usar estadios tempranos como mórula tardía y blastocisto inicial (Massip *et al.*, 1989; Horlacher y Brem 1994; Kasai 1999; Celestinos y Gatica 2002; Seidel y Walker 2006; Scherzer *et al.*,2006).

Sin embargo, no todos los embriones pueden ser criopreservados debido a una alta sensibilidad al frío inherente a especie, raza e incluso individuos, en que también influyen el estadio de desarrollo y las condiciones en que el embrión fue originado (Schiewe *et al.*, 1991; Fahning y García 1992; Pollard y Leibo 1993; Pollard y Leibo 1994; Leibo *et al.*, 1996; Balasubramanian y Rho 2006). Se ha detectado un diferencial en la viabilidad tras la revitalización establecido entre los embriones bovinos, ovinos, de ratón y de conejo –los que resultan muy estables al congelarse- contra los derivados de porcinos o equinos, que no logran ser congelados con éxito en la mayoría de los casos (Polge *et al.*, 1974; Fahning y García 1992; Leibo *et al.*, 1996; Massip 2001; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004a; Mazur *et al.*, 2008). Este fenómeno es conocido como criosensibilidad y se ha reportado en estructuras como ovocitos de ratón y humano, los espermatozoides porcinos, caprinos, caninos y de ave, los embriones equinos, porcinos, bovinos de razas derivadas del *Bos indicus* como la Brahaman y aquellos IVP (Chen *et al.*, 1994; Kasai 1996; Holt 1997; Lewis *et al.*, 1999; Khurana y Niemann 2000; Dattena *et al.*, 2000; Massip 2001; Celestinos y Gatica 2002; Campos-Chillón *et al.*, 2006). Hasta ahora se desconoce mucho de las razones de la aparición del fenómeno, pero se sabe que en el caso de aquellos embriones IVP es debida a cambios estructurales sustanciales como la menor cantidad promedio de células de la ICM, el mayor depósito de gotas de lípidos estructurales,

presencia de blastómeros con potencial diferencial distinto al de su ubicación, anomalías en las conexiones intercelulares, alta presencia de vacuolas y enzimas que aumentan la susceptibilidad de la ZP a ser digerida y adelgazada a tal punto, que hace al embrión más permeable, sensible al enfriamiento y propenso a infecciones (Massip *et al.*, 1982; Fahning y García 1992; Pollard y Leibo 1993; Leibo *et al.*, 1995; Vajta *et a.*, 1996b; Kaidi *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000; Abd El Razek *et al.*, 2000; Massip 2001; Celestinos y Gatica 2002; Papadopoulos *et al.*, 2002; Jurisicova *et al.*, 2003; Dattena *et al.*, 2004; Balasubramanian y Rho 2006; Mucci *et al.*, 2006). Una de las variables más estudiadas en el fenómeno de criosensibilidad en los embriones IVP son las anomalías en la distribución de lípidos, de cuyo arreglo desde la membrana celular hasta los plasmalógenos depende el exitoso cambio de fase de fluido a gel ocurrido aún a temperaturas fisiológicas (temperatura de transición de fase o  $T_m$ ) y que es modulado principalmente por fosfolípidos que contienen ácido docosahexaenoico. De existir cambios irreversibles en el empaquetamiento lipídico durante el cambio de fase, las células pueden sufrir fragmentación, disfunción enzimática de ATPasas y anomalías en la homeóstasis iónica a temperaturas menores a 17°C (Holt 1997; Valcárcel *et al.*, 1997; Khurana y Niemann 2000; Holt 2000; Zeron *et al.*, 2000; Horvarth y Seidel 2006). Se ha determinado que al menos en el embrión bovino IVP, los cambios lipídicos incluyen la mayor proporción de triglicéridos, menor concentración de fosfatidilcolina, estéres del colesterol y fosfatidiletanolamina e inversión en la proporción de lípidos/proteínas (Abd El Razek *et al.*, 2000). Algunos estudios han demostrado que otro factor que hace menos criotolerantes a los embriones IVP es el período de cultivo post-fertilización. Así, los embriones IVD que son cultivados bajo condiciones de laboratorio, son criológicamente más débiles que aquellos IVP cultivados *in vivo* en el aparato reproductor de una hembra. También hay evidencia de que al mejorar las condiciones de cultivo utilizando co-cultivos con células epiteliales oviductuales o enriqueciéndolo con fluido oviductual sintético, ácido linoléico y/o albúmina, los embriones IVP no son tan susceptibles al criodañó. Sin embargo, estas medidas correctivas no pueden revertir condiciones detrimentales del cultivo *in vitro* como la presencia de mayores concentraciones de oxígeno (>20%), la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) que al igual que la exposición a la luz artificial, las anormales concentraciones de calcio en los medios de cultivo y la presencia de suero propician

daños en el genoma del embrión (Van Soom *et al.*,1992; Voelkel y Hu 1992a; Voelkel y Hu 1992b; Leibo y Loskutoff 1993; Gandolfi 1994; Semple *et al.*,1995; Vajta *et al.*,1996a; Martínez *et al.*,1998; Viuff *et al.*,1999; Vajta *et al.*,1999; Berdugo y Bueno 2000; Viuff *et al.*, 2000; Khurana y Niemann 2000; Takahashi *et al.*, 2000a; Ito *et al.*,2000; Betts y King 2001; Massip 2001; Rizos *et al.*,2001; Papadopoulos *et al.*,2002; Rizos *et al.*,2002; Martínez *et al.*,2002; Martínez *et al.*,2003; Vallejo *et al.*,2003; McEvoy 2003; Rizos *et al.*,2003; Dattena *et al.*,2004). Por último no se debe olvidar que estos embriones suelen tener diferencias en la expresión de genes (Khurana y Niemann 2000; Papadopoulos *et al.*, 2002) como lo confirman estudios alométricos y organométricos que reportan el desarrollo alterado de los órganos, presencia del síndrome de crías gigantes, senescencia orgánica acelerada como en el caso de la oveja clonada “Dolly” o muerte neonatal debida a fallas en la placentación derivadas de aplasia alantoidea, de metilación anormal en embriones derivados de transferencia nuclear o de una red vascular mal conformada (McCracken *et al.*, 2000; Berdugo y Bueno 2000; Martínez *et al.*, 2002; McEvoy 2003; Mucci *et al.*, 2006).

En el caso del embrión ovino, éste parece gozar de un estado de gracia con respecto a la criosensibilidad, pues aún aquellos embriones de distintos estadios de desarrollo o IVP, parecen tener mayor resistencia al daño criológico que aquellos de la especie bovina mantenidos bajo condiciones idénticas, por lo que se dice que el embrión ovino tiene mayor calidad intrínseca. Esta característica es aún más favorable para otros pequeños rumiantes como los caprinos (Polge *et al.*, 1974; Maurer 1978; Fahning y García 1992; Massip 2001; Papadopoulos *et al.*, 2002).

2.1.3. Evaluación morfológica del embrión en preimplantación. La evaluación morfológica del embrión es de suma importancia ya que constituye una herramienta irremplazable en la determinación de la vitalidad del mismo y la predicción de su capacidad de desarrollarse, implantarse y crecer (Mercader *et al.*, 2000; Khurana y Niemann 2000; Fabian *et al.*, 2005; Sjöblom *et al.*, 2006). Usualmente, la evaluación de embriones se realiza bajo un microscopio estereoscópico convencional, manteniendo los embriones con un medio de mantenimiento enriquecido que soporte su desarrollo mientras está siendo calificado y que contenga BSA (albúmina sérica bovina) o en su defecto alguna otra molécula que rompa la tensión superficial, evite que los embriones se adhieran

a los contenedores, acelere la sedimentación y proteja y estabilice las membranas pero sin limitar el movimiento de agua a través de ellas (Massip *et al.*, 1987; Saha *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1996; Celestinos y Gatica 2002; Van Soom y Boerjan 2002). Para emitir un veredicto deberá hacerse girar a la estructura de la que se trate siendo lo más apegado a los criterios de evaluación establecidos. Estos criterios suelen variar pues se someten a fuentes de error como la dependencia entre las características morfológicas, diferencias en los sistemas de clasificación, la dificultad de discernir detalles finos, variación en la percepción por parte del investigador debido a su entrenamiento y la calidad/alineación del equipo óptico, por lo que no hay que perder de vista que se trata de una calificación cualitativa subjetiva. Afortunadamente hay consenso en los lineamientos de evaluación que a continuación se enumeran (Márquez-Alvarado 2004; Sjöblom *et al.*, 2006).

Se considera de buena calidad a los embriones que contengan blastómeros de tamaño uniforme con citoplasma claro no granulado, que el espacio perivitelino sea transparente y esté ocupado en menos del 10% por detritus de fragmentos celulares, que su desarrollo sea acorde al estadio o edad en la que fue aislado, con la ZP íntegra y del grosor adecuado al estadio de desarrollo, con pocas células que muestren signos de muerte tales como picnosis o células aisladas muy grandes (Shea 1981; Van Soom y Boerjan 2002; Martínez *et al.*, 2003; Makarevich *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Al menos 6 características parecen tener fuerte correlación con el potencial de desarrollo embrionario a pesar de que no todas son apreciables bajo microscopía convencional, y estas son la apariencia del citoplasma, del pronúcleo y del nucleólo, el déficit citoplasmático, el grosor de la ZP y la velocidad mitótica (Sjöblom *et al.*, 2006). Algunos evaluadores sostienen que cualquier embrión que no tenga alguna de las características antes mencionadas es de pobre calidad (Martínez *et al.*, 2003). Otros investigadores establecen calificaciones numéricas correspondientes a varias características de los embriones. Para la calidad embrionaria general el 1 corresponde para excelente, 2 para buena o regular, 3 para pobre o degenerado. Para la apariencia de la ICM el 1 significa grande y compacta, 2 para claramente visible y 3 para no discernible. Para el estadio de desarrollo el 1=ovocito no fertilizado, 2=embrión muerto degenerado con número de células no acorde a su edad (2-12 células en el caso de embriones de ovino colectados el día 6½ desde el estro), 3=mórula inicial, 4=mórula compacta, 5=blastocisto inicial, 6=blastocisto maduro,



7=blastocisto expandido, 8=blastocisto en eclosión y 9=blastocisto desnudo y expandido (Campos-Chillón *et al.*, 2006; IETS 2009). La descripción de los estadios de desarrollo en el embrión ovino esperados a partir del día 6½ es: la mórula inicial tiene blastómeros que ocupan el 80% del espacio perivitelino, que son perfectamente visibles, esféricos y que se pueden contar, la ZP es gruesa, sin detritus, textura citoplásmica regular a ligeramente granular, sin parches oscuros ni vacuolas, espacio perivitelino ocupado por blastómeros y fragmentación en un 10-30%. Para la mórula compacta los blastómeros ocupan entre el 60-70% del espacio perivitelino, son poligonales y aunque todavía puede observarse los límites entre unos y otros, ya no es posible contarlos, también cuentan con una ZP gruesa e intacta, con citoplasma claro a ligeramente granuloso y con menos de 10% de las células en fragmentación. En el blastocisto inicial se observa una o varias lagunas de líquido entre las células que confluyan formando el blastocele, este deberá tener menos de 2/3 del volumen que ocupa la ICM (<50%) y numerosas células tanto en la ICM como en el TE; en el blastocisto maduro y el expandido el blastocele tendrá más del 2/3 del volumen de la ICM, el espacio perivitelino desaparece virtualmente y la ZP se encuentra en franco adelgazamiento; el blastocisto en eclosión se encontrará en reexpansión tras el colapso que la ruptura de la ZP originó por el cambio osmótico del interior del embrión con el medio exterior, en algunos casos podrá apreciarse a la ICM saliendo de la zona pelúcida con un pequeño estrangulamiento o en otros casos no será apreciable el blastocele dado que el fenómeno de eclosión es reciente y podría confundirse con una mórula compacta de no tener en cuenta el grosor de la ZP y por último, en el blastocisto desnudo no se encuentra rodeado de la ZP pero se reconoce el blastocele en la mayoría de los casos.

**Figura 1** Cualquier evidencia de parches necróticos, agregación de retículo endoplásmico liso, citoplasma oscuro no relacionado a depósito de lípidos, núcleos múltiples o fragmentación extensiva se considerará como signo de degeneración y mala calidad (Shea 1981; Park *et al.*,2006;Sjöblom *et al.*,2006). De entre los criterios menos selectivos, algunos eligen dar un valor numérico basado en el porcentaje de células de la ICM y el TE con apariencia normal o saludable, señalando que cuando menos debe haber un 50% de células intactas para considerar a un embrión como viable. Esta práctica es común en la reproducción asistida en humanos, en que el número de embriones es muy limitado y cada uno adopta un valor ético-emocional muy elevado (Duke *et al.*, 2004).

## 2.2 Antecedentes de la criopreservación de embriones.

La criología incluye a todos los procesos que buscan la conservación de tejidos vivos a temperaturas bajo cero, generalmente a temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) (Dobrinsky 1996; Celestinos y Gatica 2002). La efectividad de tales procedimientos es comprobable por una gran variabilidad de métodos de medición, entre las que se incluyen: tasas de fertilidad, monitoreo del desarrollo embrionario en cultivo (siendo frecuentes la medición de metabolitos producidos, la ocurrencia de reexpansión del blastocite o de eclosión del blastocisto) *in vitro* o *in vivo* en oviductos de coneja u oveja, aunque esta última ya es una práctica en desuso. (Willadsen *et al.*,1974; Massip *et al.*,1982., Fortier *et al.*,1994; Dinnyés *et al.*,1994; Semple *et al.*,1995; Saha *et al.*,1995; Chaves *et al.*,1997; Kaidi *et al.*,2000., Corselli *et al.*,2000; Dattena *et al.*,2000; Dobrinsky 2002; Cuello *et al.*,2004a; Duke *et al.*,2004; Dattena *et al.*,2004; Campos-Chillón *et al.*,2006). En la práctica cotidiana, la evaluación de la viabilidad de los embriones sólo se basa en su apariencia morfológica, sin embargo, se ha confirmado que este método tiene dificultades para determinar con precisión la viabilidad o los primeros signos de muerte, y esto constituye una de las principales causas de bajas tasas de fertilidad en los embriones transferidos (Aguilar *et al.*,2002; Márquez-Alvarado *et al.*,2004; Marquez *et al.*,2005)

2.2.1. Factores de variación de los métodos de criopreservación. Todos los métodos de criopreservación responden a requerimientos particulares, pero en general siguen un mismo patrón de congelación: exposición a sustancias crioprotectoras, empacamiento del espécimen de acuerdo a su naturaleza, disminución de la temperatura a una velocidad determinada y la exposición directa al NL, para permanecer ahí por tiempo indefinido hasta su utilización. Por ello existen puntos clave a controlar que son fuente de variación como: tipo celular a criopreservar, volumen de la muestra, crioprotector a elegir, su concentración, combinación con otras sustancias, su método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio; la velocidad de enfriamiento, necesidad de dilución del crioprotector para extraerlo de las células y velocidad de entibamiento. Todas estas variables están relacionadas de algún modo con la permeabilidad y toxicidad de los crioprotectores y la regulación del criodaño (Schneider y Mazur 1984; Rall 1987; Schiewe *et al.*,1991; Miyake *et al.*,1993; Dinnyés *et al.*,1994; Tervit *et al.*,1994; Kasai 1996; Arav *et al.*,2000; Papis *et al.*,2000; Kong *et al.*,2000; Massip 2001;Tran *et al.*,2004; Meryman 2007).

- ⇒ Tipo celular: todas las células tienen límites osmóticos particulares, disposición de lípidos y otras partículas en la membrana celular y en general pueden tener distinta superficie de contacto determinados por su tamaño y forma, esto hace que puedan ser más o menos sensibles a la ruptura membranal irreversible debida al cambio de fase ocurrido durante el enfriamiento o al hinchamiento celular por entrada de agua durante su revitalización (Holt 1997; Meryman 2007; Mazur *et al.*, 2008). Por ello, las células del embrión determinan la criosensibilidad ya discutida de acuerdo a los cambios celulares que ocurren conforme avanza su desarrollo (Balakier *et al.*, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Mazur *et al.*, 2008).
- ⇒ Crioprotectores: son sustancias que protegen la integridad de las membranas celulares durante el proceso de enfriamiento, en su presencia, las células vivas suelen deshidratarse parcialmente previniendo la formación de grandes cristales de hielo y la degeneración proteica resultante de la exposición al frío. Además, reducen el punto de congelación de los líquidos en que se encuentran al cambiar su composición electrolítica y osmótica, a la vez que aumentan la viscosidad interfiriendo con procesos de difusión, estabilidad lipídica de la membrana, permeabilidad al agua y el transporte de ATP, convirtiéndolas en sustancias tóxicas (Schiewe *et al.*, 1991; Dobrinsky 1996; Celestinos y Gatica 2002; Dattena *et al.*, 2004; Mazur *et al.*, 2008). Pueden clasificarse como intra- o extracelulares debido a su capacidad de entrar en la célula para ejercer sus funciones. Entre los crioprotectores intracelulares, permeables o de bajo peso molecular se incluyen el DMSO (dimetil sulfóxido), el EG, el PG (propilenglicol), el PEG (polietilenglicol), el 1-2 propanediol, el butanediol, el etanol, la acetamida, el glicerol y otros alcoholes (Miyake *et al.*, 1993; Dobrinsky 1996; Celestinos y Gatica 2002; Meryman 2007). Mientras tanto los crioprotectores extracelulares, impermeables o de alto peso molecular incluyen a azúcares como la rafinosa, lactosa, sacarosa, fructosa, trehalosa, sorbitol dextrano, galactosa; polímeros como el PVP (polivinilpirrolidona) y el Ficoll o compuestos antipáticos como la glicina, betaína, glutamina y prolina. Su modo de acción es extraer el agua no congelada del interior de la célula y cambiar el gradiente de concentración de sales en la solución acuosa, aumentando su viscosidad por lo que son muy útiles para preservar membranas a baja actividad de

agua (Celestinos y Gatica 2002). Para aprovechar las ventajas de ambos tipos de crioprotectores y reducir su toxicidad, muchos autores, han optado por combinarlos en la formulación de medios de congelación, descongelación y vitrificación (Kasai 1996; Kaidi *et al.*, 2000; Meryman 2007) procurando que exista la mayor cantidad posible de crioprotector unido al agua estructural y la menor cantidad del mismo libre en el citoplasma para no producir detrimento en la viabilidad ni en la protección celular (Rall 1987; Dattena *et al.*, 2004).

- ⇒ Velocidad de enfriamiento: asociada a variables como el volumen de la muestra, el contenedor a utilizar y la viscosidad de los medios de vitrificación, determina el tamaño de los cristales de hielo durante la enucleación y la re-cristalización a la revitalización (Arav *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 2008). De acuerdo a ella, existen 5 opciones posibles velocidades de enfriamiento: congelación de velocidad controlada, congelación con polímeros no penetrantes, congelación ultrarrápida, vitrificación y congelación de equilibrio (Rall 1987; Papis *et al.*, 2000; Meryman 2007). Cuando se habla de vitrificación en distintos dispositivos, estos suelen variar la velocidad de enfriamiento pues el diámetro interno aumenta la superficie de contacto del embrión con el nitrógeno líquido (NL), reduciendo el tiempo, volumen y concentración de los crioprotectores a los que es expuesto el embrión. Así, la pajilla de 0.25 cc logra una velocidad de enfriamiento de 2'500°C/min, la OPS de 200'000°C/min y el dispositivo vit master de 800'000°C/min (Cuello *et al.*, 2004a).
- ⇒ Dilución secuencial: es usada con el objetivo de exponer, cargar o remover los crioprotectores de las células sin dañar el potencial osmótico de forma irreversible a la vez que permite la salida de agua y rehidratación de las células, para mejorar las propiedades a la criopreservación. Consiste en depositar por algunos minutos los embriones en distintos pozos -3 a 6 generalmente- que contienen concentraciones escalonadamente mayores del crioprotector a partir de una solución PBS o de mantenimiento para que la sustancia ingrese controladamente a las células; en el caso opuesto, durante el retiro del crioprotector previo a la transferencia, se parte de la máxima concentración usada para reducir paulatinamente hasta llegar a la solución PBS exenta de crioprotectores. Su uso no es esencial por lo un protocolo puede prescindir de ella, sin embargo, se ha observado que la lenta dilución para

retirar glicerol atrae resultados positivos, sobre todo cuando se emplean pocos pasos de dilución, a pesar de correr el riesgo de excesivo hinchamiento o encogimiento (Maurer 1978; Schneider y Mazur 1984; Schiewe *et al.*, 1991; Khurana y Niemann 2000).

- ⇒ Tiempo de exposición a crioprotectores: en todo caso se prefieren tiempos de exposición lo más cortos posibles, sin embargo este factor es determinado por la toxicidad y permeabilidad natural de los crioprotectores solos o en combinación. De ahí que en el caso de crioprotectores altamente permeables y tóxicos como EG, los embriones sean expuestos en lapsos muy cortos (3-15 min) requiriendo de métodos de transferencia directa para posibilitar el cumplimiento de esta condición, mientras que crioprotectores estables y de baja toxicidad como el glicerol pueden necesitar lapsos largos de exposición de hasta 15 o 30 minutos sin dañar la viabilidad de los mismos (Kasai 1996; Martínez *et al.*, 2002; Dattena *et al.*, 2004).
- ⇒ Temperatura de adición o extracción de crioprotectores: se dice que al temperar los medios de crioconservación (20-24°C) la permeabilidad de los crioprotectores se agiliza. Ello ocurre tanto al momento del equilibrio acelerando la entrada del crioprotector, como a la revitalización, en que permite la rápida salida de los crioprotectores a pesar de que aumenta el riesgo de crecimiento de cristales de hielo ya presentes en el embrión cuando la solución aún permanece fría (Schneider y Mazur 1984; Kasai 1996; Campos-Chillón *et al.*, 2006; Meryman 2007).

2.2.2. Desarrollo histórico de las técnicas de criopreservación. Los orígenes de la crioconservación se remontan al interés por imitar los modelos de la naturaleza como el de anguilas árticas, nemátodos del suelo, camarones de río o ranas nórdicas, que parecían no verse alteradas ante las bajísimas temperaturas presentes en su ecosistemas, esta resistencia se asoció con su capacidad de acumular en sus tejidos y fluidos, sustancias como la trealosa, prolina y glicerol, conocidos en la actualidad como efectivos crioprotectores (Holt 1997).

Los primeros ensayos de congelación se atribuyen a Lázaro Spallanzani en 1803, profesor de historia natural en la Universidad de Pavia, Italia, quién demostró la supervivencia de espermatozoides tras su enfriamiento y entibiamiento (Holt 1997).

Ya como una aplicación práctica Polge y colegas en 1949, lograron la supervivencia de espermatozoides y células seminales tras su vitrificación y deshidratación parcial. A partir de los hallazgos ocurridos de los experimentos de congelación de semen se extendió el uso de la criopreservación a distintos tipos de células y embriones completos, tratando de descifrar cuáles crioprotectores eran los más apropiados, a qué concentraciones, durante cuánto tiempo de exposición y a qué velocidad de enfriamiento tendría que usarse para no inhibir el desarrollo posterior una vez revertido el proceso (Mazur *et al.*, 1991). A mediados de los 50's, Lovelock y Polge propusieron al glicerol como el crioprotector más noble dadas sus características coligativas como su bajo punto de congelación y su función protectora ante el "efecto solución" al reducir la concentración de electrolitos en la fracción de fluido no congelado (Fahning y García 1992; Holt 1997). También estudiaron los mecanismos por los que este crioprotector causa toxicidad, hallando que incrementa la viscosidad citoplasmática, se inserta en la membrana bi-lípida celular, interactúa con la dinámica de los microfilamentos citoplasmáticos, interviene en el balance bioenergético y desencadena la activación de proteasas y fosfolipasas que disparan procesos de MCP y daño celular en general. Aún así, hay que recordar que como ya ha sido discutido, el grado de daño citotóxico que ejerce el glicerol, y cualquier otro crioprotector, depende de la temperatura y tiempo de exposición, la velocidad de enfriamiento y hasta de la especie de origen de las células en función (Maurer 1978; Dobrinsky 1996; Schiewe *et al.*, 1991; Holt 2000; Meryman 2007; Mazur *et al.*, 2008;). Fue en 1972 cuando se reportó la primera congelación exitosa de un embrión mamífero, correspondiente al de ratón, realizado por Whittingham y colaboradores, y un año más tarde, Wilmut y Rowson obtuvieron el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado lentamente (Whittingham 1978; Kanagawa 1978; Maurer 1978; Rall 1987; Massip 2001; Celestinos y Gatica 2002). Fueron Willadsen y colaboradores, quienes en 1974 congelaron lentamente embriones ovinos de 5 a 8 días de edad usando DMSO y una curva estándar de enfriamiento (Willadsen *et al.*, 1974; Maurer 1978) y mientras trataban de desarrollar una técnica de criopreservación menos demandante, en 1977 descubrieron que el proceso podía ser interrumpido a temperaturas subcero relativamente altas (-25 a -35°C) antes de sumergir los especímenes en NL y que el rápido entibiamiento (360°C/min) lograba mejores tasas de supervivencia a la transferencia, fundando así las bases de las técnicas de

criopreservación ahora conocidas (Rall 1987; Pollard y Leibo 1994; Massip 2001; Mazur *et al.*, 2008). Para entonces se había elegido a la ampolleta de cristal como el contenedor de almacén de los embriones pero entre 1979 y 1985 fue sustituida por la pajilla plástica francesa de 0.25 cc utilizada en la inseminación artificial, permitiendo un almacenaje más práctico y la posibilidad de desarrollar el método de transferencia directa o “one step” en que el medio que contenía el embrión era separado del diluyente con sacarosa por burbujas de aire, para que al descongelarse y ser agitadas ocurriera la dilución en el interior de la pajilla (Massip *et al.*, 1979; Massip *et al.*, 1982; Schiewe *et al.*, 1991; Massip 2001; Dattena *et al.*, 2004). Estas modificaciones se consolidaron cuando en 1984 Leibo, utilizando EG como crioprotector notó la necesidad de depositar el embrión en el aparato reproductor femenino lo antes posible, y utilizando los conocimientos recién generados por Renard y colaboradores sobre el uso de sacarosa en la remoción de crioprotectores, refinó la técnica prescindiendo de la evaluación morfológica del embrión, de ahí que se le denominara como una técnica “libre de microscopio” (Renard *et al.*, 1983; Leibo 1984; Massip *et al.*, 1987; Schiewe *et al.*, 1991; Celestinos y Gatica 2002; Martínez *et al.*, 2002; Cuello *et al.*, 2004a). Este paso fue de vital importancia para aumentar la adopción de ET a nivel mundial pues, solo se requerían para realizarla 30 segundos y un baño maría simple, por lo que se reducían los costos asociados a la evaluación embrionaria y al descarte de embriones que no reúnen las características morfológicas necesarias para asegurar su transferencia y en el caso de los ovinos, se ha calculado que este método atrae un aumento del 7-8% de crías nacidas vivas, lo que implica un cambio positivo en la tasa costo/beneficio (Renard *et al.*, 1983; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1994; Dinnyés *et al.*, 1995; Nowshari y Brem 2000; Martínez *et al.*, 2002; Seidel y Walker 2006; Guignot *et al.*, 2006). Para esas fechas, también se realizaban importantes avances en la vitrificación, ya que Rall y Fahy describieron por primera vez un método estándar de vitrificación de embriones mamíferos, usando como modelo al ratón (Fahning y García 1992; Kasai 1996; Dobrinsky 1996; Massip 2001; Campos-Chillón *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Más tarde, Massip y colaboradores realizaron la vitrificación de embriones bovinos usando una mezcla de glicerol y propanediol (Van Der Zwalmen 1989; Fahning y García 1992). En 1990, se introdujo el concepto de cristalización o “seeding” necesario en la correcta congelación ya que permite la uniforme formación de cristales de hielo dentro

de la solución criopreservante y el embrión (Massip 2001). Desde el principio de estos hallazgos y en un afán de hacer una técnica cada vez más precisa, simple y mecanizada se diseñó un barril criogénico o aparato de congelación MacDonald, que utilizaba un termo criogénico en cuya angosta boca se insertaba una gradilla de acero inoxidable para 10 o 15 pajillas de 0.25 cc, en ella también iba incluido un termómetro de carátula conectado con una pajilla llena del crioprotector utilizado (sistema que en conjunto toma el nombre de termocouple) para medir la temperatura del interior del barril, para que ayudados por las ranuras de la gradilla ésta pudiera descender sobre el nivel de NL para regular la velocidad de enfriamiento hasta alcanzar los  $-32^{\circ}\text{C}$  y entonces sumergirlos en NL. Otro sistema mecanizado es el aparato de Robertson, en el que se utiliza metanol o etanol al 95% en un vaso de Dewar que sobre el nivel de NL, dentro del metanol y controlado por un termocouple como el descrito anteriormente, se expone a las pajillas de 0.5 o 0.25 cc que contienen al embrión y mediante un soporte universal, se regula el descenso de temperatura al introducir más el vaso de Dewar en el NL. Por último, el diseño de congeladoras automáticas programables, abatieron los costos a la congelación ya que tras un entrenamiento sencillo cualquier técnico con bases de embriología podría congelar uniformemente hasta 45 embriones por ronda en alrededor de 70 minutos de principio a fin, aunque el costo de la congeladora aún es alto (Maurer 1978; Massip *et al.*, 1982).

**Figura 2.** A lo largo de estos acontecimientos surgió la necesidad de desarrollar la nomenclatura para facilitar la identificación, codificación e intercambio internacional de embriones de especies domésticas y silvestres regulado por la IETS (Cuello *et al.*, 2004b; IETS 2009). En el año 1996, Gabor Vajta diseñó un implemento especial denominado OPS que simplificaba el método de vitrificación al adelgazar una pajilla plástica de 0.25cc calentándola en una platina y estirándola en su parte central, para una vez que se enfriaba fuera cortada por la parte más fina. El sistema OPS consiste en la exposición a la solución vitrificante en un solo paso por un tiempo ultracorto en un volumen muy pequeño (0.5-2  $\mu\text{l}$ ), el fundamento radica precisamente en que la pajilla OPS cuyo diámetro interno es sumamente reducido (0.7-0.8 mm) permite aspirar por capilaridad una microgota (10-15  $\mu\text{l}$ ) de la solución en la que dentro de los anteriores 45 segundos había sido depositado el embrión, y de inmediato sumergida horizontalmente en NL. Esta técnica ha revolucionado lo conocido sobre crioconservación, pues ha superado con un método simple obstáculos



como la criosensibilidad e incluso la posibilidad de conservar estructuras sometidas a procedimientos invasivos (Vajta *et al.*, 1996a; Vajta *et al.*, 1997; Booth *et al.*, 1998; Massip 2001; Celestinos y Gatica 2002; Zhang *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008). A partir de ello en 2006 se diseñó una pajilla aún más delgada denominada OPS ultrafina (ultra mini straw) o SOPS (superfine open pulled straw), y otros investigadores utilizaron implementos como: gradillas de cobre para microscopio electrónico o placas metálicas (sistema cryoleaf) enfriadas con NL, pajillas adelgazadas y enroscadas denominada crioloop, también se ideó el equipo vit master con un sistema de entrada de NL a presión negativa que reduce hasta -210°C a partir de su temperatura normal (-196°C), mallas de nylon, capilares de cristal adelgazados y abiertos, todos con mejoras modestas pero constantes al reducir más la velocidad de enfriamiento (Arav y Zeron 1997; Arav *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000; Hochi *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004b; Seidel y Walker 2006; Park *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008).

Hoy la tendencia es la modificación de embriones para hacerlos más susceptibles de ser congelados como en el caso de la centrifugación o delipidación en los embriones porcinos, electro-fusión con liposomas para estabilizar los lípidos, tratamiento con citocalacina o colchicina para estabilizar el citoesqueleto, incubación con colesterol-metil- $\beta$ -ciclodextrina para estabilizar el empaquetamiento membranal de lípidos, desnudamiento asistido con agentes químicos o con ayuda del micromanipulador o la extracción de líquido del blastocele de embriones equinos o humanos de gran diámetro (Nagashima *et al.*, 1994; Leibo *et al.*, 1995; Dobrinsky 1996; Beebe *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2000; Massip 2001; Cuello *et al.*, 2004b; Duke *et al.*, 2004; Seidel 2006; Horvarth y Seidel 2006; Balasubramanian y Rho 2006; Mucci *et al.*, 2006; Kader *et al.*, 2007a; Kader *et al.*, 2007b; Scherzer *et al.*, 2008; Mazur *et al.*, 2008). Sin embargo, estas técnicas están lejos de ser aplicadas en la práctica rutinaria, pues su ejecución implica inversión de tiempo valioso y la ruptura de la ZP limitando su comercio. Además, algunas de ellas han demostrado capacidad de desarrollo solo en condiciones *in vitro* no pudiendo derivar en partos de crías nacidas vivas (Massip 2001; Cuello *et al.*, 2004a; Makarevich *et al.*, 2005).



A



B



C

**Figura 2. Instrumentos utilizados en la congelación lenta mecanizada.**

A) Aparato MacDonald, B) Aparato de Robertson y C) Congeladora automática programable

2.2.3. Particularidades de la congelación lenta con glicerol. La CL se define como la reducción constante de la temperatura usando velocidades de enfriamiento de alrededor de 0.5°/min y crioprotectores conocidos, sea manual o automáticamente, para lograr la uniforme formación de hielo en los espacios intra- y extracelulares (Mazur *et al.*, 2008).

La CL con glicerol tiene ventajas relevantes como el aprovechamiento de la baja toxicidad de este crioprotector y la alta permeabilidad de los embriones a los glicoles, la uniformidad en los resultados obtenidos, la alta disponibilidad del equipo necesario, el gran número de embriones que pueden ser procesados por ciclo y la variedad de especies animales en las que se ha aplicado con éxito (Pollard y Leibo 1994; Seidel y Walker 2006; Mucci *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Las tasas de fertilidad registradas en ovinos con esta técnica alcanzan un constante 60% aunque el rango oscila entre 30 al 70% (Massip *et al.*, 1979; Renard *et al.*, 1983; Massip *et al.*, 1987; Sakul *et al.*, 1993; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1994; Caballero *et al.*, 1995; Dobrinsky 1996; Agca *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2002; Pryor *et al.*, 2006). Su mayor inconveniente es sin duda su alto costo, aún cuando no se invierte en una equipo de congelación programable, sumado a la imposibilidad de congelar estructuras criosensibles (Maurer 1978; Vajta *et al.*, 1996b).

La CL de embriones provoca cambios como la pérdida de células del TE y de la ICM, distorsiones morfológicas, degeneración de organelos, extrusión nuclear, alteraciones membranales, deshidratación y disrupción del citoesqueleto (Shea 1981; Lehn-Jensen y Greve 1982; Kasai 1996; Valcárcel *et al.*, 1997; Kaidi *et al.*, 2000; Cocero *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Mucci *et al.*, 2006). Muchos de ellos son controlados/ocasionados por el proceso en si; por ejemplo, aunque el “seeding” controle el tamaño de los cristales de hielo al inducirse un estado de superenfriamiento también origina daños asociados al calor latente resultante de la fricción de tales cristales durante el reordenamiento molecular y así, supone una fuerza opuesta al punto de congelación, por lo que para evitarlo se recomienda realizar la cristalización a temperaturas bajo cero en células lo suficientemente deshidratadas (Celestinos y Gatica 2002; Meryman 2007).

En el método de congelación convencional, lenta, de equilibrio o estándar, los embriones son expuestos a temperatura ambiente (20-22°C) al medio de congelación - compuesto por PBS y glicerol- en un solo paso durante un tiempo que puede ir de los 10 a

los 30 min, incluyendo el tiempo que tome envasarlos en las pajillas plásticas de manera que se separen 3 grandes columnas de solución mediante burbujas, ubicando al embrión en la columna media lo más centralmente posible (Celestinos y Gatica 2002). Esta disposición permitirá que el embrión no esté en contacto directo con las pinzas enfriadas en NL al inducir la cristalización en las columnas adyacentes. La importancia del “seeding” es que forma o “siembra” pequeños cristales de hielo alrededor de “núcleos” o sitios de enucleación constituidos por componentes celulares como puentes de hidrógeno, minerales o proteínas estructurales, que conducirán a la congelación uniforme de las columnas de líquido en dirección al embrión (Maurer 1978; Fahning y García 1992; Zeron *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Mucci *et al.*, 2006; Meryman 2007). Después de este proceso, se puede iniciar el descenso controlado de la temperatura, las moléculas que a temperatura fisiológica normal están en constante movimiento empiezan a permanecer estáticas y una vez alcanzados los  $-40^{\circ}\text{C}$ , el proceso de congelación sigue un patrón repetitivo en que las moléculas de agua forman núcleos o se agregan a ellos y los solutos empiezan a concentrarse (efecto solución), lo que lleva a un estado de deshidratación y al cambio de composición de la solución que resta por ser congelada y por ende, también cambia su comportamiento criológico. A este fenómeno se le llama “búsqueda de la temperatura o del punto eutéctico” en que la disipación de calor encuentra un nuevo punto de equilibrio para congelar los componentes más parecidos a una fase líquida y por último todos los sólidos restantes. En resumen, la estrategia empleada por este método de criopreservación es la velocidad de enfriamiento y la deshidratación causada por el efecto solución y la búsqueda del punto eutéctico, reduciendo los riesgos por cristalización, amortiguando el estrés osmótico y la toxicidad química (Massip *et al.*, 1987; Cuello *et al.*, 2004a; Campos-Chillón *et al.*, 2006).

2.2.4. Particularidades de la vitrificación en pajillas de 0.25 cc. La vitrificación es el cambio de fase de una solución viscosa a un estado de gel al aplicar bajas temperaturas, formando un objeto semi-sólido amorfo conocido como estado “vitreo” que mantiene la distribución iónica y molecular sin crear cristales de hielo (Rall 1987; Fahning y García 1992; Széll y Windsor 1994; Kassai 1996; Dobrinsky 1996; Holt 1997; Martínez *et al.*, 1998; Massip 2001; Kuleshova y Lopata 2002; Celestinos y Gatica 2002; Martínez *et al.*, 2002; Horvarth y Seidel 2006; Meryman 2007; Mazur *et al.*, 2008).

La vitrificación tiene numerosas bondades, entre ellas, la disponibilidad de un proceso simple, económico, adaptable a condiciones de campo y que no implica la adquisición de equipo especial. Además el vitrificar un lote de embriones puede tomar de 7 a 10 minutos, pudiendo aplicarse a estructuras criosensibles con las que la CL no ha tenido resultados favorables, a embriones manipulados de manera invasiva o con la ZP fracturada o a tejidos y órganos completos para su posterior transfusión o trasplante, y por último, se pueden formular medios de vitrificación sin derivados de origen animal (Miyake *et al.*, 1993; Széll y Windsor 1994; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1994; Vajta *et al.*, 1996a; Vajta *et al.*, 1996b; Saha *et al.*, 1996; Kasai 1996; Booth *et al.*, 1998; Peura *et al.*, 1999; Semple *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004a; Seidel y Walker 2006; Smith *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). La vitrificación produce tasas de fertilidad variables de acuerdo a la metodología de vitrificación. En el caso del ovino, la vitrificación OPS ha resultado en tasas de fertilidad del 20 al 70% y tasas de desarrollo en cultivo del 50 al 95% (Papadopoulos *et al.*, 2002; Dattena *et al.*, 2004; Guignot *et al.*, 2006), mientras que utilizando pajillas plásticas de 0.25 cc se pueden encontrar tasas de fertilidad entre el 13 y 70% y de desarrollo en cultivo de 57 y 100% (Schiewe *et al.*, 1991; Traldi *et al.*, 1999; Dattena *et al.*, 2000; Massip 2001; Dattena *et al.*, 2004; Guignot *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se condujeron bajo distintas condiciones, usando protocolos de vitrificación ligeramente diferentes lo que hace difícil su comparación (Rall 1987; Papis *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002).

Por otro lado, las desventajas incluyen la posibilidad de que las pajillas se quiebren, el riesgo tóxico de las altas concentraciones de crioprotectores, la precisión en el control del tiempo durante el proceso, la baja disponibilidad de medios de vitrificación comerciales y contenedores especiales cuando no se usan pajillas de 0.25 cc, la limitada cantidad de embriones que se pueden procesar por ciclo, la necesidad de mantener el termo criogénico a los niveles máximos de NL para conservar el estado vitreo de los embriones y la gran diversidad de protocolos disponibles a elegir (Van Der Zwalm *et al.*, 1989; Vajta *et al.*, 1996b; Seidel y Walker 2006; Palasz y Mapletoft 2006; Mazur *et al.*, 2008).

Los cambios celulares provocados por la vitrificación incluyen la pérdida de conexiones celulares, pérdida de microvellosidades, fractura de la membrana plasmática y de la ZP, hinchamiento del retículo endoplásmico y encogimiento celular y mitocondrial (Van Der

Zwalmen *et al.*, 1989; Holt 1997; Kaidi *et al.*, 2000; Dhali *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Mucci *et al.*, 2006). Su aparición se debe principalmente a los cambios osmóticos drásticos ocupados dentro de su proceso -durante la exposición a crioprotectores hay deshidratación y en la revitalización existe rehidratación poco controladas-, y a la formación de cristales de hielo >150 nm y hasta 0.3 micrones durante el entibiamiento, originando daños físicos y metabólicos (Kasai 1996; Valcárcel *et al.*, 1997; Cuello *et al.*, 2004a; Meryman 2007). En caso de que los daños sean muy extensos el embrión puede ser afectado de manera irreversible por las respuestas químicas y osmóticas montadas para contrarrestar esa fuente de estrés (Schneider y Mazur 1984; Kaidi *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002).

Para lograr la vitrificación exitosa en pajillas de 0.25 cc es preciso utilizar una solución vitrificante compuesta de una alta concentración de crioprotectores que eviten la formación de cristales de hielo y que a la revitalización deben ser removidos con rapidez del interior y el medio circundante al embrión ya que resultan sumamente tóxicos (Massip 2001; Cuello *et al.*, 2004b; Guignot *et al.*, 2006). Debido a ello, usualmente se recurre a una macromolécula no embriotóxica de uso extracelular conocida como sacarosa que ayuda a extraer los crioprotectores y cuyo uso en los medios de descongelación y entibiamiento es extendido pues amortigua cambios repentinos en la osmolaridad que podrían atraer daño osmótico a los embriones al regular la entrada excesiva de agua (Cuello *et al.*, 2004a; Meryman 2007). Por su parte, muchos autores han elegido al EG para la formulación de la solución vitrificante, ya que se requiere un agente permeable, capaz de ejercer más rápidamente sus efectos al difundirse entre las células más fácilmente, además provoca que los embriones se encojan menos y a la revitalización pueden recuperar su estado osmótico con mayor rapidez. Ello conlleva a que se reduzca el tiempo de exposición que a su vez disminuye sus efectos tóxicos sobre todo si es acompañado por sacarosa, PVP o Ficoll, pudiendo estos últimos sustituir además a la BSA o el suero fetal bovino (FCS), para evitar los riesgos de transmisión de infecciones a través de ellos (Rall 1987; Massip *et al.*, 1987; Seidel *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1994; Kasai 1996; Saha *et al.*, 1996; Guerin 1997; Holt 2000; Massip 2001; Celestinos y Gatica 2002; Meryman 2007). La mezcla completa de un agente permeable (EG), una macromolécula (Ficoll 70) y un disacárido (sacarosa) constituye lo que se conoce como solución vitrificante EFS de baja

toxicidad y volumen que resulta muy eficiente (Rall 1987; Kasai 1996; Guignot *et al.*, 2006). La inmersión directa en NL es un paso vital en la vitrificación pues este cambio de temperatura tan brusco (1'200°C/min) detiene de golpe el movimiento molecular, evitando el ordenamiento de las moléculas de agua de acuerdo a sus cargas, no hay un cambio de fase propiamente dicho, no hay formación de cristales de hielo por lo que no se genera calor latente (Arav *et al.*, 2000; Massip 2001; Meryman 2007). Por ello, se debe vigilar que este cambio de temperatura tan repentino no genere el quiebre de las pajillas plásticas, que no son tan flexibles como las células vivas, y esto se hace al mantener las pajillas una vez que han sido cargadas con el embrión en cercanía de vapores de nitrógeno (-150°C) (Rall 1987; Massip *et al.*, 1987; Massip 2001; Pryor *et al.*, 2006; Seidel y Walker 2006). Por último, el término "entibiamiento" como una forma de revitalización no debe usarse indiscriminadamente como sinónimo de los términos "descongelación" y/o "desvitrificación", de hecho constituye un término exclusivo de la revitalización de aquellos embriones que fueron vitrificados por cualquier método establecido. El término "descongelación" entonces se restringe a la revitalización de aquellos embriones que fueron congelados, mientras que el término "desvitrificación" describe la pérdida involuntaria del estado vítreo pasando al de la cristalización no controlada, hecho indeseable e incompatible con la viabilidad celular y/o embrionaria. Este último hecho puede ocurrir cuando la porción vitrificada deja de estar inmersa en NL, provocando fluctuaciones de temperatura que le hacen perder el estado sólido (Rall 1987). Al entibiamiento, la presencia de sacarosa cumple con funciones distintas a las cumplidas durante el equilibrio, acelera la velocidad de entrada de agua por encima de la velocidad de salida por difusión pasiva de los crioprotectores, pero sin ser lo suficientemente rápida como para hacer estallar las células o romper las membranas celulares, preparando al embrión para que al ser colocado en un medio isotónico como el medio de mantenimiento o el interior del útero, recupere su volumen normal. Cuando se utiliza el método de transferencia directa diseñado por Leibo, estas macromoléculas son absorbidas rápidamente por el endometrio uterino mientras que los crioprotectantes aún remanentes en el embrión se diluyen con las secreciones uterinas presentes en el lumen donde éste fue depositado (Rall 1987; Fahning y García 1992; Dattena *et al.*, 2004; Cuello *et al.*, 2004a; Guignot *et al.*, 2006; Campos-Chillón *et al.*, 2006).

### 2.3 El papel de la muerte celular programada en la biología del desarrollo.

En 1868 Ernest Haeckel acuñó la ley biogenética que enuncia: “La ontogenia recapitula la filogenia”. Ella significa que el desarrollo inicial de los organismos superiores del reino animal semeja etapas que podrían indicar su origen como especie, es decir la evolución de una especie a otra. Estudios comparativos al respecto muestran la construcción y desaparición de estructuras de funcionalidad transitoria que reseñan el pasado filogenético de las especies en estudio, como la formación de los dedos mediante la remoción de tejido interdigital como ocurre en aves, reptiles y mamíferos. Esta muy bien documentado que en ese fenómeno, así como en la remodelación de las branquias embrionarias, la fusión palatal, la formación de cavidades, vesículas, órganos tubulares y aparatos huecos, participa activamente la MCP (Flores-Pérez 2002; Cregan *et al.*,2004; Fabian *et al.*,2005; Fernández-Terán *et al.*,2006). Como ya se indicó anteriormente, la MCP constituye un fenómeno fisiológico de ocurrencia espontánea (Van Soom *et al.*, 2000; Strasser *et al.*, 2000), presente en animales y plantas pluricelulares para cumplir múltiples funciones que un conjunto de células adaptadas a un ambiente requieren para subsistir como una comunidad, ya que al controlar el número de células ayuda a sostener y nutrir los tejidos que serán permanentes, se promueve la angiogénesis y la vascularización de tejidos de acuerdo al tamaño de la población celular que la requiere, y asegura en momentos clave, la adecuada contribución secretoria de las células destinadas a desaparecer (Strasser *et al.*,2000; Hipfner y Cohen 2004). Otras funciones de la MCP incluyen regular el tamaño de órganos, diferenciar tejidos, eliminar células defectuosas, de pobre desarrollo, de potencial distinto a su ubicación o portadoras de mutaciones y limitar la diseminación de información oncogénica o infecciosa introducida por virus (Jurisicova *et al.*,1996; Matwee *et al.*,2000; Van Soom *et al.*,2000; Betts y King 2001; Leist y Jäätela 2001; Flores-Pérez 2002; Jurisicova *et al.*,2003; Hipfner y Cohen 2004; Guicciardi *et al.*,2004; Jurisicova y Acton 2004; Huppertz y Herrier 2005; Han *et al.*,2005; Fabian *et al.*,2005; Jurisicova *et al.*,2005; Márquez *et al.*,2005; Fernández-Terán *et al.*,2006). En condiciones anormales como el cáncer la MCP constituye la primera línea de defensa, evento que podría ser aprovechado para desarrollar terapias innovadoras en malignidades hematológicas o sólidas (Strasser *et al.*,2000; Pruschy *et al.*,2001; Flores-Pérez 2002; Hipfner y Cohen 2004; Guicciardi *et al.*,2004; Kroemer 2004; Cregan *et al.*,2004; Jäätela 2004).



En el blastocisto, la MCP tiene dos funciones fundamentales que repercuten en el desarrollo postimplantatorio: la de controlar el potencial de desarrollo rudimentariamente diferenciado entre las células de la ICM y el TE y determinar el número y proporción de células totales y de la ICM (Betts y King 2001). Sin embargo, de incrementarse la incidencia de MCP en el embrión o existir alteraciones en las moléculas reguladoras de este proceso, podría detenerse por completo su desarrollo o alterarse la diferenciación de tejidos, desarrollando organogénesis incompleta y enfermedades autoinmunes (Strasser *et al.*,2000; Fabian *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2005). El autor G.J. Kidder citado por Gandolfi (1994) y Betteridge (1995), logró con gran precisión describir la embriogénesis al escribir: “Elaborar un blastocisto es un proceso complejo y delicado basado en el desenvolvimiento de un programa genético en un ambiente favorable. El programa genético consiste básicamente en la activación coordinada de genes reguladores jerárquicamente acomodados, que en su momento activan sets de genes subordinados para determinar el destino de la célula y la diferenciación”. Ello se opone al inadecuado concepto que de la apoptosis aún se tiene, como referencia a la muerte autodirigida por un rígido y azaroso mecanismo (Fabian *et al.*, 2005). La MCP responde a factores genómicos más que ambientales -aunque el entorno es definitivo en la ejecución de un determinado tipo de muerte- pues coordina con precisión acciones e interacciones de productos génicos para suprimir o activar la autodestrucción celular (Strasser *et al.*,2000; Betts y King 2001; Jurisicova *et al.*,2003; Gjørret *et al.*,2007).

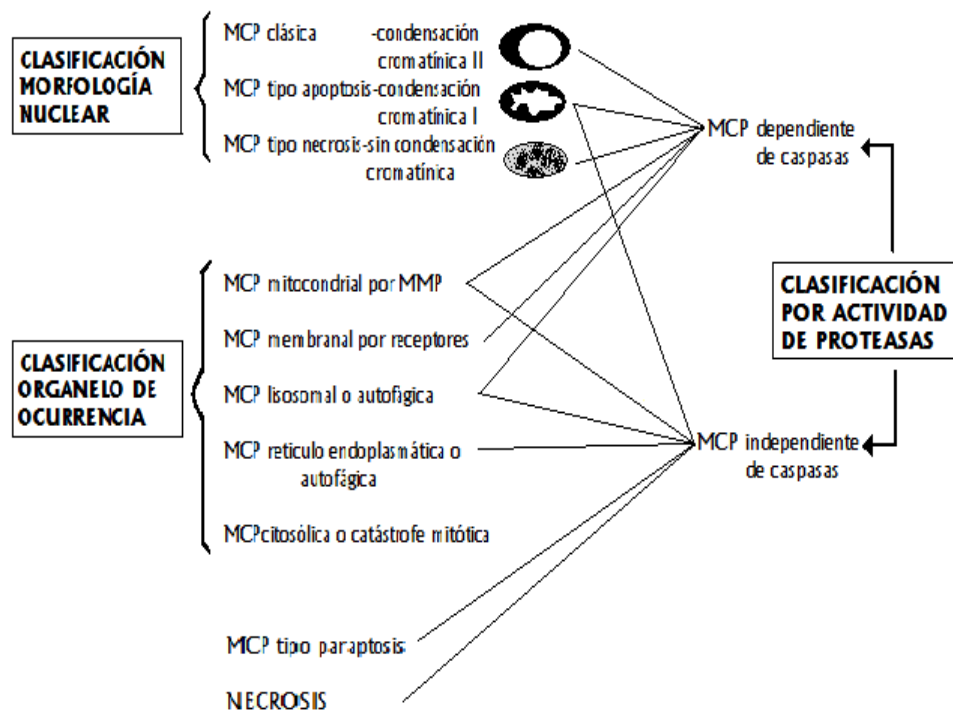
Las consecuencias resultantes de un proceso de MCP son debidas a una compleja cascada bioquímica y se pueden dividir en cambios de índole morfológico o bioquímico. Entre los morfológicos se hallan el encogimiento celular, la mayor densidad de la matriz citoplasmática, aglomeración de organelos celulares, hinchamiento del espacio intermembranal mitocondrial, aumento de presencia de vacuolas y lisosomas, cuerpos apoptóticos que engloban organelos y mitocondrias funcionales para después sufrir fagocitosis por las células vecinas sin que se asocie inflamación alguna. A su vez, en la membrana hay plegamiento en forma de ampollas (fenómeno llamado ceiosis) y pérdida de microvellosidades, mientras que en el núcleo habrá condensación, marginación (masas de cromatina condensada en torno a la membrana nuclear) y fragmentación cromatínica, y ya para las fases finales, puede observarse kariorexis (ruptura del núcleo en fragmentos

picnóticos). Por su parte, las alteraciones bioquímicas comprenden la degradación de las proteínas celulares por la presencia de caspasas activas, generación de ceramida, liberación de citocromo c y AIF (Factor Inductor de Apoptosis) desde las fases iniciales, alteraciones en el balance de iones intracelulares, la separación del ADN en fragmentos oligonucleosomales de 180-200 pares de bases en patrón denominado de escalera y exposición aleatoria de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular, debida a la suspensión del fenómeno de exposición de lípidos nombrado “flip-flop” lo que constituye el paso final de señalización para que la célula sea fagocitada (Strasser *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Leist y Jäätela 2001; Gjørret *et al.*, 2003; Márquez-Alvarado *et al.*, 2004; Jäätela 2004; Makarevich *et al.*, 2005; Fabian *et al.*, 2005; Broker *et al.*, 2005; Lamkanfi *et al.*, 2007; Kumar 2007a; Kumar 2007b; Gjørret *et al.*, 2007). Todos estos cambios morfológicos evidencian el desmantelamiento ordenado de la célula y ocurren sin una cronología específica (Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007).

2.3.1. Tipos de muerte celular programada. La ocurrencia de los cambios morfológicos y bioquímicos dependen del tipo de MCP, que responde a estímulos específicos y cuya clasificación es regulada por el comité de nomenclatura de muerte celular (Betts y King 2001). **Figura 3**

En una gran clasificación pueden dividirse como caspasa dependientes o caspasa independientes, relativa a la participación de esas proteasas digestoras de los elementos celulares dentro de la cascada proteolítica (Jäätela 2004; Kroemer 2004). La vía caspasa-dependiente constituye el mecanismo más estudiado entre los tipos de muerte, conocida como apoptosis clásica y cuyo mecanismo será descrito más adelante (Jäätela 2004). Por otro lado, la vía independiente de caspasas tiene como principal mediador químico a la endonucleasa G, que junto a otras sustancias es liberada por la mitocondria para traslocar al núcleo y que éste transcriba más proteínas pro-apoptóticas (Leist y Jäätela 2001; Martínez *et al.*, 2003; Jäätela 2004). Ambos tipos de muerte existen como un vestigio heredado filogenéticamente para dar al organismo más de una sola opción para cumplir con los cometidos de la MCP, de no ser así podría resultar riesgoso para un organismo el no poseer un familia de proteasas específica y depender de un solo comando para una función vital (Betteridge 1995; Strasser *et al.*, 2000; Pruschy *et al.*, 2001; Leist y Jäätela 2001; Flores-Pérez 2002; Jurisicova *et al.*, 2003; Jäätela 2004; Gjørret *et al.*, 2007).

Los mecanismos independientes de caspasas, por lo general se asocian con daños en la membrana mitocondrial en respuesta a numerosos estímulos apoptóticos, pero en algunos casos conllevan a tipos de muerte totalmente carentes de caspasas, como la paraptosis. Algunos de esos estímulos incluyen radiación, quimoterapéuticos, neurotoxinas y lípidos como la ceramida (Leist y Jäättela 2001; Jäättela 2004). Sin embargo, esta clasificación no es del todo útil ya que existe evidencia de que una vía de señalización que inicia como MCP independiente de caspasas puede utilizar estas proteasas al final del proceso, innovando la cascada apoptótica (Bets y King 2001; Martínez *et al.*, 2003).



**Figura 3. Clasificación de los tipos de MCP.**

Modificado del esquema presentado por Jäättela (2004) de control y consecuencias de MMP en el se muestran los 3 tipos de clasificaciones de MCP, las cuales pueden interconectarse debido a sus sistemas de redundancia, por lo que ninguna de estos agrupamientos puede considerarse como definitivo.

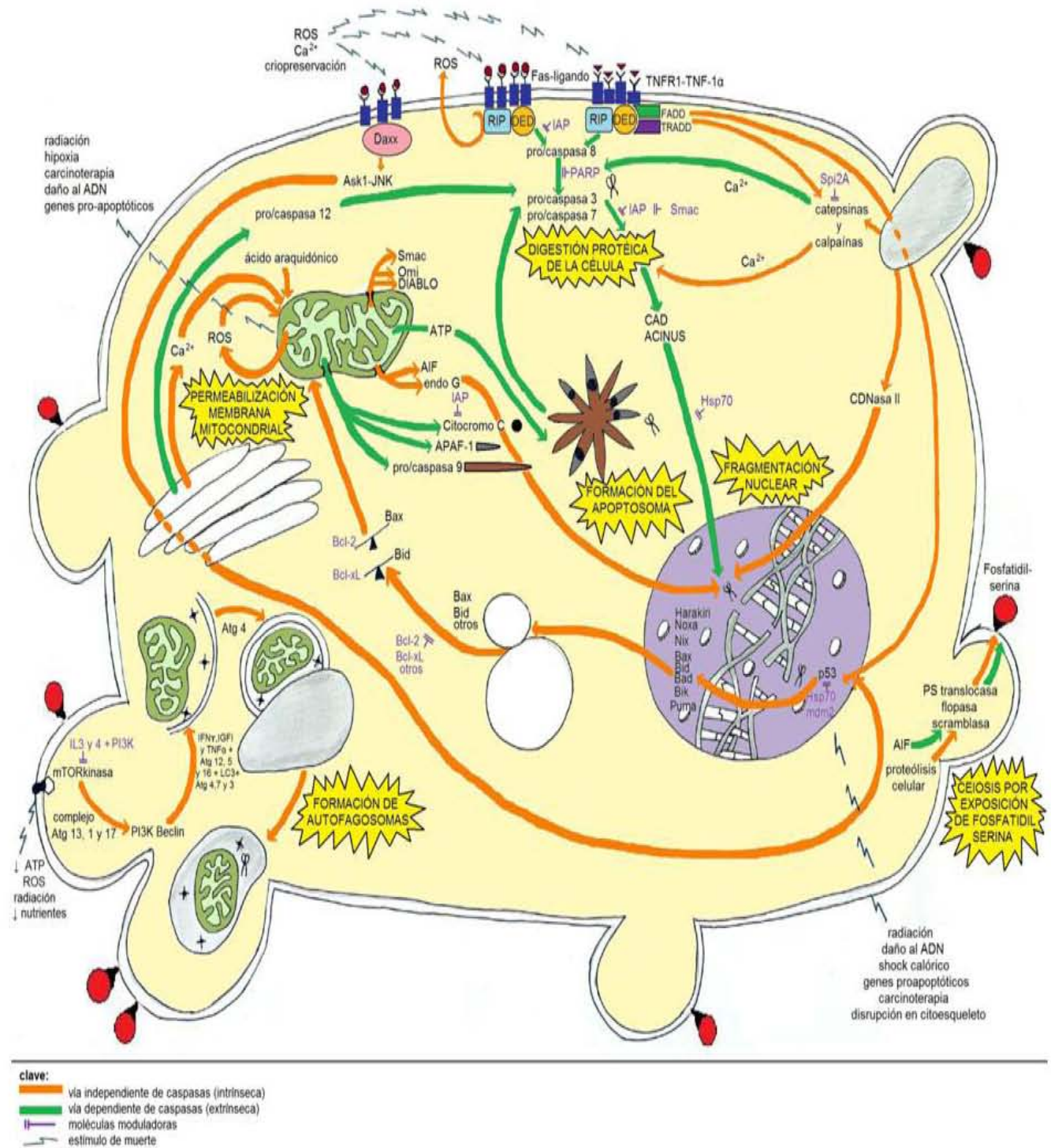
Otras clasificaciones más específicas, describen con más detalle los cambios físico-químicos de acuerdo a cada tipo de muerte. De ahí tenemos que, con respecto a su morfología nuclear se pueden agrupar en: MCP clásica cuando es observable condensación de cromatina de etapa 2 muy compacta y parecida a figuras geométricas casi perfectas; MCP tipo apoptosis cuando la condensación es de etapa 1 siendo de forma

irregular y menos compacta y MCP tipo necrosis en que no existe condensación cromatínica o ésta es muy sutil, agrupándose en pequeños puntos. Dentro de esta última categoría se encuentran la degeneración autofágica o MCP tipo II y la necrosis inducida por receptores de muerte, las cuales carecen de condensación cromatínica. Se debe tener en cuenta que cuando hay condensación cromatínica se puede tratar de mecanismos dependientes de caspasas a través del factor DFF45 o mediante endonucleasa G en la vía independiente de caspasas (Jäättelä 2004; Kroemer 2004; Lleo *et al.*, 2007). Además, estos tipos de muerte suelen acompañarse de otros cambios bioquímicos y morfológicos distintos a los nucleares, siendo para la MCP clásica la presencia de: exposición de fosfatidilserina encogimiento celular, ceiosis, cuerpos apoptóticos, caspasa-3 activa; para la MCP tipo apoptosis la presencia de moléculas de reconocimiento de fagocitosis y por último y para la MCP tipo necrosis la existencia de externalización de fosfatidilserina previa a la lisis celular, activación de caspasa-8 y -1 (Leist y Jäättelä 2001).

Un intento más por clasificar los mecanismos de muerte no menos afortunado, es el del agrupamiento con base en el compartimento u organelo de ocurrencia del proceso (sea mitocondria, lisosoma, receptores de membrana, núcleo, citoesqueleto o retículo endoplásmico) que provee mejor conocimiento del mecanismo bioquímico predominante pero que es confuso si tomamos en cuenta que la mayoría de tipos de MCP involucran más de uno de esos organelos, siendo el más constante la mitocondria. **Figura 4.** De ahí se han descrito 3 grandes grupos: los que giran alrededor de la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP por sus siglas en inglés), los mediados por la vía de receptores y los mediados por lisosomas o autofágicos. La MMP es inducida por daño mitocondrial, cambios osmóticos, proteínas de la familia Bcl-2, altas concentraciones de calcio o ROS; su mecanismo general consiste en la formación de poros membranales y la pérdida del potencial de membrana transmembranal, para así liberar citocromo c entre otras moléculas que junto con Apaf-1 y la caspasa 9 conformarán el apoptosoma, que es una maquinaria de activación de caspasas y de digestión proteolítica eficiente. Por su parte, en la vía de receptores las fuentes de estrés son interpretadas por la unión de moléculas señalizadoras con los receptores de muerte ubicados en la membrana celular, para así formar junto con proteínas adaptadoras citosólicas un complejo de señalización intracelular que inicien MMP por la transcripción de bak/bax o bien, recluten caspasas

iniciadoras, que a su vez activan a las caspasas efectoras para seguir la vía proteolítica clásica. El tipo de MCP autofágico o lisosomal ocurre en caso de un daño leve, rescata a la célula del derrame de los productos mitocondriales dañinos al citosol, de agresiones intracelulares virales o bacterianas, recicla proteínas, aísla y remueve organelos dañados, pero en caso de no poder controlar la amenaza, el proceso se amplifica y lleva a la muerte metabólica resultado de falta de ATP. Su modo de acción, conocido como autofagia, es formar autofagosomas que engloban citosol y otros componentes no vitales para la célula para luego verter su contenido en lisosomas asegurando que sufran digestión enzimática y responde a estímulos como hipoxia, deficiencias nutrimentales, exposición a radiación, anti-estrógenos y citocinas como TNF e IFN $\gamma$ . En esta clasificación todas las categorías pueden subagruparse por su dependencia de caspasas o por la morfología nuclear que presenten. Incluso, se puede encontrar al menos un tipo de muerte que combine tanto la vía efectora de las caspasas como el de la MMP en un solo mecanismo, se trata de la atípica pero no poco común catástrofe mitótica. Esta, es desencadenada por daño directo al citoesqueleto o al ADN o bien por la exposición a estabilizadores del citoesqueleto, factores que atraen disfunción en los puntos de control del ciclo celular y desembocan en la muerte de la célula cerca de la metafase si no participa p53 o, tras una mitosis incompleta si participan p53 y el punto de control de poliploidia. Sus signos morfológicos no son menos extraños: pueden presentarse husos mitóticos persistentes, vacuolas, células gigantes multinucleadas, cuerpos apoptóticos o fagocitosis (Cregan *et al.*,2004; Jäättelä 2004; Guicciardi *et al.*,2004; Kroemer 2004; Saelens *et al.*,2004; Lleo *et al.*, 2007).

2.3.2. Moléculas relevantes que componen la maquinaria apoptótica. Como ya se mencionó, determinar un tipo de apoptosis es muy subjetivo si no se cuentan con pruebas que determinen la ocurrencia bioquímica del evento apoptótico y que permitan elucidar si existe uno o más de esos tipos de MCP ocurriendo al mismo tiempo. Cada una de las moléculas por describir, participa en una cadena de eventos, involucrando sistemas de redundancia y/o de retroalimentación que dependen de la persistencia de los estímulos para ocurrir con la rapidez y eficiencia con la seguridad que el tejido necesita. No obstante, estos pueden adoptar funciones distintas como adaptadoras o conectoras durante la señalización, amplificación, reclutamiento de caspasas o ejecución de los mecanismos de muerte (Strasser *et al.*, 2000; Betts y King 2001).



**Figura 4. Vías de señalización de los distintos tipos de MCP presentes en la célula.**

Adecuado de los esquemas presentados por Jäättelä (2004) y otros autores (Betts y King 2001; Leist y Jäättelä 2001; Saelens *et al.*, 2004; Broker *et al.*, 2005; Lleo *et al.*, 2007). En el esquema se muestran las dos principales vías de señalización de MCP, conocidas como intrínseca y extrínseca. Nótese que en cualquier punto de la cascada, las mencionadas vías pueden complementarse debido a la función de los organelos como sensores de estrés. Por razones de legibilidad, solo se incluyen las moléculas y rutas más relevantes. Para detalles refiérase al texto.

Por lo general siguen un patrón similar, en el que existen fuentes de estrés en el ambiente celular que constituyen disparadores de MCP, estas pueden ser anormalidades cromosómicas, desbalance de hormonas, nutrientes y factores de crecimiento, exposición a quimioterapéuticos, ROS, citocinas, virus, radiación UV o ionizante, malas condiciones de cultivo *in vitro*, estrés calórico, altas concentraciones de calcio o proteínas proapoptóticas (Betts y King 2001; Flores-Pérez 2002; Gjørret *et al.*, 2003; Jäättela 2004; Guicciardi *et al.*, 2004; Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007). Una vez dado el estímulo, ocurre la señalización a través de receptores de membrana como Fas que se asocian a través de proteínas adaptadoras con caspasas iniciadoras ( 6, 8, 9, 10 y 1) que se activan entre sí y a otras caspasas efectoras (2, 3, 7 y 1) A esta cascada se le nombra vía extrínseca, mientras en la vía intrínseca generalmente desencadena por anormalidades en el ADN que son detectadas por el gen p53 que transcribe moléculas que al traslocar a la mitocondria liberan moléculas como AIF, citocromo C y Apaf. En este punto se reúnen las dos vías, pues se asocian con la caspasa 9 en forma del apoptosoma para activar a la caspasa 3 y así dividir la célula en cuerpos apoptóticos. (Strasser *et al.*,2000; Leist y Jäättela 2001; Kawamura *et al.*,2003; Xu *et al.*,2004; Broker *et al.*,2005; Huppertz 2005; Kawamura 2007). **Figura 4**

#### a) Disparadores o inductores

##### Familia de genes proapoptóticos

Se encuentra la familia de Bcl-2, una de las dos familias involucradas en el control de la apoptosis, representada por sus 2 moléculas de producción más notables Bax y Bak, cuya acción es abrir los poros en la membrana mitocondrial externa (MME) al interferir con el funcionamiento de los canales aniónicos dependientes de voltaje para que la mitocondria desde su espacio intermembranal libere más moléculas inductoras de muerte, todo ello sin dañar la membrana mitocondrial interna (MMI) ni su ultraestructura funcional. Estos genes transcriben proteínas que pueden ser activadas *de novo* o por cambios conformacionales. Otros miembros de esta familia son Bid, Bim/Bod, B1k, Egl-1, Bad, Bmf, Noxa, Bok/Mtd, PUMA, BNIP-3, Bcl-X<sub>S</sub>, Bik/Nbk, Hrk/DP5, MA-3 y Hspin 1. BNIP3 al integrarse a la MME provoca la pérdida de potencial transmembranario, la generación de ROS y la cascada

bioquímica para MCP tipo degeneración autofágica. Mientras Hspn1 al ser sobreexpresada e integrarse a la MME exagera la función de la proteasa lisosomal catepsina D generando autofagia sin liberación de proteínas proapoptóticas mitocondriales (Strasser *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Jäättela 2004; Saelens *et al.*, 2004). Por otro lado, el gen supresor de tumores p53 induce el arresto del ciclo celular, constituye una línea de unión entre el daño en el ADN y la respuesta mitocondrial, provocando apoptosis ante daño permanente en el ADN. Este gen da origen a una fosfoproteína de corta vida media que permanece en bajas concentraciones en el núcleo en condiciones normales, pero que al ser sobreexpresada induce la expresión de p21 para detener el ciclo celular en la fase G1 mientras funge como factor de transcripción de genes proapoptóticos como Bax (Betts y King 2001). Fuera de sus funciones en la MCP, el gen p53 participa en interacciones de la matriz celular, en la regulación de la angiogénesis y en procesos de reconocimiento específico en el sistema inmune (Pruschy *et al.*, 2001; Jäättela 2004). Se ha demostrado la presencia de este gen en embriones bovinos y de ratón, y aunque la proteína p53 se ha hallado en el citoplasma de los blastocistos bovinos, no se ha podido detectar en el núcleo de los mismos, a menos que hayan sido sometidos a estrés calórico (Matwee *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Kroemer 2004; Puzianowska-Kuznicka 2006). A su vez, la presencia de algunos de los productos de expresión de los genes primeramente descritos como Bcl-2 y Bax ha sido confirmada en embriones bovinos y humanos, Bcl-X<sub>s</sub> en embriones de ratón y humano y MA-3 en embriones de ratón (Betts y King 2001; Jurisicova *et al.*, 2003; Gjørret *et al.*, 2007).

#### Receptores membranales de muerte

Son proteínas de superficies que trimerizan para unirse a su ligando, siendo 3 los más conocidos. Dentro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) se encuentran TNFR 1 y Fas (conocido también como CD95) y también están aquellos pertenecientes a la familia de receptores TRAIL relacionados a TNFR. Se sabe que los receptores TNFR pueden conducir tanto a apoptosis clásica como a necrosis, mientras que Fas solo conlleva a MCP tipo necrosis aunque se ha sugerido que el sistema Fas-Fas ligando participa en la regulación de la apoptosis embrionaria de ratas y humanos (Strasser *et al.*, 2000; Leist y Jäättela 2001; Jäättela 2004; Park *et al.*, 2006).



## Componentes celulares o iones

Altas concentraciones de iones de calcio o de ácido araquidónico pueden inducir MMP por la vía homeostática de fosfatidil inositol trifosfato. La baja concentración de oxígeno y la producción insuficiente de ATP también conduce a MCP tipo necrosis (Jäättela 2004).

## Productos del metabolismo celular

Las ROS integran colectivamente a aquellos peróxidos y radicales de oxígeno formados intracelularmente y que en altas concentraciones suelen desencadenar procesos apoptóticos mediante la vía de receptores. El aumento en su formación se debe a la función de inhibidores de caspasas, el metabolismo lisosomal, la degradación de fosfolipasa A2 y la degradación de catalasa -secuestrador intracelular de radicales libres- durante la autofagia (Jäättela 2004; Lleo *et al.*, 2007). Su presencia *per se* no es tóxica, pero en presencia de iones metálicos causa peroxidación lipídica y pérdida de la integridad de las membranas celulares y puede causar ruptura en las bandas de ADN al formarse radicales hidroxilo que son potentes oxidantes del ADN (Betts y King 2001; Boe-Hansen *et al.*, 2005; Lleo *et al.*, 2007) Se espera que, en el embrión en preimplantación, las reacciones metabólicas empiecen a incrementarse al momento de la EGA en el que se ha comprobado que inicia el metabolismo de la glucosa. A partir de ese momento el metabolismo oxidativo es la principal fuente de energía de la que depende el embrión al menos hasta la etapa de blastocisto expandido, en que también ocurre glicólisis (Betteridge 1995; Donnay *et al.*, 2000; Feugang *et al.*, 2001). También se ha comprobado la inducción de MCP por daño al ADN y el retardo en el desarrollo de embriones bovinos cultivados *in vitro* debido al estrés oxidativo originado por las altas concentraciones de oxígeno, por sobrepoblación de embriones o por falta de recambio del medio de cultivo (Takahashi *et al.*, 2000b; Betts y King 2001; Leist y Jäättela 2001).

## b) Señalizadores liberados por la mitocondria

### Citocromo c

Es una proteína hidrosoluble evolutivamente conservada y componente esencial de la cadena respiratoria realizada en la mitocondria, activa las caspasas al formar junto con

Apaf-1 y caspasa 9 el apoptosoma que es un complejo multiprotéico que cataliza la autoactivación de caspasas dependientes de ATP al provocar proximidad, pero también tiene un componente catalítico controlado por las IAP (Strasser *et al.*, 2000; Leist y Jäättelä 2001; Saelens *et al.*, 2004; Bröker *et al.*, 2005).

#### Endonucleasa G (EndoG)

Se trata de una proteasa evolutivamente conservada que puede ocasionar la fragmentación del ADN sin presencia de caspasas en núcleos aislados, aunque bajo condiciones fisiológicas normales, se cree que coopera con exonucleasas y ADNasa I activadas por caspasas para producir los fragmentos internucleosomales característicos de algunos tipos de MCP (Saelens *et al.*, 2004; Jäättelä 2004; Bröker *et al.*, 2005).

#### AIF

Es una flavoproteína asociada a oxidoreductasa que es liberada desde el espacio intermembranario mitocondrial durante la MCP tipo apoptosis y otros tipos de muerte independientes- y dependientes de caspasas, aunque normalmente lleva a cabo funciones de óxido-reducción. Al ser liberada al citosol y translocar al núcleo con EndoG, se asocia con cambios nucleares como condensación y marginación cromatínica. Además cuenta con un papel preponderante al fungir como conector de las diferentes vías apoptóticas cuando estas toman un mecanismo alternativo, pues tiene una amplia capacidad de respuesta río arriba y río abajo. También funciona como un quelante de radicales libres por lo que impide tipos de muerte inducidos por estrés oxidativo (Strasser *et al.*, 2000; Leist y Jäättelä 2001; Jäättelä 2004; Saelens *et al.*, 2004; Cregan *et al.*, 2004; Bröker *et al.*, 2005).

#### Smac/DIABLO

Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with LOw PI o segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína de unión directa a IAP con bajo fosfatidil inositol) quelan a las IAPs y promueven la activación de caspasa 9 al desplazarla de su unión con XIAP (Saelens *et al.*, 2004).

#### HtrA2/OMI

Es una proteasa de serina que compite con las caspasas 3, 7 y 9 al separarlas de sus respectivas IAP, XIAP, cIAP1 y 2 promoviendo la proteólisis (Saelens *et al.*, 2004).

### c) Efectoras proteolíticas

#### Caspasas

Se trata de una familia de proteasas de residuos de cisteína citoplasmática ubicadas en distintos organelos celulares, se han identificado al menos 14 isoenzimas involucradas tanto en la señalización como en la ejecución de la MCP y se pueden clasificar como caspasas inflamatorias y proapoptóticas, pudiendo estas últimas sub-agruparse en iniciadoras (caspasas 6, 8, 9, 10 y 12) y efectoras (-1, 2, 3 y 7) (Strasser *et al.*,2000; Leist y Jäättela 2001; Pruschy *et al.*,2001; Betts y King 2001; Martínez *et al.*,2003; Park *et al.*,2006) Estos compuestos son sintetizados en forma de zimógenos con baja capacidad enzimática intrínseca y que son activadas por la pérdida de residuos específicos de aspartato inducida por otras proteasas ya activas. Sus moléculas blanco incluyen a una amplia variedad de proteínas vitales para la célula como PARP, MDM2 (inhibidor de p53), lamina, gelsolin, ácido aspártico, histonas H1, enzimas proteincinasas ADN-dependientes, proteínas anti-apoptóticas enzimas reparadoras de ADN, entre otras, pero en general son capaces de desensamblar todos los componentes celulares sin destruir a las mitocondrias productoras del ATP, ya que es necesario para continuar el proceso. También participan en la activación del DFF45 que fragmenta el ADN y condensa la cromatina (Strasser *et al.*,2000; Flores-Pérez 2002; Martínez *et al.*,2003; Jäättela 2004; Gjørret *et al.*, 2007) e incluso cuentan con funciones no relacionadas a MCP como la transformación celular de la espermiógenesis y la regulación de patrones estructurales en blastómeros embrionarios (Strasser *et al.*,2000; Martínez *et al.*,2003; Kroemer 2004). Las caspasas son moduladas por las IAP y de forma indirecta por proteínas y genes anti- y pro-apoptóticos (Leist y Jäättela 2001; Jurisicova *et al.*, 2003; Park *et al.*,2006). La presencia de casi todas las caspasas ha sido detectada en todos los estadios embrionarios de todas las especies como productos inactivos, pero la ubicación de proteasas funcionales dependerá de los mecanismos de MCP presentes. Se ha asociado con procesos de MCP a la presencia de caspasas activas -3, -6, -7 -8 y -10 en el embrión humano y en el bovino, a caspasas 3, -6 y -7 en el estadio de 16 células (Jurisicova *et al.*,2003; Gjørret *et al.*,2007).

## Calpaínas

Son proteasas de cisteína que se encuentran en el citosol de forma inactiva, que son activadas por altas concentraciones de iones de calcio y son reguladas por calpastatinas -inhibidor natural de proteasas- y cuya función surge ante estímulos como la presencia de ionóforos, radiación o neurotoxinas que eleven los niveles de calcio sin que intervengan las caspasas (Leist y Jäättela 2001; Jäättela 2004).

## Catepsinas

Son proteasas lisosomales que translocan al citosol, espacio extracelular y al núcleo ante una gran diversidad de formas de estrés celular, teniendo capacidad de cambiar de sustrato, especificidad y localización. En el humano se conocen 11 tipos: B,H,L,S,F,K,C,W,X,V y O, de entre las cuales, los tipos más frecuentes son digestoras de cisteína, como las catepsinas B y L, mientras que la catepsina D es digestora de ácido aspártico; las más estables a pH fisiológico son las catepsinas B y D, por lo que tienen mayor actividad en la MCP tipo apoptosis, -tipo necrosis y autofágica. Su activación ocurre dentro del lisosoma, por lo que al escapar de él no necesitan ningún otro cambio conformacional para degradar sus sustratos. En particular, la catepsina B es responsable de la translocación de fosfatidil-serina, la catepsina D desencadena la activación de Bax y en general, todas pudieran activar a las caspasas y promover disfunción mitocondrial. Todas las catepsinas son reguladas por cistatinas y también poseen funciones ajenas a la MCP mayormente relacionadas con síntesis proteica, remodelación ósea y acción inmune (Leist y Jäättela 2001; Jäättela 2004; Guicciardi *et al.*, 2004; Bröker *et al.*, 2005).

## ADNasas mitocondriales

Son enzimas citosólicas que participan en la degradación nuclear del ADN de procesos dependientes e independientes de caspasas. Incluyen múltiples nucleasas, helicasas y oxidoreductasas asociándose a modo de heterodímero para contribuir a la condensación y fragmentación cromatínica, está formado por CAD (o DFF40), ACINUS y HELICARD que actúan ayudados por endonulceasa G y AIF (Saelens *et al.*, 2004).

#### d) Moléculas Interruptoras con acción anti-apoptótica

##### Bcl-2

Proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Boo/Diva y Bcl-X<sub>L</sub> que se oponen a la MMP al heterodimerizar con las proteínas proapoptóticas de su misma familia, evitando que se formen heterodímeros Bax-Bak. Se encuentran localizadas en membranas intracelulares como la envoltura nuclear, la membrana mitocondrial externa y el retículo endoplásmico para iniciar y regular la MCP mediante la activación o inactivación de enzimas específicas de muerte. La expresión de Bcl-2 se ha registrado en embriones humanos en etapas de división muy tempranas y blastocistos (Strasser *et al.*,2000; Betts y King 2001; Jäättela 2004; Guicciardi *et al.*,2004; Bröker *et al.*,2005).

##### IAP

Son proteínas que contienen un dominio BIR que actúa como inhibidor intracelular pancaspasa, entre sus miembros se encuentran IAP, cIAP 1 y 2, XIAP y NAIP y son contrarrestadas por las partículas mitocondriales OMI/HtrA2 y Smac/DIABLO. Una de las IAP que recientemente ha sobresalido es la survivina, proteína bifuncional que regula el ciclo celular mientras suprime apoptosis al inhibir directamente algunas caspasas efectoras (-3 y -7 en específico) activadas por la vía de receptores Fas. En los embriones de humanos, bovinos y ratones se ha podido aislar (Betts y King 2001; Leist y Jäättela 2001; Kawamura *et al.*, 2003; Saelens *et al.*, 2004; Bröker *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006).

##### Hsp70

Las proteínas de shock calórico (Hsp) como la Hsp70 son inducidas por el factor de shock calórico (Hsf-1) bajo condiciones fisiológicas normales y bajo estrés celular. Participan en la modulación de la actividad protéica, de su correcto plegamiento, transporte y degradación, y recientemente se les han atribuido funciones antiapoptóticas previniendo tipos de MCP caspasa-dependientes e -independientes. Se ha comprobado que los blastocistos bovinos son capaces de sobrerregular el gen hsp70 en respuesta a estrés calórico, en condiciones de cultivo con alta tensión de oxígeno y tras la vitrificación, por lo que se le considera un eficiente indicador de estrés celular y pobre calidad del blastocisto (Matwee *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Park *et al.*, 2006; Gjørret *et al.*,2007).

## **2.4 Evidencia de muerte celular programada en embriones en la etapa previa a la implantación.**

Se ha reportado la ocurrencia de MCP durante la embriogénesis de una gran cantidad de especies animales, entre las más estudiadas se encuentran ratón, humano, bovino, rana, cerdo, pez cebra, larvas de *C. elegans* y *Drosophilla spp.* (Van Soom *et al.*,2000; Donnay *et al.*,2000; Strasser *et al.*,2000; Betts y King 2001; Feugang *et al.*,2001; Fabian *et al.*,2005; Fernández-Terán *et al.*,2006). Por lo general, se presenta en aquellos embriones que ya han sufrido la EGA, no obstante es posible inducirla antes de ese momento mediante sustancias específicas como la estaurosporina o la diamina, denotando que desde el inicio del desarrollo estos organismos cuentan con los elementos necesarios para realizarla (Betts y King 2001; Gjørret *et al.*,2007). La EGA es especie dependiente, de modo que en el ratón este fenómeno ocurre durante el estadio de 2 células, mientras que en la vaca y la oveja ocurre cuando el embrión tiene 8-16 células y en humanos y cerdos ocurre entre los estadios de 4 y 8 células. Se ha hipotetizado que la fragmentación de ADN coincidente con el momento de EGA surge como la necesidad de remover células incapaces de activar su propio genoma (Crosby *et al.*,1988; Betts y King 2001; Gjørret *et al.*,2003; Fabian *et al.*,2005; Gjørret *et al.*,2007). Sin embargo, se ha probado que aunque en el embrión IVP bovino la principal actividad en la transcripción de ARN ocurre en el estadio de 8 células, algunas actividades transcripcionales pueden darse desde que tiene 2 células (Betteridge 1995). Eso explica que embriones IVD de ratón o cerdo no exhiban células TUNEL-positivas hasta la etapa de blastocisto aunque ya pudieran observarse signos de muerte desde estadios de 8-16 células (Fabian *et al.*, 2005). Aunado a ello, la funcionalidad de las caspasas es precozmente activada, desde la fertilización y en cercana coincidencia de la EGA (Exley *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2003) e incluso se ha hipotetizado que la desaparición del primer cuerpo polar en ovocitos de humanos y ratones, constituye también una evidencia de MCP precoz, cuyo mecanismo parece ser no dependiente de caspasas (Martínez *et al.*, 2003; Fujino *et al.*, 2007).

Se sabe que la incidencia de apoptosis en el embrión bovino, humano y de ratón está correlacionada con el número de células totales y con la calidad embrionaria, siendo que en blastocistos con pocas células, la incidencia es de 0-30%, mientras que en aquellos que cuentan con un gran número de células se registran valores menores al 10% y tienen

mayor probabilidad de implantarse y dar lugar a una cría viva (Betts y King 2001; Makarevich *et al.*, 2005). También debe contemplarse que el registro de la incidencia de células apoptóticas, tanto en momento como en proporción, suele variar de acuerdo con la prueba de diagnóstico del mismo que utilizó el investigador. Otra variable importante a tomar en cuenta es el origen del embrión, muy independientemente de la especie de la que fue aislado y que junto con las estirpes raciales han demostrado causar cambios en la frecuencia de MCP, es vital saber si el embrión fue recolectado de una hembra donadora o bien, fue originado bajo condiciones de cultivo *in vitro* pues generalmente, los embriones desarrollados en el laboratorio presentan mayores incidencias que aquellos IVD y esto permite la fluctuación de tasas de incidencia de apoptosis (Betts y King 2001; Márquez *et al.*, 2005). Existen luego fuentes de variabilidad en los resultados cuando se evalúan los procesos apoptóticos a través de tasas de incidencia, pudiendo enumerar el momento de evaluación (llámese edad del embrión), el método de detección o diagnóstico de MCP, el criterio de evaluación de células apoptóticas y el ambiente de origen en que el embrión fue primeramente aislado para su análisis (Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007).

2.4.1. Métodos de diagnóstico de muerte celular programada. El diagnóstico de MCP y sus tipos necesita de herramientas sumamente precisas que detecten sus señales bioquímicas y morfológicas. Aunque se cuenta con la fotografía electrónica como la prueba con mayor sensibilidad ante el diagnóstico de algún tipo de MCP, no se puede recurrir a ella sin tener alguna idea de la incidencia localizada en el embrión, evidencia del tipo de muerte o de algunos marcadores químicos que dirijan la búsqueda de signos dentro de un organismo complejo. Tampoco si se buscan los signos iniciales de la MCP ya que los cambios morfológicos y la fragmentación de ADN son signos tardíos de algunos tipos de muerte. Cada tipo de MCP tiene características cardinales, algunas morfológicas, de las cuales echar mano para diagnosticarla. Brevemente son en el caso de: apoptosis clásica la participación de caspasas, la condensación de cromatina en figuras geométricas y la fragmentación de ADN en dígitos de 180-200 pares de bases; MCP tipo apoptosis por la participación de calpaínas, endonucleasa G y factor inhibidor de apoptosis; MCP tipo necrosis por la cromatina no condensada y la lisis celular; autofagia por la alta presencia de vacuolas y la catástrofe mitótica por la disrupción del citoesqueleto.

Para diagnosticar los tipos de muerte se dispone de una gran variedad de pruebas de laboratorio que evalúan su incidencia y distribución en las células que conforman al embrión. Estos incluyen el análisis estructural por microscopía electrónica, tinciones convencionales como Hematoxilina-Eosina o fluorescentes (Hoeschst 33258, DAPI, Ioduro de propidio, Anexina V-FITC, rodamina, entre otras) que denoten integridad o permitan hacer conteos, electroforesis de ADN fragmentado pudiendo ser de una sola hebra o de ambas (Cometa alcalina y neutra), prueba MTT por lector de ELISA o la medición del potencial de membrana mitocondrial. Algunas de estas pruebas pueden combinarse con citometría de flujo en suspensiones de células, con la ubicación de moléculas componentes de la cascada apoptótica mediante inmunohistoquímica o western blot o con la prueba *in situ* TUNEL en tejidos complejos (Valcárcel *et al.*,1997; Graham 1999; Takahashi *et al.*,2000a; Strasser *et al.*,2000; Betts y King 2001; Florez-Pérez 2002; Boe-Hansen *et al.*,2005). Las técnicas más empleadas, por separado o combinadas, son el análisis ultraestructural por microscopía electrónica y la prueba TUNEL. Su uso es amplio debido a que ambas cuentan con alta sensibilidad y al combinarse son cualitativas y cuantitativas (Fabian *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Cabe decir que al utilizar uno o más de estos métodos puede determinarse con cierta seguridad qué factor causó la MCP (Gjørret *et al.*,2003; Fabian *et al.*,2005; Gjørret *et al.*,2007). No obstante, la gran limitante de todas estas pruebas es que son invasivas y requieren la muerte de los embriones por la fijación en paraformaldehído para ser realizadas (Marquez *et al.*, 2005).

La prueba TUNEL (que toma el nombre de las siglas: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) puede detectar *in situ* la fragmentación nuclear del ADN resultante de procesos de MCP, factor que constituye el punto cardinal de su clasificación. La prueba detecta núcleos apoptóticos a través de enzimas marcadas con fluoresceína que se unen a los radicales libres generados por la fragmentación de ADN característica (Betts y King 2001; Gjørret *et al.*,2003; Fernández-Terán *et al.*, 2006; Gjørret *et al.*,2007). Cuando se combina con la tinción Hoechst 33258 o DAPI que marcan el ADN inespecíficamente se puede calcular el índice de ocurrencia de MCP (Van Soom *et al.*, 2000; Van Soom y Boerjan 2002; Flores-Pérez 2002). Sin embargo, la prueba TUNEL cuenta con una especificidad cuestionable porque puede marcar células necróticas o células que no muestran cambios nucleares asociados a



apoptosis (entre un 12 y 15%), incluso puede dejar de marcar células que exhiben cambios asociados a algún tipo de MCP. Además, los cuerpos apoptóticos al ser marcados como ADN fragmentado pueden contarse como núcleos positivos y aumentar la tasa de incidencia, sin contar que la apreciación de fluorescencia y en general la microscópica, suele tener un componente de subjetividad, agravado sobre todo cuando el técnico es inexperto o no se cuentan con programas de apreciación automatizados (Betts y King 2001; Gjørret *et al.*, 2003; Fabian *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Gjørret *et al.*, 2007).

2.4.2. Tasas de incidencia espontánea de MCP en especies domésticas. Los próximos valores de aparición de la MCP deben contemplarse bajo el supuesto de que contienen factores de variación en su análisis, sobre todo en el método de diagnóstico utilizado y el modelo de origen de los embriones. Las proporciones de incidencia comúnmente conocidas para el blastocisto IVP e IVD de ratón, el blastocisto humano y para los blastocistos bovinos IVP son del 70-80% de embriones con signos morfológicos de apoptosis. En el embrión porcino se reporta una tasa de 56-71% cuando son IVD y hasta un 90% cuando son IVP (Van Soom *et al.*, 2000; Gjørret *et al.*, 2003; Fabian *et al.*, 2005; Gjørret *et al.*, 2007). Por su parte se sabe que para el día 7 el blastocisto de los primates ya ha eliminado aproximadamente el 20% de sus células mediante apoptosis (Jurisicova *et al.*, 2003). En cambio, utilizando la prueba TUNEL en embriones IVP bovinos, se pueden notar cambios en la incidencia de acuerdo al estadio de desarrollo: siendo en la mórula compacta de 6 días de edad de  $5.1 \pm 1.1$  células apoptóticas en el 66% de los embriones analizados, para blastocisto inicial de 7 días  $6.6 \pm 0.9$  células apoptóticas en el 94% de los mismos y para los blastocistos maduros a expandidos (8 o más días) de entre 2.8 o 6.7 a 16.5 células apoptóticas en el 100% de ellos. La mayoría de las observaciones en especies domésticas y de laboratorio confirman que el nivel máximo de apoptosis espontánea ocurre en el estadio de blastocisto (Van Soom *et al.*, 2000; Donnay *et al.*, 2000; Matwee *et al.*, 2000; Feugang *et al.*, 2001; Gjørret *et al.*, 2003; Fabian *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Se ha observado que las células TUNEL positivas pueden encontrarse en los embriones no importando si su calidad morfológica ha sido catalogada como excelente, buena, regular o pobre (Marquez *et al.*, 2005).

También suele haber diferencias en la cantidad y distribución de las células dentro del embrión, encontrándose en la ICM con mayor frecuencia cuando se trata de blastocistos bovinos de buena calidad o igualmente diseminadas en la ICM o el TE cuando se habla de embriones de calidad pobre o regular. Y aunque no se ha establecido una clara correlación entre elevados índices de MCP con calidad morfológica en declive, se sabe que los embriones son mosaicos compuestos de células normales y anormales con distintos potencial de desarrollo, exposición a fuentes de estrés y susceptibilidad de sufrir apoptosis (Van Soom *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Gjørret *et al.*, 2007). Usando la técnica TUNEL se han contabilizado de 6.2 a 7.8 células en los embriones bovinos frescos de buena calidad, mientras que en embriones de regular y de pobre apariencia la cifra aumenta (de 14.8 a 15.8 y de 21.8 a 16.8 células respectivamente) mientras que bajo microscopía electrónica hay un mayor número de células mostrando los signos clásicos de apoptosis en embriones de baja calidad, comparado al registrado en embriones de mejor calidad (Marquez *et al.*,2005; Gjørret *et al.*,2007). Cuando se intenta distinguir el diferencial de incidencia de apoptosis entre la ICM y el TE del blastocisto, también pueden hallarse diferencias importantes, por ejemplo se ha reportado una distribución e incidencia específicas de especie en estas regiones, siendo en el humano y el porcino similar entre las células del TE y de la ICM, mientras que en rumiantes y roedores, la incidencia espontánea es mayor en la ICM (Betts y King 2001; Fabian *et al.*,2005). El registro en el embrión IVD de ratón muestra una incidencia de 1-3% en el TE y 10-20% en la ICM y en el blastocisto bovino IVD ocurrieron porcentajes de 2.4-3.6% y 6.1-11.2% respectivamente, en tanto que en el embrión humano IVP ocurre en 7-8% en ambas regiones (Jurisicova *et al.*,2003; Gjørret *et al.*,2003; Fabian *et al.*,2005; Gjørret *et al.*,2007). Esto podría estar relacionado con el hecho de que las células apoptóticas de la ICM pueden ser fagocitadas por los blastómeros vecinos mientras que las células que sufren MCP en el TE tienden a ser extruídas al espacio perivitelino o al blastocele en espera de sufrir necrosis secundaria, además que el TE constituye solo una monocapa de células y por ende su cantidad es menor a la ICM comparativamente (Cocero *et al.*,2000; Betts y King 2001; Men *et al.*,2003; Jurisicova y Acton 2004; Hipfner y Cohen 2004; Márquez-Alvarado *et al.*,2004; Makarevich *et al.*,2005; Fabian *et al.*,2005; Jurisicova *et al.*,2005; Park *et al.*,2006).

En todo caso estos hallazgos apuntan a que tanto en la ICM como en el TE imperan distintas condiciones ambientales (Betts y King 2001; Balakier *et al.*, 2001; Fabian *et al.*, 2005). Apoyando esta teoría, se ha documentado que la apoptosis aumenta en estas regiones del embrión cuando ocurre la presencia y fagocitosis de células con potencial trofoectodérmico dentro de la ICM, dicha condición señalan, aumenta en embriones IVP que se exponen a condiciones subóptimas para su desarrollo y que al persistir en arresto mitótico pueden rastrearse en la placenta, lo que una vez fue el TE (Van Soom *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001). Otra condición de interés zootécnico que se ha encontrado como determinante en la cantidad de células apoptóticas, es la producción de embriones durante diferente estación climática, hallando una mayor incidencia en temporada de secas comparada con la de lluvias (Marquez *et al.*, 2005).

Dados todos estos factores de variación, se ha determinado que la mejor manera para hacer comparable los resultados es recurrir a las células TUNEL positivas y al total de núcleos teñidos inespecíficamente para calcular el DCI (por sus siglas en inglés *death cell index*) también conocido como índice apoptótico. Así se contemplan porcentajes de muerte para blastocistos de distintas especies: del 1.4-10.2% de apoptosis en el ratón (IVP e IVD); 0-7.3% en el porcino sea IVP o IVD, y cuando son IVP la apoptosis ocurre en 7-11% en el humano y 4-9% en el bovino (Van Soom *et al.*, 2000; Fabian *et al.*, 2005).

2.4.3. Tasas de incidencia de MCP inducida por criopreservación. La MCP puede ser desencadenada en respuesta a condiciones inadecuadas para el desarrollo de un embrión -como cuando es cultivado *in vitro*- o en el caso de fuentes de estrés severo como es la criopreservación o la micromanipulación de embriones (Maurer 1978; Schneider y Mazur 1984; Mazur *et al.*, 1991; Széll y Windsor 1994; Kasai 1996; Khurana y Niemann 2000; Roca *et al.*, 2000; Van Soom *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000a; Takahashi *et al.*, 2000b; Betts y King 2001; Gjørret *et al.*, 2003; Vallejo *et al.*, 2003 Jäätela 2004; Fabian *et al.*, 2005; Makarevich *et al.*, 2005; Boe-Hansen *et al.*, 2005; Mazur y Koshimoto 2005; Park *et al.*, 2006; Horvarth y Seidel 2006; Gjørret *et al.*, 2007; Meryman 2007). Por ello es importante considerar aquella incidencia de MCP resultante de la aplicación de tratamientos que constituyen fuentes de estrés. Cuando se estudian los estímulos que disparan estos tipos de muerte, se pueden encontrar similitudes con lo que sucede durante los procedimientos de criopreservación o durante su reversión.

Por ejemplo, se ha encontrado que la ruptura de las proteínas que forman el citoesqueleto constituye el estímulo necesario para la catástrofe mitótica, la MCP tipo necrosis y si es muy severa, a la necrosis, fenómeno que también se ha confirmado durante una congelación lenta convencional y en la descongelación. También se ha hallado que la reducción del volumen celular, como el resultante del encogimiento de las células en deshidratación durante la vitrificación puede ser interpretado por el genoma como un signo inicial de apoptosis y entonces, desencadenar la vía clásica de MCP o derivar en autofagia o que, tras un hinchamiento de organelos como la mitocondria y el retículo endoplásmico como el que podría ocurrir a la revitalización sobreviene la paraptosis (Bröker *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Hay evidencia en diferentes publicaciones de microfotografías de embriones criopreservados que muestran evidencias de autofagia por una alta vacuolización del citoplasma o de catástrofe mitótica por la incapacidad de formar el huso mitótico (Van Soom *et al.*, 2000; Men *et al.*, 2003; Márquez-Alvarado *et al.*, 2004; Makarevich *et al.*, 2005; Marquez *et al.*, 2005, Gjørret *et al.*, 2007). Agrupando estas evidencias, pero guardando en la mente que la congelación lenta y la vitrificación conllevan cambios físicos y químicos diferentes en el embrión -mayormente debido a que los procedimientos son radicalmente distintos-, se podría esperar que la proporción de apoptosis después de la reversión de los procesos sean igualmente distintas, o al menos que se desencadenen diferentes tipos de MCP en distintos grados, para así justificar esa diferencia en la viabilidad de los embriones tras su criopreservación. Por ejemplo, cuando los embriones son vitrificados por el método convencional y de enfriamiento de volumen mínimo con soluciones EFS, aumenta el índice apoptótico en 11.9 y 11% respectivamente, comparados con el control no criopreservado (Gjørret *et al.*, 2003; Makarevich *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Por su parte, en embriones bovinos congelados lentamente con glicerol se han registrado cuentas de núcleos TUNEL positivos de 15.3 a 19.7 cuando los embriones son de excelente calidad y de 17.5 a 21.2 cuando son de buena calidad, sin embargo se han registrado cuentas tan altas como 22-26 núcleos marcados con reacción TUNEL, siendo importante el tiempo de permanencia en NL. En tanto, en el embrión de ratón que ha sido congelado y descongelado se ha reportado un incremento en la fragmentación de DNA indicada por núcleos TUNEL-positivos (Marquez-Alvarado *et al.*, 2004; Márquez *et al.*, 2005).

### III OBJETIVOS

#### Objetivo general

Comparar el DCI (índice de muerte celular) producido en los embriones ovinos después de ser vitrificados o congelados lentamente.

#### Objetivos específicos

Comprobar si el DCI inducido por la criopreservación es mayor en los embriones congelados lentamente en comparación a los vitrificados.

Confirmar la presencia de apoptosis clásica, como uno de los principales tipos de muerte celular programada en los embriones ovinos en preimplantación.

Determinar los tipos de muerte celular programada presentes tanto en embriones vitrificados como en los congelados lentamente.

### IV HIPÓTESIS

El proceso de vitrificación provocará menor proporción de muerte celular programada en los embriones ovinos, que el proceso de congelación lenta de los mismos.

## V MATERIAL Y MÉTODOS

La fase experimental del presente trabajo se realizó en dos partes: la obtención de la muestra y el procesamiento de la misma. La obtención de la muestra, compuesta por embriones ovinos derivados *in vivo*, se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) de la FMVZ de la UNAM, utilizando durante la época reproductiva 49 donadoras de razas Suffolk y Dorset. Cabe mencionar que durante esta fase e inmediatamente a su obtención, los embriones fueron sometidos a uno de dos tratamientos de criopreservación embrionaria o manipulados para incluirlos en el grupo de control. Durante la segunda parte, se procesaron los embriones obtenidos y sometidos a los tratamientos que incluyó el diseño experimental, en el laboratorio de biología de la reproducción Facultad de Química, UNAM.

El diseño experimental contempló que las ovejas donadoras fueran sometidas a un programa de producción de embriones *in vivo*, para que en las próximas 4 a 5 h de la recolección (Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004a; Cuello *et al.*, 2004b) y evaluación morfológica los embriones resultantes fueran asignados a uno de tres grupos: vitrificación, congelación lenta o de embriones frescos. Puesto que la donadora ha demostrado ser una variable que influye en el desarrollo de los embriones (Cuello *et al.*, 2004a; Fabian *et al.*, 2005), se designó el mismo número embriones de cada donadora para cada uno de los tratamientos propuestos, procurando cumplir las condiciones de un diseño en bloques al azar. Posteriormente a recibir el tratamiento, cada bloque de tres tratamientos fue procesado en el laboratorio mediante las técnicas de TUNEL e inmunohistoquímica (IHQ) para caspasa 3 activa que determinan la presencia de muerte celular programada clásica o apoptosis, de acuerdo a las siguientes condiciones:

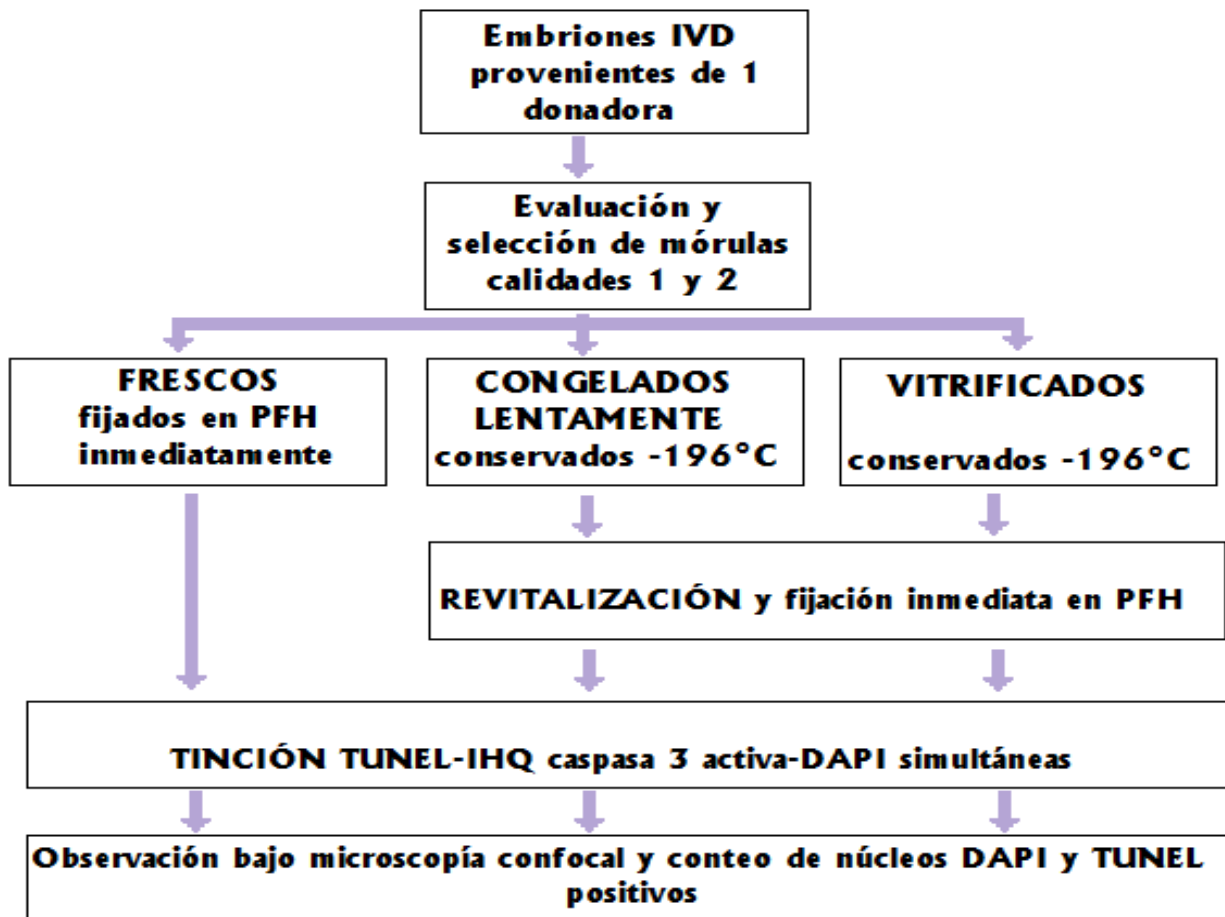


Figura 5. Esquema del diseño experimental utilizado.

## TRATAMIENTO HORMONAL

Con el fin de recolectar el mayor número posible de embriones de la misma edad o estadio de desarrollo fue imprescindible sincronizar su ciclo estral y manipularlo para obtener la ovulación múltiple mediante tratamientos hormonales conocidos (Rowson y Moor 1966; Rhodes y Nathawielsz 1988; Dattena *et al.*, 2004).

Para la sincronización de las donadoras se utilizaron dispositivos vaginales conocidos como CIDR por 12 días (de las siglas en inglés Control Internal Drug Release) impregnados con 300 mg de progesterona\*; mientras que para la superovulación se administraron 200 mg de Hormona Folículo Estimulante (FSH) de origen porcino\*\*, dividida en dosis decrecientes aplicadas dos veces al día, durante 4 días.

\* Eazi-breed CIDR G. Dispositivo vaginal con progesterona al 9% (0.3 g) InterAg N.Z.

\*\* Folltropin .V. Extracto de FSH purificado de pituitarias porcinas (400 mg). Bioniche. Ontario Canada

Las dosis comenzaron a aplicarse vía intramuscular de acuerdo al siguiente esquema: dos días antes de retirar el CIDR una dosis de 40 mg por la mañana y otra de 30 mg por la tarde, un día previo al retiro se aplicaron dos dosis de 30 mg, el día del retiro en la mañana se administró 30 mg y por la tarde 20 mg y un día después del retiro dos dosis de 10 mg por la mañana y tarde respectivamente, siempre que no se encontraran ya en celo, en cuyo caso el programa se daba por completado. Utilizando un macho celador con mandil, se detectaron calores tres veces al día iniciando a las 24 horas de retirado el CIDR y a toda aquella oveja que presentó estro conductual (día 0 del ciclo estral) se les dió monta natural dirigida con un semental de su raza cada 8 horas mientras permanecieron receptivas.

### RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

La recolección se realizó el día 7 posterior a la aparición del estro por laparotomía media ventral que es utilizado por Baril y col. (1995) con modificaciones (Kraemer 1989; Thibier y Nibart 1992). Para tal efecto, se sometió a las donadoras a anestesia general disociativa bajo 36 h de restricción de alimentos sólidos y 12 h de privación de agua para evitar el riesgo de regurgitación y broncoaspiración. La tranquilización se llevó a cabo mediante la administración intramuscular de 0.45 mg de xilazina al 2%/kg de peso vivo y como anestésico se aplicó ketamina (2 mg/kg de peso vivo) por vía endovenosa 10 minutos después de la inyección de xilazina. Una vez que surtió efecto la anestesia, el animal fue sujeto a una camilla de recolección en posición decúbito dorsal, se le cubrieron los ojos y los oídos, y se rasuró, lavó y desinfectó la región abdominal para posteriormente realizar una incisión de aproximadamente 4 cm de largo y 3 cm anterior a la ubre sobre línea media. Se palpó la respuesta superovulatoria en los ovarios y se exteriorizó el aparato reproductivo, manteniéndolo humectado con solución salina tibia para evitar adherencias futuras. Posteriormente, en cada cuerno uterino se insertó una sonda Foley (calibre 10Fr) en la luz de la base del cuerno mediante una punción realizada con un catéter intravenoso (14G x 5½) para infundir y recuperar mediante ella el medio de lavado\*. Posteriormente, a través de otro catéter intravenoso (18Gx 5¼) insertado en la punta del lumen del cuerno uterino, se administraron 40 ml del medio de lavado y con ayuda de la gravead y un masaje gentil, se recuperó el líquido que fluía de la sonda a un filtro concentrador.\*\*

---

\* Vigro complete flush solution. AB Technology. U.S.A.

\*\* Em Con filter. Embryo concentrator gamma irradiated. ImmunoSystems Inc. WI. USA



Una vez terminado el procedimiento en cada cuerno , se colocó un punto de sutura absorbible de 4 ceros en cada una de las incisiones del útero, se regresó el aparato reproductivo a la cavidad abdominal y se suturó la incisión abdominal. Al mismo tiempo y lo antes posible después de su colección, el líquido contenido en el filtro concentrador fue vertido en una caja de búsqueda, se esperaron un par de minutos para dejar sedimentar los embriones y se observó cuidadosamente bajo el microscopio estereoscópico a baja resolución 2x. Los embriones hallados fueron separados, lavados y conservados en PBS enriquecido de mantenimiento\* durante su evaluación morfológica y se seleccionaron para ser asignados aleatoriamente a un grupo solo las mórulas y blastocistos iniciales de calidades 1 y 2 (excelente o buena calidad y regulares) de acuerdo con Shea (1981).

### CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES

CONGELACIÓN LENTA. Se utilizó el método general desarrollado por Willadsen y colaboradores (1974) con ligeras modificaciones de acuerdo a otros autores (Maurer 1878; Massip *et al.*, 1982; Massip *et al.*, 1987; Lehn Jensen y Greeve 1982; Martínez *et al.*, 2002). Los embriones procedentes de una misma donadora, en grupos de 1 a 3, se expusieron en un solo paso al medio de congelación (PBS con 10 % de glicerol más sacarosa y BSA) a temperatura ambiente (20-22°C) por 10 minutos, incluyendo el tiempo que tomó identificar y envasar todos los embriones en una pajilla plástica irradiada de 0.25 ml. La forma en que se envasó la pajilla fue utilizando dos columnas de medio holding que rodeaban una columna más pequeña de medio de congelación de un solo paso que contenía al embrión y que estaban separadas mediante pequeñas burbujas de aire. Posteriormente se colocaron en una congeladora de embriones programable\*\*, siguiendo el programa 1 de congelación que consiste en una exposición inicial de -6°C que permaneció así durante 2 minutos para equilibrar la temperatura de la pajilla y la de la congeladora. Transcurrido este tiempo se indujo la cristalización al poner en contacto la superficie de la columna próxima superior al embrión empajillado con una pinza de acero enfriado con nitrógeno líquido. Entonces se dejó correr el programa, manteniendo 10 minutos más la temperatura estable a -6°C y posteriormente se disminuyó la temperatura paulatinamente a una velocidad de

---

\* Em care holding medium. Agtech Inc., KS., USA.

\*\* Freeze control CL-5500. Cryologic. Vic., Australia

0.5°C hasta llegar a -32°C en aproximadamente 53 minutos. Una vez alcanzada esta temperatura, las pajillas se retiraron del equipo de congelación y se sumergieron en nitrógeno líquido debidamente empacadas y etiquetadas en un termo criogénico.

VITRIFICACIÓN. Se utilizó el método de vitrificación descrito por Rall y Fahy en 1985 y modificado recientemente por Pryor y colaboradores (Pryor *et al.*,2006; Seidel *et al.*,2006). Los embriones provenientes de la misma donadora se colocaron en grupos de 1 a 3 y fueron vitrificados utilizando un kit de vitrificación comercial\* siguiendo las instrucciones del fabricante. De acuerdo a estas, los embriones se equilibraron por 5 minutos en una microgota del primer medio de vitrificación o medio de equilibrio (V1=holding + 5M etilenglicol=10.8 ml de medio base plus 4.2 ml de etilenglicol) a temperatura de laboratorio (25°C); mientras pasaba este lapso una pajilla irradiada de 0.25 ml fue cargada con una columna del diluyente (diluyente= galactosa 1 M ) incluido en el kit y el tapón plástico que sellaría la pajilla fue identificado. Durante el segundo paso, los embriones se colocaron en una gota de 20 µl de medio vitrificante V2 (V2=holding + 7M etilenglicol + 0.5 M galactosa + 18% (w/v) de Ficoll 70= 19.5 ml de etilenglicol, 9 g de Ficoll 70 y 4.5 g de galactosa aforado a 50 ml de medio base), inmediatamente después se envasaron por succión en la misma pajilla plástica antes utilizada separando mediante una burbuja de aire de otra columna de diluyente y sellada en un período no mayor de 45-60 segundos. Finalmente la pajilla fue expuesta verticalmente a vapores de nitrógeno dentro de un goblet inmerso en vapores de nitrógeno por al menos 1 minuto y después sumergida directamente en nitrógeno líquido.

Una vez obtenidos todos los embriones que compusieron la muestra se mantuvieron al menos un mes en un termo criogénico con NL a -196°C y se procesó el material experimental para lo que fue necesario revitalizar los embriones que fueron congelados lentamente o vitrificados por un método correspondiente de acuerdo a las bases establecidas por Renard y colaboradores (1983) y Nowshari y Brem (2000).

#### DESCONGELACIÓN O REVITALIZACION DE EMBRIONES

En el caso de embriones congelados lentamente, la descongelación se llevó a cabo sacando las pajillas del NL, exponiéndolas 10 segundos al aire y sumergiéndolas en baño

---

\* Bovine vitrification kit. Syngro. Bioniche. WA. U.S.A.

María a 30-35°C durante 20 a 30 segundos. Los embriones fueron descargados a un placa de petri para su recuperación, fueron colocados en el medio de descongelación comercial de tres pasos \* (concentraciones decrecientes de crioprotectores: paso 1: 6% v/v glicerol, 10.3% w/v sacarosa; paso 2: 3% v/v glicerol, 10.3 % w/v sacarosa y paso 3: 10.3% W/v sacarosa) pasando 7 minutos en cada paso, para después lavarlos en PBS-BSA y evaluarlos morfológicamente (grado de desarrollo y calidad). Posteriormente, fueron fijados a la brevedad por 30 minutos en PFA al 4% en PBS (pH 7.4) y suspendidos en viales de 100 µl de PBS-BSA y mantenidos a 4°C hasta su análisis de laboratorio.

Para los embriones vitrificados, el proceso de calentamiento directo, entibiamiento o revitalización, como también se le conoce, se realizó de acuerdo al método de dilución en pajilla descrito por Leibo (1984) tomando en cuenta las variaciones realizadas por Kuwayama y colaboradores (1994). Constó en extraer las pajillas del nitrógeno líquido, mantenerlas durante 10 segundos a temperatura ambiente, sumergir la pajilla en un baño María a 30-35°C durante 20 a 30 segundos, secarla y agitarla de manera similar que a la de un termómetro de mercurio para mezclar las columnas de diluyente con el embrión. Después de retirar el tapón plástico, se descargó la pajilla en una placa de petri para recuperar los embriones en cuestión, y dejando actuar un par de minutos la sacarosa contenida en el diluyente en los embriones e inmediatamente fijarlos en PFA al 4% en PBS (pH 7.4) por 30 minutos para su posterior análisis con TUNEL o inmunohistoquímica.

#### TÉCNICA DE TINCIÓN FLUORESCENTE SIMULTANEA TUNEL-INMUNOHISTOQUÍMICA DIRIGIDA A CASPASA 3 ACTIVA DESPUÉS DE LA FIJACIÓN.

Para realizar la técnica de TUNEL que determine el grado de fragmentación del ADN por apoptosis, se utilizó un kit de diagnóstico comercial\*\* siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que se utilizó una tinción inmunohistoquímica para localizar en el mismo espécimen la presencia del zimógeno caspasa 3 activa y así confirmar o desechar la incidencia de apoptosis clásica en los embriones en preimplantación. Se utilizó el protocolo utilizado por Fabian y colaboradores (2005) con ligeras modificaciones realizadas por la Dra. Adriana Mendoza, y en el cual, se utilizan embriones suspendidos en solución PBS-BSA posterior a su fijación con paraformaldehído al 4% (15-20 µl por pozo). En cada

---

\* Em care CSU thawing kit. Agtech, KS, USA.

\*\* In situ cell death detection kit fluorescein. Roche Alemania

corrida de embriones experimentales procesados, se requirió además de dos controles de la tinción, el positivo y el negativo integrados por 2 o 3 embriones que no componían la muestra. Llegado el momento del análisis, los embriones fijados que hasta ese momento fueron mantenidos en refrigeración y suspendidos en PBS-BSA, se extraen para ser lavados 3 veces con PBS-BSA al 0.3 % de Triton X-100\*, acto seguido fueron permeabilizados en gotas de 20µl de PBS-BSA al 1% de Triton X-100 por 2 h a temperatura de laboratorio (25°C) en atmósfera humedecida, y al terminar este paso, fueron lavados 3 veces en PBS-BSA. Entonces el control positivo de la tinción fue incubado por 30 minutos a 37°C\*\* en atmósfera humedecida con DNasa I\*\*\* utilizando una concentración de 100 UI/ml, para después lavarlos nuevamente con PBS-BSA en 3 ocasiones. Posteriormente, tanto los especímenes de muestra de los 3 grupos en cuestión (llámense grupos 1 o congelación lenta, 2 o vitrificación y 3 o frescos), como el control positivo de la tinción, fueron incubados con la solución TUNEL (compuesta de una mezcla de 10 µl de Terminal desoxinucleotidil transferasa en 90 µl de fluoresceína conjugada a dUTP suspendida en un amortiguador) por 1 h a 37°C en atmósfera humedecida y protegidos de la luz; mientras que el control negativo fue incubado solo con el amortiguador con nucleótidos parte del kit TUNEL bajo las mismas condiciones. Todos fueron lavados 3 veces en PBS-BSA y posteriormente bloqueados en gotas de 20µl de PBS-BSA al 5% de suero normal caprino\*\*\*\* y 0.1% de Triton X-100 por 30 minutos a temperatura ambiente, atmósfera humedecida y protegidos de la luz. Entonces, los especímenes de la muestra y el control positivo se incubaron con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-cabra anti-caspasa 3 activa\*\*\*\*\* en dilución 1:25, en ambiente húmedo, protegidos de la luz a 4°C por una noche; mientras que el control negativo fue incubado en 20 µl de PBS-BSA al 1% de Triton X-100 bajo las mismas condiciones ambientales. Fueron nuevamente lavados 3 veces en PBS- BSA e incubados con anticuerpos secundarios anti-conejo marcados con rodamina\*\*\*\*\* en dilución 1:100 por 2 h a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad y ambiente humedecido.

---

\* Triton X-100, Sigma- Aldrich, St Louis MO, USA.

\*\* Cámara de incubación Envitron shaker, Lab Line, USA

\*\*\* Desoxiribonucleasa I; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

\*\*\*\* Normal Goat Serum, Santa Cruz, CA,USA

\*\*\*\*\* Active Caspase-3 Polyclonal Antibody, BioVision, CA, USA.

\*\*\*\*\* Rhodamine Conjugated Affinity Purified Secondary Antibody, Chemicon-Millipore, Millipore corp., USA

Fueron lavados 3 veces en Tritón al 0.3% en PBS-BSA y expuestos por 10 minutos a la tinción DAPI\* y por última vez lavados 3 veces en PBS-BSA para su montaje y observación. Para ello se utilizó una laminilla a la que se le agregó una gota de 14 µl de un medio de montaje\*\* especial para retrasar el palidecimiento de la fluorescencia para ser examinados bajo microscopía confocal invertido Olympus FV1000 de láser diodo con filtro 473 nm de excitación para FIT-C, filtro 559 para rodamina y 405 para DAPI. Para obtener el índice de incidencia de apoptosis clásica en los embriones teñidos, se observaron y contaron por método doble ciego los núcleos positivos a TUNEL (de color verde amarillento fluorescente) los núcleos marcados con DAPI (azul) y se observó y registró la presencia de un puntillero rojizo que denotara la marca de caspasa 3 activa en el mismo embrión.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La tasa de incidencia de apoptosis conocida como índice de muerte celular (DCI) corresponde a la fórmula descrita por varios autores (Van Soom *et al.*, 2000; Fabian *et al.*, 2005; Makarevich *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006):

$$\frac{\text{(Número de núcleos TUNELpositivos/ Total de núcleos en el embrión)}}{100}$$

100

Esta tasa fue comparada entre todos los grupos (congelados lentamente, vitrificados o fijados en fresco). Al tratarse de una población de datos que no se distribuye normalmente pero que tiene homogeneidad de varianzas según Bartlett, estos fueron sometidos a un análisis de varianza usando la prueba no paramétrica de comparación múltiple de medias de Kruskal-Wallis. Dado que en la literatura se reporta que la donadora es una variable importante que impacta en la supervivencia, se bloqueó por esta característica y se sometió a un procedimiento GLM para determinar que tanto de la variabilidad se le puede atribuir a la donadora, usando una prueba ANCOVA por Tukey. El nivel de significancia fue fijado en  $P < 0.05$ .

---

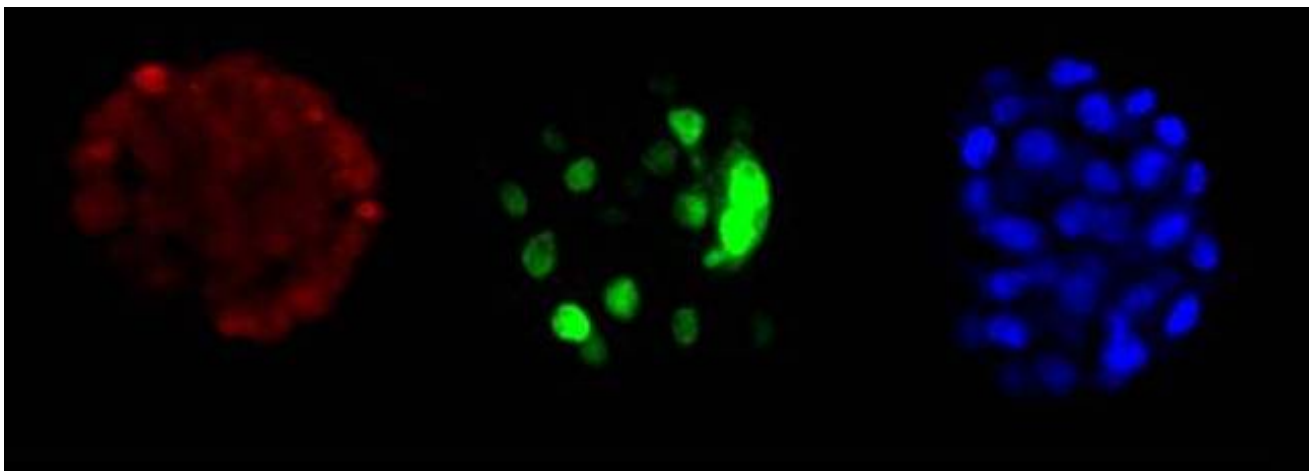
\* DAPI, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA.

\*\* Fluorescence Mounting Medium, DAKO, CA, USA.

## VI RESULTADOS

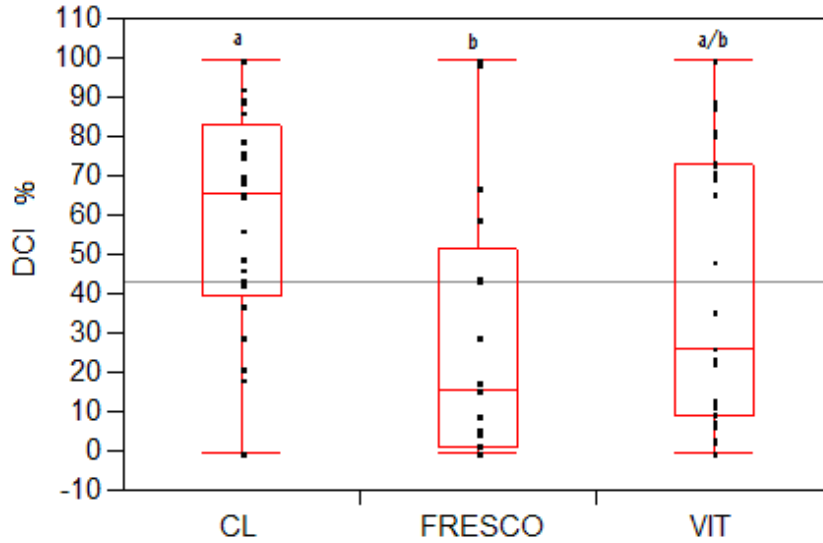
### 6.1 Cambios entre los índices de muerte celular programada presentes en embriones criopreservados e intactos.

Los estudios de colocalización utilizando distintos fluoróforos que ayudaran a calcular la incidencia de apoptosis en los embriones ovinos, frescos o criopreservados por dos métodos distintos revelaron una diferencia significativa en el índice de muerte celular (DCI) entre embriones frescos y congelados lentamente, más no así para los embriones que fueron vitrificados, cuya tendencia numérica fue intermedia entre los grupos antes mencionados. ( $P>0.05$ ) **Figura 6** El DCI calculado para cada uno de los grupos fue de  $58.79\pm 29.37\%$  para el grupo de congelación lenta, de  $34.15\pm 34.15\%$  para el de vitrificación y sólo del  $29.46\pm 36.45\%$  para los embriones frescos ( $P>0.05$ ) **Figuras 7-9**. Se halló que el 86.66% de los embriones presentaron al menos una célula TUNEL positiva, cuyo rango de presentación fue de 0 a 89 células TUNEL positivas por embrión (media= $25.26\pm 22.66$ ), mientras que el embrión registró  $59.18\pm 23.86$  células totales en promedio, cifra acorde al estadio de mórula compacta. ( $P>0.05$ ) Esto indica una gran variabilidad en el número de núcleos totales y TUNEL positivos por embrión.



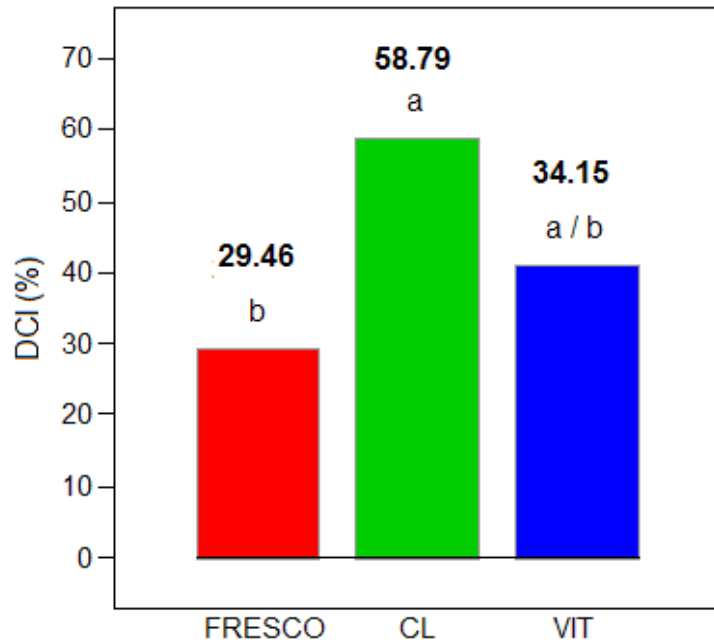
**Figura 6. Apariencia de los fluoróforos en el embrión ovino en preimplantación.**

De izquierda a derecha: caspasa 3 activa marcada con rodamina TRITC en rojo, núcleos TUNEL positivos marcados con FIT-C en verde y núcleos totales teñidos con DAPI en azul. NOTA: no se muestra la tinción del mismo espécimen



**Figura 7. Distribución del índice de muerte celular (DCI) en la población de embriones de acuerdo al tratamiento de criopreservación.**

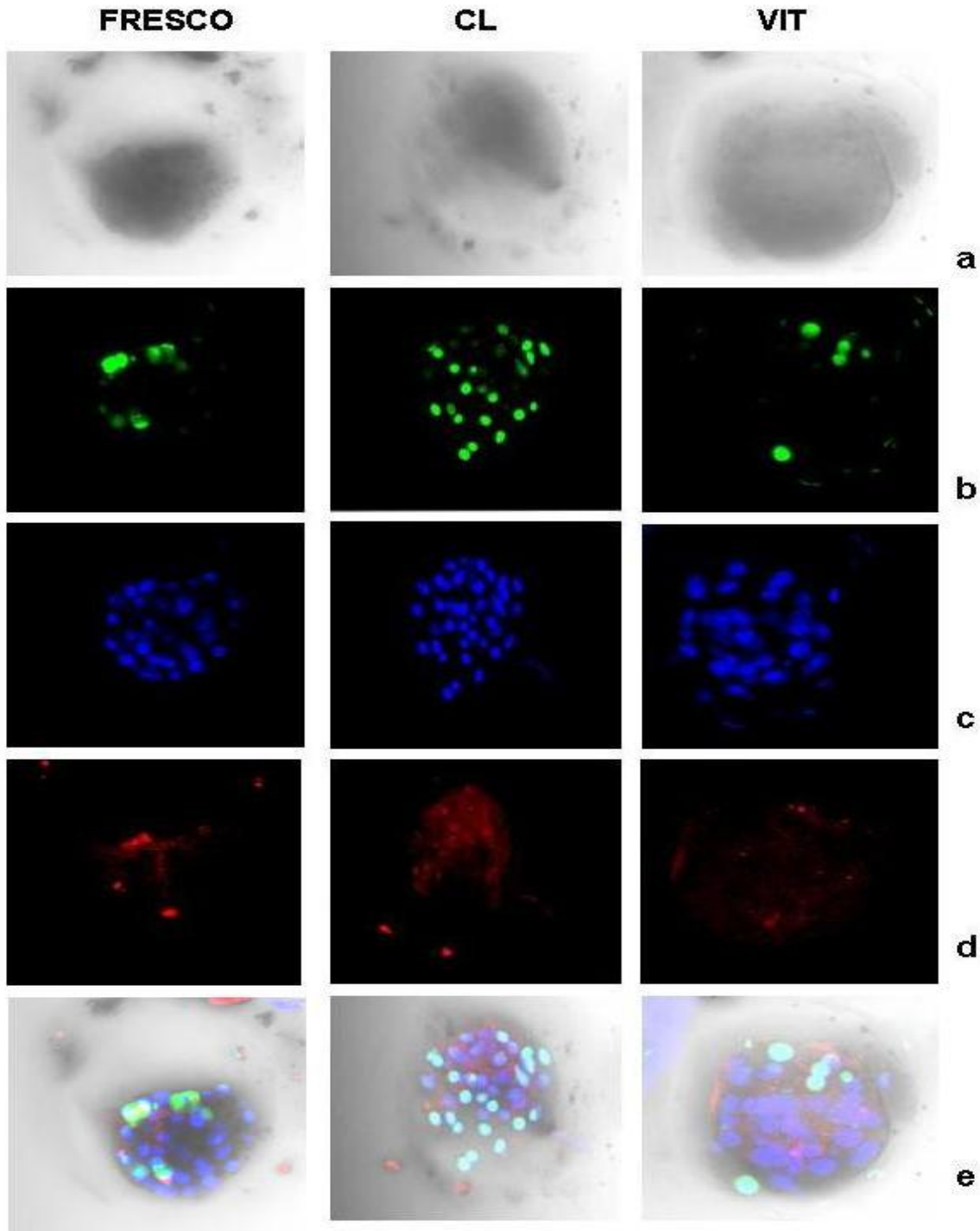
CL=congelación lenta con glicerol, VIT=vitrificación en pajillas de 0.25 cc y FRESCO=embriones no criopreservados



**Figura 8. Índice de muerte celular (DCI) de acuerdo al tratamiento de criopreservación.**

CL=congelación lenta con glicerol, VIT=vitrificación en pajillas de 0.25 cc y FRESCO=embriones no criopreservados

En ambas gráficas, se aprecia la similitud de la respuesta entre los grupos CL y VIT, mientras que el grupo FRESCO permanece a la baja de los anteriores siendo el único que muestra diferencia significativo comparado con el grupo CL. ( $P > 0.05$ ). Las literales distintas muestran diferencias significativas.



**Figura 9. Distribución y frecuencia del DCI en embriones ovinos de 6 días de edad.**

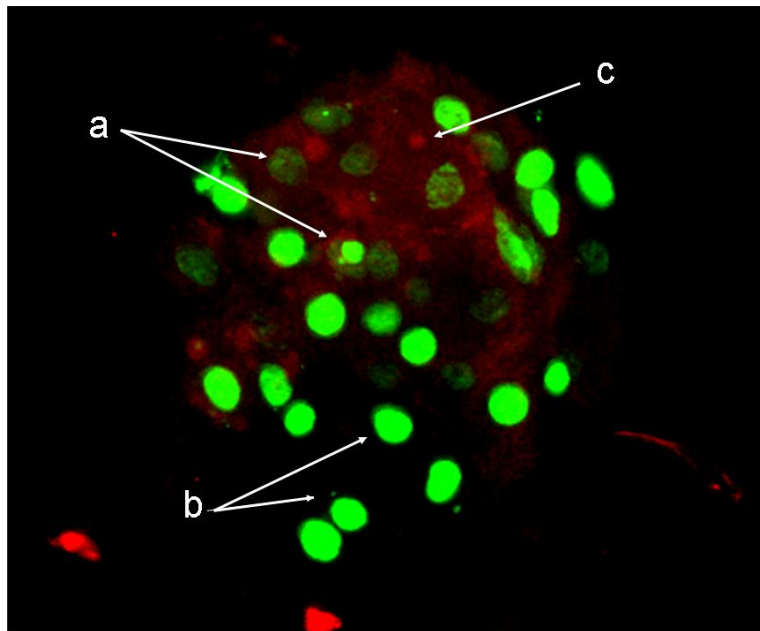
Las columnas denotan la presencia de células TUNEL positivas, células totales y presencia de caspasa 3 activa en las mórulas procesadas, identificadas de izquierda a derecha como: F=embriones no criopreservados, CL=congelación lenta con glicerol y VIT=vitrificación en pajillas de 0.25 cc. Las filas denotan las variables antes mencionadas identificables por los fluoróforos, siendo de arriba hacia abajo: a) para la visión óptica, b) verde para TUNELpositividad, c) azul para DAPI, d) puntillero rojo para caspasa 3 activa y e) para la colocalización directa en el embrión.



Cabe mencionar que 6 de los 31 bloques iniciales fueron eliminados debido a que en 2 de ellos, se encontraron varios embriones que al momento de contar sus núcleos totales teñidos con DAPI, demostraron que habían sido sobreestimados en cuanto a su edad, y dado que contaban con menos de 18 células, se estipuló que no cumplían con la premisa de estar en el estadio de mórula compacta con EGA. Los cuatro bloques restantes eliminados mostraron en el control fresco, así como en ambos tratamientos de criopreservación, todas sus células marcadas tanto con DAPI como con Fit-C asociada a prueba TUNEL, indicando que al momento de su fijación, manejo o incluso desde su recolección, estaban muriendo o ya se encontraban muertos. La prueba de ANCOVA por Tukey demostró que el efecto de la donadora en la presentación de DCI no es significativo, por lo que un diseño completamente aleatorizado pudiera haber atraído los mismos resultados, pudiendo utilizarse una prueba ANOVA común.

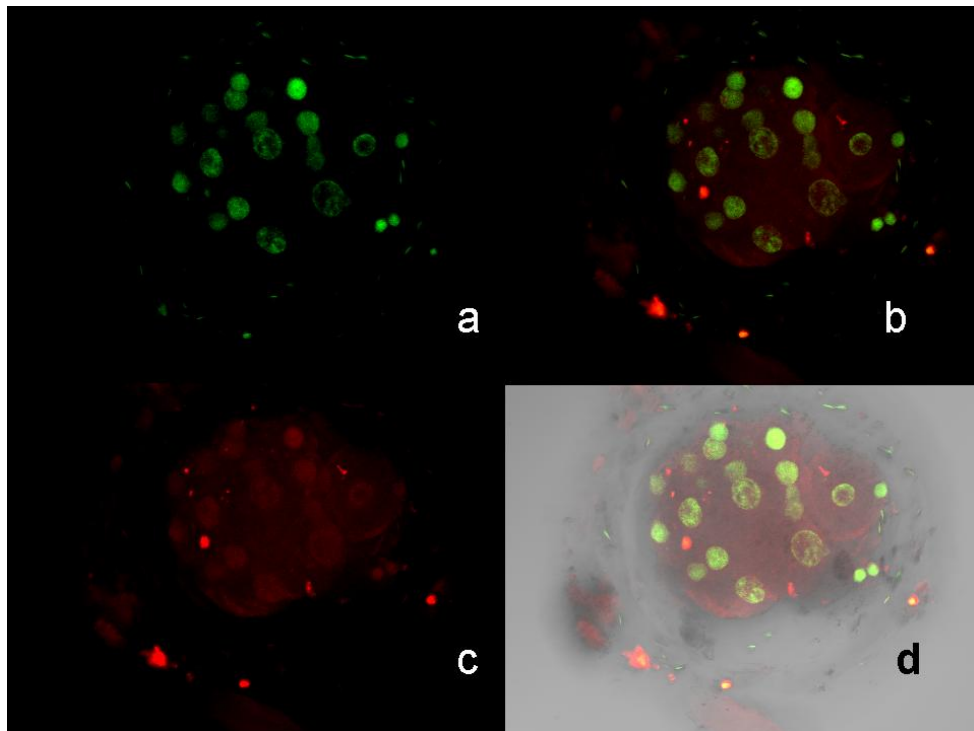
## **6.2 Hallazgos morfológicos relacionados con los métodos de criopreservación.**

Cualitativamente se encontraron distintas características de interés. En primer lugar, la presencia de células TUNEL positivas (marcadas en color verde), fue acompañada en gran cantidad de células y embriones por la actividad de caspasas 3-activas marcadas con rodamina (visible como un puntilleo rojizo en el citoplasma y en los núcleos), sobre todo en el caso de los embriones frescos, indicando que al menos una proporción de la muerte presentada en estos organismos se lleva a cabo en la forma espontánea como MCP clásica dependiente de caspasas. En los embriones criopreservados, no importando el método utilizado también se observó este fenómeno aunque, también se detectaron algunos núcleos TUNEL positivos sin presencia de caspasas, signo característico de tipos de muerte independientes de estas proteasas. También fue posible detectar núcleos y citoplasma celulares marcados con los anticuerpos anticaspasa 3 activa, pero sin que hubiera ruptura del ADN denotada por TUNEL. **Figuras 10 y 11** No se detectó ningún patrón de localización específica de muerte, estando los núcleos TUNEL positivos uniformemente distribuidos en el embrión.



**Figura 10. Actividad de caspasa-3 activa en el embrión ovino de 6 días de edad.**

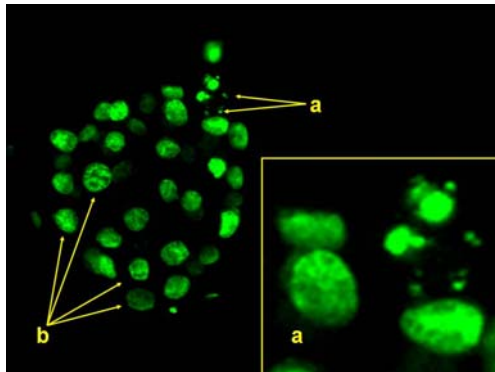
En esta fotografía de microscopía confocal, es posible ver la presencia de células TUNEL positivas acompañadas por actividad de caspasa-3 (a), la actividad apoptótica sin participación de caspasas (b) y la tinción de núcleos con rodamina detectando actividad proteolítica pero no apoptótica (c).



**Figura 11. Colocalización de tinciones sobre los blastómeros embrionarios que evidencian MCP clásica.**

En esta serie de imágenes de un embrión CL, se esquematiza la acción de la tinción TUNEL (a) y caspasa-3 activa (c) aisladamente, para después, comparar su ocurrencia simultánea (b) y localizarla sobre el corte óptico del embrión (d). En el corte “d” puede observarse la forma y contorno de algunos blastómeros, definiendo el citoplasma por su coloración roja granular y el núcleo teñido con mayor intensidad en verde.

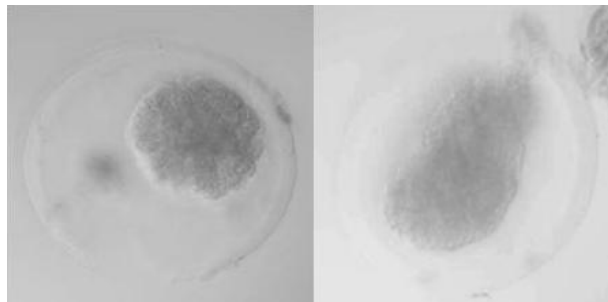
Otro hecho sobresaliente fue la presencia de fragmentos nucleares marcados por TUNEL en aquellos embriones criopreservados, que en comparación a los núcleos mostraban menor tamaño y tenían bordes y formas irregulares. **Figura 12**



**Figura 12. Presencia de fragmentos nucleares en embriones ovinos criopreservados**

Proveniente del grupo CL, este embrión muestra en la parte superior-derecha pequeños puntos fluorescentes con bordes definidos no acordes al tamaño de un núcleo y más bien parecidos a restos nucleares tal vez contenidos en vesículas de degradación celular conocidas como cuerpos apoptóticos,

Por último, se halló evidente deformación de la mórula, tomando la forma de aumento del espacio perivitelino y ruptura de la ZP en el caso de algunos embriones vitrificados, de los que se esperaba no tuvieran daños físicos en su estructura y sin embargo, el DCI no fue significativamente distinto al de los embriones fijados en fresco tras su recolección. En el grupo de embriones congelados lentamente, solo un par de embriones mostraron expansión del espacio perivitelino. **Figura 13**



**Figura 13. Efecto de la vitrificación en la morfología del embrión a su revitalización.**

A la izquierda, un embrión con un gran espacio perivitelino y a la derecha una mórula vitrificada con sus células comprimidas unas contra otras.

Ningún espécimen vitrificado sufrió la ruptura de la pajilla al momento del entibiamiento, indicando que el proceso logra controlar correctamente este fenómeno indeseable que hasta la fecha constituye un importante de la baja adopción de esta tecnología.

## VIII DISCUSIÓN

La supervivencia de los embriones en preimplantación está sujeta a múltiples determinantes que incluyen las condiciones favorables a su desarrollo en la forma de niveles adecuados de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento y, que a su vez, propician que el embrión sea capaz de contrarrestar las agresiones también presentes en el medio (Crosby *et al.*, 1988; Gandolfi 1994). Uno de los mecanismos con que cuenta el embrión para revertir dichas adversidades, es el proceso de MCP y cada una de sus moléculas componentes, ya que de acuerdo a su concentración y acciones reguladoras opuestas, logran controlar la incidencia de la misma, reduciéndola a niveles lo suficientemente bajos como para no atentar contra el subsecuente desarrollo embrionario, a la vez que cumplen funciones fisiológicas en la transformación del embrión (Betts y King 2001; Gjørret *et al.*, 2003). En el actual experimento, la presencia de células TUNEL positivas colocalizadas con marcaje por inmunohistoquímica de caspasa 3-activa – molécula en que convergen las vías apoptóticas de receptores y daño mitocondrial- solo confirma la ocurrencia espontánea de MCP clásica en mórulas ovinas de 6 días de edad, derivadas *in vivo* y recién extraídas del ambiente uterino. **Figura 11.** Esto es acorde a lo publicado por Gjørret y colaboradores (2003 y 2007), quienes encontraron convergencia de tinciones TUNEL e inmunohistoquímica dirigida a caspasa 3 activa en la aplastante mayoría de los blastómeros de blastocistos bovinos IVP o IVD frescos y tratados con estaurosporina. En publicaciones recientes, algunos autores todavía se oponen ante la presencia de células TUNEL signifique la presencia de MCP en embriones tempranos, pues suponen que la ocurrencia del fenómeno en embriones recién extraídos de hembras superovuladas, consituye la manipulación del ambiente natural y puesto que la regulación del desarrollo inicial y la fragmentación del ADN sólo se conserva *in vivo* y en condiciones *in vitro*, su presencia constituye un artefacto (Matwee *et al.*, 2000; Betts y King 2001).

Se sabe que el balance entre moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia de proteínas Bcl-2, es uno de los reguladores primordiales de la ocurrencia normal de MCP, sin embargo, recientemente se ha comprobado que las caspasas son unos reguladores importantes en el inicio de tipo de muerte, incluso si no dependen de estas para su ejecución. Su modo de regulación gira en torno a su unión a moléculas antiapoptóticas como Apaf1/Ced4, y que ante el arribo de sus contrapartes apoptóticas, son liberadas para intercambiarse por ellas, liberando a las caspasas y desatando la

maquinaria apoptótica (Strasser *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Gjørret *et al.*, 2007). La presencia de caspasas 2 y 3 se detectan en todos los estadios embrionarios, y junto con otras caspasas se pueden ubicar en toda célula que sufre apoptosis no importando el origen del estímulo, entonces solo se hace necesario distinguir a estas mismas cuando se encuentran activas, para determinar si participan junto con otras moléculas en vías de señalización ante fuentes de estrés o en condiciones normales (Jurisicova *et al.*, 2003). En el modelo del embrión bovino, de forma coincidente a los resultados aquí obtenidos, se ha demostrado la presencia de caspasa 3 activa en citoplasma, fragmentos citoplásmicos o nucleares y núcleos de embriones bovinos tras la compactación en que se presenta MCP espontánea e inducida por estaurosporina, pudiendo o no converger con tinción TUNEL (Gjørret *et al.*, 2007). Los resultados que ocupan esta discusión indican la presencia de caspasas activas distribuidas de forma semejante entre los 3 grupos en cuestión, lo que es consistente con la información obtenida por Huang y colaboradores (2008) quienes encontraron igual distribución de proteasas entre embriones de ratón congelados lentamente, vitrificados con el sistema cryoleaf o frescos en estadios de división de 2-4 células. Además, se sabe que las funciones enzimáticas, como las que efectúan las caspasas no son interrumpidas por la exposición al frío, al contrario, éstas ocurren con más eficiencia a bajas temperaturas en animales aclimatados a 11-19°C en comparación a los acostumbrados a 38-47°C (Holt 1997). Sin embargo, al menos en el embrión humano, se ha determinado que la activación de las caspasas no explica la alta incidencia de apoptosis en ellos y que por lo tanto debe asociarse a otras funciones distintas a la muerte celular, principalmente porque células marcadas como caspasa-activas positivas podían continuar dividiéndose (Martínez *et al.*, 2003). **Figura 10.** Sin embargo, cuando se inhibe a las caspasas 1 y 3 así como todas las caspasas sensibles al inhibidor zVADfmk, el proceso de MCP inducido por fármacos puede proseguir (Strasser *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Leist y Jäättela 2001; Cregan *et al.*, 2004; Kroemer 2004; Jäättela 2004; Gjørret *et al.*, 2007). Se ha propuesto que la no convergencia de células teñidas por TUNEL y por IHQ-caspasa 3 activa, obedece a factores cronológicos, pues de estos dos fenómenos que se encuentran separados en la cascada de cambios morfológicos de los distintos tipos de MCP. Mientras la activación de caspasas constituye un signo temprano que marca el inicio de los mecanismos de muerte, la fragmentación del ADN que denota la marca TUNEL es un signo más bien avanzado, y así se puede establecer que la activación

de caspasa 3, se encuentra corriente arriba de la degradación de ADN mediada por CAD, quien no está de más recalcar fue activada por tales caspasas. También se enfatiza que la presencia de células TUNEL positivas sin marcaje de caspasas 3 activas, podrían ser el resultado de la degradación autoproteolítica extensa en la célula, que fue mediada por las caspasas en un inicio, pero que al terminar su labor, vuelven a su estado inactivo, son recicladas o se agotan de ese tejido en particular (Gjørret *et al.*, 2003; Gjørret *et al.*, 2007).

Se ha especulado ya por varios años, que existe un nivel basal en la ocurrencia de MCP que determina si el embrión fenece o continúa su desarrollo al revertir la pérdida de blastómeros defectuosos (Massip *et al.*, 1979; Betts y King 2001). Sin embargo, ninguno de los investigadores que han sometido embriones a diversas fuentes de estrés en forma de métodos físicos-invasivos, químicos y deprivación de nutrientes, han encontrado un valor específico de los niveles mínimo y máximo de MCP que sean compatibles con la supervivencia de estos organismos. Aún así, de esos estudios se han extraído datos valiosos, que pueden dirigir la búsqueda de ese valor, tales como: que la presencia de un tipo de muerte u otro está determinada en gran parte por el estímulo de estrés en forma casi específica en el que intervienen el contexto celular; que un solo estímulo puede desencadenar distintos tipos de MCP y se han registrado algunos parámetros de incidencia de MCP en embriones de distintas especies domésticas, de laboratorio y silvestres, así como en el embrión humano, siendo del 3-12% de forma fisiológica y de alrededor del 20-40% en blastocistos bovinos sometidos a criopreservación (Betts y King 2001; Kroemer 2004; Jäättela 2004; Park *et al.*, 2006). Esto es acorde a lo observado en la industria pecuaria y en la asistencia a la reversión de baja fertilidad en humanos, en que los procesos de criopreservación reducen significativamente la viabilidad de los embriones a la transferencia, siendo que entre el 17-70% no sobreviven a tales procesos y la mayoría sufre, aunque sea de manera parcial, degeneración y efectos adversos deletéreos relacionados con su permanencia a tan bajas temperaturas (Ragni *et al.*, 2008).

Estos fenómenos se presentan no importando el crioprotector utilizado, pero si es determinante la calidad morfológica que los embriones presenten al momento de su procesamiento, siendo que los embriones afectados son usualmente de apariencia buena a excelente como los utilizados en el presente experimento (Balakier *et al.*, 2001; Sjöblom *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan parcialmente con

esos antecedentes, pues aunque el DCI se encuentra elevado comparado a las referencias, guardan la misma proporción y so pudiera deberse a una mayor criosensibilidad de las mórulas comparada a la de los blastocistos cuando se aplican los métodos de criopreservación elegidos (Van Der Zwalmen *et al.*, 1989). Esto demuestra que, tal como se ha sospechado por mucho tiempo, el proceso de congelación lenta constituye una fuente de estrés severa, capaz de aumentar la incidencia de MCP, mientras que la vitrificación parece al menos ser un poco menos dañina ( $58.79 \pm 29.37\%$  para el grupo CL  $\geq 34.15 \pm 34.15\%$  para VIT  $\geq 29.46 \pm 36.45\%$  para embriones no criopreservados), por lo que se puede deducir que la vitrificación contiene componentes de estrés celular en su proceso, que pueden elevar moderadamente el DCI, pero sin alejarse de los valores de MCP mostrados de manera espontánea por un embrión viable recién fijado. **Figura 8.** El DCI es una herramienta más útil en la evaluación de la incidencia de apoptosis en un embrión temprano comparada a la simple cuenta de células marcadas con TUNEL (Fabian *et al.*, 2005). Esta establecido por estudios morfométricos que la variabilidad en el número de células que contiene un embrión en sus distintos estadios de desarrollo es muy alta, sobre todo cuando provienen de hembras superovuladas, que aunque recolectados al mismo tiempo, suelen guardar horas de diferencias en su desarrollo, resultado de la asincronía de la ovulación, la fertilización y la ocurrencia de las primeras divisiones celulares. Esto define que el número de blastómeros varíe de un individuo a otro, pero siempre guardando un rango de entre 16 a 79 células en el estadio de mórula, siendo la media en la mórula temprana de 16 células y de 79 en la mórula tardía (compacta) (Wintenberger-Torrès y Sevellec 1987; Rätty *et al.*, 2000). El estadio de mórula en el ovino, es la edad en que ocurre la EGA en esta especie -acaecida en la fase de 18 células aproximadamente), antes de ese momento no es detectable por medio de la prueba TUNEL evidencia alguna de MCP, a pesar de que todas las células desde su legado ovocitario cuentan ya con la maquinaria molecular que efectúa ese proceso, tal como hipotetizó Weil en 1996, sobre que toda célula nucleada de mamífero es capaz de desempeñar apoptosis y expresar constitutivamente todas las proteínas requeridas. Ante ello se ha planteado una especie de teoría de resistencia a la MCP en los estadios de baja segmentación o de alta susceptibilidad en los estadios preimplantatorios que pudieran atribuirse a la ausencia de mecanismos proapoptóticos corriente arriba de la maquinaria presente en los blastómeros, a la inhibición de estos por la aún latente EGA o por la

dominancia de mecanismos antiapoptóticos o genes supresores de apoptosis (Crosby *et al.*, 1988; Betts y King 2001; Gjørret *et al.*, 2003; Gjørret *et al.*, 2007). Esta teoría es apoyada con prácticas cotidianas en la reproducción asistida animal y humana, en que los blastocistos de especies domésticas son considerados como los de mayor sobrevivencia a la transferencia sobre todo si cuentan con un gran número de células, mientras que en humanos se prefiere congelar embriones de apenas 2 o 3 células dada la improbabilidad de que se presente degeneración alguna y la alta criosensibilidad de estadios más avanzados, pudiendo entrever que los blastómeros iniciales son más resistentes a los estímulos de muerte que las células de la ICM o el TE. Por ejemplo, se ha observado que estadios de desarrollo bovino *in vitro* previos a la compactación, son más resistentes a la inducción de apoptosis con estaurosporina que las mórulas y blastocistos, resultando en 0-50% y de 50-100% de células marcadas con TUNEL, respectivamente. Otras observaciones acordes, son la inhibición de apoptosis en el desarrollo temprano del anfibio mediada por inhibidores maternalmente heredados o la inhibición de la apoptosis en embriones de ratón y humano a la post-compactación, resultado de la presencia de factores de supervivencia como TGF e IGF (Gjørret *et al.*, 2007) y que hay mayores niveles de incidencia de apoptosis espontánea en blastocistos desnudos y en expansión, así como en tejidos fetales en diferenciación y gastrulación (Betts y King 2001; Hipfner y Cohen 2004; Sjöblom *et al.*, 2006). Dicha información solo es reflejo de la alta dinámica de procesos de proliferación y muerte que existen en los estadios avanzados de desarrollo, siendo particularmente sensibles a fuentes de estrés.

Por otro lado y de manera quizá más enfática, la elevación del DCI en embriones que han sido congelados lentamente concuerdan con los hallazgos realizados por Márquez-Alvarado (2004 y 2005) en blastocistos bovinos de raza Zebú, que aunque mide el impacto del daño a través de la cuenta de núcleos TUNELpositivos, reflejan los efectos detrimentales que la congelación lenta puede producir. Tal como lo demuestra ese trabajo, la elevada variabilidad en los índices de muerte celular presentes en un mismo experimento pueden explicarse por diferencias estacionales o por los animales utilizados para su estudio, ya que registros recientes de cantidades de núcleos TUNEL positivos similares han reportado la incidencia de 22 a 26 núcleos positivos en embriones bovinos congelados lentamente con glicerol durante dos años consecutivos, de los 4 en que se repitió el experimento, siendo significativamente menores las cuentas TUNEL en los



restantes dos años (11 y 13 núcleos TUNEL positivos). Así mismo, daños similares se han reportado en ovocitos congelados con todo y su capa de células de la granulosa, siendo que estas últimas sufrieron el mayor daño (Wang *et al.*, 2007). La alta incidencia de apoptosis en embriones congelados podría también asociarse a las deficiencias con las que cuentan los equipos automáticos en controlar y disipar el calor latente o de fusión generado al atravesar la ventana de temperatura de criodañó, causando un agudo incremento en la temperatura, momento en el cual el lote de embriones no continúa el descenso de temperatura a la par de la cámara de enfriamiento pudiendo permanecer estática por 2-3 minutos antes de proseguir y que se ha demostrado, reduce la viabilidad embrionaria (Maurer 1978; Holt 2000). Los equipos manuales de congelación regulan mejor este fenómeno. De la misma forma, los volúmenes de congelación más pequeños (alrededor de 4 $\mu$ l) suelen ser controlados con mayor uniformidad, tal como ocurre en la vitrificación (Maurer 1978; Holt 1997).

La similitud en la proporción de incidencia de MCP generada por ambos métodos de criopreservación, tanto en número de células TUNEL-positivas como en DCI, es acorde a los hallazgos realizados por Jung y colaboradores (2008) quienes en un gran número de embriones murinos congelados lentamente y vitrificados, no encontraron diferencias significativas entre ellos (11.5 $\pm$ 7 vs 12.9 $\pm$ 8.1 células apoptóticas respectivamente). Esto podría señalar, salva excepción de aquellos casos en que más del 90% de las células están dañadas y marcadas con TUNEL, que ambos procesos aunque generan cierto grado de daño, son compatibles con la reversión natural de esas pérdidas. Existe evidencia de que las células adyacentes a alguna célula en proceso de MCP proveen a la misma de señales de supervivencia, sobre todo cuando en ella existen deficiencias de factores de crecimiento o pérdida de las uniones intercelulares. Estos mecanismos de muerte, son considerados accidentales y reciben el nombre de “muerte por negligencia” pudiendo ser bloqueados por proteínas de la familia Bcl-2, y al igual que la MCP clásica, son disparadas por la vía de receptores membranales y sus ligandos (Strasser *et al.*, 2000; Betts y King 2001). La aplastante evidencia indica entonces que estas tasas son compatibles con el desarrollo y no constituyen el nivel máximo de muerte requerida para detener el desarrollo de los embriones, al menos en un 40% de los embriones analizados, apoyados por la evidencia de supervivencia *in vivo* e *in vitro* acumulada por más de 60 años en las especies domésticas. Más aún, mediante estudios de supervivencia que

comparan la congelación lenta contra la vitrificación en pajillas de 0.25 cc, se ha determinado que solo existen diferencias significativas entre estos cuando se manejan estructuras criosensibles, teniendo porcentajes de desarrollo *in vivo* o *in vitro* muy similares cuando se someten a los procesos embriones IVD o de especies tolerantes al enfriamiento (Martínez *et al.*, 1998).

Otra posibilidad que pudo haber originado el aumento del DCI en el presente experimento es que embriones de buena apariencia al momento de su recolección y manipulación estuvieran sufriendo procesos de degeneración y muerte, condición que es difícil de diagnosticar en sus etapas iniciales con la evaluación morfológica por si sola, a pesar de que sólo se incluyeron mórulas de calidades 1 y 2 con la ZP intacta y considerando que las características morfológicas de evaluación no son variables independientes. En 7 de 75 casos se detectó que aún en los controles frescos, la evaluación morfológica inicial de los embriones previa a su asignación a los tratamientos, falló en discriminar embriones que estaban muriendo o se encontraban sin vida como lo demostró la prueba TUNEL al marcar el total de células del embrión, esto debido a la buena apariencia que aún guardaban. Con respecto a ello, algunos experimentos controlan este error al usar embriones IVP en los cuales, el constante monitoreo de su desarrollo no deja dudas de su viabilidad al momento del análisis, o bien, otra opción, es extraer los embriones de la donadora e inmediatamente introducirlos a cultivo *in vitro*. No obstante, esta última opción podría generar nuevos errores debidos a que el cultivo, al ser nutritivamente subóptimo a las condiciones *in vivo*, pueden generar criosensibilidad que dificultaría el análisis de resultados (Khurana y Niemann 2000). Las limitaciones de la evaluación morfológica, son un factor común entre los estudios ultraestructurales del embrión, en los que es frecuente ver reportada la inclusión de embriones no viables por error, el cambio de técnico durante la evaluación o que se confunden blastocistos por mórulas cuando el blastocele colapsa (Gjørret *et al.*, 2003; Márquez-Alvarado *et al.*, 2004; Balasubramanian y Rho 2006). Tratando de controlar el error humano, todos los procesos del presente experimento fueron llevados a cabo por un mismo equipo, en que el evaluador contaba con la mayor experiencia en campo para clasificar embriones en cuanto a estadio y calidad y el personal que realizó el conteo de las células marcadas se sometió a una proceso de lectura doble ciego. Se ha demostrado que muy aparte de las agresiones físicas directas en perjuicio del embrión, acciones tan aparentemente

inofensivas como la exposición a la luz del microscopio o el uso de ciertas micropipetas pueden resultar realmente traumáticas, e incluso, se ha demostrado que el aumento en el DCI a veces es atribuible a malas condiciones de cultivo, comprobando su capacidad de fungir como un indicador de estrés (Shea 1981; Thouas *et al.*, 2001; Makarevich *et al.*, 2005; Sjöblom *et al.*, 2006). En el caso contrario, 10/75 embriones (86.66%) no mostraron actividad TUNEL, hecho que concuerda con resultados previos que afirman que en el 99 al 100% de los embriones diagnosticados por prueba TUNEL muestran al menos una célula positiva no importando su etapa de desarrollo y que, en promedio, del 1 al 8% del sus células sufren apoptosis basal, proporción consecuente con la eliminación aislada de células con potencial de desarrollo inapropiado (Van Soom *et al.*, 2000; Gjørret *et al.*, 2003; Hipfner y Cohen 2004; Fabian *et al.*, 2005; Makarevich *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Gjørret *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha recomendado que el uso de FCS y BSA debe ser reemplazado por moléculas químicamente definidas, no solo por razones sanitarias referentes a la limitación de transmisión de microorganismos entre especies, sino que la evidencia apunta que estos derivados de origen animal pueden incrementar la criosensibilidad de los embriones al promover la absorción de lípidos séricos y la presencia de mitocondrias afuncionales o inmaduras, además que no se trata de compuestos esenciales una vez ocurrida la fertilización -en el caso de los embriones IVP- y aunque pudiera contener cantidades desconocidas de factores y péptidos de supervivencia, también podrían contener factores de muerte como TNF que es un desencadenante de MCP. Se ha comprobado que la presencia de estos compuestos resulta detrimental para el desarrollo pues se ha notado que se reducen las tasas de eclosión en embriones cultivados con medios que contienen BSA (Vajta *et al.*, 1996b; Vajta *et al.*, 1999; Betts y King 2001; Semple *et al.*, 2005; Horvarth y Seidel 2006; Balasubramanian y Rho 2006; Mucci *et al.*, 2006).

Muchos reportes investigadores recalcan la importancia del conteo de núcleos, evitando incluir fragmentos nucleares o cuerpos apoptóticos con restos del núcleo para así evitar aumentar el DCI de forma artificial. En los resultados que actualmente se analizan, la presencia de pequeños objetos marcados con TUNEL y no acordes al tamaño de los núcleos que llevan a cabo MCP en la periferia del espacio perivitelino **Figura 12**, corresponden posiblemente a cuerpos apoptóticos extraídos, tal como lo señalan los estudios ultraestructurales de Gjørret y colaboradores (2007) en el embrión bovino, en que

este tipo de estructuras, convergen el marcaje fluorescente TUNEL y características de apoptosis a la microscopía electrónica. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se estudia la incidencia de fragmentación citoplasmática relacionada a MCP, esta puede ocurrir en segmentos que ya han sido separados de blastómeros aparentemente saludables (Betts y King 2001; Martínez *et al.*, 2003). A propósito de la marginación de las células marcadas con TUNEL, en que éstas aparentan tener una ubicación periférica, lo más probable es que no constituya un patrón de presentación del fenómeno de MCP, sino que sea la evidencia de la extrusión de los blastómeros al espacio perivitelino (Gjørret *et al.*, 2003). Por su parte, la fragmentación nuclear y citoplasmática de los blastómeros suelen tomarse como sinónimos de apoptosis, pues algunos autores les consideran signos morfológicos del desensamble celular que podría asociarse a componentes genéticos de MCP, basándose en el hecho de que la fragmentación completa del cigoto de 1 célula en ratón indica ser debido a bajas cantidades de ARNm transcrito de genes supresores de MCP y altas cantidades de genes maternos promotores de muerte (Jurisicova *et al.*, 2003; Gjørret *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008). Mientras, otros estudiosos insisten en separar ese fenómeno de la nomenclatura de muerte celular, ya que tal vez sea la causa y no la consecuencia de la MCP, pues puede relacionarse a la fragmentación nuclear con la degeneración necrótica de blastómeros en arresto, y en su afán de eliminar células muertas sin dañar a las adyacentes con desarrollo normal, el conjunto de células podrían promover su desmantelamiento por apoptosis. Incluso en sistemas de evaluación de calidad embrionaria se le ha dado poco peso a la fragmentación en sistemas numéricos acumulativos, ya que su presencia no impide la obtención de blastocistos viables (Antzack y Van Blerkom 1999; Betts y King 2001; Martínez *et al.*, 2003; Sjöblom *et al.*, 2006). La fragmentación de los blastómeros es una anomalía morfológica frecuente de los embriones viables siempre que no rebase el 20% del total de los blastómeros, el término se refiere a alteraciones en las proporciones núcleo-citoplasma manifestándose como células multinucleadas, dismorfismo en organelos y células anucleadas, que frecuentemente provienen de una simple asincronía entre los ciclos celulares nuclear y citoplasmático, ocurriendo citocinesis sin cariorexis, pero que de resultar muy abundante puede estar delatando anomalías cromosómicas que pueden crear alteraciones genéticas o del desarrollo, por lo que es más significativo evaluar patrones de fragmentación, que simplemente la incidencia de la misma (Jurisicova *et al.*, 2003; Gjørret

*et al.*,2003; Sjöblom *et al.*, 2006). Un tipo de muerte, que pudiera ser compatible con la presencia de fragmentación nuclear y citoplásmica, así como con mecanismos independientes de caspasas- apoyado por la presencia de células TUNEL positivas pero caspasa 3 activa-negativas, es el de la catástrofe mitótica, en que alteraciones estructurales del citoesqueleto y el huso mitótico pueden llevar a cariorexis y citocinesis incompletas. La catástrofe mitótica pudiera constituir una forma de evadir el estrés que representa la vitrificación, toda vez que se ha comprobado que el huso meiótico es muy sensible a la exposición al frío y que las tóxicas soluciones vitrificantes son capaces de desorganizar de forma irreversible los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto al deshidratar las células, sobre todo si la rehidratación a la revitalización es incompleta debido a una deficiente extracción de los crioprotectores. Sin embargo, la posibilidad de que ello ocurra en el método de vitrificación aquí descrito es muy remota, primero porque se ha comprobado que en su gran mayoría los efectos del frío en la inestabilidad del citoesqueleto son de corto plazo, y segundo porque, al menos en el embrión porcino, bovino y murino, la exposición de citocalasina, colchicina y taxol, -conocidos estabilizadores del citoesqueleto e inductores de MCP tipo catástrofe mitótica-, pueden combinarse con el uso de la vitrificación, aumentando la supervivencia embrionaria por reducir su criosensibilidad (Schneider y Mazur 1984; Nagashima *et al.*, 1994; Fuku *et al.*, 1994; Dobrinsky 1996; Beebe *et al.*, 2000; Gjørret *et al.*,2003; Albarracín *et al.*, 2005; Mazur y Koshimoto 2005; Seidel 2006; Horvarth y Seidel 2006; Mucci *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008).

A su vez, la posible presencia de una de estos tipos alternativos de muerte a la MCP clásica podría comprobar la teoría de que los estresores subletales pueden activar solo parcialmente la maquinaria apoptótica en comparación a los inductores químicos de apoptosis, que suelen activar todas las vías de señalización conocidas hasta ahora. De ser así, significaría también que los mecanismos de muerte se encuentran compartimentalizados y no solo responden a estímulos específicos, sino que se extienden en módulos de acuerdo al daño producido por un estímulo dado para restablecer la normalidad de la comunidad celular, liberándose tal vez de los mecanismos represores de forma gradual (Gjørret *et al.*, 2003). Sin embargo, las pruebas aquí realizadas fueron insuficientes para determinar la presencia de otros tipos de muerte en los embriones analizados.

La posibilidad de que las células TUNEL positivas que no son acompañadas por caspasa 3 activa correspondan a un tipo de muerte accidental provocado por los métodos de criopreservación, es muy elevada puesto que la prueba TUNEL tiene limitaciones para distinguir entre apoptosis y necrosis y también porque se ha hallado que las MCP del tipo apoptosis y necrosis son mediadas por la vía de receptores TNFR-1 y TNFR- $\alpha$ , tal como la MCP clásica (Balakier *et al.*,2001; Betts y King 2001; Park *et al.*,2006; Matwee *et al.*,2000; Flores-Pérez 2002; Gjørret *et al.*,2003; Fabian *et al.*,2005; Broker *et al.*,2005; Gjørret *et al.*, 2007). La necrosis es un tipo de muerte accidental, que puede ser isquémica o coagulativa, en ambos casos como resultado de injuria celular, que deriva en la ruptura de las membranas, la desintegración nuclear desordenada, el hinchamiento celular y la inflamación secundaria resultado de la diseminación de componentes celulares al entorno. De estar muy extendida se le aplica el término de oncosis, que se refiere al estado preletal irreversible, ya que la propia inflamación exagera y agiliza los procesos de muerte y degeneración. Se ha comprobado la coexistencia de marcaje TUNEL con características morfológicas de necrosis bajo microscopía electrónica (Gjørret *et al.*, 2003; Gjørret *et al.*, 2007). No obstante, la presencia de núcleos marcados con TUNEL sin presencia de caspasas observada en el experimento, también es compatible con la ocurrencia de uno o más tipos de muerte caspasa independientes como la autofagia, que habiendo iniciado ante un estímulo de apoptosis clásica se transformen en necrosis o en MCP tipo necrosis, pudiéndose diseminar el daño en forma de oncosis, o bien, pueden solo digerir blastómeros o partes de los mismos defectuosos, sin afectar el futuro desarrollo. Con respecto a los posibles estímulos que disparan la MCP autofágica relacionados con procesos de criopreservación, se puede incluir el hallazgo del daño mitocondrial debido a shock térmico que se vuelve aparente entre los 10 y 5°C,-temperaturas muy por encima siquiera de la primera exposición al frío equilibrante de esos procesos- (Windsor y White 1995; Jäättela 2004; Gjørret *et al.*, 2007). También se ha demostrado que la primera oleada de MCP fisiológica puede ser bloqueada al interferir la cascada apoptótica a nivel de AIF, y aunque este proceso se ha asociado a la vía de receptores y a la actividad de caspasa 3, al aplicar inhibidores pancaspasa como ZVAD, el proceso prosigue por la vía de la autofagia. Asimismo, se ha observado que la presencia de una u otra molécula, aunque indica en la mayoría de los casos el tipo de MCP más frecuentemente desplegado, no es exclusivo del mecanismo en cuestión, sino que pueden participar en distintas rutas e

incluso transformar las vías de señalización, tal como ocurre con la catástrofe mitótica en que participan indistintamente caspasas o MMP para ejercer la proteólisis celular.

Volviendo al DCI elevado en los embriones vitrificados, éste puede deberse a los efectos osmóticos, más que a los daños físicos. El choque osmótico se define como la exposición de células vivas a un medio de osmolaridad anormalmente alta o baja en relación a la óptima o naturalmente presente en el organismo del que procede (Vallejo *et al.*, 2003). Se sabe que los embriones frescos son menos susceptibles al daño osmótico que los que fueron criopreservados (Kanagawa 1978; Kasai 1996; Balakier *et al.*, 2001). Muy a pesar de que una gran cantidad de embriones en este grupo presentaron fractura de la ZP y deformación de la “mórula” en que se agrupan las células **Figura 13**, estos no parecen relacionarse con los mecanismos de muerte pues el DCI no muestra diferencias significativas con respecto al grupo de embriones fijados en fresco, contrariamente a lo ocurrido con el grupo de congelados lentamente. La misma deformidad en la distribución de las células, que parecían haberse comprimido o deprimido permanentemente, adoptando la forma de una manopla, pudiera ser evidencia del elevado estrés osmótico al que se sometió al embrión al exponerse a medios vitrificantes y en que solo unos segundos adicionales de permanencia en ellos puede dañar las células embrionarias, de modo que no pudiendo regular su adaptación a medios densos como el medio de montaje utilizado para la observación confocal, el embrión se comprima de igual forma que lo hizo cuando se expuso a los viscosos medios de vitrificación (Guignot *et al.*, 2006; Meryman 2007). Rall en una de sus revisiones sobre la criología fundamental de la vitrificación, indica que embriones que permanecen encogidos tras la revitalización son resultado de la deficiente entrada del crioprotector a temperatura ambiente y que al momento de ser enfriados a 4°C, ello interfiere con los procesos de equilibrio que las células montan para restablecer su volumen normal (Rall 1987). Entonces, es probable que hayan sido insuficientes los 5 minutos de exposición a la solución vitrificante de equilibrio, previos a la exposición a V2 e inmediato enfriamiento de las mórulas, pero también es posible que al regresar a temperaturas fisiológicas tras la revitalización, durante el tiempo transcurrido entre el entibiamiento y la fijación en paraformaldehído, se hayan interrumpido los procesos de reexpansión celular. La ausencia de estos cambios en los embriones que fueron congelados lentamente va de acuerdo con la demostración de que cambios nocivos en el volumen celular son menos probables de ocurrir cuando los procesos de

deshidratación/rehidratación se llevan a cabo lentamente (Holt 1997). Otra evidencia sobre este aspecto lo constituye la pérdida irreversible de la homeóstasis osmótica en espermatozoides de carnero expuestos a soluciones hiper- e hipotónicas para después ser regresadas a concentraciones isotónicas, mientras que la exposición al frío de ese mismo tipo celular ha demostrado no afectar las bombas mitocondriales de calcio, más no así cuando son congelados y descongelados, en que el potencial de membrana se disipa a alta velocidad. Más aún, se ha demostrado que altas concentraciones de sacarosa, pueden ser perjudiciales al comportamiento osmótico de los blastómeros y alterar su permeabilidad membranal (Pollard y Leibo 1994; Windsor y White 1995; Betts y King 2001; Massip 2001; Martínez *et al.*, 2002; Cuello *et al.*, 2004a; Campos-Chillón *et al.*, 2006). No obstante, sería contradictorio, que una técnica que fue diseñada para evitar los daños osmóticos como es la vitrificación aumente las posibilidades de limitar el desarrollo del embrión criopreservado por esa vía de muerte. Además, uno de los efectos benéficos comprobados en la vitrificación de espermatozoides es que la alta osmolaridad detiene el metabolismo y la respiración, evadiendo la senescencia por exposición a radicales libres y otros daños fisiológicos (Holt 1997).



## VIII CONCLUSIONES

Los embriones congelados lentamente incrementan su índice de muerte celular debido al proceso de criopreservación, en comparación a los embriones frescos, esto se debe a un aumento en la muerte celular programada como lo denota la presencia de caspasa 3 activa, pero también participan otros tipos de muerte que bajo las condiciones en que se realizó el presente experimento no es posible determinar. Por su parte los embriones vitrificados presentan índices de muerte similares a los de los embriones frescos y a los congelados lentamente, significando que hay un daño en las células por el proceso de criopreservación de magnitud ligeramente menor al de la congelación lenta. Se propone como perspectiva de estudio a futuro, el análisis ultraestructural del citoesqueleto, posiblemente usando tinciones fluorescentes y microscopía confocal para descartar MCP por catástrofe mitótica y/o bien, la ubicación de moléculas propias de la MCP autofágica posiblemente acompañada de análisis morfológico por microscopía electrónica, todas acompañadas de tinción de yoduro de propidio previa a la permeabilización para contabilizar las células muertas por necrosis que los procesos de criopreservación deriven. Resultaría de gran interés determinar a que nivel el criodaño afecta el citoesqueleto y citoplasma de las células, sea por ruptura de los microtúbulos o microfilamentos que lo conforman o bien, por digestión enzimática lisosomal. Fuera de la línea de investigación propuesta, es evidente que la sola clasificación morfológica no es suficiente para determinar la viabilidad de los embriones, por lo que se sugiere siempre incluir controles frescos, una muestra grande y acompañar las pruebas con tinción TUNEL-DAPI, para eliminar defectos de evaluación previos a la asignación a grupos.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

ADN ácido desoxirribonucleico  
AIF factor inductor de apoptosis del inglés *apoptosis inductor factor*  
BSA albúmina sérica bovina del inglés *Bovine Serum Albumin*  
CL congelación lenta con glycerol  
DCI índice de muerte celular del inglés *death cell index*  
Diablo Direct IAP-Binding protein with Low PI  
DMSO dimetilsulfóxido  
EG etilenglicol  
EGA activación del genoma embrionario del inglés *Embryonic Genome Activation*  
ET transferencia embrionaria del inglés *embryo transfer*  
FCS suero fetal bovino del inglés *Fetal Calf Serum*  
Hsp Heat Shock Protein  
IAP proteínas inhibidoras de apoptosis del inglés *inhibitory apoptosis protein*  
ICM masa celular interna del inglés *internal cell mass*  
ICSI inyección intracitoplasmática de espermatozoides del inglés *intracytoplasmic sperm injection*  
IETS International Embryo Transfer Society  
IGFIR receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I  
IVD *in vivo* derived  
IVP *In vitro* produced  
MCP muerte celular programada  
MME membrana mitocondrial externa  
MMI membrana mitocondrial interna  
MMP permeabilización de la membrana mitocondrial del inglés *mitochondrial membrane permeabilization*  
MTT reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol  
NL nitrógeno líquido  
OPS Open Pulled Straw  
PEG polietilenglicol  
PG propilenglicol  
PVP polivinilpirrolidona  
ROS especies reactivas de oxígeno del inglés *Reactive Oxygen Species*  
Smac Second Mitochondria-derived Activator of Caspase  
SOPS Superfine Open Pulled Straw  
TE trofoectodermo  
TNFR receptor del factor de necrosis tumoral  
UV ultravioleta  
VIT vitrificación en pajillas de 0.25cc  
ZP zona pelúcida

## IX LITERATURA CITADA

- Abd El Razek I.M., Charpigny G., Kodja S., Marquant-Leguienne B., Mermillod P., Guyader-Joly C., et al. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro- produced bovine embryos. *Theriogenology* 2000;53:346.
- Agca Y., Monson R.L., Northey D.I., Abas Mazni O., Schaefer D.M., Rutledge J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology* 1998;50:147-162.
- Agca Y., Monson R.L., Northey D.L., Abas Mazni O., Rutledge J.J. Post-thaw survival and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification. *Theriogenology* 1994;41:154.
- Aguilar M.M., Galina C.S., Merchant H., Montiel F., Canseco R., Márquez Y.C. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 2002;37:341-346.
- Albarracín J.L., Morato R., Rojas C., Mogas T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 2005;63:890-901.
- Antzack M., Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Human Reprod.* 1999;14:429-447.
- Arav A., Zeron Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 1997;47:341.
- Arav A., Zeron Y., Ocheretny A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows succesful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 2000;53:248.
- Balakier H., Cabaca O., Bouman D., Laskin C., Squire J.A. Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism. *Human Reprod.* 2001;15:2404-2410.
- Balasubramanian S., Rho G.J. Effect of chilling on the development of in vitro produced bovine embryos at various cleavage stages. 2006;23:55-61.
- Baril G., Brebion P. y Chesné P. compiladores Estudio FAO producción y sanidad animal 115: Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Italia (Roma): FAO, 1995.
- Beebe L.F.S., Cameron R.D.A., Blackshaw A.W., Higgins A., Nottle M.B. Piglets born from vitrified zona-intact blastocyst. *Theriogenology* 2000;53:249.
- Berdugo J.A., Bueno J.C. Partenogenesis: Un modelo para el estudio de los eventos tempranos del desarrollo mamífero. *IATREIA* 2000;13:40-45.
- Betteridge K.J. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 1995;41:1061-1098.
- Betts D.H., King W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 2001;55:171-191.

- Boe-Hansen G.B., Morris I.D., Ersbøll A.K., Greve T., Christensen P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology* 2005;63:1789-1802.
- Booth P.J., Vajta G., Holm P., Jacobsen H., Greve T., Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification of both cytoplasts and day 3 embryo donors in bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 1998;49:384.
- Bröker L.E., Kruyt F.A.E., Giaccone G. Cell death independent of caspases: A review. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:3155-3162.
- Buckrell B.C., Gartley C.J., Johnson W.H. Results of a commercial sheep embryo transfer program. *Theriogenology* 1989;31:178.
- Caballero G.V., Saharrea M.A., Balcázar S.A., Mejía V.O., Zarco Q.L., Valencia M.J. Fertilidad de embriones frescos y congelados transferidos por laparoscopia en cabras. *Vet. Mex.* 1995;26:366.
- Cameron I.L., Short N.J., Fullerton G.D. Verification of simple hydration/dehydration methods to characterize multiple water compartments on Tendon Type I Collagen. *Cell Biol. Int.* 2007;31:531-539.
- Campos-Chillón L.F., Walker D.J., De la Torre-Sánchez J.F., Seidel G.E. In vitro assesment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology* 2006;65:1200-1214.
- Celestinos M., Gatica R. Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Arch. Med. Vet.* 2002;34:1-12.
- Chaves M.G., González E.P., Abreu R.C., Agüero A. Cryopreservation of equine embryos by two vitrification methods. *Theriogenology* 1997;47:388.
- Chen B., Pan H., Zhu L., Deng Y., Pollard J.W. Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase→AKT→GSK-3β→cyclin D1→pRB pathway to block uterine epithelial cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* 2005;19:1978-1990.
- Chen J.C., Ji W.Z., Shang E.Y., Yang S.C., Zou R. Cryopreservation of kumming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols. *Theriogenology* 1994;41:174.
- Christensen L.C. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology* 1991;35:141-149.
- Chupin D. Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology* 1986;25:147.
- Cocero M.J., Moreno S., Aguilar B. Ultrastructure of in vivo-produced sheep embryos after cryopreservation in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 2000;53:250.
- Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:105-116.
- Corselli J., Cseh S., Chan P., Bailey L. In vitro survival of cryopreserved expanded, hatching or hatched mouse blastocysts. *Theriogenology* 2000;53:251.
- Cregan S.P., Dawson V.L., Slack R.S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004;23:2785-2796.

- Crosby I.M., Gandolfi F., Moor R.M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 1988;82:769-775.
- Cuello C., Gil M.A., Parrilla I., Tornel J., Vázquez J.M., Roca J., et al. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 2004a;62:1144-1152.
- Cuello C., Gil M.A., Parrilla I., Tornel J., Vázquez J.M., Roca J., et al. Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* 2004b;62:351-361.
- Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B., et al. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro derived. *Theriogenology* 2004;62:481-493.
- Dattena M., Ptak G., Loi P., Cappai P. Lambing rate following transfer after vitrification of in vitro- and in vivo-produced ovine embryos. *Theriogenology* 2000;53:252.
- Dhali A., Manik R.S., Das S.K., Singla S.K., Palta P. Effect of ethylene glycol concentration and exposure time on post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo oocytes. *Theriogenology* 2000;53:253.
- Dinnyés A., Dai Y., Jiang S., Yang X. Somatic cell nuclear transfer with vitrified recipient oocytes in cattle. *Theriogenology* 2000;53:215.
- Dinnyés A., Carolan C., Lonergan P., Solti L., Massip A., Mermillod P. In vitro survival of in vitro produced (IVP) bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology* 1995;43:197.
- Dinnyés A., Keefer C.L., Stice S.L., Solti L., Vajta G., Macháty Z., et al. Vitrification of IVMFC bovine embryos in VS3a and EFS solutions: a preliminary report. *Theriogenology* 1994;41:189.
- Dobrinisky J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 2002;57:285-302.
- Dobrinisky J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996;45:17-26.
- Donnay I., Bernard S., Feugang J.M., Kaidi S., Moens A. Effect of cyanide (KCN) on bovine embryos development and apoptosis. *Theriogenology* 2000;53:350.
- Duke M., Basile N., Johnson M., Copperman A., Sandler B., Barritt J. Hatched blastocysts that collapse during slow freezing have higher post-thaw survival rate. *Fertil. Steril.* 2004;82:S150 abstract P41.
- Exley G.E., Tang C., McElhinny A.S., Warner C.M. Expression of caspase and Bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 1999;61:231-239.
- Fabian D., Koppel J., Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 2005;64:221-231.
- Fahning M.L., García M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 1992;29:1-18.

- Fernández-Terán M.A., Hinchliffe J.R., Ros M.A. Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev. Dyn.* 2006;235:2521-2537.
- Feugang J.M., Moens A., Bernard S., Dessy F., Donnay I. Induction of degenerateness and apoptosis in in vitro-produced bovine embryos by pro-oxidant agents. *Theriogenology* 2001;53:352.
- Flores-Pérez F.I. ¿Es la muerte importante para la vida? *Vet. Mex.* 2002;33:161-172.
- Fortier M.A., Nadeau Y., Blouin L. Cultured endometrial cells as a detection system for quantitative evaluation of bovine embryo quality. *Theriogenology* 1994;41:196.
- Fujino Y., Kikuchi K., Nakamura Y., Kobayashi H., Yonemura I., Susuki M., et al. Batchwise assesment of porcine embryos for cryotolerance. *Theriogenology* 2007;67:413-422.
- Fuku E., Liu J., Downey B.R. Viability and ultrastructural changes in bovine oocytes exposed to a vitrification solution. *Theriogenology* 1994;41:198.
- Gandolfi F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1994;41:95-100.
- Gilbert S. *Developmental biology*. 8a ed. EUA: Sinauer associates, 2006.
- Gjørret J.O., Fabian D., Avery B., Maddox-Hyttel P. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine in vitro produced pre-implantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2007;74:961-971.
- Gjørret J.O., Knijn H.M., Dieleman S.J., Avery B., Larsson L.-I., Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.* 2003;69:1193-1200.
- Graham A. Whole embryo assays for programmed cell death. In: Sharpe P.T. y Mason I. editores, *Methods in molecular biology*. Volumen 97 *Molecular embriology. Methods and protocols*. EUA (New York): Humana press, 1999: 667-672.
- Guerin B. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology* 1997;47:33-42.
- Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004;23:2881-2890.
- Guignot F., Bouttier A., Beril G., Salvetti P., Pignon P., Beckers J.F., et al. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology* 2006;66:1004-1011.
- Han Z., Chung Y-G., Gao S., Latham K.E. Maternal factors controlling blastomere fragmentation in early mouse embryos. *Biol. Reprod.* 2005;72:612-618.
- Hay-Schmidt A., Viuff D., Vajta G., Callesen H., Hyttel P. Development of cell adhesion and junctional complex proteins in in vitroproduced bovine embryos. *Theriogenology* 1998;49:180.

Hinchcliffe E.H. Cell cycle: seeking permission from the mother centriole. *Curr. Biol.* 2003;13:646-648.

Hipfner D.R., Cohen S.M. Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5:805-815.

Hochi S., Akiyama M., Kimura K., Hanada A. Vitrification of in vitro-matured bovine oocytes in open-pulled glass capillaries of different diameters. *Theriogenology* 2000;53:255.

Holt W.V. Alternative strategies for long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997;9:309-319.

Holt W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;62:446-21.

Horlacher W., Brem G. Comparison of 3 different vitrification methods for cryopreserving mouse embryos. *Theriogenology* 1994;41:218.

Horvarth G., Seidel G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Theriogenology* 2006;66:1026-1033.

Huang J.Y.J., Chen H.Y., Park J.Y.S., Woo C., Jee B.C., Chian R.-C. Comparison of apoptosis in the mouse oocytes and the resultant embryos following vitrification and slow freezing. *Fertil. Steril.* 2008;88:339 abstract P698.

Humbolt P., Perrin J., Jeanguyot N., Nibart M., Thibier M. Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology* 1987;27:240.

Huppertz B., Herrler A. Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 2005;75:249-261.

IETS Certificate of embryo recovery/Certificate of embryo transfer/Certificate of freezing (printable form). ;:.

Ishwar A.K., Memon M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rumin. Res.* 1996;19:35-43.

Ito K., Hirabayashi M., Ueda M., Sekimoto A., Nagao Y., Kato M., et al. Effect of linoleic acid albumin on the developmental potential of embryos produced by nuclear transfer into frozen-thawed bovine cytoplasts. *Theriogenology* 2000;53:256.

Jäättelä M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004;23:2746-2756.

Jung Y.J., Lee J.H., Kook M.J., Choi K.W., Lee S.J., Kim J.W. Comparative study of embryo development and apoptosis vitrification vs. slow freezing of biopsed mouse embryo. *Fertil. Steril.* 2008;88:345 abstract P716.

Juriscova A., Acton B.M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction* 2004;128:281-291.

Juriscova A., Antenos M., Vermuza S., Tilly J.L., Casper R.F. Expression of apoptosis related genes during human preimplantation embryo development:

potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.* 2003;9:133-141.

Juriscicova A., Detmar J., Caniggia I. Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 2005;75:262-280.

Juriscicova A., Varmuza S., Casper R.F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.* 1996;2:93-98.

Kader A., Abdelrazik H., Sharma R., Falcone T., Goldberg J., Agarwal A. Effect of zonal hatching on expanded and non-expanded blastocysts vitrification. *Fertil. Steril.* 2007a;88:93 abstract O249.

Kader A., Agarwal A., Abdelrazik H., Falcone T., Goldberg J., Sharma R. Improvement in expanded blastocyst vitrification outcome by the use of a pre-vitrification intervention and non-intervention technique. *Fertil. Steril.* 2007b;88:93 abstract O248.

Kaidi S., Donnay I., Dessy F., Massip A. Effect of freezing or vitrification on the quality of in vitro-produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 2000;53:257.

Kanagawa H. Freezing of mammalian ova. *Cryobiology* 1978;15:680.

Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:67-75.

Kawamura K., Kawamura N., Kumagai J., Fukuda J., Tanaka T. Tumor Necrosis Factor regulation of apoptosis in mouse preimplantation embryos and its antagonism by Transforming Growth Factor Alpha/phosphatidylinositol 3-kinase signaling system. *Biol. Reprod.* 2007;76:611-618.

Kawamura K., Sato N., Fukuda J., Kodama H. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 2003;256:331-341.

Khurana N.K., Niemann H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* 2000;54:313-326.

Kobayashi S., Tomita M., Pollard J.W., Leibo S.P. Survival of cryopreserved porcine embryos vitrified in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 1994;41:228.

Kong I.K., Lee S.I., Im Y.T., Cho S., Ohh H.J., Ohh D.H., et al. Improvement of post-thaw hatching rates of in vitro-produced bovine embryos vitrified by ultramini straw. *Theriogenology* 2000;53:258.

Kraemer D.C. Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology* 1989;31:141-148.

Kroemer G. Cell death and cancer: an introduction. *Oncogene* 2004;23:2744-2745.

Kuleshova L., Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil. Steril.* 2002;78:449-454.

Kumar S. Caspases and their many biological functions. *Cell Death Differ.* 2007a;14:1-2.



- Kumar S. Review: Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007b;14:32-43.
- Kuwayama M., Tasaka M., Hamano S. In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994;41:231.
- Lamkanfi M., Festenjs N., Declercq W., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 2007;14:44-55.
- Lehn-Jensen H., Greve T. The survival of cow blastocysts frozen in 1.4 M glycerol after plunging between -15 and -60°C and rapid thawing. *Theriogenology* 1982;17:95.
- Leibo S.P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984;21:767-790.
- Leibo S.P., Loskutoff N.M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993;39:81-94.
- Leibo S.P., Martino A., Kobayashi S., Pollard J.W. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:45-53.
- Leibo S.P., Pollard J.W., Martino A. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1995;43:265.
- Leist M., Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:589-598.
- Lewis I.M., Lane M.W., Vajta G. Pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos vitrified by open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology* 1999;51:168.
- Lleo A., Invernizzi P., Selmi C., Coppel L., Alpini G., Podda M., et al. Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *J. Autoimmun.* 2007;29:61-68.
- Makarevich A.V., Chrenek P., Zilka N., Pivko J., Bulla J. Preimplantation development and viability of in vitro cultured rabbit embryos derived from in vivo fertilized gene-microinjected eggs; apoptosis and ultrastructure analyses. *Zygote* 2005;13:125-137.
- Malumbres M., Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 2005;30:630-641.
- Marquez Y.C., Galina C.S., Moreno N., Ruiz H., Merchant H. Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 2005;40:553-558.
- Marquez-Alvarado Y.C., Galina C.S., Castilla B., León H., Moreno-Mendoza N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the tunnel technique. 2004;39:141-145.
- Martínez A.G., Brogliatti G.M., Valcarcel A., De las Heras M.A. Pregnancy rates transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology* 2002;58:962-972.

- Martínez A.G., De Matos D.G., Furnus C.C., Brogliatti G.M. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1998;50:757-767.
- Martínez A.G., Valcárcel A., De Las Heras M.A., De Matos D.G., Furnus C., Brogliatti G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Anim. Reprod. Sci.* 2002;73:11-21.
- Martinez F., Rienzi L., Iacobelli M., Ubaldi F., Mendoza C., Greco E., et al. Caspase activity in preimplantation human embryos is not associated with apoptosis. *Human Reprod.* 2003;17:1584-1590.
- Massip A. Review: Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* 2001;36:49-55.
- Massip A., Van Der Zwalmen P., Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 1987;27:69-79.
- Massip A., Van der Zwalmen P., Ectors F., De Coster R., D'Leteren C., Hanzen C. Deep freezing of cattle embryos in glass ampules of french straws. *Theriogenology* 1979;12:79-84.
- Massip A., Van Der Zwalmen P., Hanzen C., Ectors F. Fast freezing of cow embryos in french straws with an automatic program. *Theriogenology* 1982;18:325-332.
- Massip A., Van Der Zwalmen P., Scheffen B., Ectors F. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.* 1989;19:117-129.
- Matwee C., Betts D.H., King W.A. Apoptosis and localization of P53 protein in response to heat stress in bovine blastocysts. *Theriogenology* 2000;53:278.
- Maurer R.R. Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. *Theriogenology* 1978;9:45-68.
- Mazur P., Koshimoto C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? *Biol. Reprod.* 2005;66:1485-1490.
- Mazur P., Leibo S.P., Seidel G.E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status and future directions. *Biol. Reprod.* 2008;78:2-12.
- Mazur P., Schneider U., Mahowald A.P. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology* 1991;29:39-68.
- McCracken J.E., Wilmut I., Young L.E. Temporary in vivo culture in ligated sheep oviducts effect on fetal size and development. *Theriogenology* 2000;53:279.
- McEvoy T.G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod. Domest. Anim.* 2003;38:268-275.
- Men H., Monson R.L., Parrish J.J., Rutledge J.J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology* 2003;47:73-81.

Mercader A., Galan A., De los Santos M.J., Remohí J., Pellicer A., Simón C. Have day 3 embryo morphology a predictive value in blastocyst formation? *Fertil. Steril.* 2000;74 suppl 1:53 abstract O139.

Meryman H.T. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 2007;47:935-945.

Miyake T., Kasai M., Zhu S.E., Sakurai T., Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993;40:121-134.

Mucci N., Aller J., Kaiser G.G., Hozbor F., Cabodevila J., Alberio R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 2006;65:1551-1562.

Nagashima H., Kashiwasaki N., Ashman R., Grupen C., Seamark R.F., Nottle M. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 1994;41:113-118.

Naitana S., Bogliolo L., Ledda S., Leoni G., Madau L., Falchi S., et al. Survival of vitrified mouflon (*ovis musimon*) blastocysts. *Theriogenology* 2000;53:340.

Nowshari M.A., Brem G. Effect on thawing temperature and in-straw dilution of cryoprotectant on survival and development of murine embryos frozen by a rapid-freezing procedure. *Theriogenology* 2000;53:261.

Palasz A.T., Mapletoft R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.* 1996;14:127-149.

Papadopoulos S., Rizos D., Duffy P., Wade M., Quinn K., Boland M.P., et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* 2002;74:35-44.

Papis K., Shimizu M., Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000;54:651-658.

Park S.-Y., Kim E.-Y., Cui X.-S., Tae J.-C., Lee W.-D. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts *Zygote* 2006;14:125-131.

Peura T.T., Vajta G., Lane M.W., Boekel K.N., Trounson A.O. Vitrification of bovine cytoplasts for nuclear transfer. *Theriogenology* 1999;51:211.

Polge C., Wilmut I., Rowson L.E.A. The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiology* 1974;11:560.

Pollard J.W., Leibo S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994;41:101-106.

Pollard J.W., Leibo S.P. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993;39:287.

Pruschy M., Rocha S., Zaugg K., Tenzer A., Hess C., Fisher D.E., et al. Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001;49:561-567.

- Pryor J.H., Looney C.R., Walker D., Seidel G.E., Hasler J.F., Kraemer D.C., et al. Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of *in vivo* embryos from brahman cattle. *J. Rep. Fert. Dev.* 2006;52suppl:abstract 215.
- Puzianowska-Kuznicka M., Pietrzak M., Turowska O., Nauman A. Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation. *Acta Biochim. Pol.* 2006;53:641-650.
- Ragni G., Paffoni A., Alagna F., Restelli L., Somigliana E. Reduced developmental potential of human oocytes after vitrification compared to slow freezing. *Fertil. Steril.* 2008;88:345 abstract P715.
- Rall W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987;24:387-402.
- Räty M., Raula J., Paranko J., Markkula M. Number of cells positive for proliferating cell nuclear antigen immunocytochemistry is lower in bovine *in vitro*-produced embryos vitrified on day 8 than on day 7. *Theriogenology* 2000;53:262.
- Renard J.-P., Heyman Y., Leymonie P., Plat J.-C. Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology* 1983;19:145.
- Rhodes L., Nathawielsz P.W. Comparison of controlled internal drug release device containing progesterone with intravaginal medroxyprogesterone sponges for estrus synchronization in ewes. *Theriogenology* 1988;30:831-836.
- Rizos D., Fair T., Papadopoulos S., Boland M., Lonergan P. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 2002;62:320-327.
- Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Pérez-Garnelo S., De la Fuente J., Boland M.P., Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocysts development, cryotolerance and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 2003;68:236-243.
- Rizos D., Ward F., Boland M.P., Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 2001;56:1-16.
- Roca J., Rodriguez M.J., Gil M.A., Lucas X., Vázquez J.M., Martínez E.A. Effect of catalase and superoxide dismutase on viability and *in vitro* penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 2000;53:263.
- Rowson L.E.A., Moor R.M. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and the recipient animal. *J. Reprod. Fert.* 1966;11:207-212.
- Saelens X., Festjens N., Vande W.L., Van Gurp M., Van Loo G., Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23:2861-2874.
- Saha S., Boediono A., Sumantri C., Murakami M. Vitrification of bovine *in vitro*-matured and pronuclear oocytes with different vitrification solutions. *Theriogenology* 1996;45:179.

- Saha S., Rajamahendran R., Boediono A., Cece S., Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology* 1995;43:311.
- Saito N., Imai K., Tomizawa M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1994;41:1053-1060.
- Sakul H., Bradford G.E., BonDurant R.H., Anderson G.B., Donahue S.E. Cryopreservation of embryos as a means of germ plasm conservation in sheep. *Theriogenology* 1993;39:401-409.
- Scherzer J., Fayrer-Hosken R.A., Ray L., Heusner G. A new approach to cryopreservation of large equine embryos by vitrification after blastocoele micromanipulation. *J. Rep. Fert. Dev.* 2006;52suppl:abstract 217.
- Schiewe M.C., Hollifield V.M., Kasbohm L.A., Schmidt P.M. Embryo importation and cryobanking strategies for laboratory animals and wildlife species. *Theriogenology* 1995;43:97-104.
- Schiewe M.C., Rall W.F., Stuart L.D., Wildt D.E. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology* 1991;36:279-293.
- Schneider U., Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984;21:68-79.
- Seidel G.E. Embryo transfer: the next 100 years. *Theriogenology* 1991;35:171-180.
- Seidel G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 2006;65:228-235.
- Seidel G.E., Elsdon R.P., Brink Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology* 1990;33:322.
- Seidel G.E., Walker D.J. Pregnancy rates with embryos vitrified in 0.25 ml straws. *J. Reprod. Dev.* 2006;52suppl:71-76.
- Sell K.M. Viability of frozen tissues. *Cryobiology* 1978;15:681.
- Semple E., Weissman A., Gotlieb L., Casper R., Leibo S.P. Transplantation of fresh or cryopreserved bovine ovarian cortex to nod-scid mice. *Theriogenology* 2000;53:264.
- Semple M.E., Betteridge K.J., Leibo S.P. Cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology* 1995;43:320.
- Shea B.F. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* 1981;15:31-42.
- Sjöblom P., Menezes J., Cummins L., Mathiyalagan B., Costello M.F. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil. Steril.* 2006;86:848-861.
- Smith G.D., Fioravanti J., Hassun P.A., Alegretti J.R., Motta E.L., Serafini P. Prospective randomized controlled study of human oocyte cryopreservation by slow-rate freezing and/or vitrification. *Fertil. Steril.* 2006;86:S96 abstract O224.

- Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:217-245.
- Sun Y., Jiang G. Vitrification of bovine embryonic stem-like cells. *Theriogenology* 2000;53:265.
- Széll A.Z., Windsor D.P. Survival of vitrified sheep embryos in vitro and in vivo. *Theriogenology* 1994;42:881-889.
- Takahashi M., Keicho K., Takahashi H., Ogawa H., Schultz R.M., Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology* 2000a;53:365.
- Takahashi M., Keicho K., Takahashi H., Ogawa H., Schultz R.M., Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology* 2000b;54:137-145 .
- Tervit H.R., Pugh P.A., McGowan L.T., Bell A.C.S., Wells R.W. The freezability of sheep embryos is affected by culture system and source (in vivo or in vitro derived). *Theriogenology* 1994;41:315.
- Thibier M. Data retrieval committee annual report. Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *IETS Newsletter* 2006;24:12-18.
- Thibier M. The animal embryo transfer industry in figures. A report from the IETS data retrieval committee. *IETS Newsletter* 2001;:16-22.
- Thibier M., Nibart M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. *Anim. Reprod. Sci.* 1992;28:139-148.
- Thouas G.A., Jones G.M., Lewis I.M., Moore L. Embryo-toxicity of disposable glass capillaries. *Theriogenology* 2001;53:366.
- Traldi A.S., Leboeuf B., Cognié Y., Poulin N., Mermillod P. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 1999;51:175.
- Tran C., Le A., Tan T., Tran A., Ivakhenko V., Behr B. Freezing at lower strating temperature (-6°C) improves human embryo viability and pregnancy rate. *Fertil. Steril.* 2004;82:132 abstract O329.
- Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H. Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 1997;47:501-509.
- Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H. Cumulative efficiency of biopsy, vitrification and in straw dilution in a bovine in vitro embryo production system. *Theriogenology* 1996a;45:162.
- Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim. Reprod. Sci.* 1996b;45:191-200.
- Vajta G., Kuwayama M., Booth P.J., Holm P., Greve T., Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. *Theriogenology* 1998;49:176.

- Vajta G., Peura T.T., Holm P., Booth P.J., Greve T., Callesen H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 1999;51:176.
- Valcárcel A., De las Heras M., Pérez L., Moses D.F., Baldassarre H. Assesment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.* 1997;45:299-309.
- Vallejo J., Gómez-Piquer V., Tarin J.J. Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. 2003;30:177-187.
- Van Der Zwalmen P., Touati K., Ectors F.J., Massip A., Beckers J.F., Ectors F. Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology* 1989;31:270.
- Van Soom A., Boerjan M. editores Assesment of mammalian embryo quality. Invasive and non-invasive techniques. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- Van Soom A., Van Vlaederen I., Mahmoudzadeh A.R., Deluyker H., De Kruif A. Compactation rate on in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 1992;38:905-919.
- Van Soom A., Vanroose G., Laevens H., de Kruif A. Apoptosis in in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2000;53:367.
- Van Wagtendonk-de Leeuw A.M., Den Daas J.H.G., Rall W.F. Pregnancy rates in a comparative field trials of vitrification and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology* 1994;41:326.
- Viuff D., Avery B., Greve T., Thomsen P.D. Evaluation of chromosome aberrations in in vitro produced bovine embryos at day 2-5 post-insemination using in situ hybridization. *Theriogenology* 2000;53:368.
- Viuff D., Rickords L., Offenbergh H., Hyttel P., Avery B., Greve T., et al. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol. Reprod.* 1999;60:1273-1278.
- Voelkel S.A., Hu Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992a;37:23-37.
- Voelkel S.A., Hu Y.X. Use of ethylene glycol as cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 1992b;37:687-697.
- Wang W., Liu H-C., He Z., Tang Y., Rosenwaks Z. All cell types in mouse ovary can be well preserved by vitrification. *Fertil. Steril.* 2007;88:92 abstract O246.
- Wassarman P.M. Gamete interactions during mammalian fertilization. *Theriogenology* 1994;41:31-44.
- Whittingham D.G. Freezing embryos of laboratory species. *Cryobiology* 1978;15:367-369.
- Willadsen S.M., Polge C., Rowson L.E.A., Moor R.M. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology* 1974;11:560.

Windsor D.P., White I.G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim. Reprod. Sci.* 1995;40:43-58.

Wintenberger-Torrès S., Sevellec C. Atlas of the early development of the sheep embryo. Francia (París): INRA, 1987.

Xie Y., Purscheck E.E., Rappolee D.A. Effects of SAPK/JNK inhibitors of preimplantation mouse embryo development are influenced greatly by the amount of stress induced by the media. *Mol. Hum. Reprod.* 2006;12:217-224.

Xu J.S., Lee K.F., Lee W.M., Kwok K.L., Lee W.M., Luk J.M., et al. Embryotrophic factor-3 from human oviductal cells enhances proliferation, suppresses apoptosis and stimulates the expression of the  $\beta$ 1 subunit of sodium-potassium ATPase in mouse embryos. *Human Reprod.* 2004;19:2919-2926.

Zeron Y., Tomczak M., Crowe J., Arav V. Electrofusion of bovine oocytes with different liposomes changes the membrane thermobehavior and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 2000;53:267.

Zhang Y., Wang H., Belova N., Vermesh M. Does embryo biopsy before blastocyst cryopreservation affect post-thaw embryo survival and development? *Fertil. Steril.* 2007;88:92-93 abstract O247.