

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Acuicultura**

**Identificación y caracterización de las células germinales
primordiales (CGPs) en embriones y larvas de *Totoaba
macdonaldi***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Raquel Escuredo Vielba

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Raquel Escuredo Vielba

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Miguel Angel del Río Portilla
CoDirector de Tesis

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
CoDirectora de Tesis

Miembros del comité

Dra. Marie Silvie Dumas Lepage

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Dr. Benjamín Barón Sevilla



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Raquel Escuredo Vielba © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Raquel Escuredo Vielba** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Acuicultura.

Identificación y caracterización de las células germinales primordiales (CGPs) en embriones y larvas de *Totoaba macdonaldi*

Resumen aprobado por:

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
CoDirector de Tesis

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
CoDirectora de Tesis

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*), es un pez endémico del Golfo de California con alto potencial tanto económico como ecológico, sin embargo, en la actualidad, es una especie en peligro de extinción. Por lo tanto, el propósito de esta tesis fue caracterizar las células germinales primordiales (CGPs) de este pez perteneciente a la familia Sciaenidae, con dos objetivos: (1) proporcionar la base para la criopreservación de las CGPs para conservar el recurso genético y (2) dar el primer paso para conocer la génesis gonadal y la diferenciación sexual de este pez. El análisis de inmunofluorescencia realizado desde la etapa de 2 células hasta 8 días después de la eclosión (DDE) muestra que la proteína VASA es específica de las CGPs. Estas células se observaron por primera vez en las regiones periférica y dorsal del blastodisco, en aproximadamente el estadio del 50% -epibolia y migraron hacia ambos lados del cuerpo del embrión durante el desarrollo. Finalmente, a los 7 DDE, las CGPs del embrión alcanzaron la zona donde se desarrollará la gónada. El análisis histológico de las larvas mostró el primordio gonadal con un grupo de CGPs en el lado dorsal del peritoneo a los 11 DDE. El crecimiento de la gónada, como resultado de la interacción entre las CGPs y las células somáticas derivadas del peritoneo, se observó a los 16 DDE. Los resultados de qPCR mostraron que la expresión del gen *Vasa* estaba restringida al desarrollo embrionario y larval temprano, los valores más altos se observaron en la etapa de 2 células y de blástula media, lo que sugiere la herencia materna del ARNm de *Vasa*. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de preformación en las CGPs de *T. macdonaldi*. El patrón de migración de las CGPs en esta especie, nos permite recomendar el aislamiento y la posterior criopreservación de estas células antes de los 7 DDE cuando el desarrollo embrionario y larval se da a 21 ° C.

Palabras clave: Células germinales primordiales, Expresión *Vasa*, Proteína VASA, Ruta migratoria, *Totoaba macdonaldi*, Familia Scianidae.

Abstract of the thesis presented by **Raquel Escuredo Vielba** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Aquaculture

Identification and characterization of primordial germ cells (PGCs) in embryos and larvae of *Totoaba macdonaldi*

Abstract approved by:

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Thesis CoDirector

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Thesis CoDirector

The totoaba (*Totoaba macdonaldi*) is an endemic fish of the Gulf of California with high economic and ecological potential, however, at present, it is an endangered species. Therefore, our purpose was to characterize the Primordial Germ Cells (PGCs) of this Sciaenid with two objectives: (1) to provide the basis for PGCs cryopreservation to preserve the genetic resources and (2) to take the first step to know the gonadal genesis and sex differentiation of this fish. Immunofluorescence analysis performed from 2-cell stage to 8-day after hatch (DAH) shows that VASA protein is specific for PGCs. These cells were first observed in the peripheral and dorsal regions of the blastodisc at approximately the 50%-epiboly stage and migrated to both sides of embryo body during the development. Finally, at 7 DAH the PGCs of the hatching embryo reached the place where the gonad will develop. Histology analysis of larvae showed a genital ridge with enclosed PGCs on the dorsal side of the peritoneum at 11 DAH, gonadal primordium growth was observed as a result of the interaction between PGCs and somatic cells derived from the peritoneum. Results of qPCR showed that *Vasa* expression was restricted to the embryonic and early larval development, the highest values were observed in 2-cell and mid-blastula stage suggesting the maternal inheritance of *Vasa* mRNA. These findings support the hypothesis of preformation in *T. macdonaldi* PGCs. The migration pattern of PGCs allow us to recommend the isolation and subsequent cryopreservation of these cells before 7 DAH when temperature during embryonic and larval development is 21°C.

Keywords: Primordial germ cells, *Vasa* expression, VASA protein, migration pathway, *Totoaba macdonaldi*, Scianidae family.

Dedicatoria

A mi hijo Mateo y a Pablo mi compañero de vida

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para alcanzar esta meta tan importante para mí.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al departamento de Acuicultura por haberme aceptado en su programa de Doctorado.

Al Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) por la generosa donación de los embriones y larvas de *Totoaba macdonaldi* empleadas en este trabajo y en especial al personal técnico del programa de cultivo de peces marinos por la ayuda brindada en todo momento. Sin su colaboración este trabajo no habría sido posible.

A la Dra. Carmen Paniagua Chávez y al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por aceptarme como su estudiante de Doctorado, por su paciencia, por compartir sus conocimientos y el apoyo incondicional durante mi formación académica.

A los miembros de mi comité de tesis Dra. Silvie Dumas Lepage, Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz y Dr. Benjamín Barón Sevilla, por enseñarme todo lo que saben, por sus comentarios, sugerencias, por su inestimable ayuda para enriquecer este trabajo y sobre todo por su apoyo para alcanzar esta meta.

Al Dr. Manuel Segovia, por sus consejos en todos los ámbitos de la vida, allá donde estés recibe mi más profunda gratitud.

A Paz Herráez y su equipo (Universidad de León, España) por su ayuda con los protocolos de marcaje utilizando anticuerpos y por resolver todas las dudas que me surgieron en el camino.

A la M. en C. Constanza del Mar Ochoa, técnico del Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos, por el soporte técnico, por su destreza con el microscopio, por sus sugerencias para enriquecer este trabajo, pero sobre todo por su amistad, entusiasmo y apoyo incondicional.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura, por el entrenamiento técnico, elaboración de laminillas histológicas, estandarización de protocolos histológicos y por su ayuda incondicional.

A la Biol. Uvinai Salgado, técnico del Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura, por el apoyo brindado durante el cultivo larval y la producción de alimento vivo.

A Abelardo Campos técnico del Departamento de Acuicultura, por su ayuda en la decorionización de los embriones y por su apoyo en el uso de los equipos del Departamento de Acuicultura.

A mi generación: Pablo Fuentes, Jorge Madrid, Rigoberto Delgado, Luis Miguel Molina, Paul Vázquez, Miriam Lecuanda, David Guzmán y Roberto Cruz, compañeros de viaje en la maestría y el doctorado, gracias a todos por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A Fabi, Vivi, Miriam y Sarita, por los buenos momentos que pasamos juntas, aunque ya no nos veamos tanto siempre las recordaré.

A toda la gente que ha formado parte de mi historia en Ensenada en estos últimos 10 años, por todas las experiencias vividas, todo lo viajado y todo lo aprendido, porque sin ustedes no hubiese sido lo mismo, Gracias por hacerme el viaje tan agradable.

A mis amigos de aventuras y locuras: Lucía, Celia, Tere, Diana, Cacarlos y Anita ha sido un placer coincidir con ustedes durante este ratito en Ensenada, no los olvidaré.

A mis amigos de infancia, por las risas, la comprensión y esa sensación de que, a pesar de la distancia, nunca estoy sola.

A mi familia: A mis abuelos que ya no están conmigo, a mis tíos y primos que siempre están presentes mandándome energía y ánimos, pero sobre todo a mis padres, Ventura y Encarna y a mis hermanos Rubén y Jesús que siempre me han apoyado en este camino y que además me ha enseñado a luchar y salir victoriosa. Os quiero muchísimo.

A mi familia adquirida: A Silvia y Roberto, mis suegros, a Valeria y Jimena, mis cuñadas y a toda esa gran familia a la que ahora tengo la suerte de pertenecer. Gracias por formar parte de mi vida y quererme tanto. ¡Los quiero mucho a todos!

A mis dos amores: A Pablo, por tu ayuda, por tu paciencia, pero sobre todo por tu amor, no pude haber elegido mejor compañero para este viaje. A Mateo, mi pequeñín, mi inspiración y mi amor incondicional, siento las horas de juego que te he robado para conseguir esta meta. Sois el motor que siempre me impulsa a seguir adelante a pesar de las dificultades. No puedo quererlos más.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Generalidades de la especie <i>Totoaba macdonaldi</i>	2
1.1.2 Importancia del recurso	4
1.1.3 Técnicas de reproducción asistida	5
1.1.4 Células germinales primordiales	12
1.1.4.1 Origen de las CGPs	12
1.1.4.2. Migración de las CGPs	20
1.1.4.3. Proliferación de las CGP	22
1.1.6 Genes específicos de la línea germinal	23
1.1.6.1 Gen <i>Vasa</i>	26
1.2 Justificación	27
1.3 Hipótesis.....	27
1.4 Objetivos	28
1.4.1 Objetivo general.....	28
1.4.2. Objetivos específicos.....	28
Capítulo 2. Metodología.....	29
2.1 Producción de embriones	29
2.2 Cultivo larvario	29
2.3 Análisis Histológico.....	30
2.4 Análisis de inmunofluorescencia “ <i>Whole-mount</i> ”	31

2.5 Análisis de los niveles de expresión del gen <i>Vasa</i>	32
2.5.1 Diseño de iniciadores para amplificación de gen <i>Vasa</i>	32
2.5.2 Optimización de los iniciadores	34
2.5.3 Extracción de RNA	35
2.5.4 Retrotranscripción y amplificación (RT-qPCR)	35
2.5.5 Secuenciación.....	36
2.6 Análisis estadístico	37
Capítulo 3. Resultados	38
3.1 Desarrollo embrionario	38
3.2 Caracterización histológica de las CGPs	41
3.3 Resultados del análisis de inmunofluorescencia.....	43
3.4 Niveles de expresión del gen <i>Vasa</i>	46
3.4 Amplificación del gen <i>vasa</i>	47
Capítulo 4. Discusión	49
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones	57
Literatura citada	59
Anexo 1.....	69
Anexo 2.....	73
Anexo 3.....	75
Anexo 4.....	77
Anexo 5.....	78
Anexo 6.....	80
Anexo 7.....	81
Anexo 8.....	83
Anexo 9.....	85
Anexo 10.....	87
Anexo 11.....	89

Lista de figuras

- Figura 1. Imagen de una hembra de totoaba, colectada en el archipiélago de las Islas Encantadas, B.C.**
Fotografía de José L. Niebla (Tomado de Sitio Web Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora).....2
- Figura 2. Área de distribución de la especie y delta del Río Colorado**.....3
- Figura 3. Trasplante de células germinales en peces adultos.** (A) Las células germinales endógenas de los receptores, se reducen mediante tratamientos térmicos y químicos. (B) Una suspensión de espermatogonias es cosechada del pez donante. (C) Las células se tiñen con colorante fluorescente y se trasplantan en el receptor a través de la papila urogenital. (D) Meses después del procedimiento, las células trasplantadas se diferencian en gametos funcionales con la carga genética del donante. (E) Los peces subrogados son inseminados artificialmente o se les permite el desove natural. (F) Producción de progenie de origen donante (Tomado de Majhi y Kumar, 2017).8
- Figura 4. Trasplante de CGPs en embriones de peces.** (A) Las CGPs se microinyectan en el blastodisco de los embriones receptores. (B) Las CGPs del donante migran y colonizan la cresta gonadal del embrión receptor. (C) Las CGPs proliferan y se diferencian en gametos funcionales derivados del donante cuando los peces alcanzan la madurez sexual. (D) Los peces subrogados maduros liberan gametos funcionales con la carga genética del donante. (E) Generación de progenie subrogada por inseminación artificial o desove natural (Tomado de Majhi y Kumar, 2017).9
- Figura 5. Trasplante de células germinales en larvas recién eclosionadas.** (A) Las CGPs del donante se trasplantan en la cavidad celómica de la larva recién eclosionada durante el período en el que las CGPs endógenas están en migración activa. (B) Las CGPs trasplantadas migran y colonizan las crestas germinales del receptor. (C) Después de alcanzar la madurez sexual, el receptor producirá gametos derivados del donante. (D) Generación de la progenie por inseminación artificial o desove natural (Tomado de Majhi y Kumar, 2017).11
- Figura 6. (A) Epigénesis: Moléculas específicas de la línea germinal no están presentes en los ovocitos durante la fertilización.** Durante la embriogénesis señales inductivas (negro) inducen la formación de las CGPs dando comienzo a la expresión de genes específicos de la línea germinal (gris oscuro). (B) Preformación: Los determinantes maternos de la línea germinal (gris claro) se localizan en el citoplasma del ovocito y son heredados por las CGPs en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Figura tomada de Extavour, 2007).13
- Figura 7. Modos de especificación de las células germinales en Metazoos:** rojo, epigénesis; azul, preformación; medio rojo, medio azul, grupos en los que algunas especies muestran preformación y otras epigénesis; blanco, sin datos. Los asteriscos indican filios en los que se ha reivindicado la epigénesis, pero recientes datos sugieren preformación (Tomado de Extavour y Akam, 2003).14
- Figura 8. Ilustración esquemática de los cuatro tipos de trasplantes realizados en embriones de ratón durante la fase de desarrollo temprano.** El epiblasto del embrión donante *HMG-lacZ* se disecó en fragmentos proximal (P) y distal (D) cortando a lo largo de las líneas punteadas. Se aislaron grupos de 5-20 células de ambos fragmentos y se realizó un trasplante ortotópico (D→D, P→P) y otro heterotópico (D→P, P→D) (Tomado de Tam y Zhou, 1996). 16

Figura 9. Se trasplantó el plasma del polo posterior del embrión donante al polo anterior del receptor (zona sombreada). Las células que se formaron en el lugar del trasplante presentaron una morfología muy similar a las CGPs. Estas células fueron aisladas y trasplantadas en embriones hospederos donde generaron gametos viables (Tomado de Illmensee y Mahowald, 1974).18

Figura 10. Estadios del desarrollo embrionario en *Totoaba macdonaldi* at 21 °C. Periodo de clivaje: A. Estadio de 2 células. B. Estadio de 4 células. C. Estadio de 8 células. D. Estadio de 16 células. E. Estadio de 64 células. Periodo de blástula: F. Estadio de 128 células. G. Estadio de 512 células. H. 30 % de cobertura celular, movimientos epibólicos. Periodo de Gástrula: I. 60 % de cobertura celular del huevo, anillo germinal visible. J. 75 % de cobertura celular del huevo. K. 90 % del huevo cubierto por células. Escudo embrionario y eje corporal del embrión visibles. Periodo de segmentación: L. Formación de somitas. M. Estadio de 14 somitas. N. Estadio 20 somitas. Eclosión: O. Pigmentación temprana del embrión, rudimentos de ojos y notocorda. P. Elongación del embrión. Empiezan movimientos de eclosión. Escala: 250 μm40

Figura 11. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 6 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 3.9 mm \pm 0.3. El área recuadrada corresponde al primordio gonadal; PI, intestino posterior; AI, intestino anterior; MI, intestino medio; SB, vejiga natatoria. Escala 200 μm . B. Ampliación del área recuadrada. Las flechas indican CGPs; PI, intestino posterior. Escala 20 μm . Tinción con Hematoxilina-eosina.....41

Figura 12. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 9 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 5.1 mm \pm 0.3. El área recuadrada corresponde al primordio gonadal; L, Hígado; PI, Intestino posterior; AI, Intestino anterior; ND, Conducto nefrítico; SB, vejiga natatoria. Escala 200 μm . B. Amplificación del área recuadrada. Las flechas indican CGPs; P, peritoneo; SC, Células somáticas. Escala 10 μm . Tinción con Hematoxilina-eosina42

Figura 13. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 11 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 5.8 mm \pm 0.3. El área recuadrada corresponde al primordio gonadal; L, Hígado; PI, Intestino posterior; AI, Intestino anterior; MI, Intestino medio; ND, Conducto nefrítico; SB, vejiga natatoria. B. Ampliación del área recuadrada. Las flechas indican CGPs; P, peritoneo; SC, Células somáticas. Tinción con Hematoxilina-eosina.42

Figura 14. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 16 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 7.1mm \pm 0.7. El área recuadrada corresponde al primordio gonadal; L, Hígado; PI, Intestino posterior; AI, Intestino anterior; MI, Intestino medio; ND, Conducto nefrítico; SB, vejiga natatoria. B. Ampliación del área recuadrada. Las flechas indican CGPs; P, peritoneo; GP, Primordio gonadal. Tinción con Hematoxilina-eosina.43

Figura 15. Inmunofluorescencia *Whole-mount* para CGPs usando el anticuerpo policlonal contra proteína VASA DDX4/MVH. Análisis confocal llevado a cabo usando el programa FV10- ASW 4.2 Viewer. Las cabezas de flecha indican células positivas para proteína VASA. Las muestras fueron contrateñidas con DAPI. Las imágenes fueron procesadas usando inkscape. A. Embrión de 2 células. Escala 200 μm . B. Embrión de 4 células. Escala 200 μm . C. Fase de gástrula al 60%, escala 200 μm . D. Ampliación del área recuadrada. Escala 10 μm . E. Embrión de 8 somitas. Escala 200 μm . F. Amplificación del área recuadrada. Escala 10 μm . G. Periodo de eclosión. Escala 200 μm . H. Ampliación del área recuadrada. Escala 10 μm . I. Larva de 8DDE. Escala 500 μm . J. Ampliación del área recuadrada. Escala 10 μm46

- Figura 16. Perfil de niveles de expresión del gen *Vasa* en embriones de *Totoaba macdonaldi* (2-4 células, blástula media, gástrula, somitogénesis y eclosión) y larvas (0, 1, 3, 5, 7 DDE).** Validación de patrones de expresión del gen *Vasa* mediante qPCR. Niveles de expresión del gen 18S fueron usados como control interno. Los valores se indican como media con estándar (SE) por triplicado. Las diferencias significativas (letras minúsculas) fueron detectadas mediante análisis de varianza (ANOVA). Una vez que se determinó que existían diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizó un test post-hoc Newman-Keuls (SNK). Para realizar todos los análisis se empleó el programa STATISTICA.....47
- Figura 17. Resultados de la RT-qPCR.** Amplificación positiva en el ciclo 26 (color azul) de un par de iniciadores para gen *Vasa* diseñado con base a la secuencia de *Nibeia mitsukurii* (Nmi *Vasa*). Amplificación positiva del gen de referencia, 18S, en el ciclo 2 (rojo).....63
- Figura 18. Optimización de iniciadores** a concentraciones (200, 400 y 800 μM) y temperaturas (58, 59, 60 y 61 $^{\circ}\text{C}$) en las condiciones experimentales descritas en la sección 2.5.4. Se seleccionó una concentración óptima de 200 μM y una temperatura de anillamiento de 60 $^{\circ}\text{C}$64
- Figura 19. Curva de fusión** del gen 18s (T_m de 84.23) y *Vasa* (T_m de 82.9)65
- Figura 20.** Amplificación del gen 18s (ciclo 2- 40) y *Vasa* (ciclo 28-40)65

Lista de tablas

Tabla 1. Mecanismo de formación de las CGPs en algunas especies de peces	19
Tabla 2. Tiempo de proliferación y migración de las CGPS en diferentes especies de peces teleósteos.	21
Tabla 3. Genes involucrados en el desarrollo de la línea germinal.....	25
Tabla 4. Iniciadores de teleósteos para gen <i>Vasa</i>	33
Tabla 5. Iniciadores seleccionados para q-PCR. Se indican secuencias de los primers para <i>Vasa</i> y <i>18S</i> , tamaño del amplicón en pares de bases (pb), eficiencia de las reacciones (E) y coeficientes de determinación de Pearson (R^2).	34
Tabla 6. Resultado del BLAST para el fragmento de 83 pb después de quitar los iniciadores.....	48
Tabla 7. Preparado de solución fijadora Davidson (1L).....	77
Tabla 8. Proceso de deshidratación del tejido: 17h	78
Tabla 9. Proceso de desparafinación e hidratación de los cortes	79
Tabla 10. Tinción con Hematoxilina. Eosina	80
Tabla 11. Volúmenes de componentes del master mix por muestra	83
Tabla 12. Master mix por muestra gen <i>Vasa</i>	85
Tabla 13. Master mix por muestra gen <i>18S</i>	85

Capítulo 1. Introducción

La *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) es un pez emblemático de la Familia Scianidae y el de mayor tamaño del Orden de los Perciformes. Entre 1920 y 1974 constituyó la pesquería más importante del Golfo de California (García De León, 2013), sin embargo, en los años 70 la pesquería fue cerrada por sobreexplotación y disminución de la población natural debido a alteraciones del Río Colorado (Lercari y Chávez, 2007). Hasta la fecha, la *T. macdonaldi* se encuentra dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie en peligro de extinción. Los esfuerzos más importantes para la conservación de la totoaba se llevaron a cabo en 1974 cuando se creó la reserva de la biosfera del alto Golfo de California y el delta del Río Colorado y se creó un programa de conservación de esta especie (Baillie y Groombridge, 1996). Sin embargo, los esfuerzos de restauración de la población de totoaba por medio de prácticas de conservación *in-situ* de ecosistemas pueden ser útiles, pero no conclusivos. El cultivo de esta especie en cautiverio fue reportado en 2012 (True, 2012) permitiendo la mejora de estrategias reproductivas en cautiverio por medio de la reproducción asistida. Sin embargo, los costos de producción en cautiverio son muy elevados dado el tamaño del organismo y el tiempo necesario para conseguir la madurez sexual.

La reproducción asistida en conjunto con la criopreservación del germoplasma de esta especie representa una estrategia importante para su producción y conservación. Un nuevo método de reproducción asistida que podría contribuir en gran medida a la reproducción en cautiverio de esta especie es el aislamiento y criopreservación de las células germinales primordiales (CGPs) para ser posteriormente trasplantadas en un receptor filogenéticamente próximo, esta técnica presenta ventajas como la disminución de costos por mantenimiento de reproductores además de lograr una efectiva propagación de este organismo para uso en la acuicultura y recuperación de la población natural. Sin embargo, antes de poder realizar la criopreservación y el trasplante de CGPs, es necesario realizar estudios básicos ya que, hasta la fecha, no se tiene ninguna información sobre estas células en la totoaba. De esta manera, en este trabajo se propone identificar y caracterizar las CGPs en larvas de *Totoaba macdonaldi* además de identificar la presencia del gen *Vasa*, característico de estas células.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades de la especie *Totoaba macdonaldi*

La totoaba, *Totoaba macdonaldi*, es un pez teleósteo perteneciente a la familia Sciaenidae. Morfológicamente se distingue por poseer un cuerpo alargado y poco comprimido, con el dorso escasamente elevado, una aleta dorsal con hendidura y boca grande con mandíbula inferior ligeramente proyectada (Rosales y Ramírez, 1987). La coloración de los adultos es gris, aunque pueden presentar tonalidades doradas y azules (Figura 1), mientras que los juveniles tienen manchas oscuras en el dorso (Arvizu y Chávez, 1972). Es uno de los sciaenidos de mayor tamaño, puede llegar a pesar más de 100 kg y medir hasta 2 m de longitud total, aunque la talla media es de 1.30 m (Berdegué, 1962). Son peces longevos, llegan a vivir entre 20 y 25 años, su madurez sexual es tardía, 6 años en los machos y 7 años en las hembras y no presentan caracteres morfológicos externos que diferencien ambos sexos, aunque las hembras alcanzan una mayor talla y peso que los machos (Rosales y Ramírez, 1987; Cisneros-Mata et al., 1995; De Anda-Montañez et al., 2013). En lo referente a sus hábitos alimenticios, son peces carnívoros que se alimentan de pequeños crustáceos y otros peces (Rosales y Ramírez, 1987)



Figura 1. Imagen de una hembra de totoaba, colectada en el archipiélago de las Islas Encantadas, B.C. Fotografía de José L. Niebla. Tomado de Sitio Web Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora (<https://www.iaes.gob.mx/index.php?pag=infografia-de-la-totoaba>)

La totoaba es un pez endémico del Golfo de California. Su distribución comprende desde la desembocadura del Río Colorado, en la zona norte, hasta Bahía Concepción (Baja California Sur), en la costa oeste del Golfo y en el este hasta la desembocadura del Río Fuerte (Jordan y Evermann, 1896).

Presenta un patrón de migración anual en la época primaveral, donde los organismos adultos migran para reproducirse al delta del Río Colorado, situado en el extremo norte del Golfo de California (Figura 2). Se ha probado que en esta zona se encuentra el área de desove y crianza de esta especie. La época de reproducción empieza a finales de febrero o principios de marzo y se extiende hasta los primeros días de junio, aunque las hembras presentan un periodo de máximo desove en mayo (Arvizu y Chávez, 1972; Flanagan y Hendrickson, 1976; Rosales y Ramírez, 1987; Cisneros-Mata et al., 1995). Las larvas recién eclosionadas permanecen en aguas cercanas a la costa y los juveniles de hasta dos años se encuentran en aguas con una profundidad menor de un metro a lo largo de ambas costas del Golfo de California. Cuando alcanzan la edad adulta se desplazan a aguas más profundas por la costa nororiental donde se agrupan en cardúmenes (Rosales y Ramírez, 1987)

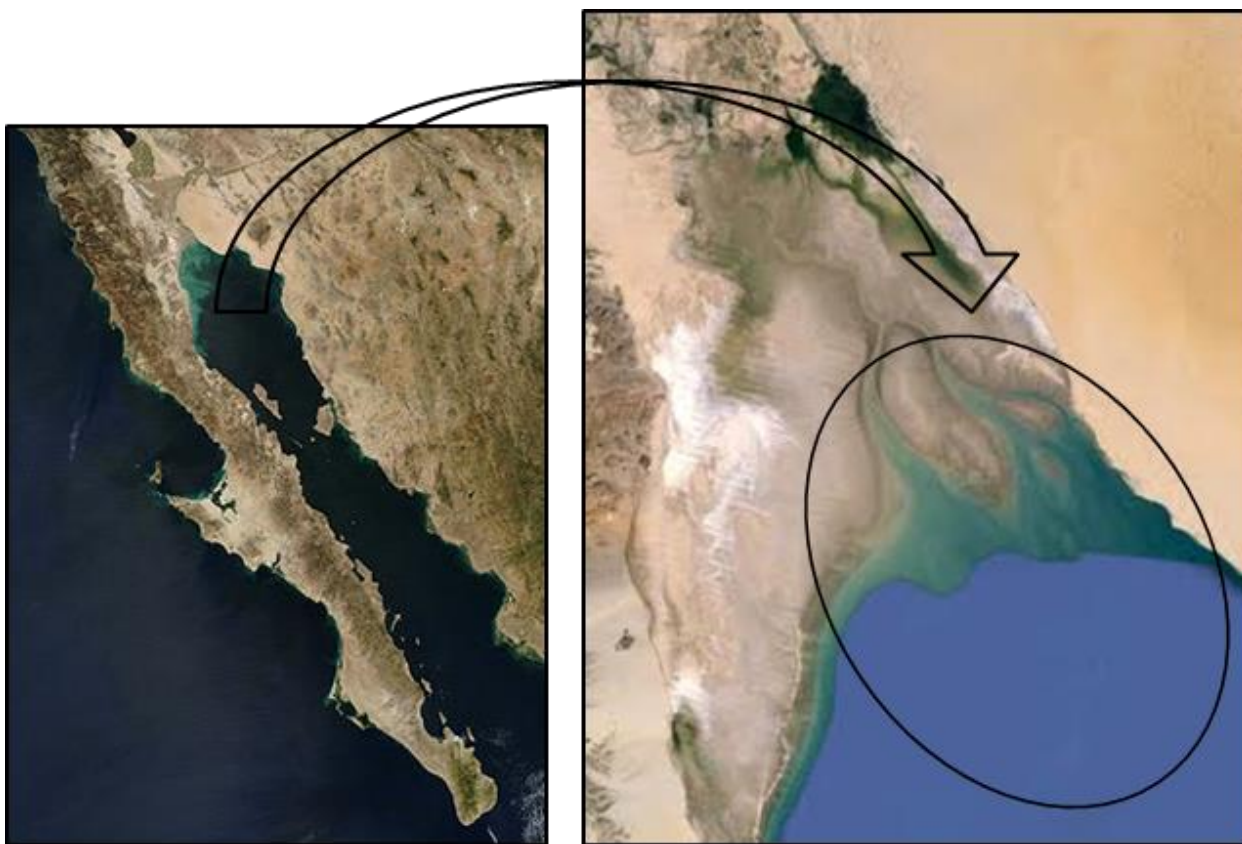


Figura 2. Área de distribución de la especie y delta del Río Colorado donde se ubica la zona de reproducción y desove

1.1.2 Importancia del recurso

La pesquería de la *Totoaba macdonaldi* se estableció en los años 20, el desarrollo de nuevas técnicas de refrigeración y el uso de embarcaciones con mayor capacidad de carga provocó que las capturas anuales de este recurso alcanzaran las 2300 toneladas en 1942 (Rosales y Ramírez, 1987). El aumento del esfuerzo de pesca provocó una notable disminución del recurso que acabó con el cierre de la pesquería en los años 70 (Arvizú y Chávez, 1972).

En 1976, esta especie fue incluida en el apéndice I de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES). En 1991 fue declarada especie en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y desde 1995 está en veda permanente (Arvizu y Chávez, 1972; Valenzuela- Quiñonez et al., 2011; Mata-Sotres et al., 2015).

Estudios recientes atribuyen el descenso poblacional a una combinación de factores antropogénicos como la sobrepesca, la degradación progresiva de su hábitat de desove y crianza, además de la pesca furtiva e incidental (Valenzuela- Quiñonez et al., 2011). La sobrepesca se debió al uso de redes agalleras en zonas de alta densidad como el delta del Río Colorado, unido a la falta de vedas efectivas. En el Alto Golfo, la pesca deportiva también contribuyó al descenso poblacional de la totoaba, debido a la captura de peces de gran tamaño durante la migración reproductiva (Flanagan y Hendrickson, 1976). El deterioro de su hábitat de desove y crianza se debió principalmente al aumento de la salinidad del agua en las zonas naturales de desove, asociada al descenso de flujo debido a la construcción de represas (Hoover y Glen Canyon), lo que provocó cambios en la salinidad, temperatura y patrón de corrientes. Sin embargo, el efecto de estos factores sobre las poblaciones de totoaba no se ha demostrado (Berdegué, 1956; Barrera-Guevara, 1990).

La pesca furtiva, motivada por la elevada demanda de buches (vejigas natatorias) en el mercado oriental, donde pueden alcanzar un valor aproximado de hasta \$18, 000 USD por kg, ha contribuido a deteriorar la población (Chute, 1928). La pesca incidental de fauna de acompañamiento, como juveniles de totoaba, por las redes de arrastre de barcos camaroneros se debió principalmente al incremento de la pesquería de camarón en alta mar (1924-1945). La mortalidad por esta causa se estimó para los años 80 alrededor de 120,000 juveniles/año (Cisneros-Mata et al., 1995).

En las últimas dos décadas se han realizado esfuerzos para recuperar las poblaciones naturales, lo que ha dado como resultado el conocimiento de su biología reproductiva (True et al., 1997, 2001), el

desarrollo larvario (Díaz-Viloria et al., 2013) o aspectos nutricionales (Rueda -López et al., 2011; Badillo-Zapata et al., 2014; Fuentes-Quesada et al., 2018), pero el desarrollo de la línea germinal no se ha estudiado desde un punto de vista molecular. Además, una estrategia prometedora para mejorar los esfuerzos de conservación es la criopreservación de las CGPs de totoaba para preservar el acervo genético (Yamaha et al., 2007). Mediante técnicas de reproducción asistida, estas células aisladas de embriones donantes pueden ser trasplantadas en larvas receptoras filogenéticamente cercanas, lo que permite la producción de gametos con la carga genética del donante.

1.1.3 Técnicas de reproducción asistida

La industria pecuaria y en particular el sector correspondiente a la crianza de ganado bovino, productor de leche, se ha visto especialmente favorecida por el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida y criopreservación de esperma , contribuyendo a la producción de animales con características productivas superiores, mejorando la administración de los recursos destinados al manejo de reproductores, e incluso brindando la posibilidad de recuperar una población dada en caso de presentarse algún desastre natural (Simianer, 2005, Groeneveld et al., 2010, Diez et al., 2012, Trigal et al., 2012, Mara et al., 2013).

En épocas más recientes, se ha despertado el interés en desarrollar e incorporar las técnicas de reproducción asistida y criopreservación de gametos en organismos acuáticos, particularmente en peces de importancia alimenticia como el salmón o la trucha, en moluscos bivalvos de alto valor comercial, en organismos acuáticos utilizados como modelos animales en laboratorios y, por supuesto, en organismos con gran necesidad de ser protegidos de la extinción (Stoss y Refstie, 1983, Conget et al., 1996, Kawamoto et al., 2007, Goyard et al., 2008, Mazur et al., 2008).

En la última década el trasplante de células germinales se ha considerado una técnica de reproducción asistida prometedora para la conservación y propagación de especies en peligro de extinción y recursos genéticos valiosos (Majhi et al., 2009; Robles et al., 2017). Esta técnica se ha llevado a cabo con éxito en especies como el “pearl danio” (*Danio albolineatus*) donde las CGPs trasplantadas generaron gametos del donante en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) (Saito et al., 2008). En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), las CGPs de trucha pudieron colonizar las crestas germinales del salmón masu (*Oncorhynchus masou*) y diferenciarse en células germinales masculinas y femeninas en las gónadas del

salmón (Takeuchi et al., 2004). Además, las CGPs se pueden criopreservar por periodos prolongados antes del trasplante y pueden restablecer la espermatogénesis cuando son trasplantadas en el receptor, generando gametos funcionales con la carga genética del donante (Kobayashi et al., 2007).

Los primeros estudios sobre el trasplante de células germinales fueron realizados por Brinster et al. (1994) en ratones, en donde se inoculó una suspensión de células del testículo del donante fértil en el lumen del túbulo seminífero de un ratón infértil. El resultado de este estudio fue que las células germinales primordiales (CGPs) presentes en la suspensión del donante fueron capaces de colonizar los túbulos seminíferos restableciendo la espermatogénesis. Esta técnica, además de abrir nuevos campos de investigación básica, se reveló como una herramienta muy útil para la reproducción asistida de otras especies, lo que la ha convertido en objeto de estudio en los últimos años. Aunque el uso de CGPs, está relativamente bien establecido en mamíferos, su aplicación en peces es reciente (Ciruna et al., 2002; Takeuchi et al., 2009; Lacerda et al., 2012).

En peces existen diferentes métodos de trasplantes que dependen principalmente de la fase de desarrollo en la que se encuentran el donante y el receptor, que pueden ser un embrión, una larva en los primeros estadios del desarrollo o un organismo adulto.

En organismos adultos (Figura 3), cuya gónada está completamente desarrollada, se ha implementado una técnica, que consiste en obtener una suspensión de espermatogonias de los testículos del donante, este tipo de trasplante permite producir óvulos y espermatozoides funcionales derivados de la espermatogonia (Yoshizaki et al., 2011). Lacerda y colaboradores (2010) fueron pioneros en esta técnica, extrajeron una suspensión de espermatogonias tipo A de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), y la marcaron con el colorante PKH26-GL, que tiñe de rojo la membrana celular. Esta suspensión, formada por espermatogonias, fue trasplantada a través de la papila urogenital en un receptor adulto el cual tenía la espermatogénesis endógena suprimida debido a la administración de una droga citostática, el busulfán (1,4-butanediol dimetansulfonato) en combinación con altas temperaturas (35 °C) (Figura 3). Este método confirmó la posibilidad de utilizar peces adultos como receptores de las células germinales. En los estudios realizados por Majhi y colaboradores (2009) con el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), las células germinales de un juvenil donante se aislaron mediante un gradiente de densidad utilizando percoll, y posteriormente se realizó un trasplante que consistió en una inyección con una suspensión de espermatogonias tipo A, implantadas en la papila urogenital del receptor adulto con la espermatogénesis endógena reprimida. El resultado de este estudio fue que las espermatogonias consiguieron colonizar la gónada del receptor adulto y desarrollarse como gametos funcionales derivados del donante. En pez cebra

(*Danio rerio*) se realizó un trasplante de células precursoras de espermatogonias (SSCs) en un receptor hembra, consiguiendo que estas células derivasen en células germinales femeninas, lo que confirmó la plasticidad de estas células (Nóbrega et al., 2010). Esta técnica también se ha aplicado en forma exitosa en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), donde se aisló una suspensión de espermatogonias de la trucha y se implantaron en la cavidad peritoneal de larvas de salmón triploide (*Oncorhynchus masou*) de ambos sexos. Las espermatogonias de trucha se desarrollaron en la gónada del salmón receptor, reanudando la gametogénesis y produciendo espermatozoides y óvulos en los salmones receptores (Yoshizaki et al., 2011).

La principal ventaja que conlleva este trasplante es la accesibilidad del material de partida, siendo el testículo diferenciado un órgano fácil de reconocer en los peces teleósteos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la suspensión de espermatogonias inyectada, contiene células germinales en distintas fases de desarrollo y que solo las espermatogonias tipo A son capaces de colonizar y proliferar en el esbozo gonadal de la larva receptora (Okutsu et al., 2006)

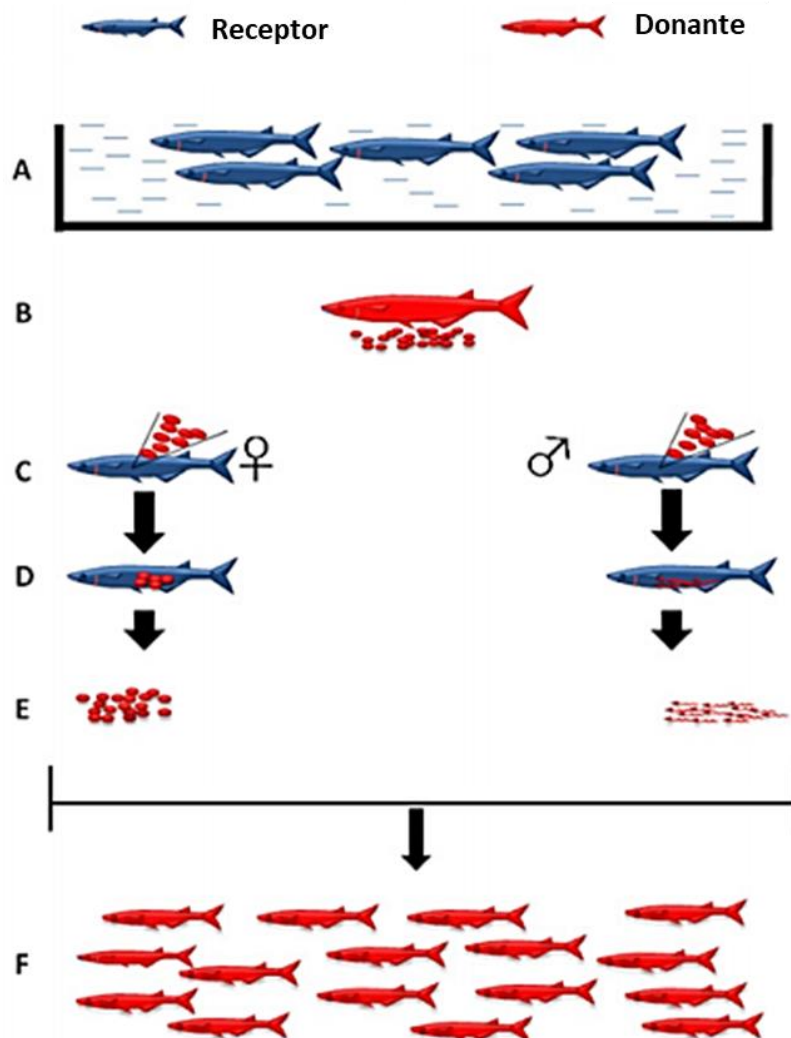


Figura 3. Trasplante de células germinales en peces adultos. **(A)** Las células germinales endógenas de los receptores, se reducen mediante tratamientos térmicos y químicos. **(B)** Una suspensión de espermatogonias es cosechada del pez donante. **(C)** Las células se tiñen con colorante fluorescente y se trasplantan en el receptor a través de la papila urogenital. **(D)** Meses después del procedimiento, las células trasplantadas se diferencian en gametos funcionales con la carga genética del donante. **(E)** Los peces subrogados son inseminados artificialmente o se les permite el desove natural. **(F)** Producción de progenie de origen donante (Tomado de Majhi y Kumar, 2017).

Para realizar un trasplante de CGPs en organismos que están en fase embrionaria (Figura 4), se utilizan técnicas de micromanipulación. Las CGPs se obtienen de embriones donantes y se trasplantan en el blastodisco del receptor embrionario, que tiene bloqueado el desarrollo de las CGPs endógenas por una inyección de *dead end* (MO). El resultado es el reemplazo total de las CGPs del receptor por las del donante, una de las principales ventajas de este método es que el sistema inmune de los embriones de peces no está desarrollado y por tanto no hay rechazo de las CGPs trasplantadas. La desventaja que presenta esta

técnica es la elevada mortalidad embrionaria (Ciruna et al., 2002; Giráldez et al., 2005; Lacerda et al., 2012).

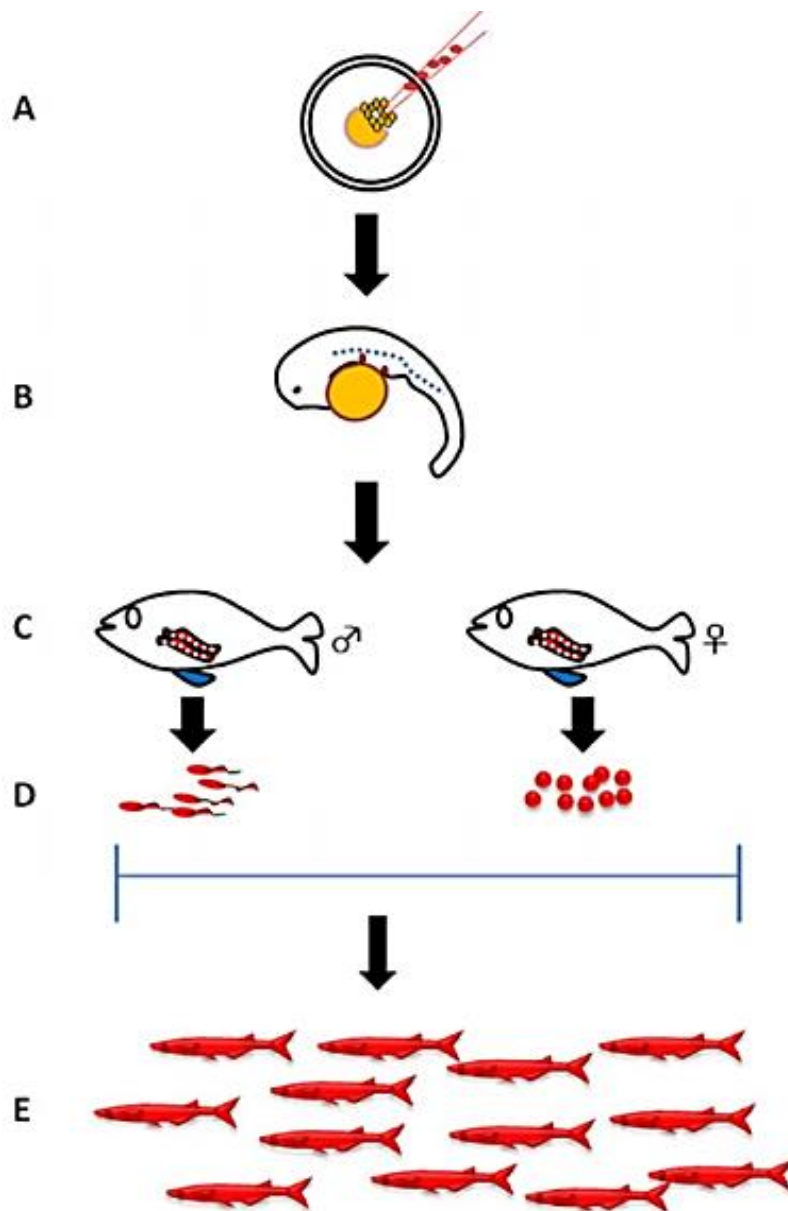


Figura 4. Trasplante de CGPs en embriones de peces. **(A)** Las CGPs se microinyectan en el blastodisco de los embriones receptores. **(B)** Las CGPs del donante migran y colonizan la cresta gonadal del embrión receptor. **(C)** Las CGPs proliferan y se diferencian en gametos funcionales derivados del donante cuando los peces alcanzan la madurez sexual. **(D)** Los peces subrogados maduros liberan gametos funcionales con la carga genética del donante. **(E)** Generación de progenie subrogada por inseminación artificial o desove natural (Tomado de Majhi y Kumar, 2017).

En las larvas recién eclosionadas (Figura 5), este último método de reproducción asistida es el más utilizado en los peces, las células germinales primordiales (CGPs) son aisladas cuando el donante está en

los primeros estadios del desarrollo larval, posteriormente son inyectadas en la cavidad peritoneal de las larvas recién eclosionadas, durante el período en que las CGPs endógenas de las larvas receptoras están migrando. Las células trasplantadas colonizarán el primordio gonadal del receptor. Si el receptor es hembra las células germinales se diferenciarán en óvulos y si es macho en espermatozoides. Estas células portarán el material genético del donante, de quien proceden las CGPs. Este tipo de trasplantes debe realizarse entre especies filogenéticamente cercanas y en las fases de desarrollo adecuadas para que la migración se dé correctamente (Takeuchi et al., 2003; Lacerda et al., 2006; Cabrita et al., 2013).

Las larvas recién eclosionadas son un buen receptor porque carecen de un sistema inmunitario funcional y por tanto las CGPs implantadas no provocarían una respuesta inmune de rechazo (Majhi y Kumar, 2017). Sin embargo, en este enfoque la única desventaja es que los gametos derivados del donante podrían ser generados aproximadamente 2-3 años después del trasplante, dependiendo del periodo en el que el receptor madure sexualmente por primera vez.

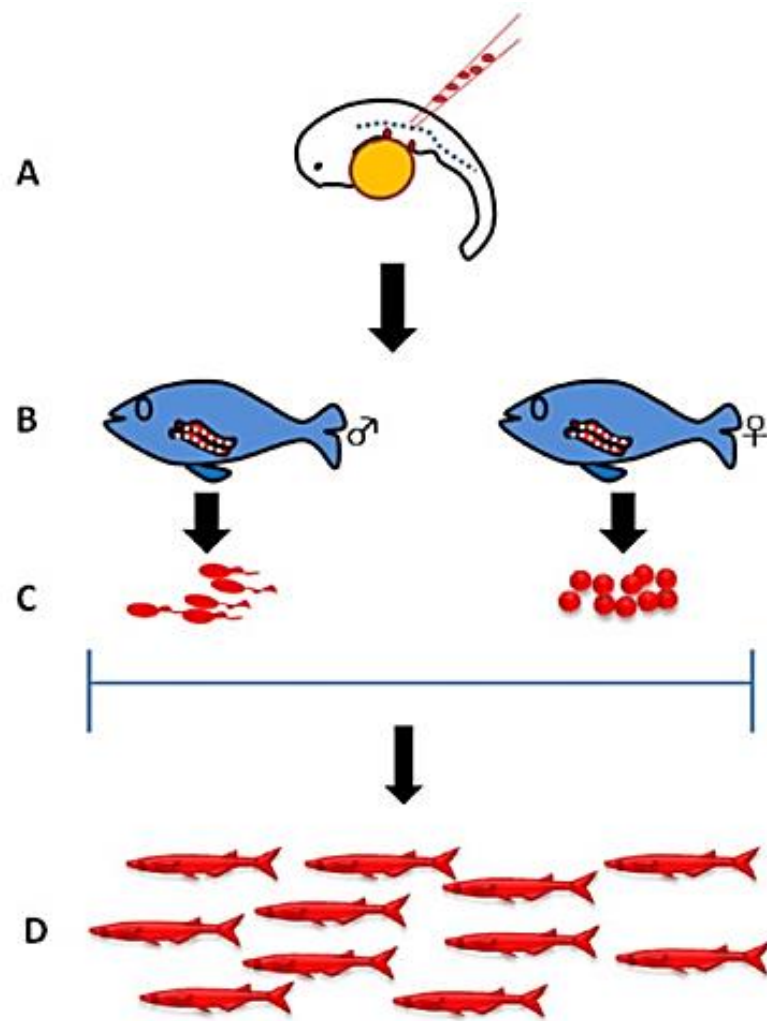


Figura 5. Trasplante de células germinales en larvas recién eclosionadas. **(A)** Las CGPs del donante se trasplantan en la cavidad celómica de la larva recién eclosionada durante el período en el que las CGPs endógenas están en migración activa. **(B)** Las CGPs trasplantadas migran y colonizan las crestas germinales del receptor. **(C)** Después de alcanzar la madurez sexual, el receptor producirá gametos derivados del donante. **(D)** Generación de la progenie por inseminación artificial o desove natural (Tomado de Majhi y Kumar, 2017).

La falta de técnicas de criopreservación de ovocitos y embriones de peces, ha dado lugar al desarrollo de técnicas de reproducción asistida basadas en el trasplante de CGPs. En la actualidad, la criopreservación y posterior trasplante de CGPs es una herramienta muy valiosa que ha permitido producir óvulos y espermatozoides funcionales de especies en peligro de extinción o que poseen rasgos genéticos deseables.

Estas células han sido criopreservadas con éxito en algunas especies de peces como salmón en el que se criopreservó el primordio gonadal con las CGPs, tras la descongelación y el posterior trasplante de

las CGPs en la cavidad peritoneal de una larva de trucha se constató que esas células dieron lugar a ovocitos. Los huevos fertilizados con espermatozoides criopreservados dieron lugar a una F1 fértil (Kobayashi et al., 2007). Higaki y colaboradores (2009) lograron la vitrificación de embriones de pez cebra completos, cuando los descongelaron lograron recuperar CGPs viables que fueron trasplantadas con éxito.

1.1.4 Células germinales primordiales

Las células germinales primordiales (CGPs) son los precursores embrionarios de los gametos, y se observan, mayoritariamente, en organismos donde la gónada no está morfológicamente desarrollada y las células sexuales no están diferenciadas (Extavour y Akam, 2003; Rosner et al., 2009). La diferenciación se produce a través de procesos de espermatogénesis y ovogénesis donde las gonias se convierten en ovocitos y espermatocitos que maduran finalmente hasta convertirse en óvulos y espermatozoides (Braat et al., 1999). El origen de estas células sexuales son las CGPs y, a su vez, los precursores de estas últimas, son las células germinales primordiales presuntivas (pCGPs), que inicialmente no se distinguen morfológicamente de las células somáticas que las rodean y se dividen mitóticamente para producir una CGP y una célula somática (Extavour y Akam, 2003; Rosner et al., 2009).

Las CGPs son bipotenciales, es decir, son capaces de originar cualquier tipo de gameto, ya sea masculino o femenino. Morfológicamente hablando presentan un gran tamaño con respecto a las células somáticas, una elevada relación núcleo-citoplasma y forma ovalada con contornos irregulares. Presentan un solo nucléolo, citoplasma con pocos organelos y algunas mitocondrias de gran tamaño situadas cerca del núcleo que se encuentran ligadas a unos cuerpos germinales denominados *ciment* (Le Menn et al., 2007).

1.1.4.1 Origen de las CGPs

Las CGPs se diferencian de las células somáticas durante el desarrollo embrionario mediante dos mecanismos: la epigénesis y la preformación. La epigénesis sostiene que las CGPs se originan en las crestas germinales como resultado de señales inductivas procedentes del ectodermo extraembrionario y que, por lo tanto, su diferenciación depende de su posición en el organismo (Extavour y Akam, 2003). Por otro lado, la preformación es el mecanismo que incluye la existencia de determinantes maternos pre-localizados en

el huevo, denominados plasma germinal. Estos determinantes son un conjunto de proteínas citoplasmáticas y ARNm almacenados en el ovocito durante las primeras etapas de la ovogénesis (Gilbert, 2006).

La principal diferencia entre epigénesis y preformación es el momento en el cual se expresan los genes específicos de la línea germinal (*Vasa*, *Nanos*, *Dazl*, *Piwi*, *Dead end* entre otros) y la localización de sus productos en la célula. En la epigénesis, común en mamíferos, los productos de estos genes no están presentes en el citoplasma del óvulo fertilizado y por lo tanto no pueden ser heredados a las CGPs; además, los genes involucrados en la migración y supervivencia de las CGPs son activados a través de señalización célula-célula (Figura 6.A). En la preformación, los productos persisten en el citoplasma hasta completar la ovogénesis y por lo tanto están disponibles para su inclusión en las CGPs antes del inicio de la transcripción en las células del embrión (Figura 6.B).

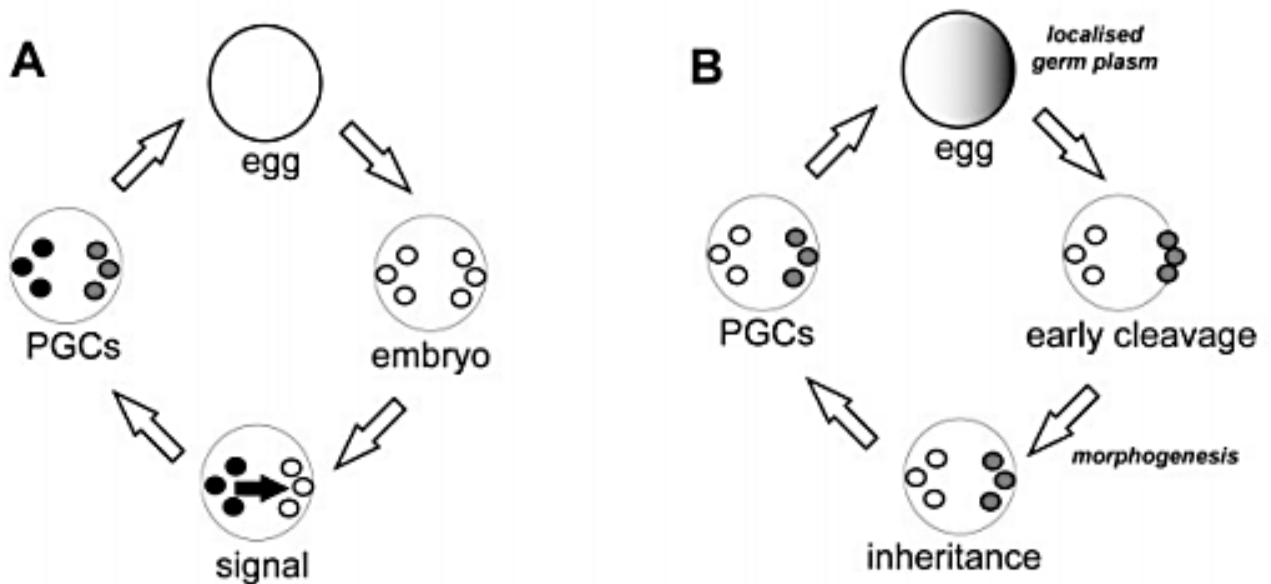


Figura 6. (A) Epigénesis y preformación. Epigénesis: Moléculas específicas de la línea germinal no están presentes en los ovocitos durante la fertilización. Durante la embriogénesis señales inductivas (negro) inducen la formación de las CGPs dando comienzo a la expresión de genes específicos de la línea germinal (gris oscuro). **(B)** Preformación: Los determinantes maternos de la línea germinal (gris claro) se localizan en el citoplasma del ovocito y son heredados por las CGPs en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Figura tomada de Extavour, 2007).

Aunque ambas estrategias se pueden observar en el reino animal, la epigénesis está más extendida (Fig. 7) y se cree que evolutivamente es el mecanismo más antiguo.

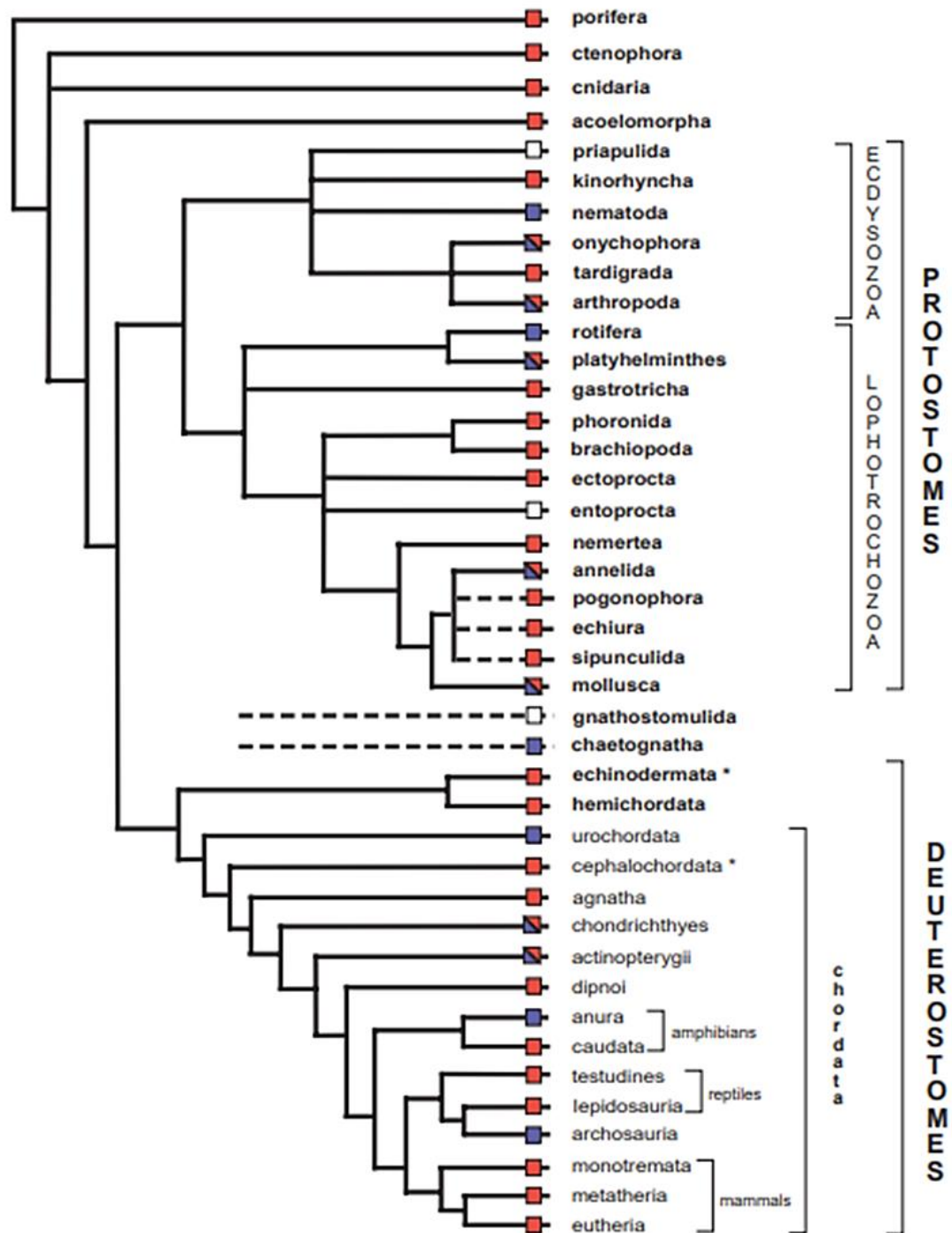


Figura 7. Modos de especificación de las células germinales en Metazoos: rojo, epigénesis; azul, preformación; medio rojo, medio azul, grupos en los que algunas especies muestran preformación y otras epigénesis; blanco, sin datos. Los asteriscos indican filos en los que se ha reivindicado la epigénesis, pero recientes datos sugieren preformación (Tomado de Extavour y Akam, 2003).

Epigénesis

La epigénesis es el mecanismo de diferenciación de las CGPs más común en el reino animal, la principal diferencia entre este mecanismo de diferenciación y la preformación es la ausencia del plasma germinal en el primero.

El mecanismo epigenético para la especificación de línea germinal fue demostrado experimentalmente por Tam y Zhou (1996), quienes realizaron un experimento en un embrión de ratón (*Mus musculus*), que consistió en aislar células del epiblasto proximal y distal y trasplantarlas en forma heterotópica y ortópica en dos hospederos (Figura 8). Los resultados de este estudio mostraron que, aunque las células del epiblasto distal (D) se diferencian predominantemente en neuroectodermo y ectodermo superficial, cuando se trasplantaron a la región proximal del epiblasto (P) del hospedero, dieron lugar a tejidos mesodérmicos. Además, el 3.7% de las células trasplantadas del epiblasto distal al proximal se diferenciaron en CGPs, frente al 3.9% del trasplante ortotópico (proximal- proximal). Las células del epiblasto proximal (P), que darían origen a las CGPs, trasplantadas heterotópicamente al epiblasto distal no se diferenciaron en células del mesodermo ni CGPs. Esta plasticidad confirmó la hipótesis de que la diferenciación de las CGPs en mamíferos está influenciada por la posición de las células en el embrión y por interacciones célula-célula.

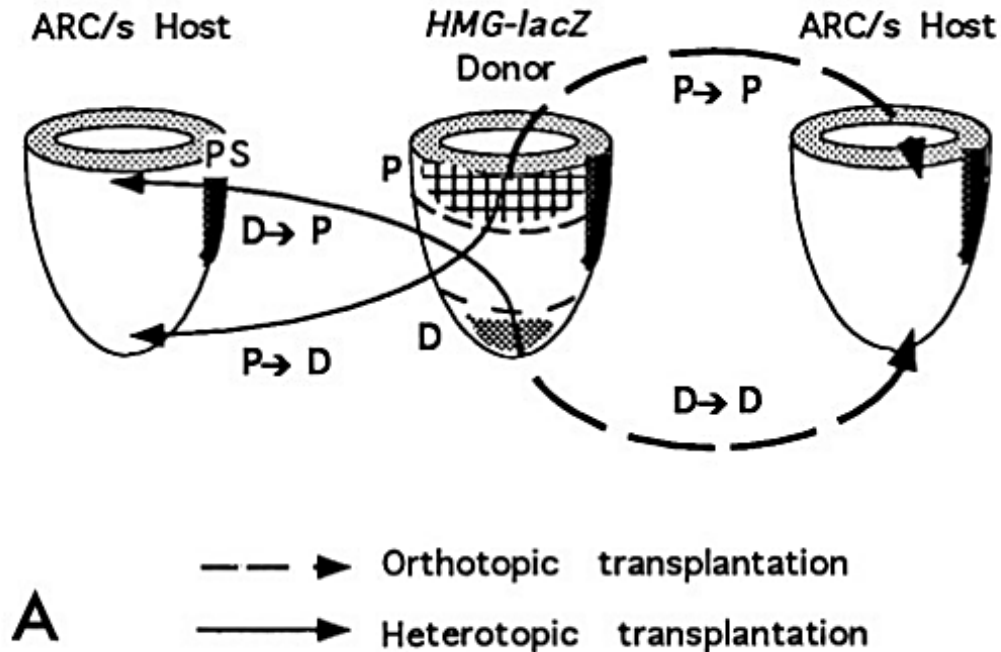


Figura 8. Ilustración esquemática de los cuatro tipos de trasplantes realizados en embriones de ratón durante la fase de desarrollo temprano. El epiblasto del embrión donante *HMG-lacZ* se disecó en fragmentos proximal (P) y distal (D) cortando a lo largo de las líneas punteadas. Se aislaron grupos de 5-20 células de ambos fragmentos y se realizó un trasplante ortotópico (D→D, P→P) y otro heterotópico (D→P, P→D) (Tomado de Tam y Zhou, 1996).

Investigaciones posteriores sobre cómo estas células epiblasticas pluripotentes se diferenciaban en CGPs dieron como resultado el descubrimiento de factores reguladores pertenecientes a la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), aunque su mecanismo de acción a nivel molecular todavía no está claro, se sabe que estas proteínas están involucradas en la supervivencia y migración de las CGPs en mamíferos. El bloqueo de los genes que codifican estas proteínas demostró que la señalización de BMP es esencial para la formación de células germinales primordiales (CGPs) y que los embriones deficientes de *ALK2*, un receptor de BMP en el endodermo visceral (VE), carecían completamente de CGPs (Lopes et al., 2004).

Otros estudios realizados en ratón (*Mus musculus*) para conocer la localización celular de la proteína VASA (MVH) durante el desarrollo de células germinales, demostraron que la proteína MVH se detectaba en las CGPs únicamente después de la colonización de las gónadas embrionarias. Estos resultados descartaron un origen materno de la proteína y por tanto la expresión del gen *Vasa* estaría causada por la interacción entre células germinales y células somáticas gonadales, reforzando la hipótesis

del origen de las CGPs mediante señales inductivas en mamíferos (Toyooka et al., 2000; Fujiwara et al., 2001).

Preformación

La preformación es el mecanismo de diferenciación presente en organismos modelo como *Drosophila melanogaster* (Williamson y Lehmann, 1996), *Xenopus laevis* (Whittington y Dixon, 1975) y *Caenorhabditis elegans* (Hird et al., 1996), este mecanismo implica la existencia del plasma germinal, que se sintetiza durante el estadio I de la ovogénesis y está restringido a unas pocas células del embrión. Este plasma germinal está formado por gránulos de ARNm y partículas proteicas muy importantes en la regulación, almacenamiento y estabilidad del ARN.

En 1974, Illmensee y Mahowald realizaron un experimento (Figura 9) en el cual trasplantaron el plasma germinal del polo posterior al polo anterior del huevo de *Drosophila melanogaster*, los resultados mostraron que las CGPs se formaron en la zona donde se realizó el trasplante heterotópico, concluyendo que el plasma germinal tiene todos los componentes necesarios para formar las CGPs y por tanto estas células tienen una mayor autonomía que las originadas por mecanismos inductivos.

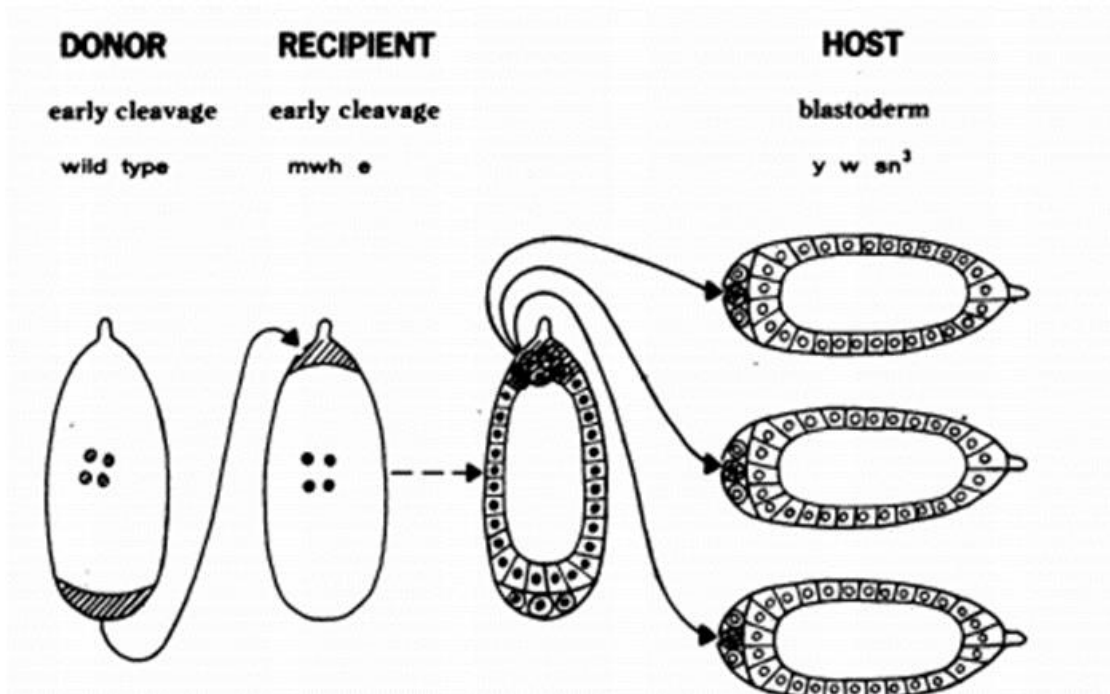


Figura 9. Se trasplantó el plasma del polo posterior del embrión donante al polo anterior del receptor (zona sombreada). Las células que se formaron en el lugar del trasplante presentaron una morfología muy similar a las CGPs. Estas células fueron aisladas y trasplantadas en embriones hospederos donde generaron gametos viables (Tomado de Illmensee y Mahowald, 1974).

La preformación se ha identificado en los peces como el mecanismo de especificación mayoritario (Tabla 1), aunque todavía no se ha establecido como común para todos los grupos. En el pez modelo de los teleosteos, el pez cebra (*Danio rerio*), la microscopía electrónica de transmisión ha demostrado que el ARNm del gen *Vasa* reside en una matriz electro-densa que es característica del plasma germinal (Knaut et al., 2000). Estos hallazgos respaldan la opinión de que la especificación de la línea germinal en este pez, depende del material suministrado por la madre y valida la idea de que el mecanismo que origina las CGPs en pez cebra es la preformación

Se ha sugerido un mecanismo epigenético para la especificación de las CGPs en taxones como los peces cartilagosos. Estudios realizados en la subclase Elasmobranchii (Tabla 1), sugieren que el origen de las CGPs no se debe a alguna “partícula” presente durante el desarrollo embrionario temprano, sino a una señalización célula- célula en la zona del epitelio germinal de la gónada (Extavour y Akam, 2003; Presslauer et al., 2012). Esta diferencia entre los peces cartilagosos y los teleosteos se puede deber a que muchos de los aspectos reproductivos de los peces cartilagosos conservaron una condición primitiva (Dodd, 1983).

Tabla 1. Mecanismo de formación de las CGPs en algunas especies de peces

Especie	Gen marcador	Mecanismo origen CGPs	Conclusiones del estudio	Referencia
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	<i>Vasa</i>	Preformación	RNA <i>Vasa</i> presente en los embriones justo después de la fertilización y, por lo tanto, es suministrado por la madre. <i>Vasa</i> se detectó en los planos de escisión en el estadio de 2-4 células. Durante las divisiones posteriores, el ARN es segregado como agrupaciones subcelulares a un pequeño número de células que pueden ser las futuras CGPs.	Yoon et al., 1997
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	<i>Vasa</i> <i>nanos 1</i>	Preformación	Alteraciones en el entorno somático no alteraron el número de CGPs en medaka, lo que es inconsistente con un modelo inductivo que depende de las señales de las células somáticas. La presencia de determinantes citoplásmicos heredados de la madre confirman la hipótesis.	Herpin et al., 2007
Bacalao del Atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	<i>Vasa</i> , <i>nanos3</i>	Preformación	La expresión de los genes <i>Vasa</i> y <i>nanos 3</i> , se detectó a partir de las primeras divisiones embrionarias en el bacalao del Atlántico; el ARNm de ambos genes estaba presente desde la etapa de 32 células y se segregó en 4 células, confirmando la hipótesis de la preformación	Presslauer et al., 2012
Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	<i>Vasa</i> , <i>Dead end</i> y <i>lymphocyte antigen 75</i>	Preformación	Los transcritos de <i>Vasa</i> , <i>dnd</i> y <i>ly75</i> estuvieron presentes durante todo el desarrollo embrionario y alcanzaron sus niveles más altos en la embriogénesis temprana, entre las etapas de dos células y 10 somitas. Esto sugirió que los tres ARNm son de herencia materna.	Nawasaga et al., 2013
Esturión (<i>Acipenser</i>)	<i>Buc</i> <i>nanos 3</i>	Preformación	Las CGPs surgen en posición extraembrionaria y migran durante el desarrollo embrionario con un patrón similar al de otros teleósteos. El marcaje mostró que las CGPs se especifican por herencia del plasma germinal suministrado por la madre.	Saito et al., 2014
Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	<i>Vasa</i>	Preformación	Se detectó presencia de ARNm de <i>Vasa</i> en etapas anteriores a la blástula media, lo que sugiere su acumulación durante la ovogénesis y por tanto es heredado por vía materna.	Pachiarini et al., 2012

Tabla 1 (cont.)

Especie	Gen marcador	Mecanismo origen CGPs	Conclusiones del estudio	Referencia
Mielga (<i>Squalus acanthias</i>)	-	Epigénesis	Las células germinales surgieron del epitelio germinal de la gónada.	Woods, 1902
Raya (<i>Raja batis</i>)	-	Epigénesis	No se encontró evidencia que indique que el origen de las células germinales se deba a alguna célula/s o partícula presente durante el desarrollo embrionario temprano.	Beard, J., 1902
Raya (<i>bathyraja aleutica</i>)	-	Epigénesis/ preformación	Se observaron CGPs en la cresta germinal y se asume que pudieron migrar desde otra zona del embrión. No hay información concluyente sobre el origen de las CGPs.	Teshima y Tomonaga, 1986

1.1.4.2. Migración de las CGPs

El origen y la posición donde se especifican las CGPs puede diferir en función de la especie, pero un tema común para las especies estudiadas es que las CGPs se forman en regiones alejadas de la zona donde se formará el primordio gonadal y por tanto tienen que migrar (Weidinger et al., 1999). La mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), ratón (*Mus musculus*) y pez cebra (*Danio rerio*), en todos estos organismos se encontró que siguen una ruta cercana al intestino en desarrollo, moviéndose a lo largo del eje ventro-dorsal del embrión.

Aunque la ruta migratoria esté conservada, el tiempo de migración de las CGPs es especie-específico (Tabla 2) y está condicionado al tamaño y forma del huevo, pero sobre todo a velocidad a la que ocurre el desarrollo embrionario. En *Salmo salar* la migración se completa a los 83 días después de la fecundación (DDF) y la proliferación de las CGPs ocurre a los 139 DDF (Nawasaga et al., 2013), debido a la temperatura a la que ocurre el desarrollo del embrión (10 °C).

En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), las CGPs alcanzan la cresta germinal, completando su migración a los 20 DDF, mientras que la fase de proliferación comienza aproximadamente a los 15 DDF y continúa hasta que se produce la diferenciación sexual aproximadamente a los 60 DDF (Okutsu et al., 2006)

Tabla 2. Tiempo de proliferación y migración de las CGPS en diferentes especies de peces teleósteos.

Especie	Tiempo finaliza migración CGPs	Tiempo inicia proliferación CGPs	Referencia
Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	83 DDF	139 DDF	Nawasaga et al., 2013
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	7 DDF	12 DDF	Tzung et al., 2015
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	15 DDF	20 DDF	Okutsu et al., 2006
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	6-8 DDF	11 DDF	Farlora et al., 2014
Lenguado Japonés (<i>Paralichthys Olivaceus</i>)	15 DDE	22 DDE	Yang et al., 2018
Atún aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)	5DDF	10-30 DDF	Kobayashi et al., 2015
Sábalo americano (<i>Alosa sapidissima</i>)	56 HDF	No se observó	Wu et al., 2018
Corvina (<i>Nibeas mitsukurii</i>)	17DDF	23 DDF	Takeuchi et al. al., 2009

*DDF: Días después de la fertilización; DDE: Días después de la eclosión; HDF: horas después de la fertilización

Numerosos estudios se han centrado en investigar los mecanismos moleculares que determinan la migración de las CGPs a largas distancias para alcanzar la cresta germinal. Su movimiento se debe a señales direccionales producidas por los tejidos adyacentes (Anderson et al., 1999). Se ha demostrado que esas señales son factores quimiotácticos generados por las células somáticas del primordio gonadal. Los factores quimiotácticos son sustancias químicas que atraen o repelen a las células y que las guían a su destino a lo largo de un gradiente de concentración.

En el pez cebra, las CGPs de un embrión en fase de blástula experimentan una transición de células inmóviles a una población de células con movimientos activos (Blaser et al., 2006). Al iniciar la migración, las CGPs modifican sus características estructurales, adquiriendo una forma alargada. Estos cambios morfológicos les permiten dirigirse hacia el primordio gonadal. El arrastre celular comprende tres pasos: 1. En el borde director de la célula, aparecen protrusiones que se extienden hacia adelante. 2. Las protrusiones se anclan al sustrato mediante proteínas transmembranales de tipo integrina, creando adhesiones focales. 3. La parte posterior de la célula se disocia del sustrato, mediante la ruptura de las adhesiones y, posteriormente se retrae, a consecuencia de lo cual se produce la translocación (Alberts et al., 2013).

Aunque el mecanismo molecular implicado en el inicio del movimiento de las CGPs en los teleósteos no está claro, se cree que depende de la actuación de dos genes que codifican factores quimiotácticos: El *Dead end (Dnd)*, que codifica una proteína de unión al ARN llamada dead end y el *PI3K* que codifica una fosfatidilinositol 3-quinasa. Weidinger et al. (2003) encontraron que el factor Dnd, que está presente en el plasma germinal, es esencial para la formación de los pseudópodos en las CGPs del pez cebra. Cuando se bloqueó el gen que codifica este factor, las CGPs no pudieron iniciar el movimiento. Dumstrei et al. (2004) demostraron que en las CGPs en las que no se expresa el *PI3K* muestran una reducida estabilidad de los filopodios, así como una menor velocidad de migración.

Una vez iniciado el movimiento, otra señal quimiotáctica que actúa como atrayente de las CGPs hacia la zona donde se formará el primordio gonadal en pez cebra es el Factor derivado del estroma 1 (SDF-1). Esta proteína se sintetiza en las células somáticas de la cresta gonadal. Se ha observado que este factor, además de servir como guía, está involucrado en la polimerización de los filamentos de actina y, por lo tanto, en el movimiento ameboides del citoesqueleto de las CGPs (Doitsidou et al., 2002). Blaser et al. (2006) observaron la generación de protuberancias en la membrana celular de las CGPs de pez cebra como resultado de la activación de la contracción de la miosina. Este estudio determinó que estas protrusiones se formaban en la parte de la célula con mayor concentración de SDF-1, lo que sugiere que este factor también controla la dirección de la migración.

Cuando las CGPs llegan al área donde se formará el primordio gonadal pierden movilidad, aunque a nivel molecular se desconoce cómo se termina esa migración. Un estudio realizado por Reichman-Fried et al. (2004) indica que el aumento de la concentración del factor SDF-1 en la zona que dará origen a la gónada está directamente involucrado en la pérdida de movilidad de estas células. En *Totoaba macdonaldi* no se han realizado estudios que permitan conocer los factores quimiotácticos que permiten el movimiento de las CGPs, aunque teniendo en cuenta que es un mecanismo bien conservado, podríamos pensar que no difieren de los del pez cebra.

1.1.4.3. Proliferación de las CGPs

Cuando las CGPs llegan a las crestas germinales, cesa la migración y comienza su proliferación. En la actualidad la base molecular de la proliferación no está clara, aunque se cree que está controlada por las células somáticas circundantes. Se ha demostrado que la proliferación de las CGPs desempeña un

papel importante en la diferenciación sexual de teleósteos. Recientemente se ha demostrado que la proliferación de las CGPs en las primeras etapas del desarrollo larval, marca el comienzo de la diferenciación sexual en *D. rerio* (Tzung et al., 2015).

Las CGPs de ratones y otros mamíferos aumentan en número durante e inmediatamente después de la migración, mientras que las de los peces tienden a proliferar después de alcanzar las crestas genitales (Yoshizaki et al., 2002). Con base en este hallazgo, es posible que la proliferación de las CGPs en peces requiera una interacción cercana con las células somáticas gonadales, pero no con las células somáticas ubicadas en su ruta de migración y que los dos procesos también estén mediados por diferentes vías de señalización.

Las moléculas de señalización y las vías que se requieren para la proliferación de las CGPs en peces no han sido identificadas, aunque se presume que hay factores de crecimiento involucrados en la proliferación y que se expresan en las células somáticas de la cresta germinal. En embriones de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se identificó una nueva citoquina, designada como factor de crecimiento derivado del soma gonadal (GSDF), que es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento TGF – β 1. GSDF se expresó en las células somáticas de la cresta germinal durante la embriogénesis. La inhibición de la traducción de GSDF suprimió la proliferación de las CGPs. Estos resultados indican que GSDF juega un papel importante para la proliferación de las CGPs (Sawatari et al., 2007).

1.1.6 Genes específicos de la línea germinal

Independientemente de su origen, las CGPs se separan de las células somáticas durante el desarrollo embrionario y adquieren un programa único de expresión génica que resulta en la síntesis de proteínas específicas de las CGPs, que las diferencian de las células somáticas (Tabla 3). Los mecanismos que controlan la expresión génica específica de la línea germinal son en gran parte desconocidos. Lo que sí se sabe es que las CGPs tienen un mecanismo para evitar la diferenciación celular en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Lehmann et al., 2009). El silenciamiento génico o bloqueo de la expresión génica, característico de las CGPs, puede ser transcripcional o postranscripcional. El transcripcional es el resultado de la modificación estructural de la cromatina impidiendo la traducción, mecanismos como la metilación de la citosina o la modificación de las colas de las histonas provocan alteraciones en la transcripción sin alterar la molécula de ADN (Marlow et al., 2017). El silenciamiento

postranscripcional implica la degradación del ARNm de un gen específico impidiendo que se sintetice la correspondiente proteína. Todas las células tienen el mismo ADN, sin embargo, las CGPs tienen mecanismos epigenéticos que silencian los genes que se transcriben en las células somáticas.

Uno de estos mecanismos de control son los microARN (miARN), moléculas de ARN que no codifican para proteínas y que actúan inhibiendo la expresión génica. La represión se produce mediante el acoplamiento del miARN a la región 3 no traducida (3'UTR) del ARNm provocando la reducción de la longitud de la cola de poli (A) y el cese de la traducción.

Mishima et al. (2006) demostraron que en pez cebra la inhibición de la traducción del gen *nanos1*, involucrado en la supervivencia de las CGPs, está regulada por un micro-ARN (miR-430). La represión postranscripcional de este gen, mediada por el miR-430, afecta a las células somáticas garantizando la síntesis de la proteína Nanos en las CGPs. Además, las CGPs tienen mecanismos que contrarrestan la actividad del miR-430, como factores que contribuyen a la estabilidad del ARNm de *nanos1*. En pez cebra se puede detectar como el ARNm de *Vasa* y *Nanos1* son progresivamente degradados en las células somáticas. (Raz 2003; Mishima et al., 2006). Otro gen específico de las CGPs, el *TDRD7*, también está regulado por miR-430 en pez cebra. Estos resultados indican que el miR-430 regula los genes de la línea germinal y sugiere que la estabilidad diferencial a los ARNm contribuye a la expresión génica específica del tejido (Mishima et al., 2006).

Tabla 3. Genes involucrados en el desarrollo de la línea germinal.

Gen	Proteína	Función	Especie	Referencia
Vasa	ARN helicasa de la familia Dead-box	Componente del plasma germinal, restringida a las CGPs durante el desarrollo embrionario. Función desconocida.	<i>Danio rerio</i>	Yoon et al., 1997; Olsen et al., 1997
Nanos 1	Proteína de unión al ARN	Componente del plasma germinal. CGPs con niveles bajos de nanos 1 presentan defectos en la migración y supervivencia.	<i>Danio rerio</i>	Mishima et al., 2006
Dazi	Proteína de unión al ARN	Se expresa en el polo vegetal y deja de expresarse antes de la gastrulación. Su función es desconocida.	<i>Danio rerio</i>	Maegawa et al., 1999
Dead end	Proteína de unión al ARN	Componente del plasma germinal. Crucial para migración (esencial en la formación de pseudópodos) y supervivencia de CGPs.	<i>Danio rerio</i>	Tzung et al., 2015; Weidinger et al., 2003
SDF-1/ CXCR4B	Factor quimiotáctico derivado del estroma y su receptor	Participa en la quimiotaxis que ayuda a la migración de las CGPs. Controla dirección y velocidad de migración.	<i>Danio rerio</i>	Doitsidou et al., 2002; Blaser et al., 2006
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (Factor quimiotáctico)	Proporciona estabilidad en los filopodios de las CGPs, su ausencia reduce la velocidad de la migración.	<i>Danio rerio</i>	Dumstrei et al., 2004
Bucky Ball	-	Participa en el ensamblaje del plasma germinal, en la formación de las CGPs y del cuerpo de Balbiani.	<i>Danio rerio</i>	Bontems et al., 2009, Saito et al., 2014
Piwi	Ribonucleasa H (RNasa H)	Prescindible para la especificación de las CGPs, pero esencial para su mantenimiento. El bloqueo de <i>Piwi</i> resulta en una pérdida progresiva de CGPs durante el desarrollo larval debido a la apoptosis.	<i>Danio rerio</i>	Houwing et al., 2007

Entre los genes específicos de la línea germinal en los peces teleósteos (Tabla 3), destaca el gen *Vasa*, ampliamente utilizado como marcador molecular y que se expresa en las CGPs de todos los organismos eucariotas.

1.1.6.1 Gen *Vasa*

En el pez cebra, se utilizó la expresión del gen *Vasa* para determinar por primera vez el origen de las CGPs (Yoon et al., 1997) y estudiar su migración al primordio gonadal (Olsen et al., 1997). En *Oryzias latipes* y *Gadus morhua* se demostró que este gen era necesario para la migración de las CGPs, ya que su silenciamiento producía patrones anormales de migración (Li et al., 2009; Presslauer et al., 2012). *Vasa* regula la formación y migración de las CGPs y también juega un papel esencial en la diferenciación de células germinales durante la gametogénesis (Xu et al., 2010).

Este gen codifica la proteína VASA, que es una RNA-helicasa, dependiente de ATP, que forma parte de la familia “DEAD box” denominada así por las siglas en inglés de cada aminoácido (asp-glu-ala-asp). VASA es una proteína específica de la línea germinal y su secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre especies situadas a gran distancia evolutiva. Esta proteína se describió por primera vez en *D. melanogaster*, donde forma parte de los gránulos polares, precursores de la línea germinal (Hay et al., 1988). Aunque sus funciones no están bien definidas, se sabe que esta proteína está ligada a diversos procesos celulares como edición del ARN, procesamiento de ARNr, exportación de ARNm nuclear y degradación del ARNm (Luking et al., 1998).

El gen *Vasa*, también llamado *Ddx4*, es un gen específico que se expresa, predominantemente en las CGPs de todos los organismos eucariotas y fue descrito por primera vez en *Drosophila* (Liang et al., 1994). La identificación de este gen como el primer marcador de la línea germinal en el pez cebra (Olsen et al., 1997) supuso un avance significativo en el estudio de la línea germinal en peces desde un punto de vista molecular, donde ha sido detectado durante el desarrollo temprano, la migración al primordio gonadal y la diferenciación sexual (Kobayashi et al., 2002; Aoki et al., 2008; Pacchiarini et al., 2013). En el pez cebra, el gen *Vasa* se detectó en unas estructuras segmentadas formadas a ambos lados del tubo neural durante el desarrollo embrionario (Olsen et al., 1997), mientras que en el pez medaka se ha detectado durante la fase de gastrulación del desarrollo embrionario (Shinomiya et al., 2000). En los testículos la expresión de este gen queda restringida a las espermatogonias, la primera fase del desarrollo de las células sexuales masculinas y en los oocitos se ha detectado durante la vitelogénesis temprana (Shinomiya et al., 2000; Guerrero- Estévez et al., 2012).

El gen *Vasa* se ha sido descrito en diferentes especies de peces como medaka o trucha arcoíris (Shinomiya et al., 2000; Yoshizaki et al., 2000). Su secuencia es muy conservada, no sólo con respecto a otros teleósteos sino también en especies con gran distancia evolutiva. Esto ha permitido la creación de

anticuerpos que reconocen la proteína que codifica el gen *Vasa* en diferentes especies de peces, convirtiéndolo en un excelente marcador molecular (Xu et al., 2005; Guerrero- Estévez et al., 2012).

1.2 Justificación

El trasplante de CGPs en organismos subrogados se presenta como una herramienta alternativa para la conservación de especies en peligro de extinción o recursos genéticos de alto valor, como es el caso de la totoaba. En los últimos años se han desarrollado programas de reproducción en cautiverio con fines de repoblación y comercialización de esta especie. Sin embargo, el costo de mantenimiento de estos organismos en cautiverio es muy elevado debido a su gran tamaño, ya que tardan entre 4 y 5 años en alcanzar la madurez sexual.

La producción de totoaba en hembras subrogadas otra especie de menor tamaño, filogenéticamente cercana, se presenta como una alternativa económicamente viable que podría contribuir al restablecimiento de las poblaciones naturales y a la posible comercialización de organismos producidos en cautiverio. Sin embargo, hasta la fecha no se tienen estudios sobre las CGPs de la totoaba, que son básicos para la producción de esta especie en hembras subrogadas. Por este motivo, en el presente estudio se identificaron y caracterizaron las CGPs (morfología, patrón de migración y edad de formación de las CGPs) y además se identificó la presencia del gen *Vasa* en las larvas de *Totoaba macdonaldi* con el fin de generar conocimiento que establezca las bases para el posterior desarrollo de técnicas de reproducción asistida utilizando trasplante de células germinales de esta especie.

1.3 Hipótesis

- Debido a que las características de las CGPs son muy conservadas en los peces teleósteos, será posible identificar y caracterizar dichas células en la especie *Totoaba macdonaldi*, utilizando procedimientos de histología- inmunohistoquímica y RT- PCR desarrollados para otros peces.
- Si las CGPs en *Totoaba macdonaldi* se forman por mecanismos de preformación se observará la migración de las mismas desde el endodermo del intestino hasta los primordios gonadales.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar las CGPs y el nivel de expresión del gen *Vasa* en larvas de *Totoaba macdonaldi*

1.4.2. Objetivos específicos

1. Describir, identificar y caracterizar las CGPs en *Totoaba macdonaldi*
2. Establecer el mecanismo de maduración y edad de formación (DDE) de las CGPs en *Totoaba macdonaldi*
3. Determinar los niveles de expresión del gen *Vasa* en embriones y larvas de *Totoaba macdonaldi*, por medio de retrotranscripción y amplificación con PCR.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Producción de embriones

Los embriones de *Totoaba macdonaldi* se obtuvieron de un grupo de reproductores del "Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora" (CREMES). Cuando se detectó, mediante canulación, la etapa madura de los reproductores, se indujo a la ovulación y la espermiación mediante una inyección intramuscular de hormona liberadora de gonadotropina análoga, GnRHa (AquaGyn, North Carolina, USA), en la musculatura epiaxial, situada debajo de la aleta dorsal. Las hembras fueron inducidas al desove con una dosis total de 100 µg por kg de peso corporal. Los machos recibieron 50 µg de GnRHa por kg de peso corporal. El desove ocurrió 24 h después de la inducción. Se tomaron fotografías de embriones de todos los estadios, desde la etapa de 2 células hasta la larva recién eclosionada y se conservaron inmediatamente en solución de estabilización RNAlater™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad CA, EE. UU.) para analizar la expresión del gen *Vasa*. Para el análisis de inmunofluorescencia "Whole mount", los embriones se fijaron y conservaron en paraformaldehído al 4% (PFA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.4) hasta su posterior procesamiento.

Para estudiar las CGPs durante la etapa larval, un lote de embriones fue transportado desde el CREMES al Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del "Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada" (CICESE) en bolsas de plástico con oxígeno a saturación y una temperatura de 18 °C. Una vez en el laboratorio, se analizó una muestra bajo el microscopio para verificar el desarrollo y la viabilidad. La descripción del desarrollo embrionario se realizó con base a la descripción de *Danio rerio* (Kimmel et al., 1995).

2.2 Cultivo larvario

Una vez en el CICESE, las larvas se mantuvieron desde la eclosión hasta los 30 DDE (días después de la eclosión) en el sistema de cultivo larvario, siguiendo el protocolo ya establecido en el laboratorio de peces marinos, que consiste en la incubación de los embriones a una densidad de 50 a 80 por litro, en un tanque cónico de fibra de vidrio de 2000 L de capacidad con suministro de aire, una temperatura de 25 ± 1 °C, salinidad de 34 ± 1 ‰ y oxígeno disuelto a saturación 6.9 ± 0.4 mg L⁻¹. El fotoperiodo fue de 24 h de

luz hasta el día 3 DDE, posteriormente, el fotoperiodo se ajustó a 12 h de luz: 12 h de oscuridad hasta que el cultivo larval finalizó el día 30 DDE.

Las larvas iniciaron la alimentación exógena a los 3 DDE con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) a una densidad de 1 por mL y gradualmente la densidad de presas aumentó a cinco por mL. Los rotíferos fueron alimentados con pasta de microalgas (Instant Algae, Reed Mariculture Inc. USA) y enriquecidos, 12 h antes de alimentar a las larvas, con una emulsión oleosa de origen marino, Origreen® (Skretting, Noruega) según a las instrucciones del fabricante. A los 10 DDE, se realizó un cambio gradual de rotíferos a nauplios de *Artemia* recién eclosionados, el suministro de rotíferos fue disminuyendo progresivamente en una proporción de 75 %, 50 %, 25 % hasta llegar al 0 % el día 23 DDE. Los nauplios de artemia se enriquecieron con Origreen® (Skretting, Noruega) y se suministraron a una densidad inicial de 1 nauplio por mL hasta una densidad final de 5 nauplios por mL.

El cambio gradual de nauplios de *Artemia* a alimento formulado (Otohime®, Reed mariculture, Campbell, CA) se realizó de los 23 a los 30 DDE. Las larvas fueron alimentadas tres veces al día (9:00, 14:00 y 18:00 h) a lo largo de todo el cultivo larval. Todos los procedimientos a los que fueron sometidos los organismos durante este estudio estuvieron en concordancia con los estándares éticos para el uso de peces en la investigación de la American Fisheries Society (AFS) y se siguieron todas las pautas institucionales aplicables para el cuidado de los animales.

2.3 Análisis Histológico

Las larvas usadas para el análisis histológico fueron colectadas diariamente desde la eclosión hasta 30 DDE. Las muestras fueron fijadas en solución Davidson (Anexo 4) durante 24 h, una vez que concluyó el periodo de fijación fueron preservadas en etanol al 70 % hasta su posterior análisis. Las larvas fueron colocadas en “cassettes” histológicos y sometidas a un proceso de deshidratación mediante una serie de gradientes alcohólicos (Anexo 5) en un procesador automático de tejidos LEICA TP 1040. Las muestras fueron embebidas en parafina (Anexo 5) usando un incluidor automático LEICA EG 1160. Para obtener secciones longitudinales de 5-6 µm de grosor, se realizaron cortes histológicos seriados de las larvas en un microtomo LEICA RM2245. Los cortes obtenidos se fijaron en un portaobjetos con ayuda de un baño con agua desionizada, grenetina y alcohol a 50 °C y se dejaron secar 24 h a 65 °C en una estufa (Precision Scientific Co, modelo 4). Las series obtenidas fueron teñidas con el protocolo de hematoxilina- eosina

(Anexo 6) previamente descrito por Gamble and Wilson (2002) y se montaron con resina sintética (Cytoseal 60 Thermo Scientific). Las células germinales primordiales (CGPs) fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Leica DMLS que contiene una cámara digital. Las fotografías obtenidas fueron editadas con el programa LAS Vision 4.3.

2.4 Análisis de inmunofluorescencia “Whole-mount”

La migración de las CGPs se observó en diferentes etapas del desarrollo embrionario y larval. Se recolectaron muestras de embriones desde el estadio de 1 célula hasta 24 h después de la fertilización (HPF) en cada estadio embrionario y larvas desde la eclosión hasta 10 días después de la eclosión (DDE). Para detectar la proteína VASA se empleó un anticuerpo primario policlonal anti-VASA DDX4/MVH-marcador de células germinales primordiales (Abcam, Cambridge, 198 MA, USA). Este anticuerpo fue usado siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia “Whole mount” previamente descrito por Pacchiarini et al. (2013) con algunas modificaciones. Los embriones y las larvas fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS (tampón fosfato salino, pH 7.4) durante 48 h a 4 °C. Después de la fijación se retiró el corion de los embriones, este procedimiento se realizó con la ayuda de una lupa y con pinzas de disección. Para eliminar el PFA, las muestras fueron lavadas 4 veces con PBS y almacenadas a – 20 °C en metanol durante 2 h. Posteriormente las muestras fueron hidratadas en Tritón al 1 % en PBS (PBS-T) durante 5 minutos (se repitió tratamiento 3 veces) y bloqueadas con 3 % seroalbúmina de bovino (BSA) en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas a 4 °C con el anticuerpo primario anti-VASA (1:250) durante 48 h, posteriormente lavadas con PBS (4 veces durante 5 min cada una y 2 veces durante 20 min) e incubadas con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-conejo (1:500) (Molecular Probes Carlsbad, CA, USA), durante 24 h a 4 °C. Después se lavaron (4 veces durante 5 min cada una y 2 veces durante 20 min) y se tiñeron con tinción de contraste DAPI (10 µg/mL) (Sigma Aldrich, Santa Cruz, 210 CA, USA). Después de 3 lavados con PBS durante 5 min, las muestras fueron montadas con solución acuosa (Dako). El control negativo fue tratado con el mismo protocolo, pero sin utilizar el anticuerpo primario anti-VASA. Finalizando el tratamiento, los embriones y larvas fueron visualizadas con un microscopio confocal Olympus FV1000.

2.5 Análisis de los niveles de expresión del gen *Vasa*

Para determinar el momento del desarrollo embrionario o larval en el cual se forman las CGPs en la especie *Totoaba macdonaldi*, se realizó una RT-PCR del gen *Vasa*. Este gen se expresa específicamente en las células germinales primordiales, por ello se utilizó como marcador molecular para las CGPs.

2.5.1 Diseño de iniciadores para amplificación de gen *Vasa*

Gen *Vasa*

Basándonos en la premisa de que el gen *Vasa* es un gen universal y está evolutivamente conservado en la mayoría de los animales (Gustafson y Wessel, 2010) se diseñaron iniciadores con secuencias del gen *Vasa* de otros peces teleósteos, incluyendo *Nibeas mitsukurii* una corvina de la familia Sciaenidae filogenéticamente cercana a la totoaba (Tabla 4).

Los iniciadores se diseñaron con el programa Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) (Untergasser et al., 2012). Este programa muestra 4 opciones de pares de iniciadores, de los cuales se seleccionaron uno, dos o tres con base a los siguientes criterios:

- Longitud óptima de ambos iniciadores (17-22 pb)
- Contenido de G+C alrededor del 50-60 %, lo cual se traduce en temperaturas de alineamiento cercanas, maximizando el rendimiento.
- Las temperaturas de fusión o hibridación (T_m) entre 55-65 °C y cercanas entre ambos iniciadores, se tuvo especial cuidado para evitar que hubiera más de 5 °C entre la T_m del forward y el reverso.
- Se evitaron secuencias de 3 o más Cs o Gs en las regiones terminales 3'.
- Se evitaron iniciadores con regiones complementarias (más de 3 bases que se complementen dentro de este)
- Se evitó la homología entre los iniciadores sentido y antisentido.

Tabla 4. Iniciadores de teleósteos para gen *Vasa*.

Secuencia del iniciador	Tamaño fragmento	Especie	Referencia
F: ATGGCNTG(T/C)GCNCA(G/A)ACNNG R: CATNCG(A/G)TCNGC(T/C)GC(A/G)TCNAGNAC	2187 pb.	<i>Oryzias latipes</i>	Shinomiya et al., 2000
F: ATGGCNTG(T/C)GCNCA(A/G)ACNG R: (A/G)AANCCCAT(A/G)TC(T/C)AACAT	2187 pb.	<i>Oryzias latipes</i>	Shinomiya et al., 2000
F: GCTGACGCCACCATAAACCACCACTG R: CAGTGGTGGTTTATGGTGGCGTCAGC	383 pb.	<i>Scophthalmus maxima</i>	Lin et al., 2012
F: GACTACAGGGTCTGAACGCA R: CGCGGTCACCATGAATACTA	116 pb.	<i>Salmo salar</i>	Nagasawa et al., 2013
F: ATGGCNTGYGCNCARACNG R: CCDATYCTRGTGNACRTAYTC	1941 pb	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Yoshizaki et al., 2000
F: AGAGGTAGAGGTGGCAGAGG R: GGTGTCTTCGTCTTCAGGCA	176 pb	<i>Nibebe mitsukurii</i>	Yazawa et al., 2010
F: AGCGAATTCAGTGGAGAGGA R: CCCGTCTTATAGTGGGCAAA	248 pb	<i>Nibebe mitsukurii</i>	Yazawa et al., 2010
F: AACAAACACAGAAGGGGAACG R: CCCTGGTCATCACCTGATCT	194 pb	<i>Nibebe mitsukurii</i>	Yazawa et al., 2010

Los ocho pares de iniciadores diseñados fueron sintetizados por la compañía Sigma Aldrich (Santa Cruz, 210 CA, USA). Para comprobar si los iniciadores diseñados producían una amplificación positiva, se realizaron experimentos preliminares con el ADNc de las muestras de totoaba siguiendo el protocolo de RT-PCR con las condiciones experimentales que se describen en el apartado 2.5.4. Un par de iniciadores de los 8 sintetizados presentó amplificación positiva en el ciclo 26 (Anexo1). El iniciador diseñado con base a la secuencia de *Nibebe mitsukurii* (*Nmi Vasa*) fue seleccionado para la fase experimental (Tabla 5).

Gen 18S

Los genes de referencia deben determinarse para cada ensayo experimental, pero debido a la ausencia de información sobre el genoma de la totoaba se utilizó el 18S como gen de referencia, ya que se ha utilizado en otros estudios con totoaba (Galaviz et al., 2015). Este gen también se ha validado como

gen de referencia en otros estudios del desarrollo embrionario en peces teleósteos. Tang et al. (2007) recomendaron, entre otros, el *18S* rRNA como gen de referencia en el desarrollo embrionario de pez cebra. Del mismo modo, Fernandes et al. (2008) encontraron que en el lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) la expresión del gen *18S* era estable durante el desarrollo embrionario de esta especie.

Tabla 5. Iniciadores seleccionados para q-PCR. Se indican secuencias de los primers para *Vasa* y *18S*, tamaño del amplicón en pares de bases (pb), eficiencia de las reacciones (E) y coeficientes de determinación de Pearson (R^2).

Gen	Secuencia Fwd (5' - 3')	Secuencia Rev (5' - 3')	Tamaño (pb)	E	R^2
<i>18S</i>	CGGTTCTATTTTGTGGGTTTTC	CTTTCGCTTTCGTCCGTCTT	126	0.98	1.00
<i>Vasa</i>	AGAGGTAGAGGTGGCAGAGG	GGTGTCTTCGTCTTCAGGCA	123	1.00	0.99

Los iniciadores que produjeron una amplificación positiva fueron optimizados (temperatura de anillamiento y concentración) como se indica en la siguiente sección.

2.5.2 Optimización de los iniciadores

Se realizó la optimización de los iniciadores con base en dos aspectos: La concentración del iniciador y las temperaturas de anillamiento.

El primer *Nmi Vasa* fue probado a diferentes concentraciones (200, 400 y 800 μ M) y temperaturas (58, 59, 60 y 61 $^{\circ}$ C) en las condiciones experimentales descritas en la sección 2.5.4. Con base a los resultados, se seleccionó una concentración óptima de 200 μ M y una temperatura de anillamiento de 60 $^{\circ}$ C (Anexo 1).

2.5.3 Extracción de RNA

Los embriones desde el estadio de 1 célula hasta la eclosión y las larvas desde la eclosión hasta los 8 DDE se conservaron en RNAlater™ y se congelaron en nitrógeno líquido a -196 °C para su posterior análisis molecular. Se extrajo el ARN total de tres réplicas biológicas (30 embriones por réplica individual) de cada etapa de desarrollo siguiendo el protocolo del kit PureLink™ RNA Mini (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad CA, EE. UU.), con algunas modificaciones. Para maximizar la extracción de RNA total se procedió a la homogenización manual del tejido con micropistilo añadiendo 6 µL de mercaptoetanol a los 600 µl del amortiguador de lisis. El ADN genómico (ADNg) se eliminó usando la digestión con DNasa I (Ambion™) a 37 °C durante 10 min, para detener la reacción se aumentó la temperatura a 75°C durante 5 min para inactivar la enzima. La pureza y concentración total de ARN se midió por espectrofotometría (Nanodrop® LITE, Thermo Fisher Scientific INC., Wilmington, EE. UU.) y la integridad se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Solo se utilizaron muestras de ARN con relaciones de absorbancia (A260 / 280) entre 1.90 y 2.10 para la cuantificación de la expresión génica.

2.5.4 Retrotranscripción y amplificación (RT-qPCR)

Una vez obtenido el ARN total (500 ng) producto de la extracción, se prosiguió con la síntesis de DNA complementario del gen *Vasa* (ADNc) por medio de la retrotranscripción. Para ello se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems; Carlsbad CA, USA) y se siguió el protocolo recomendado por el proveedor en un termociclador Verity de 96 pocillos (Applied Biosystems). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo agregando 2 µl de amortiguador RT 10x; 0.8 µl de mezcla de dNTP's 25x, 1 µl de enzima retrotranscriptasa (MultiScribe™), 2 µl de iniciadores random RT 10x; 4.2 µl de agua DEPC y 10 µl de RNA total extraído de cada muestra, para tener un volumen de reacción final de 20 µl. Las condiciones del programa de transcripción reversa (RT-PCR) fueron 10 min a 25 °C; 120 min a 37 °C; 5 min a 85 °C y finalmente se mantuvo a 4 °C.

El ADNc obtenido se amplificó mediante reacciones de RT-qPCR que se llevaron a cabo con 4 µL de ADNc; 0.5 µL (200 µM) de los iniciadores forward y reverso (Tabla 5) y 5 µL de SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) por cada muestra, según instrucciones del fabricante. Las muestras se procesaron en paralelo utilizando el *18S* como gen de referencia, elegido con los criterios anteriormente mencionados (Ver apartado 2.5.1). Las reacciones, con un volumen total de 10 µL, se procesaron en placas de reacción

MicroAmp[®] Fast Optical de 96 pocillos (Applied Biosystems) cubiertas con adhesivo óptico MicroAmp[®] (Applied Biosystems). Los niveles de expresión relativos de ARNm se calcularon mediante el método $\Delta\Delta Ct$ definido por Livak y Schmittgen (2001), este método es un análisis comparativo basado en el número de ciclos en los que se puede detectar la señal de fluorescencia (CT) del gen de referencia y del gen probado, utilizando un umbral automatizado y una línea de base para determinar los valores de CT (software StepOne[™] V2.3). Los valores de expresión del gen *Vasa* se normalizaron con los valores de expresión del gen *18S*. Las condiciones de la PCR fueron: una etapa inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa durante 10 min a 95 °C; 40 ciclos de desnaturalización durante 15 s a 95 °C, anillado y extensión durante 45 s a 60 °C; y una curva final de fusión de 60 °C a 95 °C durante 20 minutos para verificar la ausencia de dímeros del cebador. Se realizaron curvas estándar de concentración con 4 diluciones seriadas de ARN (2.5 -0.0025 ng/ μ L de ARN) para ambos genes. Se incluyeron controles negativos, agua ultra pura libre de nucleasas en lugar de DNAC, en cada ensayo y par de iniciadores (*Vasa* y *18s*). La secuencia de nucleótidos para *18S* está disponible en GenBank con el número de acceso HM754483 (Galaviz et al., 2015). Los iniciadores para gen *Vasa* fueron diseñados usando los cds completos de *Vasa* mRNA de *Nibeia mitsukurii* (GenBank número de acceso GQ404692) con el procedimiento descrito en el apartado anterior. La especificidad de la RT-qPCR se analizó mediante secuenciación del ADN y se realizó un análisis de curva de fusión para cada muestra para verificar la amplificación individual.

2.5.5 Secuenciación

Los productos de la PCR fueron purificados para eliminar los restos de iniciadores, nucleótidos y sales con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y enviados a secuenciación. El fragmento fue enviado a Langebio (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Irapuato, Mexico) para corroborar la amplificación del gen *Vasa*. Las secuencias Forward y Reverse fueron analizadas con el software CLC MainWorkbench 8.0 (<https://www.qiagenbioinformatics.com>) para obtener una secuencia consenso. Posteriormente, se realizó una búsqueda por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en el banco de genes (GenBank) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para corroborar la amplificación del gen *Vasa* y comparar la secuencia con la de otras especies filogenéticamente cercanas para conocer el grado de similitud de este gen con respecto a otras secuencias dentro del GenBank.

2.6 Análisis estadístico

Las diferencias significativas en los niveles de expresión génica entre las diferentes etapas del desarrollo se compararon mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba *post hoc* de Newman-Keuls. Las variables se consideraron estadísticamente diferentes con $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó usando el software STATISTICA 8.0™ (StatSoft, Inc. EE.UU.).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario de *T. macdonaldi* tuvo una duración de 28 h, desde la primera división embrionaria hasta la eclosión, a una temperatura de 21 °C, no obstante, la duración del desarrollo embrionario puede variar con la temperatura. El huevo de totoaba tiene un tamaño aproximado de 800-900 µm, en las primeras divisiones presenta una segmentación parcial o meroblástica que viene dada por el abundante vitelo distribuido en el polo vegetal. El período de clivaje duró 2 h y se extendió desde la primera división celular hasta que el embrión presentó 64 células en el polo animal. Este período se caracterizó por una serie de divisiones rápidas, llevadas a cabo en intervalos de 20 min entre una división y la siguiente, que condujeron al aumento en el número de blastómeros. Con cada división se pudo observar una disminución en el tamaño de los blastómeros. En el centro del embrión se observó la gota de aceite que servirá de reserva energética durante los primeros días del desarrollo larval (Figura 10 A-E).

El período de blástula que comenzó cuando el embrión alcanzó las 64 células y el blastodisco adquirió una forma semiesférica (Figura 10F) se completó en 4 h. Los movimientos de epibolia comenzaron y las células cubrieron en forma progresiva el huevo, desde el polo animal al polo vegetal. Este período duró hasta que las células cubrieron cerca del 50 % de la superficie del huevo e inició el proceso de involución, lo que indica el comienzo de la gastrulación (Figura 10 F-H).

En la fase de gastrulación, que duró aproximadamente 6.5 h, la epibolia continuó y, además, se produjeron los movimientos celulares morfogénéticos de involución, convergencia y extensión, produciendo las capas germinales primarias (epiblasto e hipoblasto). El anillo germinal se definió cuando la cobertura del embrión era del 60 %, cuando se produjo la involución de las células del epiblasto. Cuando la cobertura del huevo llegó al 80 % aproximadamente, se formó un engrosamiento sobre el lado dorsal del embrión denominado escudo embrionario, que da origen a la notocorda y al mesodermo axial (Figura 10 I-J). La etapa de gástrula finalizó con el cese de los movimientos de epibolia y con una cobertura celular del huevo del 100 %, al final de este periodo se puede observar el eje corporal del embrión de totoaba (Figura 10 K).

Durante el transcurso del período de segmentación, que duró 15 h (Figura 10 L-N), se produjo la formación de las somitas, comenzando en la zona cefálica del cuerpo y progresando hacia la región de la cola. Se hicieron visibles los rudimentos de los órganos primarios y el esbozo de la cola. Se formó la

notocorda y se desarrolló el tubo neural. A medida que avanzó el desarrollo embrionario se pudieron observar los rudimentos de los ojos (Figura 10 M). La cola aumentó de tamaño y se produjo la elongación del embrión. Al final del desarrollo embrionario, apareció la pigmentación inicial de la piel y se observaron los primeros movimientos musculares del embrión. A las 28 h de la primera división celular se observó la rotura del corion y la eclosión del huevo dando lugar a la larva (Figura 10 O-P).

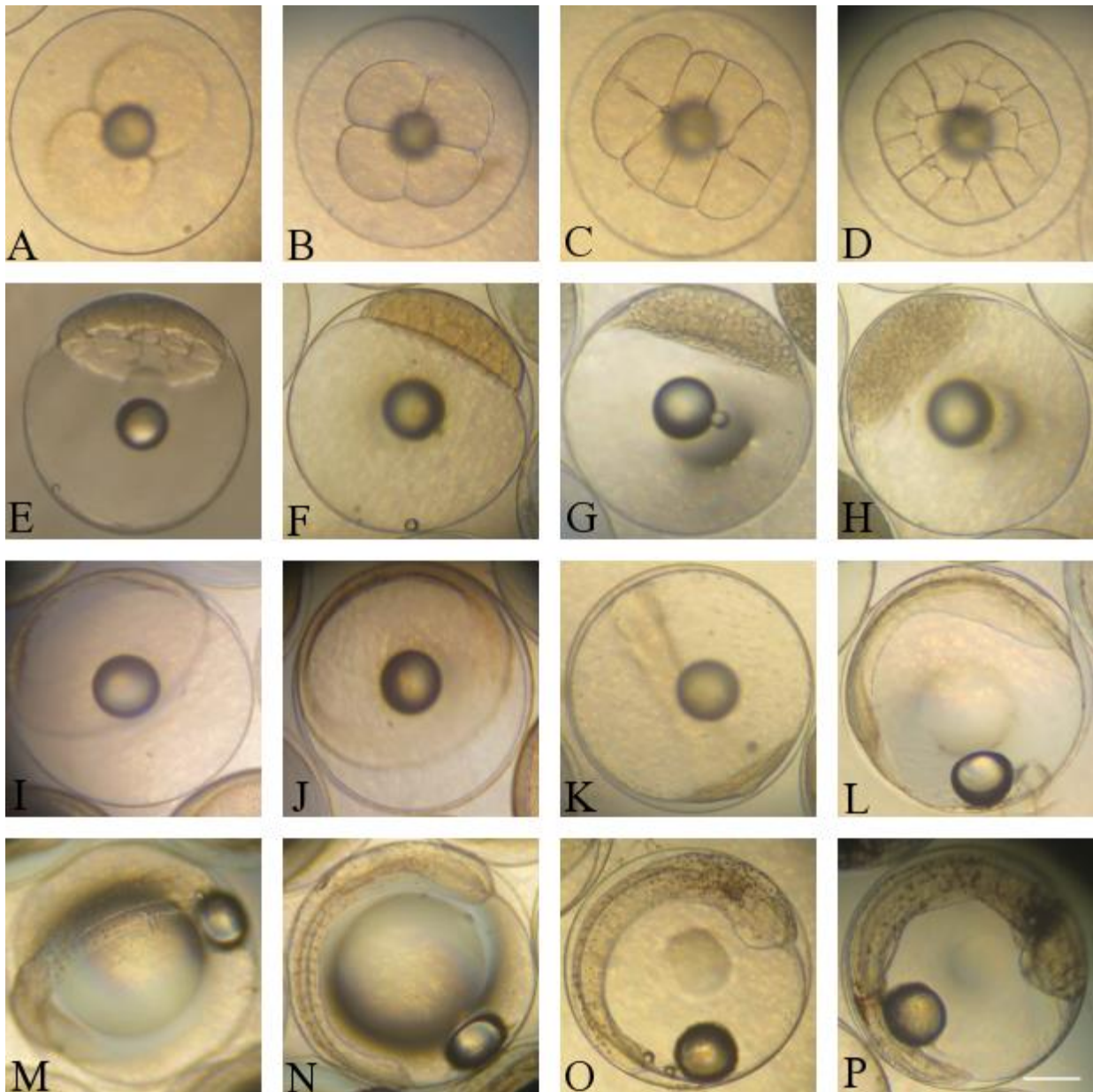


Figura 10. Estadios del desarrollo embrionario en *Totoaba macdonaldi* at 21 °C. Periodo de clivaje: A. Estadio de 2 células. B. Estadio de 4 células. C. Estadio de 8 células. D. Estadio de 16 células. E. Estadio de 64 células. **Periodo de blástula:** F. Estadio de 128 células. G. Estadio de 512 células. H. 30 % de cobertura celular, movimientos epibólicos. **Periodo de Gástrula:** I. 60 % de cobertura celular del huevo, anillo germinal visible. J. 75 % de cobertura celular del huevo. K. 90 % del huevo cubierto por células. Escudo embrionario y eje corporal del embrión visibles. **Periodo de segmentación:** L. Formación de somitas. M. Estadio de 14 somitas. N. Estadio 20 somitas. **Eclosión:** O. Pigmentación temprana del embrión, rudimentos de ojos y notocorda. P. Elongación del embrión. Empiezan movimientos de eclosión. Escala: 250 μ m

3.2 Caracterización histológica de las CGPs

Se realizaron cortes histológicos de larvas desde 1 DDE hasta 30 DDE, solo se presentan los cortes en los cuales se pudieron ver las CGPs.

Las CGPs, que darán origen a los gametos, se observaron por primera vez en larvas de 6 DDE, de aproximadamente 4 mm de longitud. En esta etapa, las células germinales se encuentran en la zona donde se formará el primordio gonadal. Las CGPs se identificaron por su morfología característica: gran tamaño (10- 15 μm), forma ovalada, contornos irregulares y núcleos grandes (7-10 μm). Se localizaron en una zona situada encima del intestino posterior dentro de la cavidad peritoneal (Figura 11).

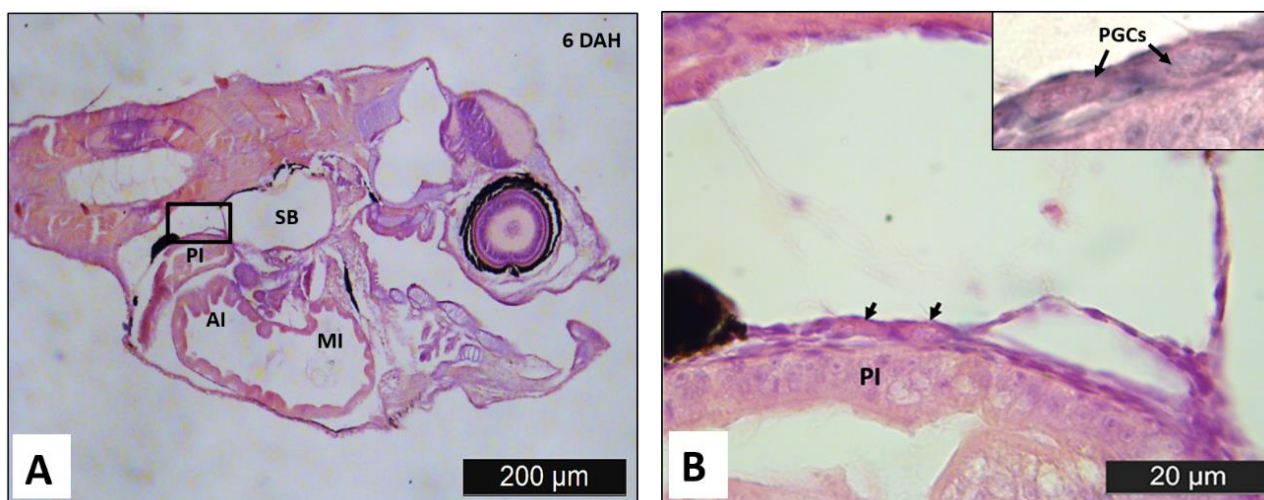


Figura 11. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 6 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 3.9 mm \pm 0.3. El área en el recuadro corresponde al primordio gonadal; PI, intestino posterior; AI, intestino anterior; MI, intestino medio; SB, vejiga natatoria. Escala 200 μm . **B.** Ampliación del recuadro. Las flechas indican CGPs; PI, intestino posterior. Escala del recuadro superior 20 μm . Tinción con Hematoxilina-eosina.

Las secciones sagitales de una larva de 9 DDE mostraron un aumento en el número de CGPs con respecto a etapas anteriores. En los cortes se observó el primordio gonadal, que da lugar a ovarios o testículos, en forma de estructura elongada en cuyo interior se encuentran 7 CGPs. Este rudimento se localizó en el extremo inferior de la vejiga natatoria, entre el peritoneo y el intestino posterior, en el lugar donde se desarrollará la gónada (Figura 12).

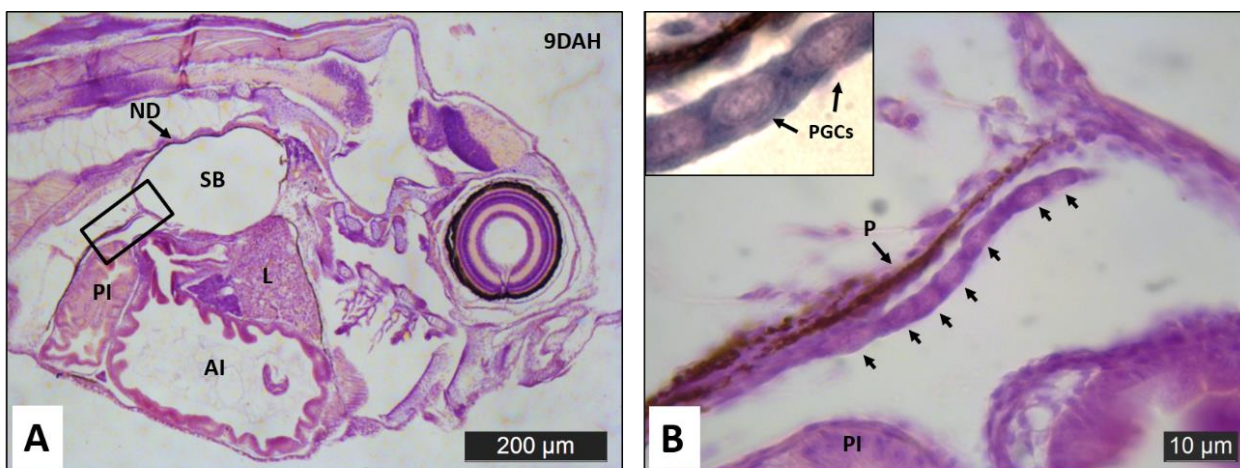


Figura 12. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 9 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 5.1 mm \pm 0.3. El área en el recuadro corresponde al primordio gonadal; L, Hígado; PI, Intestino posterior; AI, Intestino anterior; ND, Conducto nefrítico; SB, vejiga natatoria. Escala 200 μ m. B. Amplificación del recuadro. Las flechas indican CGPs; P, peritoneo; SC, Células somáticas. Escala del recuadro superior 10 μ m. Tinción con Hematoxilina-eosina

En la larva de 11 DDE, se observó un incremento del grosor del primordio gonadal. El esbozo de la futura gónada se formó como resultado de la mitosis de las células somáticas. Se puede observar como las CGPs agrupadas en el primordio son rodeadas por algunas células somáticas que formarán el tejido de sostén de la gónada en desarrollo (Figura 13).

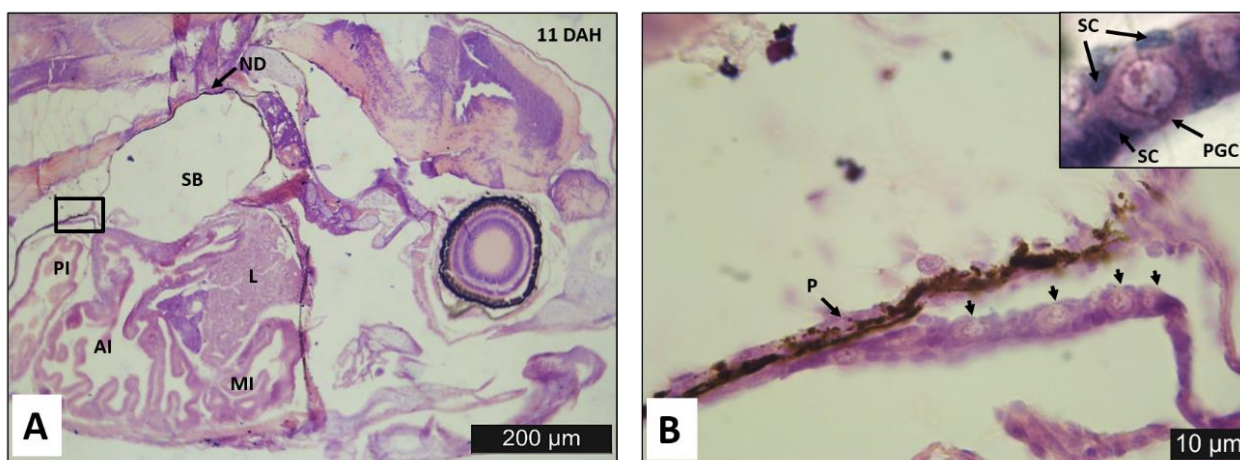


Figura 13. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 11 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 5.8 mm \pm 0.3. El área en el recuadro corresponde al primordio gonadal; L, Hígado; PI, Intestino posterior; AI, Intestino anterior; MI, Intestino medio; ND, Conducto nefrítico; SB, vejiga natatoria. Escala 200 μ m. B. Ampliación del recuadro. Las flechas indican CGPs; P, peritoneo; SC, Células somáticas. Escala del recuadro superior 10 μ m Tinción con Hematoxilina-eosina.

En la larva de 16 DDE se observó el crecimiento de la estructura gonadal indiferenciada situada en el interior de la cavidad peritoneal. La proliferación de las células somáticas gonadales que rodean a las CGPs dio como resultado un aumento tanto en la longitud como en la anchura de la gónada. Se observaron 4 CGPs en el interior de la gónada en desarrollo, sin embargo, la proliferación de las CGPs no pudo ser observada en ninguno de los cortes realizados en larvas de hasta 30 DDE. (Figura 14).

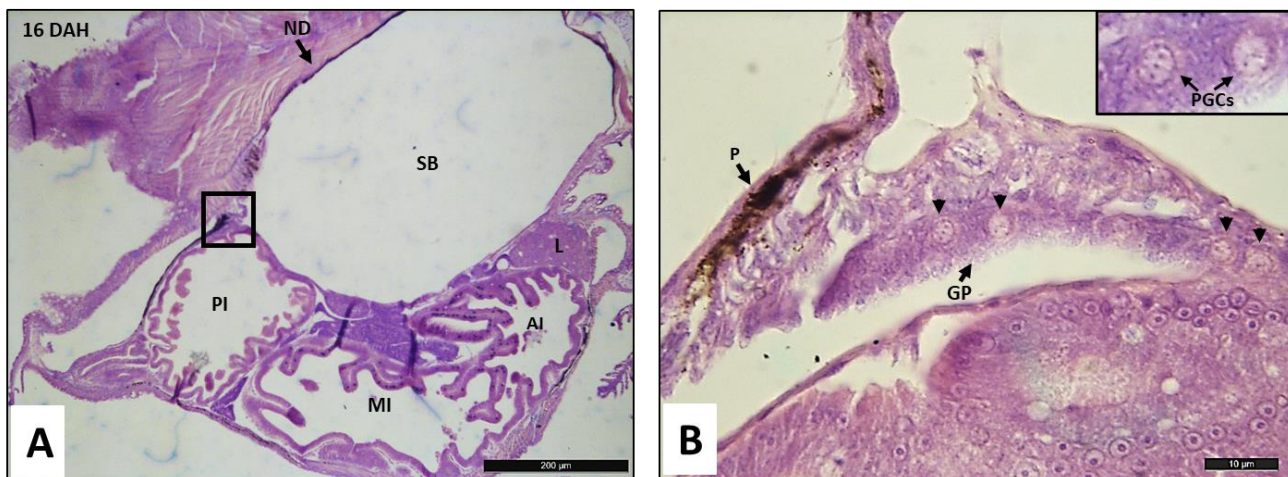


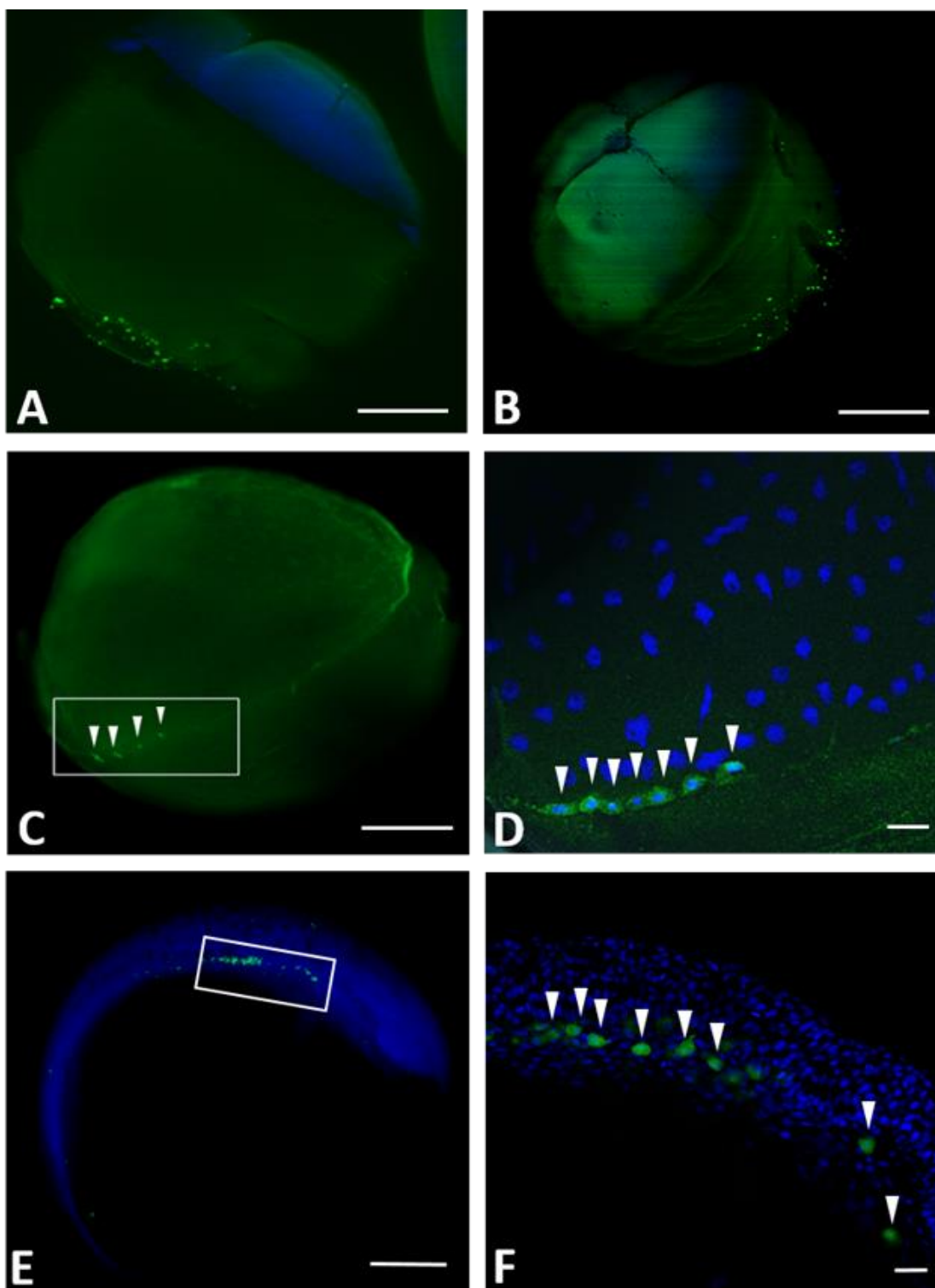
Figura 14. Desarrollo temprano de la gónada de *Totoaba macdonaldi* en una larva de 16 DDE. A. Secciones sagitales de una larva de 7.1 mm \pm 0.7. El área en el recuadro corresponde al primordio gonadal; L, Hígado; PI, Intestino posterior; AI, Intestino anterior; MI, Intestino medio; ND, Conducto nefrítico; SB, vejiga natatoria. Escala 200 μ m. **B.** Ampliación del recuadro. Las flechas indican CGPs; P, peritoneo; GP, Primordio gonadal. Escala del recuadro superior 10 μ m. Tinción con Hematoxilina-eosina.

3.3 Resultados del análisis de inmunofluorescencia

Durante el periodo de clivaje, la señal de proteína VASA positiva se localizó en una nube de puntos situada en el polo vegetal en embriones de 2-4 células. Se observó tinción positiva para DAPI en los núcleos de los blastómeros, aunque no en el polo vegetal, donde no hay células (Figura 15 A-B). En el periodo de blástula no se observó marcaje positivo para proteína VASA en ninguno de los embriones estudiados. En el periodo de gástrula temprana, con aproximadamente un 60 % epibolia, se observaron por primera vez las células germinales primordiales en una posición extraembrionaria, alrededor de las regiones periférica y dorsal del anillo germinal. En esta fase se observaron 7 células situadas en el ecuador del huevo. En el citoplasma celular se observó un marcaje verde intenso que indicó la presencia de la proteína VASA en regiones citoplasmáticas, en los núcleos de las mismas se observó tinción nuclear positiva, indicando la presencia de ADN (Figura 15 C-D).

El cambio en la localización de las CGPs en la etapa embrionaria de 10 somitas, con respecto a la etapa de gástrula media, indicó el inicio de la migración activa. Se observaron entre 8 y 12 CGPs en el sector medio de la longitud del embrión, desde la cabeza hasta la cola, situadas entre las somitas. Algunas de estas CGPs se encontraron detrás de la cabeza, en el tronco o en las regiones ventrales (Figura 15 E-F).

Durante la etapa de eclosión se observó una población, de entre 16 y 20 CGPs, que continuó la migración entre las somitas a lo largo del eje embrionario, aunque su distribución se restringió gradualmente al área donde se formará la gónada durante el desarrollo larval (Figura 15 G-H). La migración de las CGPs se completó a las 7 DDE cuando se pudo observar un grupo de CGPs asentadas en el primordio gonadal y rodeadas por células somáticas (Figura 15 I-J).



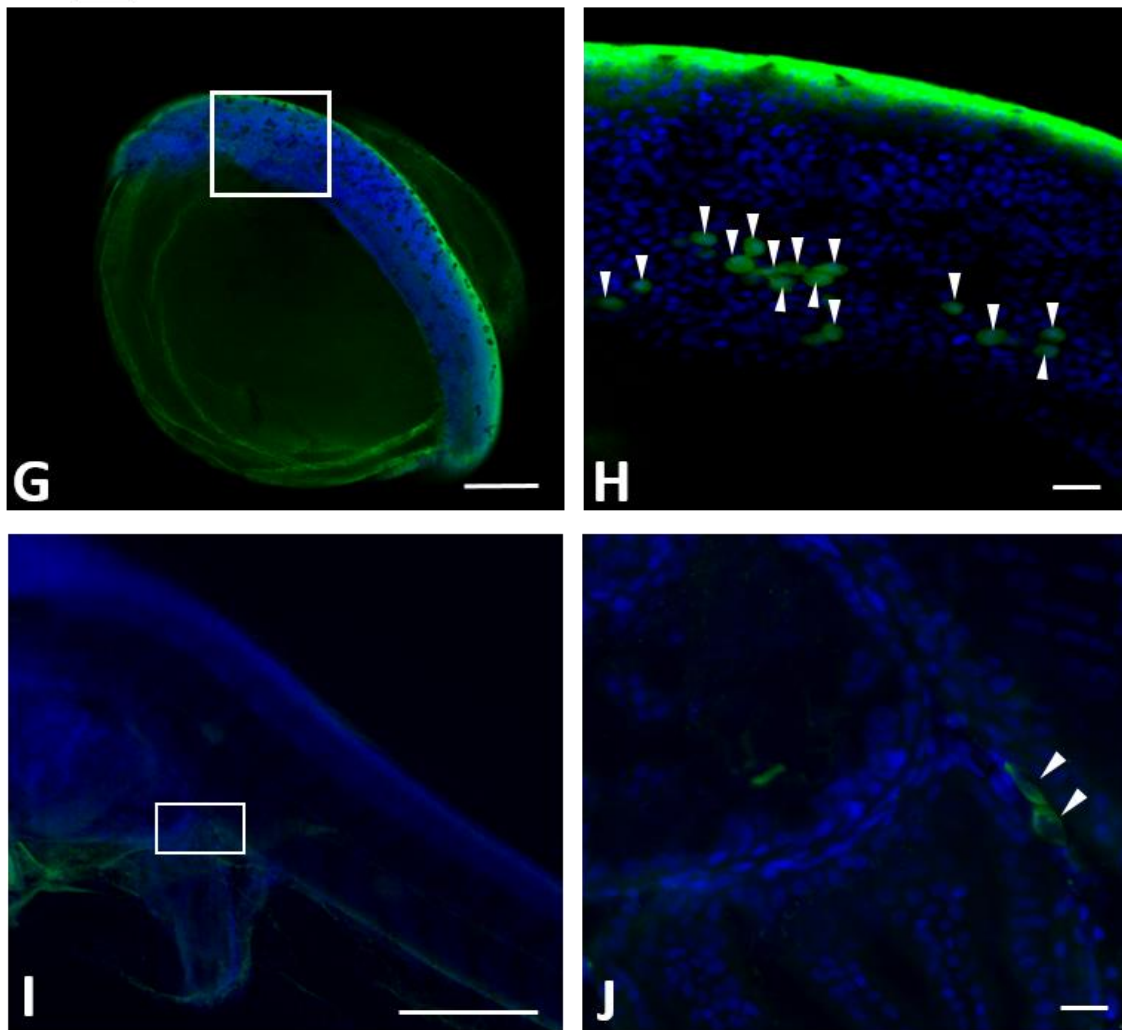


Figura 15. Inmunofluorescencia *Whole-mount* para CGPs con el anticuerpo policlonal contra proteína VASA DDX4/MVH. Análisis confocal llevado a cabo usando el programa FV10- ASW 4.2 Viewer. Las cabezas de flecha indican células positivas para proteína VASA. Las muestras fueron contrateñidas con DAPI. Las imágenes fueron procesadas usando inkscape. **A.** Embrión de 2 células. Escala 200 μm . **B.** Embrión de 4 células. Escala 200 μm . **C.** Fase de gástrula al 60 %, escala 200 μm . **D.** Ampliación del recuadro en C. Escala 10 μm . **E.** Embrión de 8 somitas. Escala 200 μm . **F.** Ampliación del recuadro en E. Escala 10 μm . **G.** Periodo de eclosión. Escala 200 μm . **H.** Ampliación del recuadro en E. Escala 10 μm . **I.** Larva de 8 DDE. Escala 500 μm . **J.** Ampliación del recuadro en I. Escala 10 μm .

3.4 Niveles de expresión del gen *Vasa*

El perfil de expresión del gen *Vasa* mostró valores positivos solo para el desarrollo embrionario y larval temprano. En la etapa embrionaria de 2 a 4 células y en la fase de blástula media (epibolia al 30 %), se observaron los valores más altos. Los niveles de expresión disminuyeron en forma progresiva desde la

fase de gástrula (60 % epibolia) y alcanzaron su valor mínimo en las etapas de somitogénesis, eclosión, 0 DDE y 1 DDE. No se detectaron niveles de expresión del gen *Vasa* en larvas de 3, 5 y 7 DDE (Figura 16).

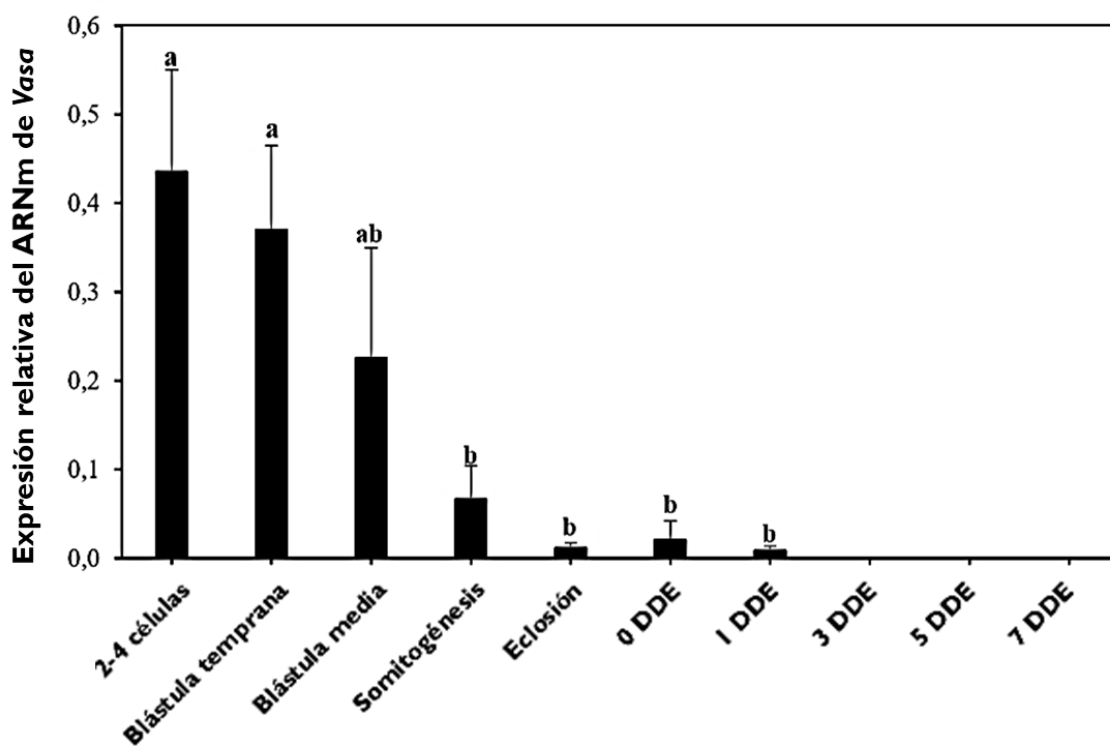


Figura 16. Perfil de niveles de expresión del gen *Vasa* en embriones de *Totoaba macdonaldi* (2-4 células, blástula media, gástrula, somitogénesis y eclosión) y larvas (0, 1, 3, 5, 7 DDE). Validación de patrones de expresión del gen *Vasa* mediante qPCR. Niveles de expresión del gen *18S* fueron usados como control interno. Los valores indican la media con desviación estándar (DE) por triplicado. Las diferencias significativas (letras minúsculas) fueron detectadas mediante análisis de varianza (ANOVA). Una vez que se determinó que existían diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizó un test post-hoc Newman-Keuls (SNK). Para realizar todos los análisis se empleó el programa STATISTICA 8.0™ (StatSoft, Inc. USA).

3.4 Amplificación del gen *Vasa*

Se amplificó un fragmento de 123 pares de bases (pb), pero solo se dejó un fragmento de 83 pb después de la eliminación de los cebadores (AGGCTTTGGAGGAGGGGAAGACAAAGAAAATAAGGATGAAAGTGATGGTGACCGACCCAGGGTCACGTACATTCCCCGACC). Este fragmento de 83 pb coincidió con los ARNm del gen *Vasa* de cinco especies de la familia Scianidae, con una identidad superior al 95 % (Tabla 6).

Tabla 6. Resultado del BLAST para el fragmento de 83 pb después de quitar los iniciadores.

Descripción	Max puntaje	Total	Cobertura	Valor E	Identidad	Acceso
<i>Larimichthys crocea</i> DEAD-box helicase 4 (ddx4), mRNA	148	148	100 %	1.00E-32	99 %	NM_001303336
<i>Argyrosomus japonicus</i> Vasa mRNA for VASA protein, complete cds	147	147	98 %	5.00E-32	99 %	LC317109
<i>Nibea albiflora</i> Vasa mRNA for VASA protein, complete cds	137	137	100 %	3.00E-29	96 %	LC317110
<i>Nibea mitsukurii</i> Vasa mRNA, complete cds	137	137	100 %	3.00E-29	96 %	GQ404692
<i>Pennahia argentata</i> Vasa mRNA for VASA protein, complete cds	132	132	100 %	1.00E-27	95 %	LC317111

Capítulo 4. Discusión

En este estudio, se describieron por primera vez las CGPs y su patrón de migración en *T. macdonaldi*. Además de la caracterización morfológica de estas células, la detección de ARNm del gen *Vasa* y la proteína VASA, se ha utilizado para una identificación más precisa

Las CGPs son los precursores embrionarios de los gametos y dan origen a las espermatogonias en los machos y a las oogonias en las hembras. Estas células se pueden observar en organismos donde la gónada no está morfológicamente desarrollada (Extavour y Akam, 2003; Rosner et al., 2009). Los resultados del análisis morfológico de las larvas mostraron que las CGPs tienen las características típicas de estas células, como un tamaño mayor que las células somáticas, forma oval, contornos irregulares y una alta relación núcleo-citoplasma, lo que permitió la identificación de las CGPs en los cortes histológicos. Estudios previos en pez cebra describieron la presencia de inclusiones citoplásmicas granulares, llamadas *nauge*, que se encontraban en estrecha asociación con grupos de mitocondrias y cerca de la envoltura nuclear (Braat et al., 1999). Estas estructuras electro-densas, formadas por ARN y proteínas, probablemente están involucradas en la regulación de la transcripción y, por lo tanto, en la diferenciación de las células germinales (Seydoux y Dunn, 1997). El análisis histológico mostró algunas aglutinaciones en el citoplasma que podrían ser el *nauge*, aunque se necesitarían análisis más detallados con microscopía electrónica para confirmar esta hipótesis.

Los resultados histológicos del presente estudio sugieren que las CGPs en la larva de 6 DDE seguían en movimiento hacia el mesenterio dorsal. El proceso de migración de estas células no se completó hasta los 9 DDE cuando se observó una cresta germinal con algunas CGPs rodeadas por células somáticas en el lado dorsal del peritoneo. En la larva de 11 DDE, se pudo observar el engrosamiento del primordio gonadal como resultado de la proliferación de un grupo de células somáticas que rodean a las CGPs, lo que indica el inicio del desarrollo gonadal. Estudios previos han demostrado que las CGPs de los peces tienden a proliferar después de alcanzar las crestas germinales (Yoshizaki et al., 2002) por tanto, la proliferación celular y el consiguiente aumento en el tamaño de las gónadas en desarrollo se deba a la interacción cercana entre las CGPs y los precursores de las células somáticas derivadas del peritoneo (Okuthe et al., 2014).

Las moléculas de señalización requeridas para la proliferación de las CGPs en peces todavía no están claras, aunque se presume que existen factores de crecimiento que se expresan en las células somáticas circundantes involucrados en este proceso (McLaren, 2003). En embriones de trucha arcoíris

(*Oncorhynchus mykiss*) se identificó un factor de crecimiento (GSDF), que se expresa en las células somáticas de la cresta germinal durante la embriogénesis. La inhibición del factor GSDF suprimió la proliferación de las CGPs en esta especie (Sawatari et al., 2007).

Aunque la proliferación de las CGPs en peces teleósteos se da cuando la migración ha finalizado, el momento en el que ocurre varía en función de la especie, en el atún amarillo (*Thunnus albacares*), la proliferación de las células germinales comenzó entre los 14 y 20 DDE (Kobayashi et al., 2015), mientras que en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ocurre a los 139 días después de la fecundación (DDF), posiblemente debido a la baja temperatura a la que se desarrolla el embrión (Nagasawa et al., 2013). La proliferación de las CGPs no se encontró en las secciones histológicas de las larvas de totoaba, aunque los estudios de *Nibeia mitsukurii*, otra especie de familia Scianidae, mostraron que las CGPs comenzaron a proliferar a los 23 DDE, cuando las células somáticas empezaron a recubrir a las CGPs, después de la formación del primordio gonadal (Takeuchi et al., 2009).

Los resultados del análisis de inmunofluorescencia mostraron una señal positiva para proteína VASA en embriones en fase de desarrollo de 2 y 4 células respectivamente, en las primeras divisiones celulares en el período de clivaje. Se detectó una fuerte señal en el polo vegetal del huevo, lo que sugiere que en esta zona hay una alta concentración de proteína VASA. Mahowald (1972) demostró que en el huevo de *Drosophila melanogaster* hay unas estructuras granulares que tienen funciones conservadas en la formación, supervivencia y migración de las células germinales, denominadas plasma germinal.

El plasma germinal es una colección de ARNm y proteínas situadas en una región del citoplasma del ovocito, cuando el ovocito es fertilizado y comienzan las divisiones celulares se segregará sólo en ciertas células, las cuales se convertirán en las CGPs del embrión en formación. Los experimentos pioneros sobre la segregación del plasma germinal se realizaron en la mosca de la fruta (*D. melanogaster*), en la cual se descubrió que durante la ovogénesis los RNAm y proteínas específicas de la línea germinal son sintetizados por las células de soporte ("nurse cells"). Estos productos son trasladados por puentes citoplasmáticos al polo posterior donde se ensamblan y son heredados por las células que se convertirán en CGPs durante la embriogénesis temprana (Williamson y Lehmann, 1996). El ensamblaje del plasma germinal en *D. melanogaster* está dirigido por varios genes (*gurken*, *staufer*, *spire*, *capuccino*) entre los cuales destaca el gen *oskar* (*osk*), que además controla el número de precursores de células germinales formados en el polo posterior del embrión. La deslocalización del ARNm de *oskar* al polo anterior conduce a la inducción de células germinales en la parte ectópica, lo que indica que el gen *oskar* es un ultra organizador del plasma germinal en *Drosophila melanogaster* (Ephrussi et al., 1992).

En pez cebra, la segregación del plasma germinal no está clara, aunque ya se ha descubierto un gen que podría cumplir la función de ultra organizador del plasma germinal como en *D. melanogaster*, el gen *bucky ball* (*buc*). Este gen desempeña un papel importante en la agregación del plasma germinal en el cuerpo de Balbiani durante la ovogénesis del pez cebra (*Danio rerio*). En ausencia del gen *buc*, durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano, el plasma germinal falla en su agregación, sin embargo, la sobreexpresión de este gen resulta en un aumento del número de CGPs durante el desarrollo embrionario. La formación *de novo* del plasma germinal mediante el gen *buc* parece improbable porque la expresión de los componentes del plasma germinal no se induce en el embrión temprano, lo que reafirma la hipótesis de que *buc* es un reclutador de los componentes del plasma germinal ya presentes en el embrión temprano (Bontems et al., 2009, Saito et al., 2014).

Los resultados del estudio de inmunofluorescencia mostraron que las células con marcaje positivo para proteína VASA no presentaban un crecimiento exponencial como las células somáticas. Knaut et al. (2000) demostraron que en pez cebra el aumento en el número de células en el embrión no conlleva un aumento en el número de células que contienen plasma germinal. Este hallazgo podría ser una consecuencia de la herencia asimétrica del plasma germinal, que consiste en que durante las primeras fases del desarrollo embrionario en pez cebra el ARN de *Vasa* se segrega en uno de los dos blastómeros, diferenciando a las CGPs de las células somáticas. En el estadio embrionario de 512 células, las células en división segregan el ARN de *Vasa* en forma asimétrica a solo una de las células hijas. Después de esta fase, el plasma germinal cambia su distribución y se propaga en el citoplasma de las células que lo contienen y, después de la división celular, es heredado por ambas células hijas. El cambio de la segregación asimétrica a simétrica se da en la etapa de blástula tardía, y precede a la etapa de proliferación de las CGPs que da como resultado un aumento en el número de CGPs (25-30) al final del primer día de desarrollo (Yoon et al., 1997; Knaut et al., 2000). La segregación asimétrica del plasma germinal no se ha observado en todos los peces teleosteos, en medaka (*Oryzias latipes*) el ARN *Vasa* no se segrega asimétricamente, sino que se distribuye ampliamente en muchas células antes de su restricción a las CGPs durante la gastrulación (Shinomiya et al., 2000). En *totoaba macdonaldi* no se detectó una distribución asimétrica del plasma germinal, aunque no podemos afirmar que la segregación no se realice del mismo modo que en el pez cebra.

En la totoaba, la proteína VASA se observa desde el desarrollo embrionario temprano, dentro del polo vegetal del huevo, lo que indica su origen materno. El papel de la proteína VASA está altamente conservado entre diferentes organismos (Raz, 2000). Aunque las funciones de VASA no están claras, el hecho de que esté presente en las CGPs nos brinda información sobre su función específica como factor

determinante en el desarrollo de la línea germinal. En *Danio rerio* (Yoon et al., 1997) y *Oryzias latipes* (Herpin et al., 2007), la proteína VASA se localiza en cuatro regiones, entre los blastómeros del embrión de 4 células. En *T. Macdonaldi* no se observó este patrón, lo que sugiere que existen diferencias en los patrones de migración entre los peces teleósteos. Estas diferencias podrían estar asociadas al tamaño del huevo y a la forma y diferencias en el desarrollo embrionario entre las especies (Robles et al., 2016).

En *T. macdonaldi*, las CGPs se observaron por primera vez en una posición extra embrionaria en el estadio de epibolia al 60 %, donde forman una línea en el borde del blastodermo. Estas células migran desde el lado ventral del intestino hasta el mesodermo, presumiblemente en respuesta a la señalización de las células somáticas y finalmente, alcanzan el área del tejido donde se formará la cresta genital a los 6 DDE. En el pez cebra, el proceso de migración se lleva a cabo más rápidamente, dentro de las primeras 20 h después de la fertilización (Molyneaux y Wylie, 2004). En la mayoría de los peces, el origen de las CGPs es extra embrionario, lo que significa que estas células se localizan en el blastodermo en el polo vegetal, donde se localizan los componentes maternos, incluida la proteína VASA (Herpin et al., 2007; Saito et al., 2014). En los embriones de peces teleósteos, el blastodermo crece en el polo vegetal sobre la reserva vitelina, pero sus células no se diferenciarán como parte de él. Por lo tanto, las CGPs se forman fuera del embrión y durante la gastrulación migran a la futura ubicación de las gónadas (Weidinger et al., 1999).

Numerosos estudios se han centrado en investigar cómo estas células pueden migrar largas distancias en un embrión, que aún no está formado, para encontrar su objetivo. Weidinger et al. (2003) encontraron que un factor quimiotáctico, una proteína de unión al ARN llamada Dead end (Dnd), que está presente en el plasma germinal, era necesaria para el inicio de la migración y la supervivencia de las CGPs en el pez cebra. Cuando se bloqueó este factor, las CGPs no pudieron iniciar el movimiento. Otra señalización quimiotáctica que actúa como un atrayente de las CGPs en pez cebra es el Factor Derivado del Estroma 1 (SDF-1), secretado por células somáticas de la cresta gonadal. Se ha observado que este factor, además de servir como guía, está involucrado en la polimerización de los filamentos de actina y, por lo tanto, en el movimiento del citoesqueleto celular (Doitsidou et al., 2002). Blaser et al. (2006) observaron la generación de protuberancias en la membrana celular de las CGPs en el pez cebra como resultado de la activación de la contracción de la miosina. Este estudio determinó que estas protuberancias se formaron en la parte de la célula con mayor concentración de SDF-1, lo que sugiere que este factor también controla la dirección de la migración. Otro estudio muestra que el factor quimiotáctico SDF-1 está directamente involucrado en la pérdida de movilidad de estas células una vez que alcanzan el área diana en respuesta a las variaciones locales en la distribución de SDF-1 (Reichman-Fried et al., 2004). Se sabe que los factores quimiotácticos activan cascadas de señalización que permiten la migración de las CGPs

hasta su objetivo. Aunque, en este trabajo se describió el patrón de migración de las CGPs de la totoaba, son necesarios otros estudios para conocer el mecanismo químico involucrado en el movimiento de estas células.

Para confirmar la hipótesis del origen materno del ARNm de *Vasa*, se analizó la expresión del gen *Vasa* durante el desarrollo embrionario y larvario temprano. El nivel más alto ocurrió en el desarrollo embrionario temprano, hasta la etapa de blástula media. Resultados similares se han obtenido en estudios del nivel de expresión del gen *Vasa* para otras especies de peces: bacalao del Atlántico, *Gadus morhua* (Presslauer et al., 2012); pez cebra (Yoon et al., 1997); Salmón del atlántico, *Salmo salar* (Nagasawa et al., 2013) y lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Pachiarini et al., 2013). El embrión no produce sus propios ARNm hasta la activación de la transcripción en la etapa media de la blástula como mencionan Kane y Kimmel, (1993), lo que nos lleva a pensar que este nivel de expresión se debe a factores maternos acumulados en el huevo. Braat et al., (1999) encontraron que durante la etapa II en la ovogénesis del pez cebra, los transcritos del gen *Vasa* se localizan inicialmente en la corteza del huevo, rodeando todo el ovocito. En otros peces teleósteos como la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, se encontró que el gen *Vasa* se expresa fuertemente en el citoplasma de los ovocitos previtelogénicos (Kobayashi et al., 2000), mientras que, en el sábalo americano, *Alosa sapidissima*, se detectó una mayor expresión de *Vasa* en las etapas tempranas de la ovogénesis y en todas las etapas de la espermatogénesis (Wu et al., 2018). Del mismo modo, en *O. latipes*, la señal de VASA fue más intensa en ovogonias y en los ovocitos en los estadios III, se mantuvo en los ovocitos en etapas III-VI y se redujo en ovocitos en la etapa VII (Yuan et al., 2014). En estos estudios, la proteína VASA se observó en la gametogénesis, lo cual concuerda con la hipótesis de que los ARNm detectados en el desarrollo embrionario temprano podrían ser producidos endógenamente durante la ovogénesis, y por lo tanto su origen es materno

La expresión del gen *Vasa* disminuyó desde la etapa de gástrula hasta 1 DDE, alcanzando un nivel cero a los 3 DDE. El hecho de que no se detecte ninguna expresión de *Vasa* en el desarrollo larval de totoaba no indica necesariamente que el gen haya dejado de expresarse. La aparente ausencia de expresión podría deberse a los bajos niveles de transcripción de *Vasa*, en comparación con la síntesis de nuevos ARNm, que enmascara la expresión de *Vasa*, como se señala en otro estudio de Blázquez et al. (2010). La expresión de *Vasa* de la etapa de 2-4 células etapa hasta los 3 DDE, podría indicar que la actividad del gen *Vasa* es necesaria para la migración de CGPs y el hecho de que estas células están cerca de su objetivo, provoca el silenciamiento de este gen. Esta idea concuerda con los hallazgos en medaka (*Oryzias latipes*) donde se requiere *Vasa* para la migración de PGC, aunque no es necesario para la supervivencia de estas células (Li et al., 2009).

El gen *Vasa* de la totoaba mostró un grado de similitud alto con cinco especies de la familia Sciaenidae con una identidad superior al 95 %, lo que indica que este gen está altamente conservado entre especies filogenéticamente cercanas. El descubrimiento de diferentes isoformas de ARNm de *Vasa* en otros peces teleósteos como *Oreochromis niloticus* (Kobayashi et al., 2000) o *Solea senegalensis* (Pacharinni et al., 2013) donde la expresión de los transcritos se detectó en la parte anterior, posterior y media del ovario, así como en los testículos de adultos maduros, sugiere que este gen también está implicado en el desarrollo gonadal y la gametogénesis en ambos sexos. Aunque su función exacta no está clara, se cree que a través de su actividad helicasa, el gen *Vasa* podría ser crítico en la regulación traduccional de los ARNm implicados en la diferenciación de las células específicas de la gónada (Raz, 2000). Finalmente, los reducidos niveles de expresión extragonadales del gen *Vasa*, sugieren que los productos de este gen pueden tener una implicación funcional en otros tejidos según los estudios mencionados anteriormente. Se necesitan estudios futuros para comprender la función de otros transcritos del gen *Vasa* en la morfogénesis gonadal de totoaba.

En conclusión, la presencia del ARNm de *Vasa* y la proteína VASA en la embriogénesis temprana indican la existencia del plasma germinal en este pez de la familia Scianidae. Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de origen de las CGPs en *T. macdonaldi* es por preformación. El gen *Vasa* podría estar involucrado en la migración de las CGPs, pero se necesitan otros estudios para aclarar su papel en la supervivencia y la diferenciación de estas células. El patrón de migración de las CGPs está bien conservado entre los peces teleósteos, la totoaba no es una excepción. Sin embargo; presenta diferencias en la ubicación de la proteína VASA en las primeras divisiones del embrión y los días que tardan estas células en llegar al primordio gonadal. Nuestros resultados nos permiten recomendar el aislamiento y la posterior criopreservación de estas células antes del día 6 después de la eclosión, cuando el desarrollo embrionario y larval se da a 21 ° C. La caracterización de estas células es el primer paso para la conservación de esta especie y nos proporciona información para comprender la génesis gonadal y la diferenciación sexual en *Totoaba macdonaldi*.

4.1 Perspectivas futuras

Este trabajo se presenta como un primer paso para el futuro aislamiento y criopreservación de las CGPs de la especie *Totoaba macdonaldi* en un banco de germoplasma. La criopreservación de estas células supondría una alternativa para la protección de este recurso endémico de Baja California.

La criopreservación de CGPs se ha llevado a cabo de manera exitosa en especies como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), donde las CGPs descongeladas que se trasplantaron a la cavidad peritoneal y se diferenciaron en espermatozoides y óvulos maduros en las gónadas del receptor. Además, la fertilización de huevos con espermatozoides derivados de CGPs criopreservadas dio lugar al desarrollo de peces fértiles (kobayashi et al. 2007). En el pez cebra también se ha logrado la criopresevación de las CGPs con una alta tasa de supervivencia celular (90%) y ausencia de daño en el ADN (Riesco et al., 2012). El desarrollo de un protocolo de criopreservación para las CGPs de la especie *Totoaba macdonaldi* es el siguiente paso para preservar este recurso.

Los trabajos realizados anteriormente en peces han conseguido el aislamiento y posterior trasplante de estas células con resultados exitosos (Saito et al., 2008; Takeuchi et al., 2004). No obstante, la manipulación de estas células, así como de los embriones, es compleja y el éxito de esta técnica depende de factores como la compatibilidad de las células del receptor y donante, así como la capacidad de las células trasplantadas de recibir las señales químicas que les permitan una migración exitosa. Otro de los problemas a los que se enfrenta esta técnica es la competencia de las CGPs endógenas con las CGPs trasplantadas (Shinohara et al., 2001) que conlleva una producción de puestas mixtas. Dichos inconvenientes se pueden evitar utilizando receptores que hayan sido previamente esterilizados sin que la gónada pierda su funcionalidad.

El trasplante de CGPs de un donante en receptores estériles es útil para la producción eficiente de gametos derivados del donante. La triploidía (Yoshizaki et al., 2011), los tratamientos de hipertermia (Ito et al., 2008), la radiación (Chmilevsky et al., 1997) y el empleo de sustancias químicas (Lacerda et al., 2012) son métodos utilizados para la obtención de receptores estériles en peces. El busulfán (1,4-butanodiol dimetanosulfonato) es una droga citotóxica que consigue eliminar las células germinales, bloquear su migración e impedir el desarrollo gonadal consiguiendo receptores estériles (Lacerda et al., 2012). Sin embargo, sus efectos adversos sobre la fisiología de los peces no han sido estudiados.

En los peces triploides (Piferrer et al., 2009), las células germinales triploides proliferan mitóticamente y ocupan el nicho de las células germinales en las gónadas, aunque no pueden completar la meiosis. Por lo tanto, la competencia por el nicho, entre las CGPs triploides endógenas y las CGPs del donante, puede estar presente en las gónadas triploides, causando la eliminación de células donantes genéticamente "menos" compatibles.

En la actualidad, un estudio realizado por Yoshikawa et al. (2018) propone una solución para conseguir receptores estériles. En este estudio, los gametos de cuatro especies de peces marinos pertenecientes a la familia Sciaenidae, como la totoaba, fueron fertilizados artificialmente para producir híbridos y el desarrollo de células germinales fue examinado a nivel molecular. La migración de las CGPs hacia las crestas fue exitosa en los embriones híbridos, pero las CGPs no proliferaban en sus gónadas. Para saber si el defecto en la proliferación era autónomo o causado por la incompatibilidad con las células somáticas circundantes se realizó un trasplante intraperitoneal de CGPs funcionales de un organismo no híbrido en un pez híbrido. Los resultados mostraron que las CGPs aumentaron en número y se distribuyeron en las crestas germinales de los receptores híbridos, lo que sugiere una proliferación exitosa de las CGPs en el entorno somático del receptor híbrido. Estudios posteriores mostraron un desarrollo gonádico normal y gametos funcionales en ambos sexos. Los híbridos sin células germinales, obtenidos en este estudio, tendrían más nichos disponibles para CGPs de donantes y por tanto serían receptores adecuados para el trasplante de células germinales, no solo en peces de la familia Scianidae, sino también en otros peces marinos (Yoshikawa et al., 2018).

Otra solución posible para la conservación de la totoaba podría ser la posibilidad de emplear células germinales no diferenciadas del testículo (espermatogonias) para llevar a cabo este tipo de trasplantes. La ventaja de las espermatogonias con respecto a las CGPs reside en que la criopreservación exitosa es más fácil en las primeras, debido a su pequeño tamaño. Sin embargo, hay que tener en cuenta que solo las espermatogonias A son capaces de colonizar y proliferar en el esbozo gonadal de la larva receptora (Okutsu et al., 2006). Por tanto, es fundamental conocer la fase de la espermatogénesis en la que se encuentra la gónada de la especie donante antes de recolectar la suspensión de espermatogonias que será inyectada en la larva receptora.

En estas técnicas de reproducción asistida, independientemente de si la célula trasplantada es una CGPs o una espermatogonia, el tamaño de la larva donante y receptora, y por tanto la fase de desarrollo en la que se encuentran, determinará si la colonización por parte de las células germinales exógenas es exitosa (Takeuchi et al., 2009).

Capítulo 5. Conclusiones

- Las CGPs en *Totoaba macdonaldi* tienen un tamaño de entre 10- 12 μm , una elevada relación nucleo- citoplasma y un contorno irregular.
- La formación del primordio gonadal situado en la cavidad peritoneal comienza a los 9 DDE en *T. macdonaldi* a una temperatura de 21°C.
- El patrón de migración de las CGPs está bien conservado entre los peces teleósteos, la totoaba no es una excepción. Sin embargo, presenta diferencias en la ubicación de la proteína VASA en las primeras divisiones embrionarias y en la cronología de su migración hasta el primordio gonadal.
- Las CGPs llegan a la zona donde se formará el primordio gonadal entre los 8 y los 9 DDE, cuando el proceso de migración de estas células se detiene.
- La presencia de ARNm de *Vasa* y de la proteína VASA en la embriogénesis temprana indica la existencia de plasma germinal en este pez de la familia Scianidae.
- El nivel de expresión del gen *vasa* alcanza su nivel más alto en el desarrollo embrionario temprano, lo que podría confirmar el hecho de que los ARNm del gen *Vasa* detectados hasta esta etapa se producen durante la ovogénesis y, por lo tanto, su origen es materno.
- Las CGPs en *T. macdonaldi* se forman por el mecanismo de preformación que es el mecanismo que incluye la existencia de determinantes prelocalizados en el huevo.
- El gen *Vasa* y la proteína VASA podrían estar involucrados en la migración de las CGPs, pero se necesitan otros estudios para aclarar su papel en la supervivencia y diferenciación de estas células.
- Se recomienda el aislamiento y la posterior criopreservación de las CGPs antes de los 6 DDE (cuando el desarrollo embrionario y larval se da a 21 ° C) para conservar el recurso genético de este valioso pez de la familia Sciaenidae.

5.1 Recomendaciones

- Ampliar el número de muestras del desarrollo larval entre el día 10 DDE y el día 20 para poder describir con más detalle la proliferación de las CGPs y la formación del primordio gonadal.
- Se recomienda realizar marcaje con proteína VASA en ovocitos sin fertilizar para poder constatar la presencia del plasma germinal.
- El protocolo de inmunofluorescencia “*Whole mount*” desarrollado en esta tesis para embriones y larvas de *totoaba macdonaldi* puede ser utilizado para marcar otras proteínas como las moléculas de señalización involucradas en la migración, ayudando a entender los mecanismos involucrados en la migración de estas células en esta especie.
- Se recomienda identificar más genes de referencia especie-específicos para los estadios de desarrollo temprano, tanto embrionario como larval para conseguir resultados más robustos en cuanto a los perfiles de expresión del gen *Vasa* en *totoaba macdonaldi*.
- Se necesitan estudios adicionales para entender la función de otros transcritos del gen *Vasa* en la morfogénesis gonadal de la totoaba.
- Se recomienda continuar este trabajo aislando y criopreservando las CGPs para su posterior trasplante.

Literatura citada

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2013. Essential Cell Biology (4^a ed.). Garland Publishing, New York & London.
- Anderson, R., Fässler, R., Georges-Labouesse, E., Hynes, R.O., Bader, B.L., Kreidberg, J.A., Schaible, K., Heasman, J., Wylie, C. 1999. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development*. 126(8):1655-64.
- Aoki, Y., Nagao, I., Saito, D., Ebe, Y., Kinjo, M., Tanaka, M. 2008. Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka. *Dev. Dyn.* 237, 800–807.
- Arvizu, J., Chávez, H. 1972. Sinopsis sobre la biología de la totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, Gilbert 1890. FAO Fish. Synops, 108.
- Badillo-Zapata, D., Lazo, J.P., Herzka, S.Z., Viana, M.T., 2014. The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquac. Res.* 1–12.
- Baillie, J., Groombridge, B. 1996. IUCN red list of threatened animals. International Union for the Conservation of Nature, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Barrera-Guevara, J. C. 1990. The conservation of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert), (Pisces:Sciaenidae), in the Gulf of California, Mexico. *J. Fish Biol.*, 37. Supple, 201–202.
- Beard, J., 1902. The germ cells. I. *Raja batis*. *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontogenie Tiere* 16, 615-702.
- Berdequé, A.J. 1956. Peces de importancia comercial en la costa noroccidental de México. *Secre. Mar., Dir. Gen. Pesca Ind. Conexas*, 345 pp.
- Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F.L., Kawakami, K., Solnica-Krezel, L., Heisenberg, C.P., Raz, E. 2006. Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev. Cell* 11, 613–627.
- Blázquez, M., González, A., Mylonas, C.C., Piferrer, F. 2011. Cloning and sequence analysis of a *vasa* homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 322–333.
- Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M.C., Dosch, R. 2009. *Bucky ball* organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol.*, 19: 414-422
- Braat, A.K., Zandbergen, T., Van De Water, S., Goos, H.J., Zivkovic, D. 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of *vasa* RNA. *Dev. Dyn.* 216: 153–167.
- Brinster, R.L., Zimmermann, J.W. 1994. Spermatogenesis following male germ cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 11298–11302 p.
- Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., Herraes, M.P. 2003. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) *Cryobiology*. 47: 204–213 p.

- Chávez, H. 1973. Descripción de los ejemplares juveniles de totaba, *Cynoscion macdonald* Gilbert. Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural, 34, 293–300.
- Chute, G.R. 1928. The totuava fishery of the California Gulf, Cal, Fish and Game. 14 (4): 275-281.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., Schier, A.F. 2002. Production of maternalzygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. Proc Natl Acad Sci. 99:14919-14924 p.
- Cisneros-Mata, M.A., Botsford, L.W., Quinn, J.F. 1997. Projecting viability of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. Ecological Applications, 7(3), 968–980. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0968:PVOTMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0968:PVOTMA]2.0.CO;2)
- Cisneros-Mata, M.A., Montemayor-López, G., Román-Rodríguez, M.J. 1995. Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. Conservation Biology, 9 No. 4, 806–814. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/2386990?seq=1#page_scan_tab_contents
- Conget, P., Fernández, M., Herrera, G., Minguell, J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 143:319-329.
- De Anda-Montañez, J.A., García-De León, F.J., Zenteno-Savín, T., Balart-Páez, E., Méndez-Rodríguez, L.C., Bocanegra-Castillo, N., Martínez-Delgado, M.E. 2013. Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción. La Paz, Baja California Sur, México.
- Díaz-Viloria, N., Sánchez-Velasco, L., Perez-Enriquez, R., Jiménez-Rosenberg, S. 2013. Molecular identification and morphological description of totoaba *Totoaba macdonaldi* and curvina *Cynoscion reticulatus* preflexion larvae (Perciformes: Sciaenidae). Ichthyol Res. 60: 390-395
- Diez, C., Muñoz, M., Caamano, J.N., Gómez, E. 2012. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. Reproduction in domestic animals. Zuchthygiene 47 Suppl 3:76-83.
- Dodd, J.M., Sumpter, J.P., 1983. Reproductive cycles of cyclostomes, elasmobranchs and bony fishes. In "Marshall's Physiology of Reproduction," 4th ed., Vol. I
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Kopranner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C. V., Leung, T., Raz, E., 2002. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. Cell, 111:647–59.
- Dudley, B., Runyan, C., Takeuchi, Y., Schaible, K., Molyneaux, K. 2007. BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. Mechanisms of Development 124, 68–77.
- Dumstrei, K., Mennecke, R., Raz, E. 2004. Signaling pathways controlling primordial germ cell migration in zebrafish. J Cell Sci, 117: 4787–4795.
- Ephrussi, A., Lehmann, R. 1992. Induction of germ cell formation by *oskar*. Nature 358, 387-392.
- Extavour, C.G., Akam, M. 2003. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. Development, 130(24), 5869-5884.

- Farlora, R., Hattori-Ihara, S., Takeuchi, Y., Hayashi, M., Octavera, A., Alimuddin, Yoshizaki, G. 2014. Intra-peritoneal germ cell transplantation in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Biotechnology* 16, 309–320.
- Fernandes, J.M., Mommens, M., Hagen, O., Babiak, I., Solberg, C. 2008. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 150:23-32
- Flanagan, C.A., y Hendrickson, J. R. 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, 4(3), 531–544.
- Fuentes-Quesada, J.P., Viana, M.T., Rombenso, A.N., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J.P., Mata-Sotres, J.A. 2018. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture* 495: 78-89.
- Fujiwara, T., Dunn, N.R., Hogan, B.L.M. 2001. Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98 (24): 13739-13744
- Galaviz, M. A., López, L. M., García Gasca, A., Álvarez González, C. A., True, C. D., Gisbert, E., 2015. Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 1117–1130.
- Gamble, M., Wilson, I., 2002. The Hematoxylin and Eosin. In: Bancroft, J.D., Gamble, M. (Eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques*, Edition 5. Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 125-138.
- García De León, F. J. 2013. La totoaba, un pez enigmático del golfo de California. *Investigación Y Ciencia*, 10–11.
- Gilbert, S. F., 2006. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Goyard, E., Goarant, C., Ansquer, D., Brun, P., de Decker, S., Dufour, R., Galinié, C., Peignon, J.-M., Pham, D., Vourey, E., Harache, Y., Patrois, J. 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*. *Aquaculture* 278:43-50 p.
- Groeneveld, L.F., Lenstra, J.A., Eding, H., Toro, M.A., Scherf, B., Pilling, D., Negrini, R., Finlay, E.K., Jianlin, H., Groeneveld, E., Weigend, S., The GLOBALDIV Consortium. 2010. Genetic diversity in farm animals. *Animal Genetics.*41 (Suppl. 1), 6–31.
- Guerrero-Estévez, S., Moreno-Mendoza, N. 2012. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J. Fish Biol.* 80, 572–594.
- Gustafson, E. A., Wessel, G. M. 2010. *Vasa* genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 32(7), 626–637.

- Hay, B. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N. 1988. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55(4): 577-587.
- Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., Schartl, M. 2007. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev. Biol.* 7:3.
- Higaki, S., Mochizuki, K., Baba, H., Akashi, Y., Yamaha, E., Katagiri, S., and Takahashi, Y. 2009. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jpn. J. Vet. Res.* 57, 119-128.
- Hird, S. N., Paulsen, J. E., Strome, S. 1996. Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation. *Development* 122: 1303–1312
- Houston, D.E., King, M.L. 2000. Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Curr. Top. Dev. Biol.* 50: 155-181
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., et al. 2007. A role for *Piwi* and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 129, 69–82
- Illmensee, K., Mahowald, A.P. 1974. Transplantation of posterior pole plasm in *Drosophila*: induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1016-1020.
- Jordan, D.S., Evermann, B.W. 1896. The fishes of north and middle America. *U.S Nat. Mus. Bull.* 47 (2): 1411
- Kane, D. A., Kimmel, C.B., 1993. The zebrafish midblastula transition. *Development.* 119: 447-456.
- Kawamoto, T., Narita, T., Isowa, K., Aoki, H., Hayashi, M., Komaru, A. Ohta, H. 2007. Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 54:19-26.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., NussleinVolhard, C. 2000. Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* 149, 875–888.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y. 2000. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mechanisms of Development.* 99: 139-142.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y. 2002. Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 111: 167–171.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2007. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol Reprod Dev.* 74(2): 207-13.

- Kobayashi, T., Honryo, T., Agawa, Y., Sawada, Y., Tapia, I., Macias, K.A., Cano, A., Scholey, V.P., Margulies, D., Yagishita, N. 2015. Gonadogenesis and slow proliferation of germ cells in juveniles of cultured yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Reproductive Biology* 15:106–112.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., Raz, E. 2001. A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* 15: 2877-2885.
- Lacerda, S.M., Batlouni, S.R., Silva, S.B.G. 2006. Germ cells transplantation in fish: The Nile- tilapia model. *Anim Reprod.* 3: 146-159 p.
- Lacerda, S.M., Costa, G.M., Campos- Junior, P.H., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., Franca, L.R. 2012. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol Biochem.*
- Lacerda, S.M., Aponte, P.M., Costa, G.M., Campos- Junior, P.H., Segatelli, T.M., Silva, M.A., Franca, L.R. 2012. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Anim. Reprod.* 9(4): 798-808 p.
- Le Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J. 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. En: Babin, P. J., Cerdà J., Lubzens E., (Eds.). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications.* 1-37.
- Lercari, B. D., Chávez, A. 2007. Possible causes related to historic stock depletion of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Perciformes: Sciaenidae), endemic to the Gulf of California. *Fisheries Research* 86:136–142.
- Li, M., Hong, N., Xu, H., Yi, M., Li, C., Gui, J., Hong, Y. 2009. Medaka *vasa* is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mech. Dev.* 126, 366–381.
- Liang, L., Diehl-Jones, W., Lasko, P. 1994. Localization of Vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development.* 120(5):1201-11.
- Lin, F., Xu, S., Ma, D., Xiao, Z., Zhao, C., Xiao, Y., Chi, L., Liu, Q., Li, J. 2012. Germ-line specific expression of a *vasa* homologue gene in turbot (*Scophthalmus maximus*): evidence for *vasa* localization at cleavage furrows in euteleostei. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 803–813.
- Livak, K. J., Schmittgen, T.J. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. *Methods* 25: 402-408.
- Lopes, S., Roelen, B., Monteiro, R., Emmens, R., Lin, H.I., Li, E., Lawson, K.A., Mummery, C.L. 2004. BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & development.* 18: 1838-49
- Lüking, A., Stahl, U., Schmidt, U. 1998. The protein family of RNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33, 259–296.
- Maegawa, S., Yasuda, K., Inoue, K. 1999. Maternal mRNA localization of zebrafish *DAZ*-like gene. *Mech. Dev.* 81, 223–226.
- Majhi, S.K., Hattori, R.S., Yokota, M., Watanabe, S. 2009. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. *Plos One*, 4(7) e6132.

- Majhi, S.K., Kumar, S. 2017. Germ cell transplantation: a potential tool for propagation of endangered fishes. *Annals Aqua Res* 4, 4–7.
- Mazur, P., Leibo, S.P., Seidel, G.E., Jr. 2008. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biology of Reproduction* 78:2-12.
- Mishima, Y., Giraldez, A., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A. F., Inoue, K. 2006. Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by Zebrafish miR-430. *Current biology: CB*. 16. 2135-42.
- McLaren, A. 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.*, 262: 1-15
- Mahowald, A.P. 1972. Ultrastructural observations on oogenesis in *Drosophila*. *J. Morphol.* 137: 29–48.
- Mara, L., Casu, S., Carta, A., Dattena, M. 2013. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science* 138:25-38.
- Mata-Sotres, J. A., Lazo, J. P., y Barón-Sevilla, B. 2015. Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture*, 437, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.037>
- Molyneaux, K., Wylie, C. 2004. Primordial Germ Cell Migration. *International Journal of Developmental Biology*. 48: 537-544.
- Nagasawa, K., Fernandes, J.M.O., Yoshizaki, G., Miwa, M., Babiak, I. 2013. Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: Characterization of Vasa, Dead End, and Lymphocyte antigen 75 genes. *Molecular Reproduction and Development*, 80(2), 118-131.
- Nakamura, A., Amikura, R., Mukai, M., Kobayashi, S., Lasko, P. 1996. Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science*, 274 5295, 2075-9.
- Nóbrega, R.H., Greebe, C.D., Van de Kant, H., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W. 2010. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *Plos One*, 5:e12808 p.
- Okuthe, G. E., Hanrahan, S., Fabian, B.C. 2014. Early gonad development in zebrafish (*Danio rerio*) *Afr. J. Biotechnol.* 13, 3433–3442.
- Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G. 2006. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J Reprod Dev*, 52:685-693.
- Olsen, L. C., Aasland, R., Fjose, A. 1997. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* 66, 95–105.
- Pacchiarini, T., Cross, I., Leite, R. B., Gavaia, P., Ortiz- Delgado, J. B., Pousao- Ferreira, P., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Cabrita, E. 2013. *Solea senegalensis vasa* transcripts: molecular characterisation, tissue distribution and developmental expression profiles. *Reproduction, Fertility and Development* 25: 646-660.
- Pacchiarini, T., Sarasquete, C., Cabrita, E. 2013. Development of interspecies testicular germ-cell transplantation in flatfish. *Reproduction, Fertility and Development* 26(5): 690-702.

- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.C., Flajšhans, M., Haffray, P. 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293: 125-156.
- Presslauer, C., Nagasawa, K., Fernandes, J.M.O., Babiak, I. 2012. Expression of *vasa* and *nanos3* during primordial germ cell formation and migration in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Theriogenology*, 78(6), 1262–1277
- Raz, E. 2000. The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biol.* 1, 1–6.
- Raz, E. 2003. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* 4:690-700.
- Reichman-Fried, M., Minina, S., Raz, E., 2004. Autonomous modes of behavior in primordial germ cell migration. *Dev. Cell* 6, 589–596
- Riesco, M.F., Martinez-Pastor, F., Chereguini, O., Robles, V. 2012. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology* 77: 122–130.
- Robles, V., Riesco, M.F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D.G., Cabrita, E., Herráez, P. 2017. Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and Spermatogonia: biotechnological applications. *Aquaculture* 472:4–20
- Rongo, C., Lehmann, R. 1996. Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Trends Genet.* 12: 102-109.
- Rosales, F., Ramírez, E. 1987. Estado Actual del Conocimiento sobre la Totoaba (*Cyonosción macdonaldi*), Gilbert 1890. Primera edición. Instituto Nacional de Pesca 7-42.
- Rosner, A., Moiseeva, E., Rinkevich, Y., Lapidot, Z., Rinkevich, B. 2009. *Vasa* and the germ line lineage in a colonial urochordate. *Dev Biol.* 331(2):113–128.
- Rueda-López, S., Lazo, J.P., Correa, R.G., Viana, M.T. 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 319: 385–390.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E. 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod* 78(1):159–166
- Saito, T., Psenicka, M., Goto, R., Adachi, S., Inoue, K., Arai, K., Yamaha, E. 2014. The Origin and Migration of Primordial Germ Cells in Sturgeons. *Plos One* 9(2): e86861
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2007. A novel transforming growth factor- β superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Biol.* 301(1): 266-275.
- Seydoux, G., Dunn, M.A. 1997. Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* 124: 2191–2201.
- Seydoux, G., Braun, R.E. 2006. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell.* 127(5): 891–904.

- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S. 2000. The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 42: 317–326
- Simianer, H. 2005. Decision making in livestock conservation. 2005. *Ecological Economics.* 53: 559 – 572.
- Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G., Raz, E. 2005. Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11): 4074–4079.
- Stoss, J., Refstie, T. 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30:229-236.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T. 2003. Generation of live fry from intra-peritoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 69, 1142–1149.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T. 2004. Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430: 629–630.
- Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., Yoshizaki, G. 2009. Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biol Reprod*, 81:1055-1063.
- Tam, P.P., Zhou, S.X. 1996. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev. Biol.* 178: 124–132.
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., Love, D.R. 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 39, 384–390.
- Teshima, K., Tomonaga, S. 1986. Primordial germ cells and lymphomyeloid system in the embryos of the Aleutian skate, *Bathyraja aleutica*. *Jpn. J Ichthyol* 33(1):19–26.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., Noce, T. 2000. Expression and intracellular localization of mouse *Vasa*-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development* 93: 139-149.
- Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J.N., Muñoz, N., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., Díez, C. 2012. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology.* 78: 1465–1475.
- True, C.D., Silva Loera, A., Castro Castro, N. 1997. Acquisition of broodstock of *Totoaba macdonaldi*: Field handling, decompression, and prophylaxis of an endangered species. *Progressive Fish-Culturist*, 59(3), 246–248.
- True, C.D., Castro-Castro, N., Sandoval-Garibaldi, G., Morales-Ortiz, C. 2001. Reproducción controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). VIII Congreso Nacional y II Simposium Internacional sobre el Mar de Cortés.
- Tzung, K.W., Goto, R., Saju, J.M., Sreenivasan, R., Saito, T., Arai, K., Yamaha, E., Hossain, M.S., Calvert, M.E.K. 2015. Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem Cell Reports* 4, 61–73.

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115.
- Valenzuela- Quiñonez, F., García-de-León, F.J., De-Anda-Montañez, J. A., Balart, E. 2011. La Totoaba del Golfo de California ¿una especie en peligro de extinción? *Interciencia*, 36, 664–671.
- Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., Raz, E. 2003. *Dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol* 13, pp. 1429–34
- Weidinger, G., Wolke, U., Kopranner, M., Klinger, M., Raz, E. 1999. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. *Development* 126: 5295–5307.
- Whittington, P.M., Dixon, K.E. 1975. Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 33(1):57–74.
- Williamson, A., Lehmann, R. 1996. Germ Cell Development in *Drosophila*. *Cell Dev. Biol.* 12, 365-391
- Woods, F. A. 1902. Origin and migration of the germ cells in *Acanthias*. *Am. J. Anat.* 1:307-320
- Wu, X.L., Tang, Z.K., Li, W., Chu, Z.J., Hong, X.Y., Zhu, X.P., Xu, H.Y. 2018. Identifying the germ cells during embryogenesis and gametogenesis by germ-line gene *vasa* in an anadromous fish, American shad *Alosa sapidissima*. *J. Fish Biol* doi:10.1111/jfb.13595
- Wylie, C. 1999. Germ cells. *Cell* 96: 165-174.
- Xu, H.Y., Gui, J.F., Hong, Y.H. 2005. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev. Dyn.* 233, 872–882.
- Xu, H.Y., Li, M.Y., Gui, J.F., Hong, Y.H. 2010. Fish germ cells. *Sci China Life Sci.* 53 (4): 435–446.
- Yamaha, E., Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K. 2007. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. *J Sea Res* 58: 8–22
- Yang, Y., Liu, Q., Xiao, Y., Wang, X., An, H., Song, Z., You, F., Wang, Y., Ma, D., Li, J., 2018. Germ Cell Migration, Proliferation and Differentiation during Gonadal Morphogenesis in All-Female Japanese Flounder (*Paralichthys Olivaceus*). *The anatomical record.* 301:727–74.
- Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N., Yoshizaki, G. 2010. Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. *Biol. Reprod.* 82 (5): 896-904.
- Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N. 1997. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development.* 124:3157–316.
- Yoshikawa, H., Xu, D., Ino, Y., Yoshino, T., Hayashida, T., Wang, J., Yazawa, R., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y. 2018. Hybrid Sterility in Fish Caused by Mitotic Arrest Primordial Germ Cells. *Genetics.*

- Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., Takeuchi, T. 2000. Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 364–371.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T. 2002. Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiology and Biochemistry.* 26: 3-12.
- Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., Takeuchi, Y. 2011. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics.* 6(1): 55-61.
- Yuan, Y., Li, M., Hong, Y. 2014. Light and electron microscopic analyses of *vasa* expression in adult germ cells of the fish medaka. *Gene.* 545: 15–22.
- Zhao, G.Q., Garbers, D.L. 2002. Male germ cell specification and differentiation. *Dev. Cell,* 2: 537-547.

Anexo 1

Selección de iniciadores

Para comprobar si los 8 pares de iniciadores para *Vasa* producían una amplificación positiva, se realizaron experimentos preliminares con el ADNc de las muestras de totoaba siguiendo el protocolo de RT-qPCR con las condiciones experimentales que se describen en el apartado 2.5.4.

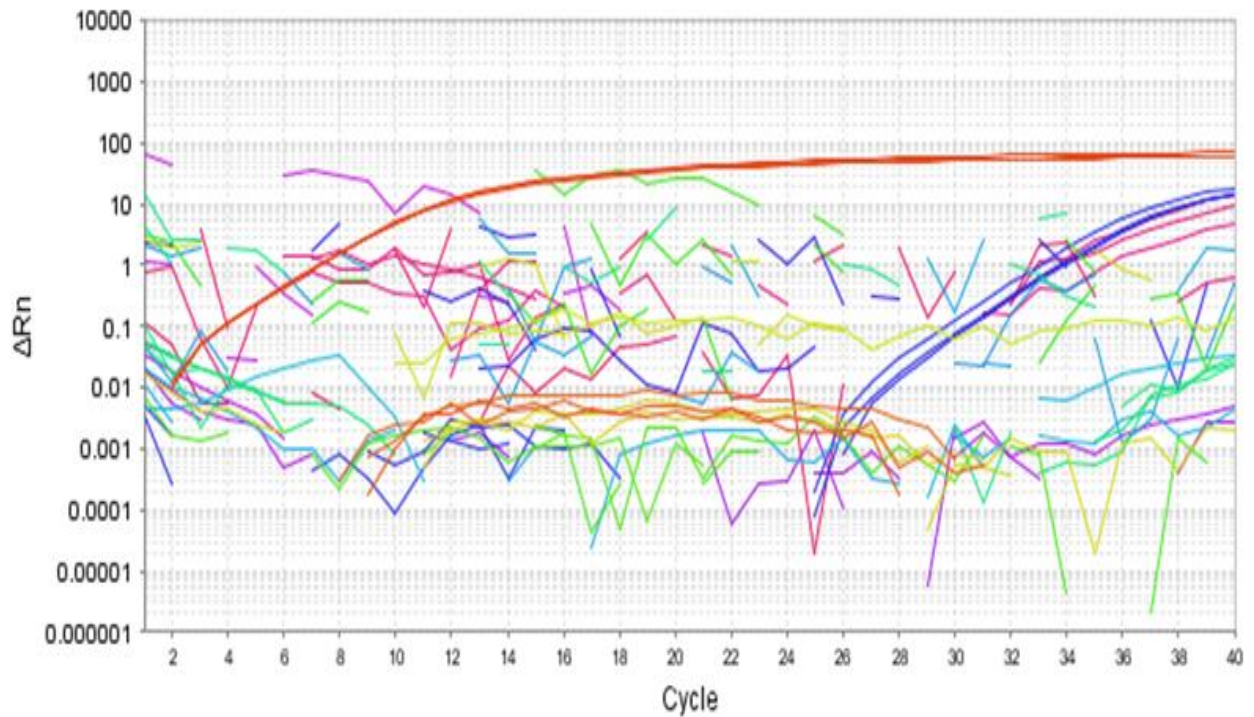


Figura 17. Resultados de la RT-qPCR. Amplificación positiva en el ciclo 26 (color azul) de un par de iniciadores para gen *Vasa* diseñado con base a la secuencia de *Nibeia mitsukurii* (*Nmi Vasa*). Amplificación positiva del gen de referencia, 18S, en el ciclo 2 (rojo).

Optimización de iniciadores

Se realizó la optimización de los iniciadores con base en dos aspectos: La concentración del iniciador y las temperaturas de anillamiento. Se colocó en la placa de RT-qPCR una muestra con los primers a diferentes concentraciones y temperaturas, y se eligieron las temperaturas y concentraciones que produjeron amplificaciones con triplicados más cercanos.

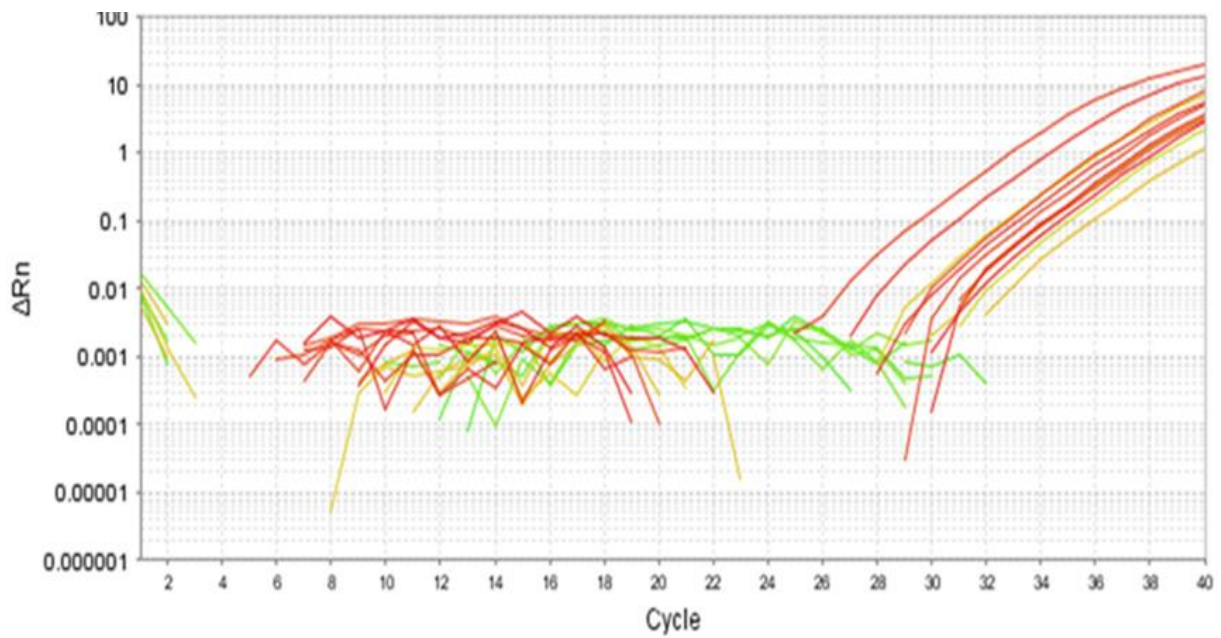


Figura 18. Optimización de iniciadores a concentraciones (200, 400 y 800 μM) y temperaturas (58, 59, 60 y 61 $^{\circ}C$) en las condiciones experimentales descritas en la sección 2.5.4. Se seleccionó una concentración óptima de 200 μM y una temperatura de anillamiento de 60 $^{\circ}C$.

Curva de fusión

Permite identificar productos específicos de la PCR mediante el análisis de la temperatura de fusión (T_m) que se expresa en una curva cuya forma se relaciona con el contenido de GC, tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos, por tanto, la T_m es específica para cada producto (Ririe et al., 1997). El gen *18s* presentó una T_m de 84.83, mientras que el gen *Vasa* presentó una T_m de 82.9, lo que permitió diferenciar ambos productos (Figura 19).

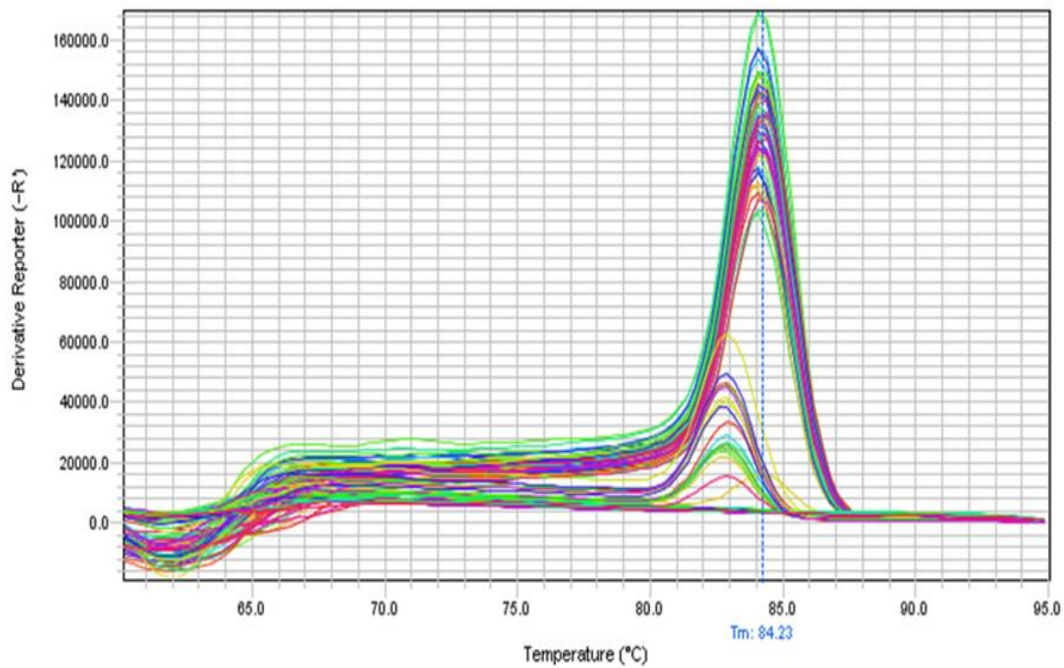


Figura 19. Curva de fusión del gen *18s* (T_m de 84.23) y *Vasa* (T_m de 82.9)

El C_t se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral de detección. Cuanto más bajo es el nivel de C_t , mayor es la concentración del producto (Figura 20). El gen *18S* (parte superior de la gráfica) presentó una concentración mayor que el gen *Vasa* (parte inferior).

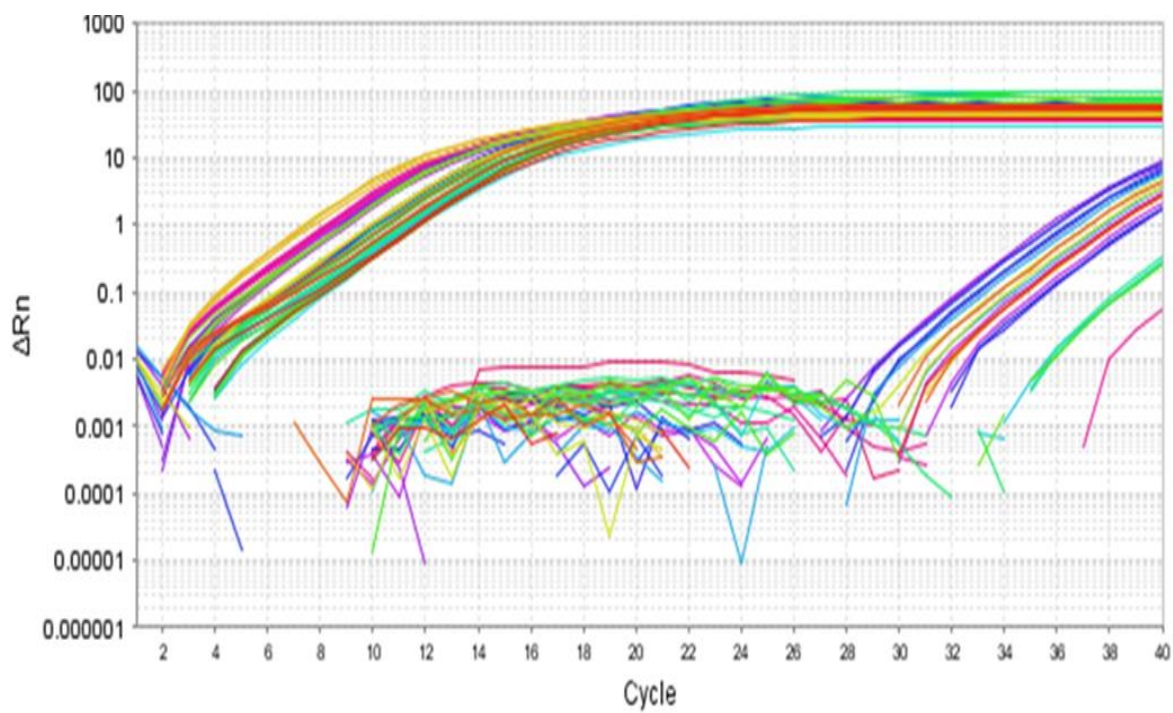


Figura 20. Amplificación del gen *18s* (ciclo 2- 40) y *Vasa* (ciclo 28-40)

Anexo 2

Protocolo de inmunofluorescencia para la detección de proteína VASA en embriones y larvas de *Totoba macdonaldi*

- 1) Colectar los embriones con una pipeta Pasteur y depositar 10 en cada tubo Eppendorff
- 2) Fijar los embriones en PFA al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.4) durante 48 horas a 4 ° C
- 3) Decorionizar manualmente los embriones usando fórceps a la lupa (IMPORTANTE: Realizarlo en campana con cubrebocas para evitar intoxicaciones. Los embriones **siempre** deben estar cubiertos con PFA mientras dura la decorionización, la exposición al aire puede generar autofluorescencia
- 4) Lavar las muestras cuatro veces en PBS para eliminar el PFA
- 5) Eliminar el PBS y añadir metanol 100 %, enfriado a -20 °C gota a gota, almacenar a -20 °C durante 2h.
- 6) Hidratar los embriones en Tritón al 1% en PBS (PBS-T) tres lavados 5 min cada uno. Temperatura ambiente y agitación constante (75 rpm)
- 7) Añadir solución de bloqueo con sero-albúmina de bovino al 3% (BSA) en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente.
- 8) Incubación del anticuerpo primario anti- VASA (1:250) durante 48 h a 4 ° C. Agitación constante. 75 rpm
- 9) Lavar con PBS (cuatro veces 5 min y dos veces 20 min) para eliminar el anticuerpo que no esté anclado a la proteína VASA.
- 10) Incubación del anticuerpo secundario, Alexa Fluor 488 (1: 500) durante 24 h a 4 ° C.
- 11) Lavar con PBS (cuatro veces 5 min y dos veces 20 min)

12) Contraintinción con DAPI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 5 min a temperatura ambiente.

13) Lavado con PBS (3 veces durante 5 min)

14) Montar muestras en solución acuosa para visualizar en el microscopio confocal Olympus FV1000.

El control negativo se trató con el mismo protocolo sin usar el anticuerpo primario anti-VASA.

Todas las soluciones se preparan con agua miliQ y posteriormente deben filtrarse para eliminar residuos.

El pH de las disoluciones debe ser 7.2- 7.4

Para facilitar la penetración, todos los lavados e incubaciones se realizarán con agitación constante de 75 rpm y a la temperatura indicada.

Anexo 3

Preparación de la solución paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS

El paraformaldehído es un derivado polimérico del formaldehído. Es un sólido blanco y cristalino, por tanto, para obtener la solución fijadora de trabajo es necesario disolverlo. El siguiente protocolo describe la técnica para generar una solución de paraformaldehído al 4% en PBS.

Precaución: El paraformaldehído es tóxico. Deben usarse guantes, gafas de seguridad y trabajar dentro de una campana extractora. Para pesar el PFA utilizar mascarilla. Lea la hoja de seguridad antes de usarlo

(http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/701a800/ns_pn0767.pdf).

Reactivos:

H₂O desionizada

HCl

NaOH (1 N)

Paraformaldehido en polvo (PFA)

PBS (1X)

Materiales:

Filtros

Vaso de cristal (para la disolución del PFA)

Guantes y gafas de laboratorio

Placa calefactora con agitador magnético

Termómetro

Procedimiento:

- 1) Para preparar 1 L de PFA al 4%, añadir 800 mL de PBS 1X en un vaso de cristal con agitador magnético. Póngalo en una placa calefactora en campana de extracción o lugar ventilado. CALENTAR SIN PASARSE DE LOS 60°C. LA DISOLUCIÓN NO DEBE HERVIR
- 2) Añada 40 g de polvo de paraformaldehído a la disolución de PBS previamente calentada.
- 3) El polvo no se disolverá inmediatamente en la solución. Agregue NaOH 1 N gota a gota desde una pipeta hasta que la solución se aclare.
- 4) Una vez que el PFA se ha disuelto, espere a que la disolución se enfríe y proceda a filtrarla.
- 5) Ajuste el volumen de la disolución a un litro con PBS 1X.
- 6) Ajuste el pH a 7.2 aproximadamente añadiendo gota a gota HCl diluido.
- 7) La disolución puede distribuirse en volúmenes de 100 mL y congelarse (-20°C) o guardarse a 4 °C en la oscuridad durante una semana.

Anexo 4

Fijación de las larvas de *Totoaba macdonaldi* para técnica histológica

Para fijar las larvas se colocan en solución Davidson con una relación 1:3 (Tejido/Fijador) durante 24 horas a 4°C, posteriormente son sumergidas en etanol al 70% hasta su procesamiento histológico.

Tabla 7. Preparado de solución fijadora Davidson (1L)

Reactivo	Volumen (mL)
Glicerina	100
Formaldehido 37 %	200
Ácido acético	100
Etanol 96 %	300
Agua de mar filtrada	300

Agitar antes de usarse

Anexo 5

La deshidratación de las larvas se realizó en el procesador automático de tejidos, marca Leica TP 1040 con los siguientes tiempos y reactivos:

Tabla 8. Proceso de deshidratación del tejido: 17h

Reactivo	Tiempo (h)
Etanol 80%	1
Etanol 95%-I	2
Etanol 95%-II	2
Etanol 100%-I	2
Etanol 100%-II	2
Etanol 100%-III	1
Benceno	1
Benceno	2
Parafina-I	2
Parafina- II	2
Total	17

Previo a la tinción, los cortes transversales de 5 μm de espesor fueron colocados en portaobjetos, desparafinados e hidratados siguiendo el siguiente protocolo:

Tabla 9. Proceso de desparafinación e hidratación de los cortes

Reactivo	Tiempo (h)
Xileno I	3 minutos
Xileno II	3 minutos
Etol 100%	15 inmersiones
Etol 95%	15 inmersiones
Etol 70%	15 inmersiones
Etol 50%	15 inmersiones
Etol 30%	15 inmersiones
Lavar en agua corriente*	3 minutos

* Hasta que el Xileno no flote en el agua

Anexo 6

Tabla 10. Tinción con Hematoxilina. Eosina

Reactivo	Tiempo	Especificaciones
Hematoxilina de Harris	3 min	Efectuar agitación lenta
Lavar en agua corriente	2 min	Flujo de agua lento
Alcohol ácido (0.3 ml HCl/200 ml Etanol 70%)	1min	Efectuar agitación lenta
Lavar en agua corriente	5 min	Flujo de agua lento
Carbonato de Litio/Sodio	2 min	
Lavar en agua corriente	3 min	Flujo de agua lento
Enjuagar con agua destilada	1 min	
Etanol 96 %	1 min	
Eosina "Y"	45 s	Efectuar agitación lenta
Etanol 95%-I	10 inmersiones	
Etanol 95%-II	10 inmersiones	
Etanol 100%-I	15 inmersiones	
Etanol 100%-II	15 inmersiones	
Xileno I	5 min	Sin agitación
Xileno II	5 min	Sin agitación
Xileno III	5 min	Sin agitación

*La agitación se realiza con cuidado subiendo y bajando el portalaminillas dentro de los reactivos sin golpear las laminillas para evitar que se rompan.

Después de la tinción se procede al montaje de las laminillas con resina sintética o Cytoseal 60 de baja viscosidad.

Anexo 7

Protocolo de extracción de ARN mediante kit PureLink™ RNA Mini (Invitrogen) con modificaciones

- 1) Introducir la muestra en tubo cónico de 2 mL, añadir 6µL de mercaptoetanol + 600µL de buffer de lisis.
- 2) Homogeneizar la muestra manualmente con ayuda de un micropistilo de plástico
- 3) Dar un vórtex a los tubos
- 4) Filtrar en columna, procurando pasar todo el homogeneizado para no perder muestra
- 5) Centrifugar un minuto a 12000g
- 6) Añadir 600µL de alcohol al 70% (VT: 1200µL)
- 7) Centrifugar 600 µL durante 2 minutos a 12000 g, desechamos el sobrenadante quitando la camisa de la columna
- 8) Añadir los 600 µL restantes, centrifugar 2 minutos a 12000g y vaciar camisa
- 9) Añadir 700 µL de buffer de lavado I
- 10) Centrifugar 20 s a 12000g
- 11) Añadir 500 µL de buffer de lavado II
- 12) Centrifugar 30 s a 12000 g
- 13) Repetir pasos 11 y 12
- 14) Eliminar el agua de la camisa y proceder al secado de la muestra mediante centrifugación a 12000g durante 1.5min.

- 15) Desechar camisa y reemplazar por tubo recolector.
- 16) Añadir 40 μ L de agua libre de RNAsas e incubar un minuto a temperatura ambiente
- 17) Centrifugar 2 min a 12000 g.
- 18) Tenemos 40 μ L de RNA EN EL TUBO RECOLECTOR. CUIDADO NO DESECHAR LA CAMISA.
- 19) Añadir DNAsa I (Ambion [™]) para eliminar ADN genómico: 10 μ L de buffer del kit de DNAsa I + 1 μ L de enzima+ 40 μ L de muestra. Vórtex muy suave.
- 20) Incubar a 37°C durante 10 minutos y aumentar a 75°C durante 5 min para detener la reacción.
- 21) Verificar integridad y pureza. Almacenar a - 80°C para evitar degradación.

Anexo 8

Protocolo transcripción reversa (RT-PCR) con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription

Con el ARN total producto de la extracción se obtuvo el ADN complementario mediante el protocolo mencionado a continuación:

Preparación del master mix:

1) Preparar el master mix RT (2X) en el hielo, añadiendo las cantidades especificadas en la tabla 11 por cada muestra/ reacción. Al preparar el master mix incluir reacciones adicionales en los cálculos teniendo en cuenta la pérdida del reactivo por transferencia.

Tabla 11. Volúmenes de componentes del master mix por muestra

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador RT (10X)	2
dNTP Mix (25X)	0.8
Iniciadores random RT (10X)	2
Enzima retrotranscriptasa (MultiScribe™)	1
H ₂ O libre de nucleasas (DEPC)	4,2
Reacción total por muestra	10

2) Poner 10 μL de master mix (2X) en cada uno de los 96 pocillos.

3) Añadir 10 μL de ARN total extraído de cada muestra en cada pocillo, para tener un volumen total de 20 μL por pocillo. Mezclar el contenido de cada pocillo bajando y subiendo el volumen con la pipeta dos veces (no olvidar cambiar de punta entre un pocillo y el siguiente).

4) Sellar las placas.

5) Centrifugar la placa para eliminar cualquier burbuja de aire.

- 6) Colocar la placa en hielo hasta que esté listo el termociclador. Cargar la placa.

- 7) Las condiciones del programa de transcripción reversa (RT-PCR) fueron 10 min a 25 ° C; 120 min a 37 ° C; 5 min a 85 ° C y finalmente se mantuvo a 4 ° C.

- 8) Añadir 180 µL de agua libre de nucleasas (DEPC) a cada muestra para obtener un volumen final de 200 µL.

Anexo 9

Protocolo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems)

El ADNc obtenido se amplificó mediante reacciones de qPCR que se llevaron a cabo con 4µL de ADNc y 6µL de master mix por cada muestra (tabla 12). Las muestras se procesaron en paralelo utilizando el 18S como gen de referencia (Tabla 13).

Tabla 12. Master mix por muestra gen *Vasa*

Componente	Volumen (µL)
SYBR® Select Master Mix	5
Forward gen <i>Vasa</i> (200µM)	0.5
Reverso gen <i>Vasa</i> (200µM)	0.5
Reacción total por muestra	6

Tabla 13. Master mix por muestra gen 18S

Componente	Volumen (µL)
SYBR® Select Master Mix	5
Forward gen 18S (200µM)	0.5
Reverso gen 18S (200µM)	0.5
Reacción total por muestra	6

- 1) Prepare el master mix para ambos genes teniendo en cuenta el número de muestras (no olvidar que cada muestra se procesa por triplicado y por gen) además de los controles negativos.
- 2) Coloque 6 μL de master mix en cada pocillo, después añada 4 μL de muestra. Las reacciones, con un volumen total de 10 μL , se procesan en placas de reacción MicroAmp® Fast Optical de 96 pocillos (Applied Biosystems)
- 3) Cubra la placa con adhesivo óptico MicroAmp® (Applied Biosystems).
- 4) Programe las condiciones de PCR: una etapa inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa durante 10 min a 95 ° C; 40 ciclos de desnaturalización durante 15 s a 95 ° C, anillado y extensión durante 45 s a 60 ° C; y una curva final de fusión de 60 ° C a 95 ° C durante 20 minutos para verificar la ausencia de dímeros del cebador
- 5) En los controles negativos sustituya la muestra por agua libre de nucleasas (DEPC).

Anexo 10

Protocolo de purificación de productos de qPCR con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen)

Los productos de la qPCR fueron purificados para eliminar los restos de cebadores, nucleótidos y sales para ser enviados a secuenciación

Antes de empezar:

- Agregue etanol (96–100%) al Buffer PE antes de usarlo (vea la etiqueta de la botella para el volumen).
- Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a 17900 x g (13,000 rpm) en una microcentrífuga de mesa a temperatura ambiente.
- Agregue 1: 250 de indicador de pH I al tampón PB (es decir, agregue 120 µl de indicador de pH I a 30 ml de tampón PB). El color amarillo del tampón PB con indicador de pH I indica un pH de aproximadamente 7.5

Procedimiento:

- 1) Agregue 5 volúmenes de tampón PB a 1 volumen de muestra de PCR y mezcle.
- 2) Si el indicador de pH I se agregó a Buffer PB, verifique que el color de la mezcla sea amarillo. Si el color de la mezcla es naranja o violeta, agregue 10 µl de acetato de sodio 3 M, Ph 5.0, y mezcle. El color de la mezcla se volverá amarillo.
- 3) Coloque la columna QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.
- 4) Ponga la muestra en la columna QIAquick y centrifugue durante 30-60 s.
- 5) Descartar el sobrenadante del tubo de recolección. Coloque la columna QIAquick de nuevo en el mismo tubo. Los tubos de recolección se reutilizan para reducir los residuos de plástico.

- 6) Para lavar la muestra, agregue 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugue durante 30-60 s.
- 7) Deseche el líquido del tubo de recolección y coloque la columna QIAquick nuevamente en el mismo tubo. Centrifugue la columna por 1 minuto adicional.
- 8) Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.
- 9) Para eluir el ADN, agregue 50 μ l de tampón EB (Tris \cdot Cl 10 mM, pH 8,5) o agua (pH 7,0–8,5) en el centro de la membrana QIAquick y centrifugue la columna durante 1 min. Alternativamente, para aumentar la concentración de ADN, agregue 30 μ l de tampón de elución en el centro de la membrana QIAquick. Deje reposar la columna durante 1 minuto y luego centrifugar de nuevo.
- 10) El ADN purificado debe analizarse en un gel. Agregar 1 volumen de colorante de carga a 5 volúmenes de ADN purificado. Mezcle la solución pipeteando arriba y abajo antes de cargar el gel.

Anexo 11

Los resultados de este trabajo se encuentran publicados en la revista “Comparative Biochemistry and Physiology, Part B”

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 225 (2018) 29–37



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpb



Characterization and localization of primordial germ cells in *Totoaba macdonaldi*



Raquel Escuredo-Vielba^a, Miguel A. Del Río-Portilla^a, Jose Antonio Mata-Sotres^b,
Benjamín Barón-Sevilla^a, Yanet Guerrero-Rentería^a, Carmen G. Paniagua-Chávez^{a,*}

^a Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Departamento de Acuicultura, Ensenada, Baja California 22860, Mexico

^b CONACYT - Nutrición y Fisiología Digestiva, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Baja California 22860, Mexico