

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Criopreservación de células germinales de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y jurel (*Seriola lalandi*): nuevas biotecnologías en la conservación de especies valiosas en México**

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

Presenta:

**Leonardo Daniel Mendoza González**

Ensenada, Baja California, México  
2019

Tesis definida por

**Leonardo Daniel Mendoza González**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**  
Directora de tesis

Miembros del comité

**Dra. Fabiola Lafarga De La Cruz**

**Dr. Marco Antonio De León Nava**



---

**Dra. Fabiola Lafarga De La Cruz**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Leonardo Daniel Mendoza González © 2019*

*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 **Leonardo Daniel Mendoza González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Criopreservación de células germinales de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y jurel (*Seriola lalandi*):  
nuevas biotecnologías en la conservación de especies valiosas en México**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez  
**Directora de tesis**

Las células germinales (CGs) son las precursoras de los gametos y tienen la capacidad de migrar hacia la gónada, para posteriormente diferenciarse en gametos. En peces se han estudiado las CGs extrayéndolas y trasplantándolas en individuos de la misma especie o de filogenia cercana. A diferencia de los gametos, las CGs son diploides, por lo que conservan todo el genoma del pez. Considerando esta particularidad de las CGs, resulta relevante desarrollar estrategias basadas en esta biotecnología reproductiva, para preservar especies amenazadas, así como especies para producir alimento con acuicultura. Este estudio reporta una serie de metodologías para disgregar tejido gonadal (TG), obtener una suspensión enriquecida con CGs y criopreservar gónadas y CGs de dos especies de alto valor ecológico y comercial en México; totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y jurel (*Seriola lalandi*). Para cumplir con este objetivo, el tejido gonadal (TG) de totoaba y jurel fue disgregado enzimáticamente con tres concentraciones de tripsina (0.25 %, 0.3 % y 0.5 %). Para enriquecer una suspensión celular con CGs, se utilizó un gradiente discontinuo con Percoll al 10 % y 40 %. El marcador *Vasa*, para CGs, fue utilizado para confirmar la presencia de CGs en la concentración del 10 % de Percoll, mediante inmunocitoquímica. Se criopreservó el germoplasma de ambas especies como TG y en suspensión enriquecida de CGs. Para criopreservar TG se probaron dos concentraciones de etilenglicol (1.5 M y 2 M) y dos tasas de congelamiento (TC de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Mientras que, para la criopreservación de suspensión de CGs, se probaron dos tasas de congelación controladas ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) y una tasa no controlada hasta  $-70^{\circ}\text{C}$ . La viabilidad de las CGs fue analizada con tinción doble de diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio después de cada tratamiento de disgregación y congelación. Para la disgregación enzimática se seleccionó la concentración de tripsina al 0.3 % en ambas especies, por ser el tratamiento que resultó con menor cantidad de restos de TG en suspensión. Sin embargo, entre las concentraciones de tripsina evaluadas no se encontraron diferencias significativas con respecto a la viabilidad. Se observó el 33.33 % de células positivas a *vasa* en totoaba y 34.16 % en Jurel, dentro de la concentración del 10 % de Percoll. Al descongelar el TG de ambos peces, se observó que ningún tratamiento tuvo diferencias significativas con respecto a la viabilidad, todos los tratamientos tuvieron  $>50$  % de células viables. Sin embargo, la prueba de efectos principales muestra que la TC tiene mayor efecto que la concentración de crioprotectante en la viabilidad de CGs. En el caso de la suspensión de CGs, la TC no controlada tuvo la viabilidad más alta, del 47.3 % en totoaba y 39.8 % en jurel. Estos resultados sugieren que tanto el TG como las CGs criopreservadas de ambas especies pueden ser utilizados para estudios futuros como el cultivo celular o trasplantes intra o interespecíficos.

**Palabras clave:** Células germinales, disgregación de gónada, criopreservación, totoaba, jurel, *vasa*.

Abstract of the thesis presented by Leonardo Daniel Mendoza González as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Cryopreservation of germ cells of totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and yellowtail amberjack (*Seriola lalandi*): new biotechnologies for conservation of valuable species in Mexico**

Abstract approved by:

---

Dr. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez  
Thesis Advisor

The GCs are the precursors of gametes and have the potential to colonize and proliferate in an exogen gonad of exogenic or allogeneic fish, as well as to differentiate into functional gametes and transmit genetic information to their offspring, due to the GCs keep the whole genome. These features make them suitable to be cryopreserved either as male or female germplasm, keeping the genetic resources for long periods. Therefore, the use of GCs for xenotransplantation, open the possibility to new breeding programs for aquatic organisms. The objective of this thesis was to developed methods to cryopreserve germ cells (GCs) in suspension or as whole gonad tissue of two important Mexican fishes; the biggest member of Scianidae family, *Totoaba macdonaldi*, and yellowtail amberjack, *Seriola lalandi*, which represents endangered and commercially valuable marine fishes in México. Three trypsin concentrations (0.25 %, 0.3 % y 0.5 %) were tested to dissociate gonadal tissue. Percoll discontinuous gradient (10 % and 40 %) was used to enrich GCs in the suspension. Enriched GCs from the 10 % Percoll layer were identified by immunocytochemistry, using a rabbit polyclonal antibody anti-DDX4 as a marker for GCs. To cryopreserve whole tissue, pieces of gonad were incubated in ethylenglicol (EG) at two different concentrations of EG (1.5M or 2M). Samples were cooled at two different controlled freezing rates (FR),  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  or  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , until  $-80^{\circ}\text{C}$  or placed in a styrofoam box for a non-controlled FR until  $-70^{\circ}\text{C}$  before plunging into liquid nitrogen. The viability was evaluated using a double staining based on diacetate fluorescein and propidium iodide after dissociation and cryopreservation procedures. The viability did not show statistic differences among trypsin concentrations, nevertheless, the 0.3% concentration was used because show less debris quantity in both species. Vasa signal positive cells were 33.33% for totoaba and 34.16% for yellowtail amberjack in the 10 % Percoll layer. No significant differences were found in the percentage of viable cells (> 50 %) of thawed gonadal tissue regarding to EG concentration or FR. Nevertheless, principal component analysis indicated major effect on viability was for FR in both species. For thawed enriched GCs suspension, the non-controlled rate was, in both species, the best FR, resulting in 47.37 % viable cells for totoaba and 39.77 % for yellowtail amberjack. These results show that both gonadal tissue and enriched GCs suspension cryopreserved are suitable to further studies as cell culture, xenogeneic or allogeneic transplantations.

**Keywords:** Germ cells, cryopreservation, totoaba, yellowtail amberjack, DDX4, gonad dissociation

## **Dedicatoria**

***A mi padre***

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico durante mis estudios de maestría. Es muy valiosa la oportunidad que ofrecen a los jóvenes para desarrollarse académicamente.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por haberme aceptado como estudiante y tener la oportunidad de realizar un posgrado, así como el libre uso y acceso a todas las instalaciones. Además agradezco por las becas para presentar los resultados de este proyecto en el congreso de la World Aquaculture Society (WAS) en Nueva Orleans.

Al Dr. Manuel Segovia por haberme aceptado como su alumno. Aunque no haya sido posible terminar los proyectos con los que llegué a esta institución, su corta, pero valiosa tutoría marcó mi estancia en el CICESE y sus consejos cambiaron por completo mi manera de aprender.

A la Dra. Carmen Paniagua por adoptarme y aceptar ser mi directora de tesis a pesar de la tormenta. Quedo infinitamente agradecido por abrirme las puertas del SUBNARGENA. Porque siempre veló para que no faltara ni un tornillo, ni una gota de reactivo, ni un gramo de alimento. La oportunidad de haber ido a The Big Easy para presentar este proyecto es invaluable, aprendí (y me divertí) muchísimo. ¡Mil gracias!

A la Dra. Fabiola Lafarga y al Dr. Marco de León, primeramente por haber aceptado formar parte de este proyecto como miembros del comité. Además, agradezco todo el tiempo que se tomaron para revisar y orientar la escritura de esta tesis. Todos sus consejos, tanto en el salón de clases como en oficina fueron muy valiosos. ¡Gracias!

A todos los académicos que compartieron sus conocimientos y larga experiencia conmigo. Especialmente a la Dra. Pilar Sánchez por acompañarnos a Nueva Orleans y apoyarnos durante el viaje, así como sus consejos durante estos dos años. Al Dr. Benjamín Barón por orientarme en varias ocasiones, facilitarme organismos y dejarme aprender sobre sus cultivos de camarón en Biofloc. Al Dr. Jorge Cáceres por su orientación desde antes de comenzar a estudiar el posgrado, así como por la oportunidad de aprender técnicas de muestreo en altamar.

Al personal administrativo del Departamento de Acuicultura por todo el apoyo de inicio a fin.

A todo el equipo de sistemas y quienes me ayudaron en la realización de este trabajo. Salvador Villasuso por el apoyo en la construcción y mantenimiento de los SRAs. Constanza del Mar, por la ayuda técnica en el laboratorio y el apoyo para conseguir todos los materiales necesarios. Al Ing.

Carlos Campos por el apoyo con el bombeo de agua marina. A Diego Delgado de la Unidad de Microscopía Avanzada del CICESE por el tiempo y recomendaciones en las sesiones con el microscopio. A Yaquelin Duarte por la ayuda durante mis experimentos y especialmente por todas las fotografías de alta calidad. A Jeaneth Ramírez por ayudarme en días festivos y vacaciones a hacer mis experimentos, pero principalmente por hacer de mi conocimiento el posgrado en Acuicultura del CICESE. A Patricio González por estar ahí desde el primer día de maestría con un apoyo incondicional 24/7.

A todas las personas que conocí en CICESE y las amistades que hice en Ensenada. Enriquecieron mi persona e hicieron de estos dos años una aventura muy amena.

A mi madre por sus cariñosos consejos y a toda mi familia por apoyarme en todas mis decisiones y estar ahí siempre, en las buenas y en las malas.

Por último y para nada menos importante, agradezco a todos los organismos que fueron despojados de su vida para los resultados de este estudio, especialmente a Splash.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	iii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
<b>Capítulo 1. Marco teórico .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Antecedentes .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2 Potencial reproductivo de las células germinales en peces .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3 Obtención de células germinales en peces .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.4 Enriquecimiento de suspensión celular con células germinales .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.4 Criopreservación de células germinales .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.4 Especies de importancia para acuicultura de conservación y comercial .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.4.1 Totoaba .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.4.2 Jurel.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Justificación .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Hipótesis .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.1 Objetivo general .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Mantenimiento de los peces.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Obtención de muestras de sangre .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Extracción de la gónada .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Disgregación enzimática de la gónada .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Enriquecimiento de suspensión celular con células germinales .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5.1 Preparación del gradiente discontinuo de densidades con Percoll.....</b>	<b>18</b>
<b>2.6.1 Preparación de portaobjetos .....</b>	<b>19</b>



2.6.2 Inmunocitoquímica .....	19
2.6.3 Observación en microscopía .....	20
2.7 Viabilidad de células germinales .....	20
2.8 Criopreservación .....	22
2.8.1 Criopreservación de gónada .....	22
2.8.2 Criopreservación de suspensión enriquecida de células germinales.....	22
2.9 Análisis estadístico .....	23
Capítulo 3. Resultados .....	24
3.1 Osmolaridad y pH del plasma sanguíneo .....	24
3.2 Disgregación enzimática de la gónada .....	24
3.2.1 Viabilidad .....	24
3.2.2 Concentración de células .....	26
3.3 Identificación de células germinales.....	27
3.4 Criopreservación .....	28
3.4.1 Criopreservación de gónada .....	28
3.4.2 Criopreservación de suspensión enriquecida de células germinales.....	31
Capítulo 4. Discusión .....	34
Capítulo 5. Conclusiones .....	37
Literatura citada.....	38
Anexos.....	44
Anexo 1. Diseño de sistemas de recirculación acuícola construidos para el mantenimiento de jureles y totoabas.....	44
Anexo 2. Anestesia y toma de muestra sanguínea .....	47
Anexo 3. Inmunocitoquímica.....	49
Anexo 4. Gradiente discontinuo de densidades con Percoll .....	51
Anexo 5. Tasas de congelación .....	52

## Lista de figuras

---

- Figura 1. Trasplante xenogénico de células germinales.** Las CGs tienen el potencial de ser extraídas de un pez donador (e.g. Atún *Thunnus thynnus*), ser criopreservadas y estar disponibles para ser trasplantadas en un pez estéril receptor de otra especie (e.g. Caballa *Scomber japonicus*). El pez trasplantado realizará la gametogénesis a partir de las CGs del donador, dando gametos con el genotipo del donador (Yazawa et al., 2013). ..... 4
- Figura 2. Esquema de obtención de CGPs o CGs.** Las CGPs son aquellas que aún no han migrado hacia las crestas gonadales. Se obtienen en estadios tempranos embrionarios (a) o larvales y se puede observar su proceso migratorio con el uso del marcador vasa (b) (imágenes tomadas y modificadas de Escuredo-Vielba et al., 2018). Las CGs son aquellas que han colonizado y proliferado en la gónada (c) y se pueden identificar con el marcador vasa (d). Según el sexo del pez, pueden ser ovogonias o espermatogonias tipo A, antes de comenzar la gametogénesis y diferenciarse posteriormente en gametos. .... 5
- Figura 3. Juvenil de totoaba utilizado en este estudio.** Fotografía: Leonardo Mendoza. .... 8
- Figura 4. Mapa de distribución de *Totoaba macdonaldi*.** La tabla de colores indica la probabilidad de incidencia. Modelo de mapa de rango nativo generado por [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), versión 2016... 8
- Figura 5. Juvenil de jurel utilizado en este estudio.** Fotografía: Leonardo Mendoza. .... 9
- Figura 6. Mapa de distribución de *Seriola lalandi*.** La tabla de colores indica la probabilidad de incidencia. Modelo de mapa de rango nativo generado por [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), versión 2016. .... 10
- Figura 7. Resumen gráfico de la metodología.** Serie de procesos que se realizaron para resguardar células germinales viables en suspensión y tejido completo. Mantenimiento: sistemas de recirculación acuícola diseñados para el mantenimiento de los organismos de este estudio. Extracción de gónada: disección de peces y extracción de gónadas inmaduras para su manejo como tejido vivo. Disgregación enzimática: uso de tripsina para disociar el parénquima y tejido conectivo de la gónada. Aislamiento: preparación de un gradiente discontinuo de densidades con Percoll. Identificación: Inmunocitoquímica mediante la identificación del marcador vasa. Criopreservación: inmersión a nitrógeno líquido de suspensión de CGs o gónada, probando distintas concentraciones de EG y Tc. Viabilidad: Tinción doble con FDA y YP para la identificación de actividad de esterasas e integridad de membranas..... 13
- Figura 8. SRAs contruidos para el mantenimiento de los organismos en este estudio.** (Izquierda) SRA de totoabas y (Derecha) SRA de los jureles. .... 14
- Figura 9. Toma de muestra de sangre de la vena caudal.** (Izquierda) totoaba (Derecha) jurel..... 15
- Figura 10. Extracción de gónada inmadura de totoaba.** Posición supina, vista frontal a caudal. .... 16

<b>Figura 11. Extracción de gónada de jurel.</b> Posición supina, vista ventral. ....	16
<b>Figura 12. Cortes transversales de gónada de totoaba.</b> .....	17
<b>Figura 13. Micrografía fluorescente mostrando células germinales de totoaba.</b> Triángulos, células viables teñidas con FDA. Rombos, células no viables teñidas con YP (200x). ....	21
<b>Figura 14. Micrografía fluorescente mostrando células germinales de Jurel.</b> Triángulos, células viables teñidas con FDA. Rombos, células no viables teñidas con YP (200x). ....	21
<b>Figura 15. Viabilidad de las células de la gónada de totoaba después de ser disgregadas con diferentes concentraciones de tripsina.</b> Los intervalos fueron calculados con las desviaciones estándar individuales. ....	25
<b>Figura 16. Viabilidad de las células de la gónada de jurel después de ser disgregadas con diferentes concentraciones de tripsina.</b> Los intervalos fueron calculados con las desviaciones estándar individuales. ....	25
<b>Figura 17. Micrografía de células de gónada de totoaba teñidas con anti-vasa conjugado con Alexa Fluor 488 y DAPI.</b> Células positivas a la presencia de proteína vasa se tiñeron de verde en su citoplasma y de azul en sus núcleos (triángulos). Las células somáticas se aprecian con la tinción azul de sus núcleos (rombos). En el recuadro blanco se muestran las células utilizadas como control (400X). ....	27
<b>Figura 18. Micrografía de células de gónada de jurel teñidas con anti-vasa conjugado con Alexa Fluor 488 y DAPI.</b> Células positivas a la presencia de la proteína vasa se tiñeron de verde en su citoplasma y de azul en sus núcleos (triángulos). Las células somáticas se aprecian con la tinción azul de sus núcleos (rombos). En el recuadro blanco se muestran las células utilizadas como control (400X). ....	28
<b>Figura 19. Gráfica de efectos principales para la viabilidad de células de la gónada descongelada de totoaba.</b> La gráfica muestra las medias ajustadas de cada nivel y cada factor aplicado. ....	30
<b>Figura 20. Gráfica de efectos principales para la viabilidad de células de la gónada descongelada de jurel.</b> La gráfica muestra las medias ajustadas de cada nivel y cada factor aplicado. ....	30
<b>Figura 21. Viabilidad de las células germinales de totoaba, criopreservadas con diferentes tasas de congelación.</b> La desviación estándar individual fue utilizada para calcular los intervalos. ....	31
<b>Figura 22. Viabilidad de las células germinales de jurel, criopreservadas con diferentes tasas de congelación.</b> La desviación estándar individual fue utilizada para calcular los intervalos. ....	32

## Lista de tablas

---

<b>Tabla 1. Concentración de células viables de gónada de jurel.</b> Los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.....	26
<b>Tabla 2. Concentración de células viables de gónada de totoaba.</b> Los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.....	26
<b>Tabla 3. Viabilidad de las células de la gónada descongelada de totoaba incubadas en 2 concentraciones de EG y congeladas en 2 TC.</b> Los valores se presentan en porcentaje y corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.....	29
<b>Tabla 4. Viabilidad de las células de la gónada descongelada de jurel ante dos concentraciones de EG y dos TC.</b> Los valores se presentan en porcentaje y corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas. ....	29
<b>Tabla 5. Concentración de células germinales viables de totoaba.</b> Los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.....	32
<b>Tabla 6. Concentración de células germinales viables de jurel.</b> Los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.....	32
<b>Tabla 7. Resumen de resultados en totoaba.</b> .....	33
<b>Tabla 8. Resumen de resultados en jurel.</b> .....	33

## Capítulo 1. Marco teórico

---

### 1.1 Introducción

Los programas de reproducción en especies marinas de interés comercial han favorecido la producción de alimentos de origen animal, que abastece gran parte de la demanda mundial de alimentos. Sin embargo, la seguridad alimentaria de los más de nueve mil millones de habitantes que se estiman para las próximas décadas, es vista como uno de los más grandes retos que enfrentará la humanidad. Por tal motivo, el desarrollo de investigación, biotecnología reproductiva y conservación de recursos genéticos, toma un papel importante en el desarrollo de la acuicultura; el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento a nivel mundial (Cabrita *et al.*, 2009; Thornton, 2010; UNPD, 2017; FAO 2018).

Una de las investigaciones de punta relacionadas con la biotecnología reproductiva ha sido la criopreservación de germoplasma de especies de alto valor comercial, especies amenazadas y líneas genéticas modelo para investigación o potencial zootécnico (Cabrita *et al.*, 2009; Tiersch, 2011; Martínez-Páramo *et al.*, 2017). Específicamente en acuicultura existe un gran interés en la criopreservación de germoplasma de peces, ya que representa al grupo de organismos con mayor producción acuícola. En 2014 se registró una producción de 16'113,194 toneladas de pescado (FAO, 2016). La criopreservación es una estrategia que consiste en disminuir o detener procesos biológicos, como el envejecimiento celular, por medio de la reducción de sus actividades metabólicas al resguardar las células a temperaturas como la del nitrógeno líquido (-196°). Además, las células criopreservadas pueden seguir viables durante periodos de tiempo aún indefinidos (Herráez, 2009; Tiersch, 2011; Martínez-Páramo *et al.*, 2017).

Hasta la fecha, existen limitaciones para criopreservar huevos o embriones de peces. Este impedimento se debe a la sensibilidad de los huevos hacia el daño por el enfriamiento y a que las soluciones crioprotectoras tienen la incapacidad de penetrar las membranas de los huevos. Otro impedimento para congelar huevos es el alto contenido de vitelo, así como el tamaño (0.95 mm de diámetro en peces marinos y hasta 6 mm en salmónidos), lo que resulta en una baja relación entre superficie y volumen que impide que el huevo a congelar se deshidrate adecuadamente, para así evitar la formación de cristales de hielo por su alto contenido en líquidos (Zhang y Lubzens, 2009; Devireddy, 2011; Jin-Chywan, 2011). Por otra parte, el semen es una cantidad finita de células que, además de ser células haploides, no tienen la capacidad de proliferar, lo que limita la conservación y propagación de características genéticas deseables. Una alternativa a estas limitantes es criopreservar las células

precursoras de gametos, células germinales (CGs), la cuales heredaron factores de origen materno como *vasa*, *nanos* o *buckyball*, que les indican que deberán ser diferenciadas posteriormente en gametos masculinos o femeninos (Raz, 2000; Cinalli *et al.*, 2008). Las CGs pueden ser trasplantadas a organismos de la misma especie o especies filogenéticamente cercanas dando como resultado la producción de esperma o huevos con las características genéticas del donador. El trasplante de CGs es una técnica innovadora de alto potencial que permite seleccionar y conservar características deseables de organismos, tanto para la acuicultura como para la conservación (Lacerda *et al.*, 2013; Martínez-Páramo *et al.*, 2017).

El estudio de las CGs, las cuales son la base de los organismos con reproducción sexual y las precursoras de las células gametogénicas (Cinalli *et al.*, 2008), es un área que comienza a ser abordada en la acuicultura, debido al impacto que puede tener en la producción y la conservación de recursos genéticos. El interés en las CGs, llamadas también *células inmortales*, es debido a que tienen características importantes tales como: la capacidad de conservar el material genético completo al ser aún diploides, diferenciarse en células sexuales masculinas o femeninas, incluso al ser trasplantadas en organismos de la misma especie (alogénico) o entre especies filogenéticamente cercanas del mismo o sexo opuesto (xenogénico) (Cinalli *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2013; Robles *et al.*, 2017).

La estandarización de protocolos para criopreservar CGs en nuevas especies es necesaria para abrir paso a nuevos programas de reproducción aplicados a la acuicultura, ya sea para la conservación o su uso comercial (Majhi *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2013; Robles *et al.*, 2017). En este estudio se criopreservaron CGs en suspensión y en TG de dos especies: la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) una especie endémica protegida y con alto potencial productivo por su buen crecimiento en cautiverio; y del jurel (*Seriola lalandi*) una especie de gran importancia económica actual a escala global. El desarrollo y estandarización de protocolos para nuevas biotecnologías reproductivas como la criopreservación de CGs, podría establecer las bases para conservar germoplasma diploide de especies en peligro de extinción, como la totoaba (Findley, 2010), así como conservar y seleccionar las características fenotípicas particulares mediante la utilización de trasplantes alogénicos o xenogénicos. Otras alternativas se basan en la producción de líneas genéticas, larvas de un solo sexo, híbridos y la sincronización de desoves entre especies.

## 1.2 Antecedentes

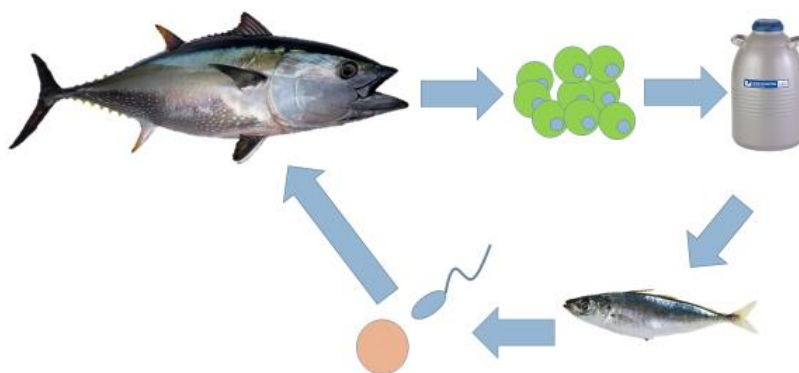
### 1.2.1 Criopreservación de germoplasma

La criopreservación de germoplasma de hembras en peces ha estado limitada por la carencia de técnicas efectivas para criopreservar huevos. Esta problemática ha generado la necesidad de investigar alternativas a la criopreservación de gametos, tal como es la criopreservación de CGs, ya que las CGs de más de 30 especies han sido ya criopreservadas exitosamente (Martínez-Páramo *et al.*, 2017).

Disponer de germoplasma en forma de CGs criopreservadas, ofrece la posibilidad de realizar futuros trasplantes para la producción de organismos subrogados, es decir, un pez estéril que recibe CGs de un organismo donador y por lo tanto, tendrá la capacidad de producir gametos con el genotipo del pez donador (Okutsu *et al.*, 2006 a, b; Lacerda *et al.*, 2013; Robles *et al.*, 2017). En los últimos años, numerosos trasplantes de CGs exitosos, lo que se refiere a aquellas CGs trasplantadas que lograron migrar, colonizar y proliferar una gónada exógena, se han demostrado en diferentes especies: trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Takeuchi *et al.*, 2003; Okutsu *et al.*, 2008); salmón, *O. masou* (Takeuchi *et al.*, 2004); tilapia, *Oreochromis niloticus* (Lacerda, 2006, 2010); pejerrey, *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* (Majhi *et al.*, 2009, 2014); pez cebra, *Danio rerio* (Higaki *et al.*, 2010a, b; Wong *et al.*, 2011); macarela, *Scomber japonicus* (Yazawa *et al.*, 2010); bagre negro, *Rhamdia quelen* (Silva *et al.*, 2016); bagre azul, *Ictalurus furcatus* y bagre de canal *I. punctatus* (Perera *et al.*, 2017), así como en esturión siberiano, *Acipenser baerii* (Pšenička *et al.*, 2015).

### 1.2.2 Potencial reproductivo de las células germinales en peces

Uno de los manejos reproductivos que derivan de la biotecnología de los trasplantes de CGs es la producción de óvulos con genotipo XY o de esperma con genotipo XX (en especies que determinan su sexo con estas variantes cromosómicas), cuyo alcance es la producción de descendencia monosexo (Yoshizaki *et al.*, 2010; Robles *et al.*, 2017). Al ser extraídas las CGs conservarán el 100 % de la información genética del organismo donador. Luego de ser trasplantadas las CGs, se diferenciarán en óvulos o espermatozoides en hembras o machos respectivamente (figura 1). Dicha característica de las CGs y la gónada de peces receptores es definida como plasticidad sexual. Estudios en peces han demostrado que las CGs y la gónada tienen alta plasticidad sexual con la producción de gametos viables y fértiles provenientes de organismos subrogados (Okutsu *et al.*, 2006a; Yoshizaki *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011).



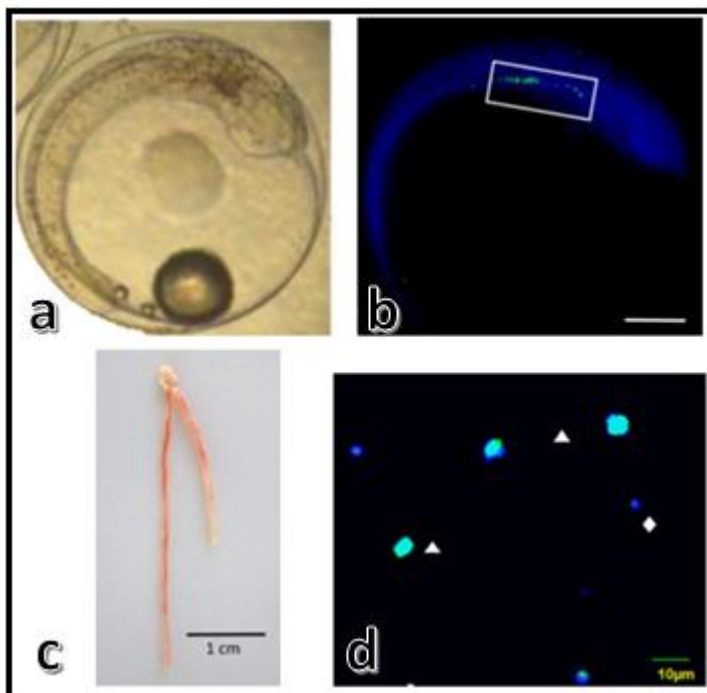
**Figura 1.** Trasplante xenogénico de células germinales. Las CGs tienen el potencial de ser extraídas de un pez donador (e.g. Atún *Thunnus thynnus*), ser criopreservadas y estar disponibles para ser trasplantadas en un pez estéril receptor de otra especie (e.g. Caballa *Scomber japonicus*). El pez trasplantado realizará la gametogénesis a partir de las CGs del donador, dando gametos con el genotipo del donador (Yazawa *et al.*, 2013).

Cuando se realizan trasplantes de CGs en nuevas especies, es necesario supervisar la migración, colonización y proliferación de las CGs donadas en los organismos receptores. Para garantizar que las CGs en el organismo receptor sean las provenientes del organismo donador, se han desarrollado técnicas para marcar las CGs donadas. En estudios previos, las CGs de peces donadores han sido identificadas post trasplante con el uso de donadores transgénicos (Takeuchi *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2003; Yoshisaki *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011) o al ser marcadas con un colorante fluorescente que se adhiere a la membrana celular, como el PKH26 (Lacerda, 2006, 2010; Yazawa, 2013; Pšenička *et al.*, 2016).

### 1.2.3 Obtención de células germinales en peces

Existen diversas alternativas para obtener células germinales primordiales (cuando las precursoras de los gametos aún no colonizan las gónadas) o CGs (ovogonias o espermatogonias) (figura 2). Se ha demostrado que las CGPs y CGs tienen la tolerancia para ser criopreservadas. Las CGPs pueden ser obtenidas de embriones; que pueden ser criopreservados completos o decorionizados en estadios tempranos; o directamente de las crestas genitales (Kawakami *et al.*, 2012a, b; Riesco *et al.*, 2012; Higaki *et al.*, 2013; Sudagar *et al.*, 2018). Las CGs pueden ser obtenidas de gónadas extraídas de organismos inmaduros, pero diferenciados sexualmente (Pšenička *et al.*, 2016) o ser aisladas en organismos maduros (Okutsu *et al.*, 2006b; Lacerda, 2010).





**Figura 2.** Esquema de obtención de CGPs o CGs. Las CGPs son aquellas que aún no han migrado hacia las crestas gonadales. Se obtienen en estadios tempranos embrionarios (a) o larvales y se puede observar su proceso migratorio con el uso del marcador *vasa* (b) (imágenes tomadas y modificadas de Escuredo-Vielba *et al.*, 2018). Las CGs son aquellas que han colonizado y proliferado en la gónada (c) y se pueden identificar con el marcador *vasa* (d). Según el sexo del pez, pueden ser ovogonias o espermatogonias tipo A, antes de comenzar la gametogénesis y diferenciarse posteriormente en gametos.

El procedimiento para obtener las CGs en una suspensión a partir de gónada consiste en extraer la gónada y exponerla a un tratamiento enzimático. El tratamiento enzimático es uno de los métodos más utilizados para la disgregación de células en tejido o cultivo y el tipo de enzima a utilizar dependerá de los propósitos de cada trabajo, así como la especie y la línea celular (Cunningham, 2010). Se han utilizado distintas enzimas para disgregar CGs de peces tales como tripsina, colagenasa, dispasa o combinaciones de éstas, además de DNasa. Una vez que se tiene una suspensión con las células de la gónada, puede ser trasplantada, criopreservada o enriquecida con CGs, aislando las CGs del resto de células somáticas (Lacerda, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2015; Pšenička *et al.*, 2016).

### 1.2.4 Enriquecimiento de suspensión celular con células germinales

Para enriquecer una suspensión celular de gónada de peces con CGs, se han utilizado varias técnicas, como el uso de un gradiente discontinuo de densidades con sustancias no tóxicas para las células como albúmina de suero bovino (BSA) o Percoll. El Percoll es un medio de gradiente para centrifugación y aislamiento o enriquecimiento de células y partículas, desarrollado por Pertoft y colaboradores (1978). Este medio consiste en partículas coloidales de sílice (~17 nm) cubiertas por una capa de polivinilpirrolidona. Una de sus características importantes es su casi nula toxicidad en células y organelos. Al disolver el Percoll a distintas concentraciones, este reactivo adquiere diferentes grados de viscosidad que le permite ser suspendido de mayor a menor concentración formando un gradiente donde las células se van a separar de acuerdo con su densidad. En trabajos donde han enriquecido suspensiones con CGs de teleósteos con Percoll, se ha descubierto que las concentraciones de Percoll con mayor número de CGs son las que contienen entre el 25 % y 40 % de Percoll, cuando el gradiente tiene densidades de entre el 5 % y el 70 % (Lacerda, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2011; Pšenička *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2015).

### 1.2.4 Criopreservación de células germinales

La criopreservación de CGs es una herramienta para resguardar germoplasma valioso y lograr una rápida propagación de especies amenazadas o con alto valor comercial. Se han publicado técnicas de criopreservación de CGs de peces en embriones y crestas genitales de trucha (Kobayashi *et al.*, 2003; Okutsu *et al.*, 2006b; Kobayashi *et al.*, 2007), especies modelo como el pez cebra (Higaki *et al.*, 2010a, b, 2013; Riesco *et al.*, 2012), anguila japonesa (Kawakami *et al.*, 2012a) y carpa común (Kawakami *et al.*, 2012b). Los trabajos de criopreservación de CGs en suspensión de gónada se han reportado en tilapia (Lacerda, 2010), lenguado senegalés (Cabrita *et al.*, 2010), en tenca (Z Linhartová *et al.*, 2014), esturión (Pšenička *et al.*, 2016) y carpa común (Franěk *et al.*, 2019).

Los resultados de los trabajos de criopreservación de CGPs y CGs coinciden en utilizar crioprotectantes penetrantes como dimetil sulfóxido, propelinglicol, etilenglicol; o crioprotectantes no penetrantes como polivinilpirrolidona o sucrosa con resultados variados de acuerdo con la especie del organismo, o el tipo y estado del tejido (embriones completos, embriones decorionizados, crestas genitales, gónada inmadura o gónada madura). La vitrificación, una técnica alternativa a la criopreservación convencional, consiste en convertir un líquido en un sólido vítreo sin la formación de

cristales de hielos (Tucker y Liebermann, 2007). La vitrificación se ha experimentado solo en CGPs de embriones completos, decorionizados y crestas genitales (Kawakami *et al.*, 2012b; Riesco *et al.*, 2012; Higaki *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha realizado en CGs de gónada. Los tiempos de exposición y concentración de crioprotectantes resultan ser especie específicos, así como el método y la tasa de congelación (TC). Derivado de estas carencias, existe la necesidad de estandarizar protocolos de criopreservación de acuerdo con cada especie marina, así como de cada línea celular (Majhi *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2013; Robles *et al.*, 2017; Sudagar *et al.*, 2018).

### **1.2.4 Especies de importancia para acuicultura de conservación y comercial**

En este trabajo se desarrollaron y estandarizaron protocolos de criopreservación de CGs de totoaba y jurel. La primera es una especie endémica del Golfo de California, altamente amenazada, que además tiene un alto valor económico, así como un alto potencial productivo (Findley, 2010). Mientras que el jurel es una especie de distribución mundial, con un alto valor en el mercado debido a las cualidades organolépticas de su carne y una inmensa demanda del mercado en el mundo (Smith-Vaniz y Williams, 2015; FAO, 2018). Actualmente las técnicas de conservación y trasplantes de CGs, han tomado relevancia en el campo del mejoramiento genético de especies nativas con potencial productivo, como en el caso de trasplantes de CGs entre bagres nativos de Norteamérica que pueden hibridar (Shang *et al.*, 2018). Esta ventaja propicia el vigor híbrido, haciendo que especies nativas incrementen su potencial productivo. Por otra parte, debido a los alcances del manejo de CGs, se han hecho estudios para conservar y trasplantar CGs de especies amenazadas, como *Oryzias celebensis* (Andriani *et al.*, 2018), una especie endémica de Célebes, Indonesia, que actualmente se encuentra en la lista roja de especies amenazadas, al igual que la totoaba.

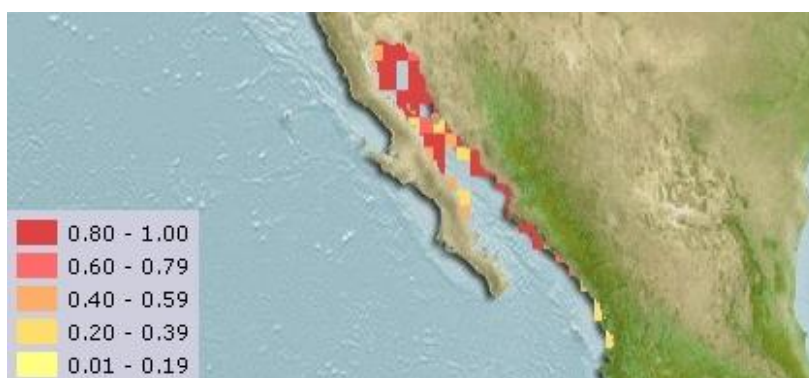
#### **1.2.4.1 Totoaba**

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert 1891) (Figura 3) es una especie en la que podría reflejarse el impacto ecológico de la criopreservación de CGs. Este teleosteo marino es el miembro más grande de la familia Sciaenidae, además de ser endémica del Golfo de México, es emblemática en el ámbito mundial al estar vinculada directamente con el hábitat de la vaquita marina (*Phocoena sinus*), un mamífero marino amenazado y también cercano a la extinción, principalmente al ser atrapadas en las redes de captura para

totoaba (Rojas-Bracho y Taylor, 2017). Se trata de peces de alimentación carnívora y en su estado silvestre su dieta se compone de pequeños teleósteos y crustáceos. La distribución de la totoaba comprende desde el delta del río Colorado en el Alto Golfo de California hasta Bahía Concepción por el lado oeste del Golfo y la boca del río Fuerte en el lado este del Golfo. Se reproduce una vez anualmente entre febrero y junio, cuando migra hasta la zona delta del Río Colorado ubicado al norte del Mar de Cortés (Figura 4). Las larvas permanecerán en aguas poco profundas (~1 m) hasta ser juveniles, para posteriormente comenzar a adentrarse en cardúmenes hacia aguas más profundas del Golfo de California. Actualmente, según la NOM-059-SEMARNAT-2010, se considera una especie en peligro de extinción y endémica, limitada su distribución al Alto Golfo de California. Unas de sus características que la han hecho susceptible a extinguirse, es su tardía madurez sexual, de hasta 7 años en vida silvestre, y una sobrepesca; que llevó a las autoridades mexicanas a declarar una veda permanente de la pesca de totoaba en 1975, tras más de 50 años de una pesca intensiva de adultos. El principal objetivo de la venta de este Sciaenideo por parte del mercado asiático, es el comercio de su vejiga natatoria deshidratada, como ingrediente para una sopa considerada por el mercado ilegal como de gusto gourmet (Flanagan y Hendrickson, 1976; Cisneros-Mata *et al.*, 1997; Valenzuela-Quiñonez *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Juvenil de totoaba utilizado en este estudio. Fotografía: Leonardo Mendoza.



**Figura 4.** Mapa de distribución de *Totoaba macdonaldi*. La tabla de colores indica la probabilidad de incidencia. Modelo de mapa de rango nativo generado por [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), versión 2016.

En totoaba, se evidenció la presencia de CGPs de estadios tempranos de desarrollo larval y su migración hacia las crestas gonadales (7 días después de la eclosión) mediante la expresión del gen *vasa* (Escuredo-Vielba *et al.*, 2018). Lo que sugiere que el marcador *vasa* permitirá la identificación de CGs extraídas de la gónada de totoaba para posteriormente criopreservar o trasplantar éstas CGs. La criopreservación de CGs de totoaba, permitirá en un futuro establecer programas de reproducción asistida, realizando trasplantes alogénicos o xenogénicos. Asimismo, como parte de los esfuerzos para conservar germoplasma de totoaba, previamente se ha criopreservado exitosamente semen (Paniagua-Chávez *et al.*, 2011). Con el resguardo de CGs se pudiera evitar que la totoaba ingrese en el vórtice de la extinción, reduciendo la posibilidad de la desaparición de la especie, ya que al tener CGs viables, pudieran colonizar y realizar gametogénesis en una especie cercana. Por otra parte, se podrían acortar los tiempos de madurez sexual, gastos de manutención de reproductores, así como una selección de rasgos deseados que contribuirán al avance y madurez de la zootecnia de la especie, que actualmente es producida de manera comercial en México, por la empresa Earth Ocean Farm (<http://www.earthoceanfarm.com>).

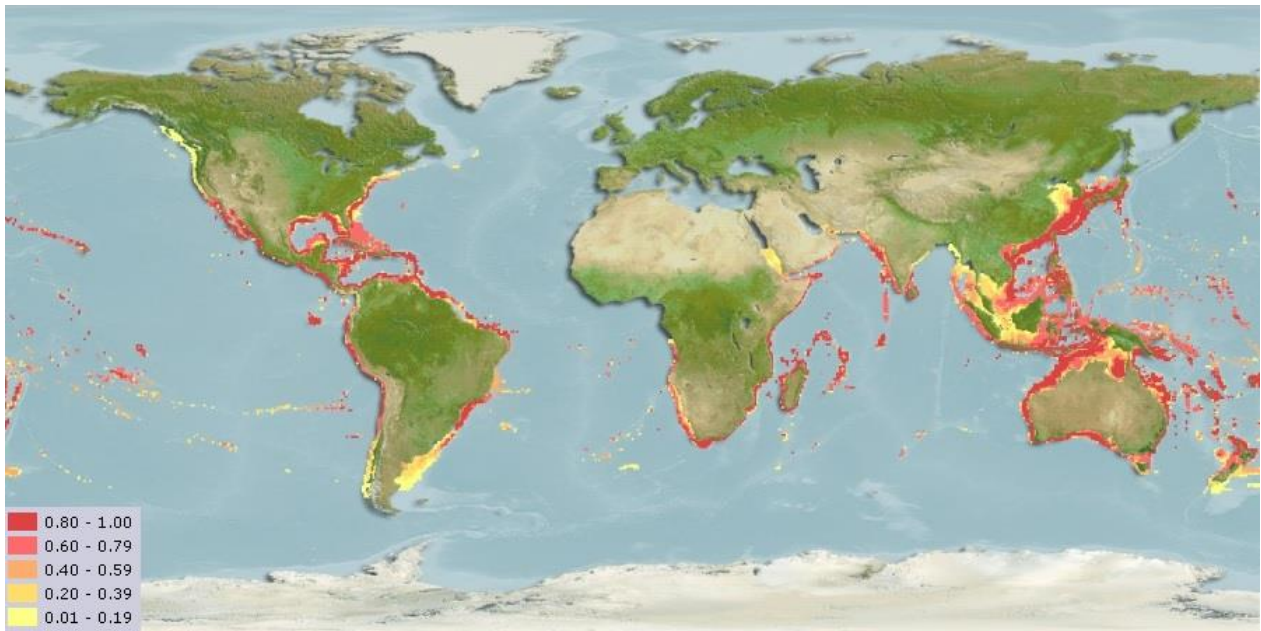


**Figura 5.** Juvenil de jurel utilizado en este estudio. Fotografía: Leonardo Mendoza.

#### **1.2.4.2 Jurel**

El jurel (*Seriola lalandi*, Valenciennes, 1833) (Figura 5) es un pez marino de distribución circunglobal (limitado a aguas subtropicales) (Figura 6) que representa una de las especies con mayor demanda en el mundo, principalmente por el mercado japonés. Su alto valor económico para la acuicultura, pesca comercial y deportiva, se debe a las características organolépticas de su carne. Pertenece a la familia Carangidae y es un organismo que puede alcanzar más de 2 m de largo y un peso de casi 100 kg. El jurel alcanza la madurez sexual hasta llegar a los 80 cm en machos y los 90 cm en hembras y realiza múltiples

desoves durante la época reproductiva, que está comprendida entre primavera y verano para esta especie (Mckenzie, 2014). Se mantienen alejados de la costa y generalmente realizan una migración desde aguas cálidas en los inviernos, por ejemplo de las costas de California, Estados Unidos en primavera, hasta las costas del Pacífico mexicano en invierno. Sus poblaciones se encuentran actualmente estables sin embargo, es necesario desarrollar programas de reproducción para disminuir el impacto de la pesca y fomentar la producción acuícola de esta especie (Smith-Vaniz y Williams, 2015). Actualmente es un pez cultivado en México por la empresa Baja Seas y sus crías se obtienen de un laboratorio de larva en México, Ocean Baja Labs (<http://www.bajaseas.com>).



**Figura 6.** Mapa de distribución de *Seriola lalandi*. La tabla de colores indica la probabilidad de incidencia. Modelo de mapa de rango nativo generado por [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), versión 2016.

El mantenimiento y manejo de un reproductor requiere amplios espacios, así como costos elevados. Estas prácticas podrían ser sustituidas con una alternativa, como el trasplante de CGs en un receptor que alcance la madurez sexual a una menor talla o edad, y de esta manera, disminuir el tiempo y gastos de su mantenimiento. En un miembro del mismo género (*Seriola quinqueradiata*) se hicieron trabajos de obtención de CGPs, identificándolas mediante hibridación *in situ* de la expresión del gen *vasa*. Posteriormente fueron trasplantadas en un miembro de la familia Sciaenidae, *Nibea mitsukurii*, como receptor, logrando que las CGPs colonizaran y proliferaran en las gónadas (Higuchi *et al.*, 2011). Sin embargo, al ser especies distantes filogenéticamente, las CGPs no se diferenciaron en gametos. Por lo cual,

realizar pruebas de trasplantes en especies más cercanas, cómo un miembro de la misma familia (Carangidae) que sea de menor tamaño y más precoz, disminuiría los costos de producción y mantenimiento de reproductores si la gametogénesis fuera exitosa.

### 1.3 Justificación

Las CGs tienen el potencial de ser trasplantadas intra e inter-específicamente, así como de conservar el material genético completo del organismo donador y poderse diferenciar tanto en gametos masculinos o femeninos. Por tal motivo, la criopreservación de CGs es una alternativa que se ofrece ante las dificultades de criopreservar huevos de peces y a las limitaciones de criopreservar semen de peces. Los huevos no se han criopreservado exitosamente debido a su tamaño y membrana impermeable. Por otra parte, los espermatozoides son una cantidad finita de células, además haploides, lo que limita la conservación del total de los rasgos deseados de un organismo.

La criopreservación de CGs de peces es un proceso que se ha realizado en pocas especies. Además, las técnicas de criopreservación son tejido y especie específica. Por lo cual existe la necesidad de estandarizar los protocolos para cada especie y para cada tejido usado, ya sean embriones o gónadas. La totoaba representa un organismo endémico en peligro de extinción y con alto potencial productivo, mientras que el jurel es una especie de alta importancia económica en el ámbito internacional. Conservar sus CGs y estandarizar los protocolos para tal efecto, permitirá establecer nuevos programas de conservación, reproducción y mejoramiento genético, así como establecer las bases para estandarizar protocolos en otras especies filogenéticamente cercanas.

### 1.4 Hipótesis

- La viabilidad de las CGs de *Totoaba macdonaldi* y *Seriola lalandi* no será afectada por los procesos que implica su conservación, tales como disgregación enzimática y criopreservación de TG o suspensión.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general

Desarrollar protocolos de disgregación, enriquecimiento de una suspensión celular con CGs y criopreservación de CGs de totoaba y jurel en suspensión y tejido, con los que se obtenga el mayor número de células germinales viables para ser conservadas en el Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la concentración de tripsina en la viabilidad de las CGs disgregadas.
- Confirmar la presencia de CGs mediante inmunocitoquímica, utilizando el marcador *vasa*, en una suspensión enriquecida con un gradiente discontinuo de densidades con Percoll.
- Evaluar el efecto de la concentración de etilenglicol y la tasa de congelación en la viabilidad de tejido gonadal.
- Determinar el tipo de congelación óptimo para una suspensión enriquecida con CGs, mediante la viabilidad celular.



## Capítulo 2. Materiales y métodos

En la figura 7 se muestra un resumen gráfico de los procesos que se llevaron a cabo en este proyecto.



**Figura 7.** Resumen gráfico de la metodología. Serie de procesos que se realizaron para resguardar células germinales viables en suspensión y tejido completo. Mantenimiento: sistemas de recirculación acuícola diseñados para el mantenimiento de los organismos de este estudio. Extracción de gónada: disección de peces y extracción de gónadas inmaduras para su manejo como tejido vivo. Disgregación enzimática: uso de tripsina para disociar el parénquima y tejido conectivo de la gónada. Aislamiento: preparación de un gradiente discontinuo de densidades con Percoll. Identificación: Inmunocitoquímica mediante la identificación del marcador *vasa*. Criopreservación: inmersión a nitrógeno líquido de suspensión de CGs o gónada, probando distintas concentraciones de EG y Tc. Viabilidad: Tinción doble con FDA y YP para la identificación de actividad de esterasas e integridad de membranas.

### 2.1 Mantenimiento de los peces

Los experimentos en organismos se llevaron a cabo cumpliendo con la guía para el uso de peces en la investigación (Jenkins *et al.*, 2014), establecida por el comité de la Sociedad Americana de Pesquerías (AFS). Se utilizaron métodos de eutanasia (Leary *et al.*, 2013) aprobados por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA). Cuarenta y cinco juveniles de jurel ( $110 \pm 30$  g) y treinta y cinco totoabas juveniles ( $800 \pm 127$  g), todos sexualmente inmaduros, fueron obtenidos del laboratorio de peces marinos

del Departamento de Acuicultura del CICESE. Los organismos se mantuvieron en sistemas de recirculación acuícola (SRAs) (Figura 8) del laboratorio de diseño y desarrollo de tecnología acuícola, del CICESE. Los parámetros de mantenimiento estuvieron controlados bajo los siguientes niveles: Temperatura de 22°C para los jureles y 26°C para las totoabas; Salinidad del 35 ‰; Nitrógeno amoniacal total <1.0 mg/L; Nitritos <1.0 mg/L; Nitratos <400 mg/L; pH 7.6 – 8.5; Fotoperiodo 12:12.

Cada especie fue mantenida en un SRA, que consta de un tanque de cultivo de 3000 L acoplado a un tanque de compensación de 640 L y un biofiltro de tipo cama empacada con capacidad de 1.13 L de medio compuesto por partículas esféricas plásticas (XS-8000, Aquaculture Systems Technologies) (Anexo 1). El flujo de agua (160 L/min) fue dado por una bomba centrífuga (0.5 HP, Sweetwater). La temperatura de las totoabas se controló con una bomba intercambiadora de calor (Titán), la temperatura de los jureles se mantuvo con el control de temperatura ambiental del laboratorio. Los organismos fueron alimentados con el 3 % de la biomasa total con materia seca por día, con una dieta comercial Skretting y Ewos Cargill. La alimentación se detuvo 24 horas previas a cada experimento.



**Figura 8.** SRAs construidos para el mantenimiento de los organismos en este estudio. (Izquierda) SRA de totoabas y (Derecha) SRA de los jureles.

## 2.2 Obtención de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre de cada especie para obtener el pH y la osmolaridad del suero sanguíneo. Se seleccionaron tres organismos de cada especie aleatoriamente, los cuales fueron anestesiados con triclaína de metanosulfonato a una concentración de 50 mg/L, en un contenedor de 90 L

con aireación constante (De acuerdo con el [anexo 2](#)). Se observó la pérdida del equilibrio y la pérdida del reflejo de huida. Una vez perdido el reflejo de huida, los peces se pesaron y midieron, para posteriormente tomar la muestra de sangre (3 mL) de la vena caudal (Figura 9). Se separó el plasma sanguíneo mediante centrifugación (500 g durante 30 min). Una vez obtenido el plasma sanguíneo, se midió la osmolaridad con un osmómetro (Vapro, Wescor). Todas las soluciones que tuvieron contacto con células vivas, fueron ajustadas a la osmolaridad media del suero sanguíneo, para evitar un choque osmótico, mediante el uso de la fórmula:

$$C1 V1 = C2 V2 \quad (1)$$

Donde C1 es la osmolaridad de la solución fisiológica de reserva. V1 es el volumen de la solución fisiológica de reserva. C2 es la osmolaridad del suero sanguíneo de los peces. V2 representa el volumen final de la solución fisiológica ajustada.

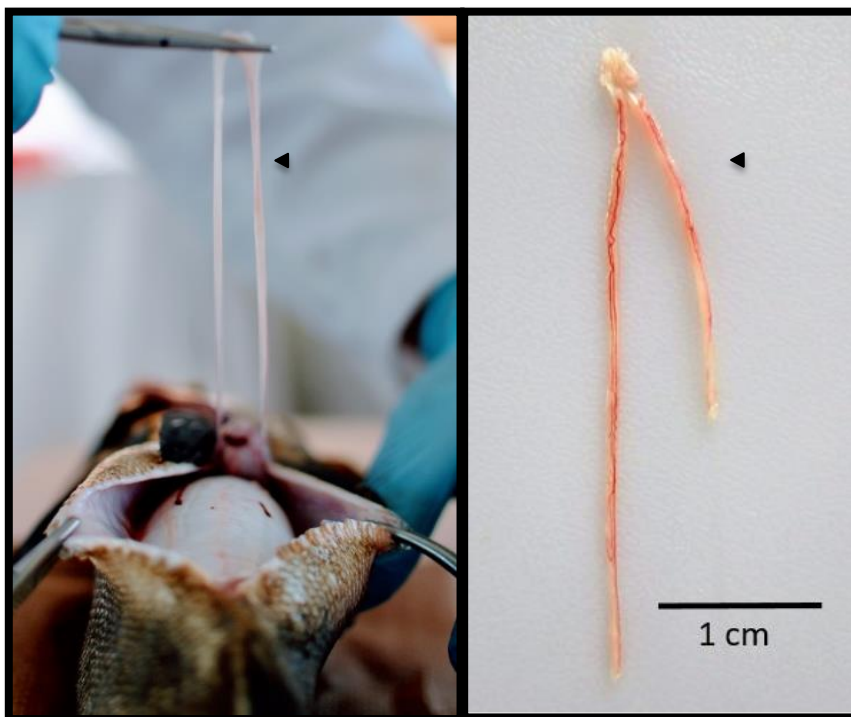


**Figura 9.** Toma de muestra de sangre de la vena caudal. (Izquierda) totoaba (Derecha) jurel.

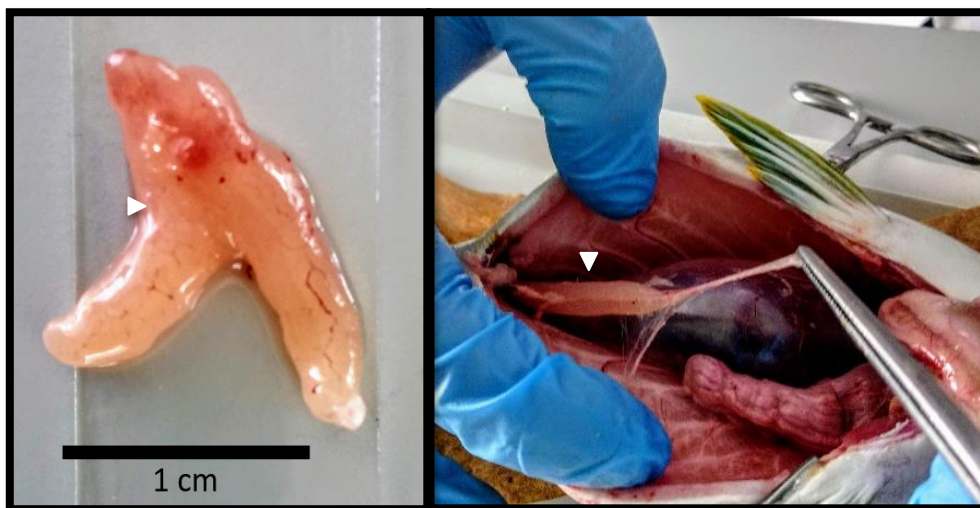
### 2.3 Extracción de la gónada

A los organismos seleccionados aleatoriamente se les aplicó eutanasia con una punción cráneo encefálica rápida y precisa, posteriormente se decapitaron. A cada organismo se le hizo un examen macroscópico externo e interno de los organismos con la técnica de necropsia descrita por Yanong (2003). La obtención de la gónada se llevó a cabo en condiciones asépticas de acuerdo a la metodología descrita por Lacerda (2006). Las gónadas fueron extraídas (Figuras 10 y 11) y lavadas con solución salina balanceada de Hanks

(SSBH: NaCl 0.137 M; KCl 5.4 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 mM; NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mM; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5.5 mM) con 0.1 % (v/v) de antibiótico y antimicótico (penicilina 10000 U.I. y estreptomicina 10 mg/mL, Sigma).



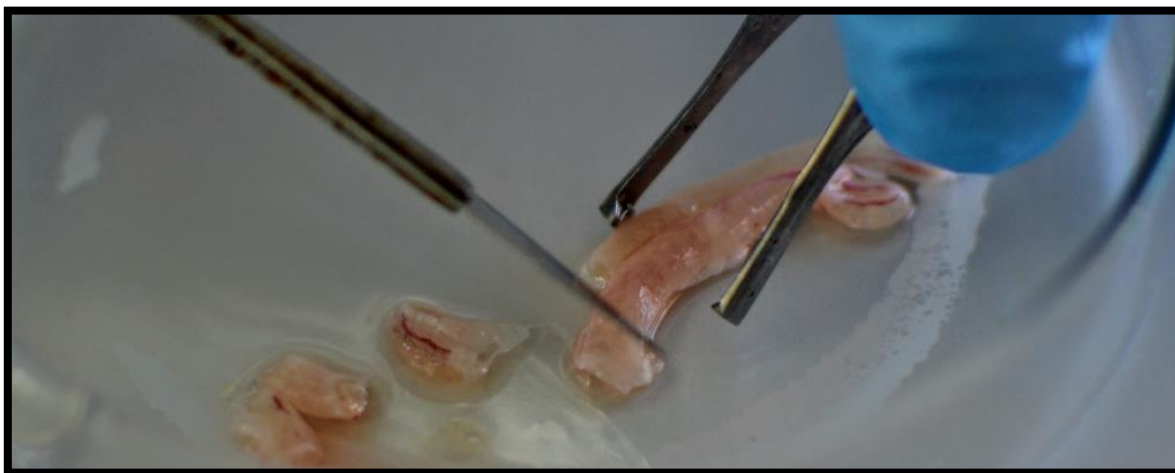
**Figura 10.** Extracción de gónada inmadura de totoaba. Posición supina, vista frontal a caudal.



**Figura 11.** Extracción de gónada de jurel. Posición supina, vista ventral.

## 2.4 Disgregación enzimática de la gónada

La gónada de cada pez fue cortada en láminas transversales, lo más fino posible ( $\sim 1 \text{ mm}^3$ ), con navaja de bisturí no. 4 en una caja Petri y lavando cuidadosamente los fragmentos con SSBH (Figura 12). Las fracciones de gónada de cada pez se agruparon en cuatro porciones semejantes y fueron sumergidas en 900  $\mu\text{L}$  con tres concentraciones de tripsina (0.25 %, 0.3 % o 0.5 %) y DNAsa al 0.05 % en SSBH (MD: Medio de disgregación) y un control que consistió en SSBH sin enzimas. Cada concentración de tripsina se realizó por triplicado por especie. Los fragmentos de gónada se dejaron incubar durante 2.5 h a temperatura ambiente con agitación constante a 200 rpm. Para detener la reacción enzimática, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de albúmina de suero bovino (ASB) al 10 % en SSBH, y así obtener una concentración final del 1 % en los tubos con gónada. Cuidadosamente se traspasó el contenido de cada tubo por un tamiz celular con poros de 40  $\mu\text{m}$  y con un émbolo de una jeringa de 1 mL, se disociaron mecánicamente los restos de tejido, arrastrando el contenido con 1 mL de SSBH a un tubo de 15 mL para que el tamiz pudiera colocarse. El control fue disociado sin enzimas, mecánicamente con SSBH. Tubos de 1.5 mL fueron llenados con suspensión de células disgregadas y fueron centrifugados a 500 g (Eppendorf, modelo 5430 R) durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de SSBH con ASB al 0.75 % (p/v). Posteriormente se evaluó la viabilidad con una tinción doble de FDA y YP como se describe en el punto 2.7, posteriormente se contó el número de células.



**Figura 12.** Cortes transversales de gónada de totoaba.

## 2.5 Enriquecimiento de suspensión celular con células germinales

El enriquecimiento de la suspensión celular con CGs se realizó con un gradiente discontinuo de densidades (10 % y 40 %) de Percoll (SIGMA). Se denominó Percoll al 100 % cuando la solución madre se ajustó a la osmolaridad de cada especie, diluyéndose en SSBH, mediante la siguiente fórmula:

$$C1V1 + C2V2 = C3V3 \quad (2)$$

Donde C1 es la presión osmótica de la solución fisiológica de reserva. V1 es el volumen de la solución fisiológica de reserva. C2 es la presión osmótica del Percoll antes de diluir. V2 representa el volumen de Percoll. C3 es la osmolaridad del suero sanguíneo de los peces. V3 representa el volumen final de la solución fisiológica ajustada.

Las densidades se realizaron incluyendo las concentraciones de Percoll que se han utilizado para enriquecer de CGs una suspensión de gónada de otras especies de peces (Lacerda, 2006; Pšenička *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2015; Yoshikawa *et al.*, 2009). Se caracterizó el tipo de células contenidas en cada concentración y el precipitado del 10 % fue utilizado posteriormente para realizar la identificación de CGs con inmunocitoquímica con marcador *vasa* ([Ver metodología en el punto 2.6.2](#)).

### 2.5.1 Preparación del gradiente discontinuo de densidades con Percoll

Se colocaron 3 mL de Percoll de cada concentración, 40 % y 10 %, en ese orden. Procurando que no se mezclaran las dos concentraciones y el gradiente pudiera ser formado. Una vez formado el gradiente, en la superficie se colocó la suspensión celular (100 µL) recuperada de la disgregación enzimática (de acuerdo como la metodología descrita en el punto 2.4). Posteriormente se centrifugaron a 500 g, con temperatura a 4°C y aceleración lenta del rotor para no deshacer el gradiente de densidades. Después de centrifugar 30 min, cada banda formada se recuperó y lavó mediante dilución 1:10 en SSBH y un centrifugado de 30 min. Cada pellet formado fue resuspendido en 1 mL de SSBH para caracterizar el contenido celular de cada banda formada con el gradiente de densidades (Ver [anexo 4](#)).

## 2.6 Identificación de células germinales

Se identificó la presencia de CGs en la banda de Percoll del 10 % mediante inmunocitoquímica utilizando marcador *vasa*. El protocolo utilizado fue modificado de Pšenička *et al.*, (2015) y Escuredo-Vielba *et al.*, (2018) para los fines de este estudio.

### 2.6.1 Preparación de portaobjetos

Los portaobjetos de dos anillos para anticuerpos (Goldseal) fueron incubados en HCl 1N durante 12 h y lavados dos veces con etanol al 100 %. Para que las células en suspensión pudieran adherirse, los portaobjetos fueron sumergidos en agarosa o Poli-L-Lisina al 0.1 % en agua desionizada durante 10 min. Se dejaron secar durante 1 h a 70°C en estufa y cada portaobjeto fue colocado en una caja Petri de vidrio para proceder a realizar la inmunotinción.

### 2.6.2 Inmunocitoquímica

La suspensión celular (1 mL) fue fijada 1:1 con paraformaldehído (PFA) al 4 % en solución salina amortiguadora fosfatada (PBS). Se tomó una alícuota de 100 µL y se dejó reposar en cada anillo de los portaobjetos durante 3 horas. El exceso de solución fue retirado y se lavó 1 vez con PBS. Las cajas Petri fueron situadas sobre gel congelado para mantener las muestras a 4°C y permeabilizar las membranas de las células con 100 µL de Tritón (Sigma) al 0.3 % en PBS (PBS-T) durante 15 min. Se hicieron tres lavados con PBS para eliminar el PBS-T y se agregó 100 µL de ASB al 1 % y Tween 20 al 0.05 % (Sigma) en PBS (Solución de bloqueo) durante una hora a 4°C. Se retiró la solución de bloqueo y se agregó 100 µL de anticuerpo policlonal producido en conejo específico para *vasa* o *DDX4* (Anti-DDX4/MVH, Abcam, ab13840) diluido 300 veces en solución de bloqueo. Como manera de control, se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Se cubrieron los portaobjetos con parafilm, para evitar que las células se deshidrataran y se dejaron incubar durante 18 h a 4°C. Se retiró el parafilm y se realizaron 3 lavados de 5 min con solución de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 h en la oscuridad a 4°C con 100 µL de anticuerpo secundario específico para IgG de conejo (AlexaFluor488, Abcam, ab150077) diluido 800 veces en solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se tiñeron los núcleos con 100 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) a una concentración de 10 µg/ml en PBS-T. Se realizaron 5 lavados

con PBS, se retiró el exceso de líquido y se colocaron 2 gotas de medio de montaje (Sigma) antes de colocar cuidadosamente los cubreobjetos. Se dejaron reposar 2 h y se sellaron las orillas de los cubreobjetos con esmalte para uñas (Ver [anexo 3](#)).

### 2.6.3 Observación en microscopía

Las muestras se observaron en la Unidad de Microscopía Avanzada del CICESE (UMAC) con un microscopio confocal (Olympus, FV1000), excitando los fluorocromos DAPI y Alexa-Fluor 488 con láser a 405 nm y 408 nm respectivamente. Las fotografías fueron tomadas a 400 X y procesadas en el software FLUOVIEW FV1000.

## 2.7 Viabilidad de células germinales

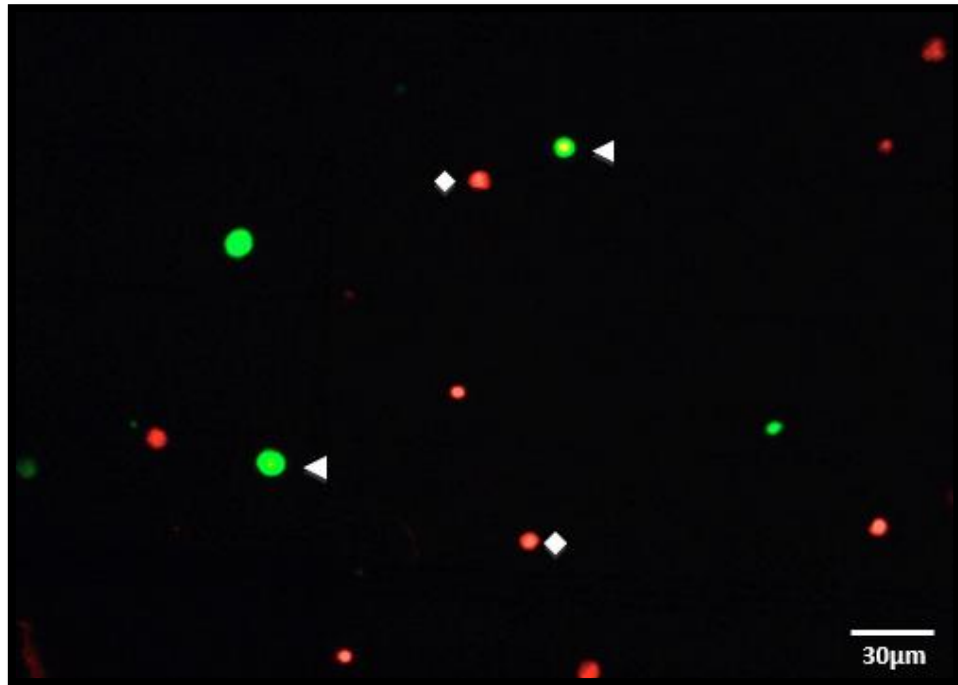
La viabilidad de las CGs fue evaluada con una tinción doble de diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (YP). El FDA tiene la capacidad de penetrar las membranas y fluorescer verde por acción de las esterasas celulares. Las células con actividad esterasa positiva se denominaron células viables. El YP no puede penetrar las membranas celulares íntegras, sólo aquellas con membrana comprometida. El YP al entrelazarse con el ADN, fluoresce color rojo. Las células fluorescentes color rojo, se denominaron células no viables. A cada suspensión celular de 1 mL se le agregó 1  $\mu$ L de FDA al 2.4 mM en acetona y se dejó incubar durante 5 min, para posteriormente incubar con 5  $\mu$ L de YP al 7.4 mM durante 5 min. La muestra se centrifugó y se resuspendió en 1 mL de SSBH para lavar el exceso de tinción y ser contada en hematocitómetro en microscopía de fluorescencia (Nikon eclipse 80i) con una excitación de los fluorocromos a 340 nm (Figura 13 y 14). Los conteos se realizaron en los cuatro cuadrantes externos (1 mm<sup>2</sup>), por duplicado, por cada muestra. Se registró el número de células viables, no viables, total y los datos fueron analizados en porcentaje de células viables mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células viables}}{\text{Células viables} + \text{Células no viables}} \times 100 \quad (3)$$

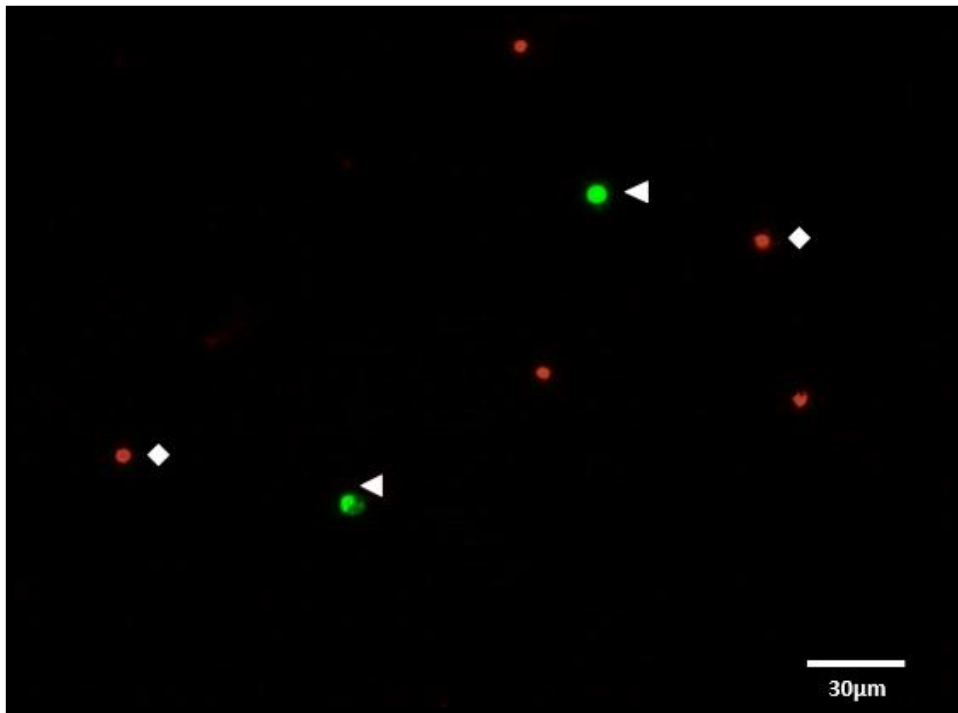
El número de células totales y la concentración de células viables en cada tratamiento fueron registrados. La concentración de células vivas se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Células viables}}{4} \times 10 \times 10,000 \quad (4)$$





**Figura 13.** Micrografía fluorescente mostrando células germinales de totoaba. Triángulos, células viables teñidas con FDA. Rombos, células no viables teñidas con YP (200x).



**Figura 14.** Micrografía fluorescente mostrando células germinales de Jurel. Triángulos, células viables teñidas con FDA. Rombos, células no viables teñidas con YP (200x).

## 2.8 Criopreservación

### 2.8.1 Criopreservación de gónada

La gónada de tres peces de cada especie fue extraída ([Ver sección 2.3](#)) y cada una fue dividida en 4 porciones equitativas (Totoabas: ~0.05 g y jurel: ~0.08 g) para distribuir en los distintos tratamientos (EG al 1.5 M o 2.0 M y TC controladas de -1°C/min o -5°C/min) ([Anexo 5](#)). Se colocaron las porciones de gónada en crioviales de 1.5 mL y se agregó el crioprotectante (EG 1.5 M o 2 M) previamente diluido en una solución extensora (0.5 % ASB, 0.1 % antibiótico-antimicótico y 50 mM de glucosa). Las muestras de gónada se dejaron incubar durante 10 min, mientras se montaban los crioviales en las cañas, sujetándolos con Parafilm para luego ser colocadas en la cámara del gabinete de congelación programable (Kryo 560-16, Planer PLC), donde se realizaron las TC controladas.

El protocolo de congelación controlada inició con la cámara del gabinete a 10°C, disminuyendo a -1°C/min o -5°C/min hasta alcanzar -80°C. Posteriormente las muestras fueron resguardadas en nitrógeno líquido (-176 en termos de criopreservación (Taylor-Wharton) para posteriormente evaluar la viabilidad celular ([Ver sección 2.7](#)). La descongelación se realizó después de 7 días de resguardo. Las muestras se descongelaron en agua a 25°C durante 1 min. Se extrajo la porción de tejido del criovial y se colocó en MD para ser disgregado ([Ver sección 2.4](#)) y posteriormente evaluar la viabilidad celular ([Ver sección 2.7](#)).

### 2.8.2 Criopreservación de suspensión enriquecida de células germinales

La gónada de tres peces de cada especie fue extraída ([Ver sección 2.3](#)), dissociada ([Ver sección 2.4](#)) y enriquecida de CGs con un gradiente discontinuo de Percoll ([Ver sección 2.5](#)). El precipitado obtenido del lavado del Percoll fue resuspendido en 1 mL de EG al 1.5 M en solución extensora. Se dejaron incubar durante 10 min, mientras se montaba la suspensión en pajillas francesas de 250 µL (3 pajillas por repetición), se sellaron con polvo sellador azul (IMV) y se colocaron en la cámara del congelador programable (para las tasas controladas) o en la red de la caja de poliestireno (para las tasas no controladas). Para determinar la TC óptima, se probaron TC controladas a -1°C/min o -5°C/min y TC no controlada ([Anexo 5](#)). Como control negativo se utilizó inmersión directa en nitrógeno líquido y como control positivo se evaluó la viabilidad de la suspensión celular antes de congelar en nitrógeno. Las tasas de congelación controladas se realizaron como se describe en la sección [2.8.1](#). La TC no controlada consistió en rellenar 3 cm de nitrógeno líquido en una caja de poliestireno (27.5 cm x 20.5 cm) y colocar

las pajillas en una red a 15 cm de distancia sobre la superficie del nitrógeno. Se monitoreó la temperatura con un termopar. Cada que la temperatura se estabilizó, la malla con las pajillas se bajó 1 cm hasta que la temperatura alcanzó los  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las muestras fueron colocadas en nitrógeno líquido en termos de criopreservación. Al menos siete días después se descongelaron las muestras en agua a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto. Las pajillas se vaciaron en tubos cónicos de 2.0 mL y la muestra se diluyó 1:4 en SSBH. Finalmente se evaluó la viabilidad celular de acuerdo a la metodología descrita anteriormente ([Ver sección 2.7](#)).

## 2.9 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Cada organismo utilizado fue seleccionado aleatoriamente, así como la asignación de los tratamientos. Los datos de porcentaje fueron transformados a raíz cuadrada del arcoseno para normalizar la distribución de los datos y estabilizar las varianzas. En todos los tratamientos se revisaron los supuestos de normalidad con una prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas mediante una prueba de Levene. Para identificar si alguna concentración de tripsina tuvo diferencias con respecto a la viabilidad celular, se utilizó un ANOVA de una vía. Mientras que, para identificar las diferencias e interacción entre la concentración del crioprotectante y las TC del tejido gonadal con respecto a la viabilidad celular, se utilizó un ANOVA de dos vías. Las diferencias en la viabilidad celular entre las TC aplicadas a la suspensión enriquecida de CGs se identificaron con un ANOVA de una vía. Posteriormente, se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey para identificar agrupamientos en todos los análisis. Los datos se procesaron en el paquete estadístico Minitab v18. Se utilizó nivel de significancia de  $\alpha 0.05$ .

## Capítulo 3. Resultados

---

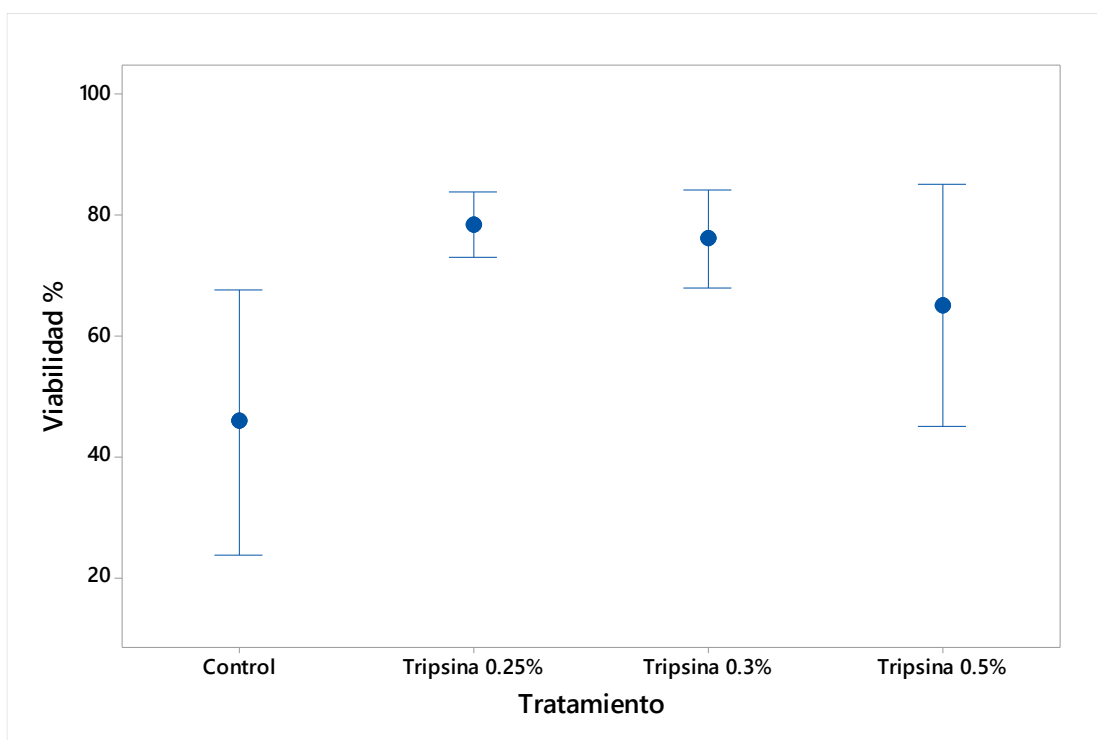
### 3.1 Osmolaridad y pH del plasma sanguíneo

La osmolaridad (Media  $\pm$  Desviación estándar) del plasma sanguíneo de las totoabas fue de  $383.33 \pm 5.13$  mOsm/kg y el pH de  $7.07 \pm 0.34$  ( $n = 3$ ). El plasma sanguíneo de los jureles tuvo valores de osmolaridad de  $417.66 \pm 11.93$  mOsm/kg y pH de  $6.90 \pm 0.05$  ( $n = 3$ ).

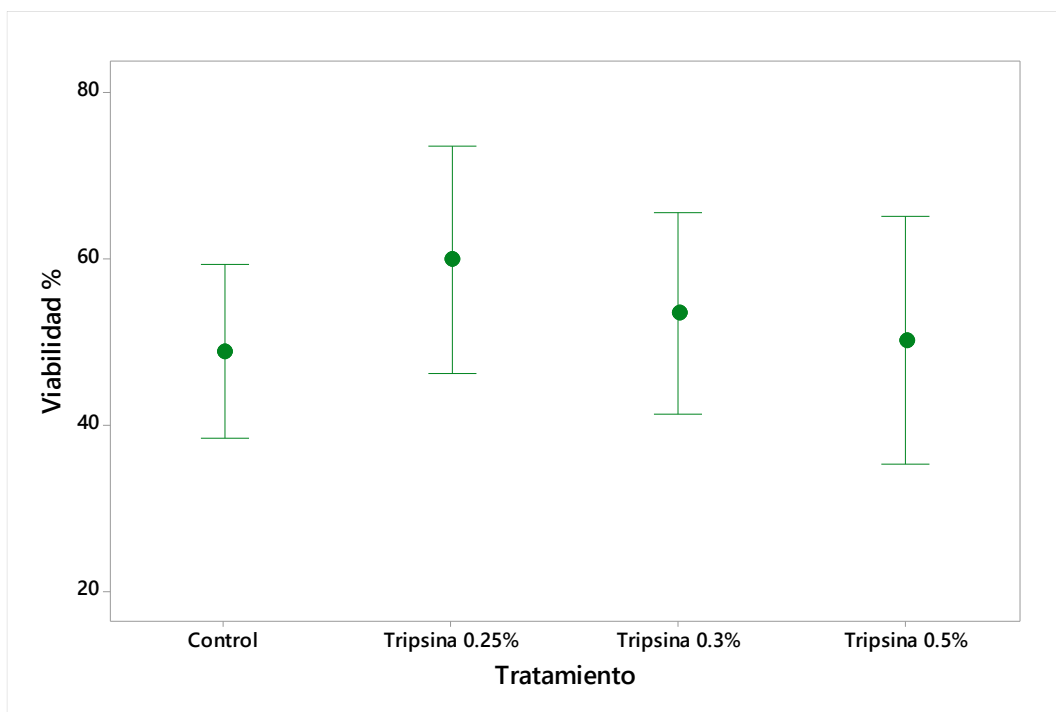
### 3.2 Disgregación enzimática de la gónada

#### 3.2.1 Viabilidad

En las CGs de totoaba se encontró que había diferencias significativas ( $P = 0.00$ ) en al menos un tratamiento mediante un ANOVA. Con la prueba *a posteriori* se encontró que entre los tratamientos enzimáticos no hubo diferencias significativas. Sin embargo, las tres diferentes concentraciones de tripsina utilizadas para disgregar TG de totoaba mostraron diferencias contra el control en el porcentaje de viabilidad. La mayor viabilidad (78.4%) de células disgregadas se encontró cuando se utilizó tripsina al 0.25% (Figura 15). En el caso del análisis en jurel no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.11$ ) entre los diferentes tratamientos para disgregar el TG. Igualmente, la mayor viabilidad (64.2%) de células disgregadas se encontró cuando se utilizó tripsina al 0.25%. (Figura 16).



**Figura 15.** Viabilidad de las células de la gónada de totoaba después de ser disgregadas con diferentes concentraciones de tripsina. Los intervalos fueron calculados con las desviaciones estándar individuales.



**Figura 16.** Viabilidad de las células de la gónada de jurel después de ser disgregadas con diferentes concentraciones de tripsina. Los intervalos fueron calculados con las desviaciones estándar individuales.

### 3.2.2 Concentración de células

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de células viables disgregadas de totoaba en relación con el control ( $P = 0.00$ ). El mayor número de células viables ( $14.35 \times 10^5$ ) se encontró en el tratamiento de tripsina al 0.3% (Tabla 1). La concentración de células viables en jurel no tuvo diferencias significativas ( $P = 0.11$ ) entre los tratamientos para disgregar el tejido, la cantidad de células viables se encontró entre  $2.1$  y  $2.96 \times 10^5$  (Tabla 2). La concentración de tripsina al 0.3% fue seleccionada tanto para totoaba como para jurel, para realizar los siguientes experimentos. Esta concentración se seleccionó debido a que fue la concentración con mayor cantidad de células viables, así como donde se encontraron menos residuos tisulares en ambas especies.

**Tabla 1.** Concentración de células viables de gónada de jurel. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis *a posteriori* de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

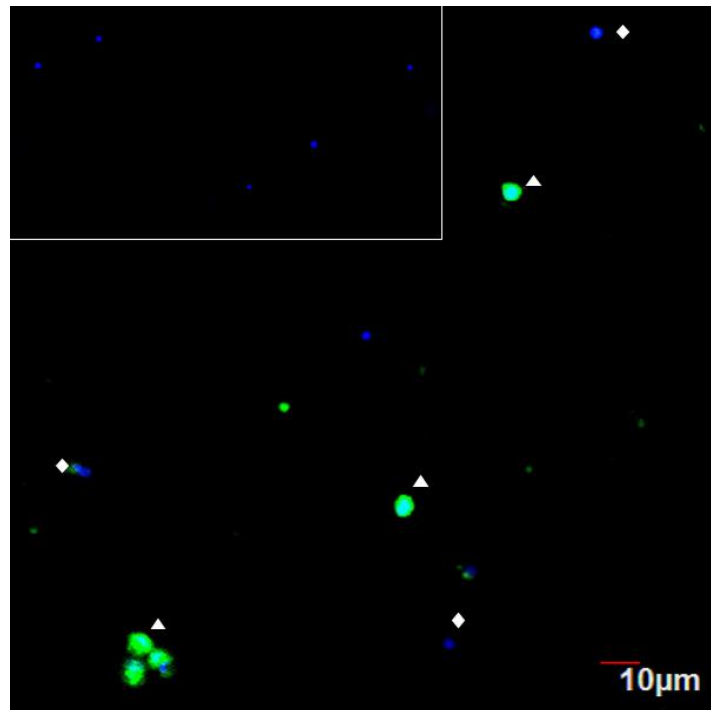
Tratamiento	Número de células gonadales viables ( $\times 10^5$ )
Control	$2.77 \pm 0.67^a$
Tripsina 0.25 %	$2.26 \pm 1.01^a$
Tripsina 0.3 %	$2.96 \pm 2.02^a$
Tripsina 0.5 %	$2.10 \pm 1.09^a$

**Tabla 2.** Concentración de células viables de gónada de totoaba. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis *a posteriori* de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

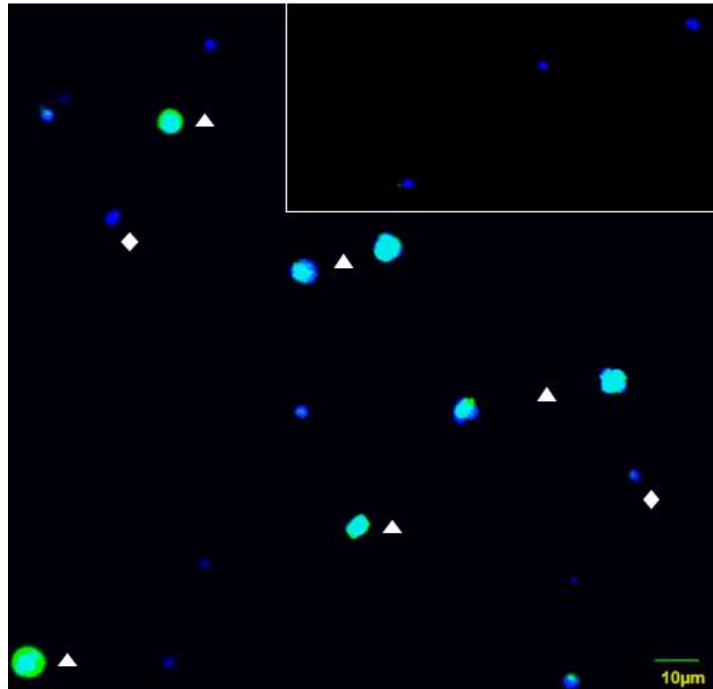
Tratamiento	Número de células gonadales viables ( $\times 10^5$ )
Control	$5.47 \pm 0.99^b$
Tripsina 0.25 %	$12.52 \pm 0.64^a$
Tripsina 0.3 %	$14.35 \pm 0.97^a$
Tripsina 0.5 %	$8.71 \pm 2.09^b$

### 3.3 Identificación de células germinales

La presencia de CGs en la suspensión celular recuperada de la concentración al 10 % de Percoll en el gradiente discontinuo de densidades fue confirmada con inmunocitoquímica. El promedio de células con fluorescencia positiva a marcador *vasa* o *DDX4*, fue del 33.3 % en totoaba y 34.2 % en jurel (Figuras 17 y 18).



**Figura 17.** Micrografía de células de gónada de totoaba teñidas con anti-vasa conjugado con Alexa Fluor 488 y DAPI. Células positivas a la presencia de proteína *vasa* se tiñeron de verde en su citoplasma y de azul en sus núcleos (triángulos). Las células somáticas se aprecian con la tinción azul de sus núcleos (rombos). En el recuadro blanco se muestran las células utilizadas como control (400X).



**Figura 18.** Micrografía de células de gónada de jurel teñidas con anti-vasa conjugado con Alexa Fluor 488 y DAPI. Células positivas a la presencia de la proteína *vasa* se tiñeron de verde en su citoplasma y de azul en sus núcleos (triángulos). Las células somáticas se aprecian con la tinción azul de sus núcleos (rombos). En el recuadro blanco se muestran las células utilizadas como control (400X).

### 3.4 Criopreservación

#### 3.4.1 Criopreservación de gónada

No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la viabilidad de las células de totoaba o jurel después de descongeladas (Tablas 3 y 4). Sin embargo, las gráficas de efectos principales muestran que la TC tiene mayor efecto que la concentración de crioprotectante sobre la viabilidad de las células gonadales (Figuras 19 y 20). En las células de totoaba, la tasa de congelación de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  tuvo la mayor viabilidad (58.4 %) siendo poco afectada por la concentración de crioprotectante. La tasa de congelación tuvo el mayor efecto en las células de jurel, sin embargo se observó mayor viabilidad celular con la TC de  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , independientemente de la concentración de EG.

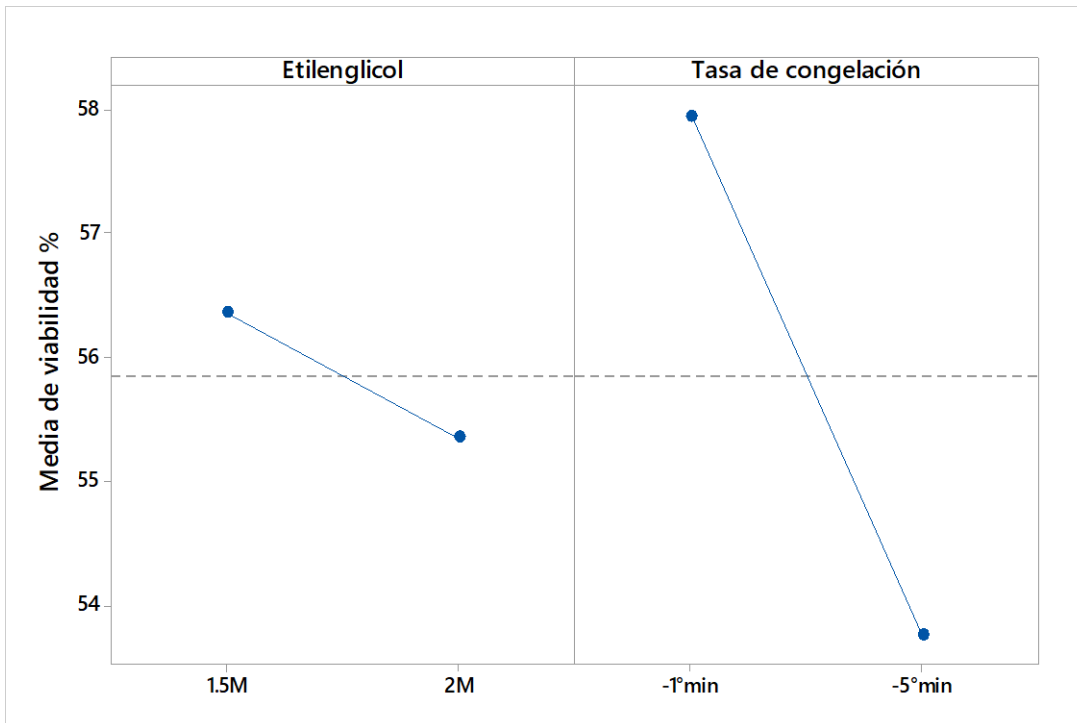


**Tabla 3.** Viabilidad de las células de la gónada descongelada de totoaba incubadas en 2 concentraciones de EG y congeladas en 2 TC. Los valores se presentan en porcentaje y corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

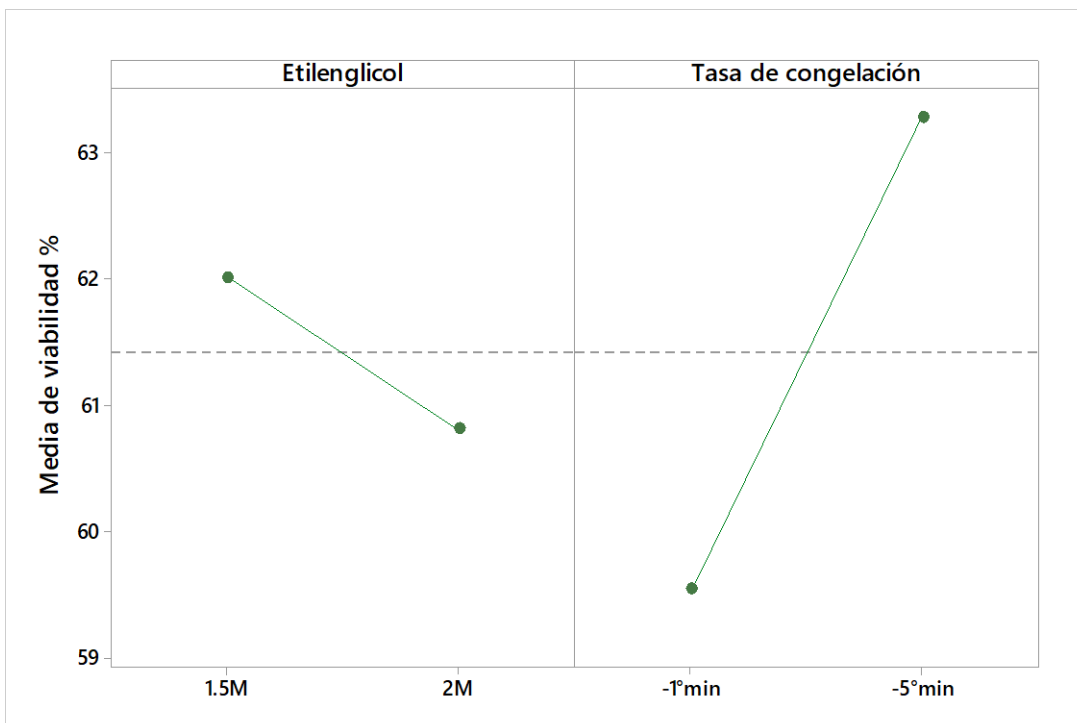
		Viabilidad %	
Concentración EG <i>P</i> = 0.67		1.5 M	2 M
Tasa de congelación <i>P</i> = 0.10	-1°C/min	58.4 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	57.5 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>
Interacción de factores <i>P</i> = 0.98	-5°C/min	54.3 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	53.2 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>

**Tabla 4.** Viabilidad de las células de la gónada descongelada de jurel ante dos concentraciones de EG y dos TC. Los valores se presentan en porcentaje y corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

		Viabilidad %	
Concentración EG <i>P</i> = 0.61		1.5 M	2 M
Tasa de congelación <i>P</i> = 0.14	-1°C/min	60.6 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	58.5 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>
Interacción de factores <i>P</i> = 0.73	-5°C/min	63.5 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	63.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>



**Figura 19.** Gráfica de efectos principales para la viabilidad de células de la gónada descongelada de totoaba. La gráfica muestra las medias ajustadas de cada nivel y cada factor aplicado.

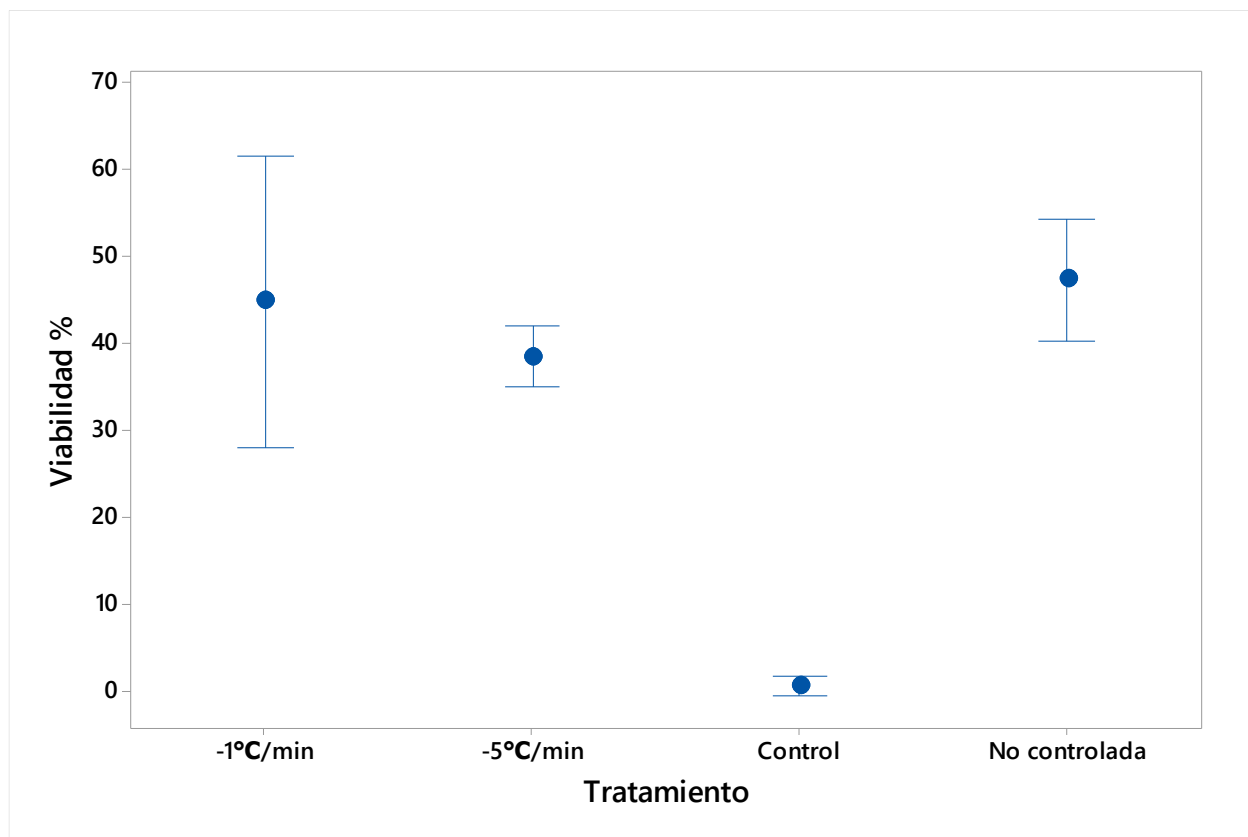


**Figura 20.** Gráfica de efectos principales para la viabilidad de células de la gónada descongelada de jurel. La gráfica muestra las medias ajustadas de cada nivel y cada factor aplicado.

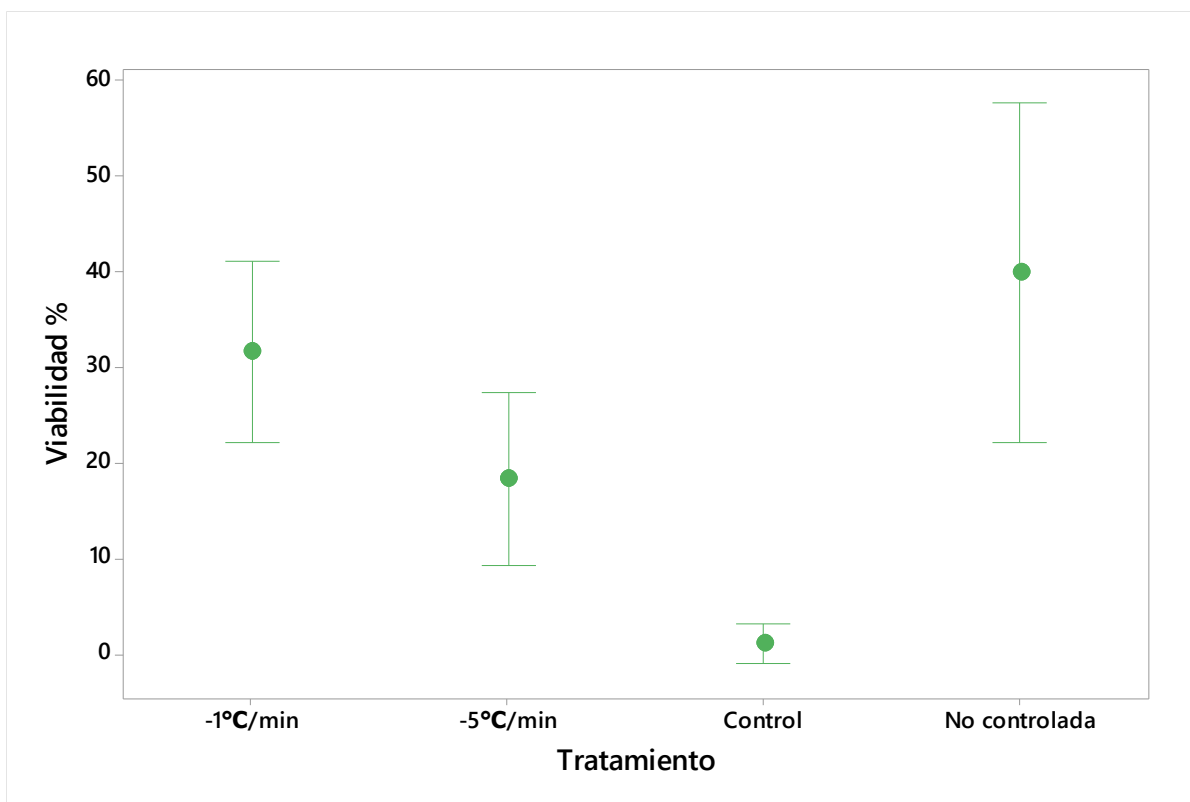
### 3.4.2 Criopreservación de suspensión enriquecida de células germinales

Los protocolos de criopreservación para CGs en suspensión, tuvieron altos porcentajes de viabilidad, tanto en células de totoaba (entre 38.5 % y 47.3 %) como de jurel (entre 18.3 % y 39.8 %) en los diferentes tratamientos aplicados. Se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.00$ ) en la viabilidad de las CGs de totoaba entre las TC controladas y no controlada. Diferencias específicas fueron encontradas solo en los controles (Figura 21). Las células germinales de jurel tuvieron significativamente ( $P = 0.00$ ) mayor viabilidad cuando fueron enfriadas a  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y con la TC no controlada (Figura 22).

Se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.00$ ) en la concentración final de células viables en totoaba y jurel con respecto a las TC. La TC no controlada tuvo el mayor número de células viables en ambas especies. Diferencias específicas en la viabilidad de células de totoaba, indican que sólo hubo diferencias significativas ( $P = 0.00$ ) con el control. La concentración de CGs viables de totoaba fue de entre  $3.9 \times 10^5$  y  $4.2 \times 10^5$  células por mL, mostrando diferencias significativas con respecto al control ( $P = 0.00$ ) (Tabla 5). La mayor concentración de CGs viables de jurel se encontró en la TC no controlada ( $7.3 \times 10^5$  cel/mL) siendo diferente contra la TC de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y el control (Tabla 6).



**Figura 21.** Viabilidad de las células germinales de totoaba, criopreservadas con diferentes tasas de congelación. La desviación estándar individual fue utilizada para calcular los intervalos.



**Figura 22.** Viabilidad de las células germinales de jurel, criopreservadas con diferentes tasas de congelación. La desviación estándar individual fue utilizada para calcular los intervalos.

**Tabla 5.** Concentración de células germinales viables de totoaba. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

Tasa de congelación	Células germinales viables ( $\times 10^5$ )/mL
Control	0.07 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
-1°C/min	3.92 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>
-5°C/min	3.04 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>
No controlada	4.20 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>

**Tabla 6.** Concentración de células germinales viables de jurel. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar. Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis a posteriori de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). La misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

Tasa de congelación	Células germinales viables ( $\times 10^5$ )/mL
Control	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
-1°C/min	3.71 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>
-5°C/min	5.08 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup>
No controlada	7.31 $\pm$ 2.25 <sup>a</sup>

Los resultados de los tratamientos aplicados en el TG y suspensión enriquecida con CGs de totoaba y de jurel, se resumen en la tabla 7 y 8 respectivamente.

**Tabla 7.** Resumen de resultados en totoaba.

<b>Procedimiento</b>	<b>Tratamiento óptimo</b>	<b>Resultado</b>
Disgregación de tejido con tripsina	0.30%	76 % viabilidad
Enriquecimiento de CGs	Percoll 10%	33.3% CGs
Criopreservación de gónada	TC: -1°C/min EG: 1.5 M	58.4 % viabilidad
Criopreservación de suspensión	TC no controlada	38.5 % viabilidad

**Tabla 8.** Resumen de resultados en jurel.

<b>Procedimiento</b>	<b>Tratamiento óptimo</b>	<b>Resultado</b>
Disgregación de tejido con tripsina	0.30%	53.3%
Enriquecimiento de CGs	Percoll 10%	35.2 % CGs
Criopreservación de gónada	TC : -5°C/min EG: 1.5 M	63.5 % viabilidad
Criopreservación de suspensión	TC no controlada	47.3 % viabilidad

## Capítulo 4. Discusión

---

Este proyecto representa el desarrollo de nuevas metodologías para el manejo de CGs de dos especies importantes en México, como lo son totoaba y jurel. El proceso comprende desde la obtención de una suspensión con células (somáticas y línea germinal) de gónada inmadura, enriquecimiento de dicha suspensión con CGs, identificación de las CGs presentes con inmunocitoquímica, criopreservación de TG, criopreservación de una suspensión enriquecida con CGs y el protocolo para evaluar la viabilidad de las células. Además, como parte del trabajo se conservaron gónadas y CGs de totoaba y jurel en el banco de germoplasma de especies acuáticas de México, SUBNARGENA. Conservando así por tiempos indefinidos y por primera ocasión CGs en suspensión y en TC de totoaba y jurel en México.

Los protocolos de disgregación de tejido en este estudio fueron adaptaciones de estudios en otras especies descritos en la literatura. Después de incubar las gónadas con tripsina para disgregar las células del tejido, se observó (1) la mayor viabilidad, (2) la suspensión más limpia de restos celulares y de tejido, así como (3) la mayor cantidad de células disgregadas con la concentración del 0.3 % en *Totoaba macdonaldi* y *Seriola lalandi*. Esta concentración de tripsina ha sido utilizada en varios estudios para disgregar gónada de teleósteos. Psenicka y colaboradores (2014) observaron que esta concentración es la óptima para obtener la mayor cantidad de células disgregadas ( $\sim 8 \times 10^5$ ), así como la mayor viabilidad (>80 %) tanto en ovarios como en testículos de esturión siberiano. Sin embargo, el uso de colagenasa al 0.2 % y posteriormente tripsina al 0.25 % ha tenido resultados favorables (89 % de colonización en trasplantes) en tilapia (Lacerda, 2010) y en dojo para realizar análisis con citometría de flujo al medir ploidía (Yoshikawa *et al.*, 2009).

El enriquecimiento de una suspensión con CGs, mediante la utilización de un gradiente discontinuo de densidades resultó ser una técnica, además de un bajo costo, eficiente que no requiere equipos sofisticados como la citometría de flujo, de acuerdo como argumenta Lacerda (2006). En este estudio se obtuvo más del 30 % de CGs en la capa de concentración al 10 % de Percoll en las dos especies que se utilizaron en este estudio. Esta misma concentración de Percoll es la recomendada por diversos autores, debido a que las células con mayor densidad, generalmente células sanguíneas, se encuentran en el precipitado de la mayor concentración, que en este estudio fue del 40 %. Por otra parte, se he observado que el sobrenadante consiste en su mayoría de restos celulares y tejido (Lacerda, 2006; 2010, Linhartová *et al.*, 2014; Psenicka *et al.*, 2015). Por tal motivo se utilizó el precipitado del 10 % de Percoll para realizar la identificación con inmunocitoquímica.

Mediante el uso de inmunocitoquímica, en este estudio se comprobó que las CGs diferenciadas en organismos inmaduros de totoaba y jurel son positivas a la señal de *vasa* en organismos juveniles y no maduros. Por lo tanto, *vasa* es utilizable como marcador para CGs de *Totoaba macdonaldi* y *Seriola lalandi*. En estudios anteriores con embriones de totoaba en etapa de dos y cuatro células, se comprobó que las CGPs son positivas a la presencia de la proteína *vasa* mediante el uso del mismo marcador (Escuredo-Vielba *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha identificado la proteína *vasa* en larvas de *Seriola quinqueradiata*, una especie el mismo género del jurel utilizado en este trabajo (Robles *et al.*, 2017), lo que sugiere que *vasa* puede ser utilizado marcador de la línea germinal en una gran cantidad de peces teleósteos, sin embargo es necesario comprobarlo en cada especie que se estudie (Raz, 2000; Linhartová *et al.*, 2014; Okutsu *et al.*, 2008)

La criopreservación de germoplasma de las dos especies utilizadas en este estudio se realizó con dos técnicas, con TG completo para ser disgregadas después de descongelar y como CGs disgregadas en suspensión. Las dos técnicas resultaron tener una alta viabilidad (Franěk *et al.*, 2019; Zuzana Linhartová *et al.*, 2014) y un alto rendimiento en la cantidad total de CGs viables recuperadas. No obstante, debido al tamaño de las gónadas no fue posible dividir las en el número de tratamientos necesarios para poder comparar estadísticamente la viabilidad entre el tejido completo y células disgregadas en suspensión.

Pšenička *et al* (2016) no encontraron diferencias significativas al congelar tejido y suspensión de CGs de esturión siberiano. Las diferencias estadísticas que encontraron fueron con respecto al crioprotectante utilizado, siendo EG el que representó al grupo con mayor viabilidad (>90 %). Sin embargo dicho estudio fue limitado a una sola concentración y una sola tasa de congelamiento (-10°C/min). En carpa común, se encontró que el DMSO al 1.5 M tuvo mayor viabilidad (~65 %) al congelar ovarios en contraste con propilenglicol y metanol (Franěk *et al.*, 2019). En ambos estudios donde congelaron TG, se realizaron trasplantes después de descongelar las muestras. Las células disgregadas fueron marcadas en su membrana con PKH26 e identificadas en el hospedero 9 días (esturión siberiano) y 2 meses (carpa común) después del trasplante. En el presente estudio se optó por utilizar EG como crioprotectante para congelar tejido completo, evaluando dos concentraciones y dos tasas de congelación, sin encontrar diferencias significativas entre los factores. Al hacer un análisis de efectos principales, observamos que la tasa de congelamiento tiene mayor efecto con la viabilidad que la concentración, obteniendo la viabilidad más alta para totoaba de 58.4 % con la tasa de -1°C/min y la viabilidad más alta para jurel del 63.5 % con la tasa de -1°C/min. Al congelar el tejido completo se conserva una mayor cantidad de células viables, lo que puede ser explicado por la protección adicional que ofrece el parénquima gonadal a la formación de los cristales de hielo. En contraste con la congelación de CGs en suspensión, donde el mantenimiento

íntegro de las membranas se limita al crioprotectante y al manejo. Por otra parte, disgregar el tejido después de descongelar resulta tener ventajas como disociar los restos de células dañadas por el proceso de congelación, obteniendo una suspensión con menos contaminación por restos celulares (Pšenička *et al.*, 2016; Franěk *et al.*, 2019). Por lo tanto, cada técnica de criopreservación es, además de especie-específica, tejido-específica y por lo tanto es necesario desarrollar una metodología para cada especie, tejido o línea celular.

El medio para criopreservación de CGs en suspensión compuesto por 0.5 % ASB, 0.1 % antibiótico-antimicótico, 50 mM de glucosa y 1.5 M como crioprotectante, presentó la viabilidad más alta en ambas especies (Totoaba: 47.3 %, jurel 39.8 %) cuando se utilizó la tasa de congelación no controlada. Por lo tanto se sugiere que el método más sencillo y que no requiere de un controlador programable, puede ser utilizado para criopreservar CGs desde instalaciones en una unidad de producción animal, cuyo equipo de laboratorio puede estar limitado, hasta en un laboratorio especializado, tal como sugieren otros autores con respecto a las tasas de congelación no controladas (Izadyar *et al.*, 2002; Lacerda, 2010). La tasa no controlada ofrece a las CGs en suspensión menor tiempo de exposición mientras desciende la temperatura hasta -80°C. Un menor tiempo de exposición de CGs a temperaturas críticas, tiene como consecuencia menor formación de cristales de hielo, los cuales pueden desintegrar las membranas citoplasmáticas. Aunado a un menor tiempo de exposición a temperaturas críticas, la incubación por 10 min en EG 1.5 M resultó ser eficiente para penetrar y proteger las CGs de los cristales de hielo también. Sin embargo, se ha observado que el uso de otros crioprotectantes penetrantes como glicerol han presentado protección a la formación de cristales de hielo, obteniendo >50 % de CGs viables en *Tinca tinca* (Linhartová *et al.*, 2014).

Los resultados indican que después de cada proceso crítico, las CGs de totoaba y jurel tienen actividad positiva de esterasas, así como integridad en sus membranas citoplasmáticas. Dichas propiedades sugieren que se puede continuar estudiando el manejo de células germinales con futuros trabajos a partir del presente, como el cultivo celular y desarrollo de protocolos de trasplantes. Mediante el cultivo celular, se podría evaluar si las células provenientes de tejido o suspensión congeladas, tienen la capacidad de realizar mitosis *in vitro*. Lacerda (2010) realizó cultivos de CGs exitosamente durante 48 h en condiciones de 5 % de CO<sub>2</sub> y medio de Eagle modificado por Dulbecco para posteriormente realizar trasplantes de CGs, logrando la colonización y proliferación de CGs en tilapia como huésped. Los trasplantes de CGs descongeladas comprobarían, además de la integridad de membrana y capacidad de mitosis, la capacidad de colonización y proliferación en una gónada exógena. Sin embargo, los factores externos a considerar están definidos por cada proceso crítico, como el cultivo, especie hospedera, estado de salud, sexo, edad, técnica de esterilización y técnica de trasplante (Robles *et al.*, 2017).



## Capítulo 5. Conclusiones

---

1. El medio de disgregación con tripsina al 0.3 % resultó ser el óptimo para obtener el mayor porcentaje y cantidad de células viables. Además es la concentración donde se observó la suspensión más limpia de restos celulares y tisulares, tanto en totoaba como en jurel.
2. Un gradiente discontinuo de densidades al 10 % y 40 % con Percoll es una técnica con la que se puede obtener una suspensión enriquecida con >30 % de CGs de totoaba o de jurel en la concentración del 10 %.
3. Congelar tejido completo es un procedimiento que protege las CGs viables de manera eficaz. La concentración del 1.5 M durante 10 min es recomendable para obtener el 58 % y 60 % de células viables en totoaba y jurel respectivamente. La tasa de congelación de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  es la que tiene mayor viabilidad (58 %) en totoaba. En jurel una tasa más rápida ( $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) resulta con una mayor viabilidad (63 %).
4. Congelar CGs en suspensión es una metodología que, con una tasa no controlada se puede obtener el 47 % de viabilidad en CGs de totoaba y el 39 % en CGs de jurel. Lo que resulta en una práctica de bajo costo y eficaz para conservar y disponer de CGs en suspensión.
5. La criopreservación de CGs es una técnica que asegura conservar el genoma completo de recursos acuáticos de gran interés ecológico y socio-económico en México, como la totoaba y el jurel.
6. La efectividad de cada técnica, como de disgregación, enriquecimiento de una suspensión con CGs, inmunocitoquímica y criopreservación son tejido y especie específicas.
7. Los resultados de este estudio establecen las bases para próximos estudios aplicados como el cultivo de CGs o los trasplantes en hospederos estériles de la misma especie o de alguna especie filogenéticamente cercana.

## Literatura citada

---

- Andriani, I., Agustiani, F., Hassan, M., Parenrengi, A., y Inoue, K. (2018). Preliminary Study on Testicular Germ Cell Transplantation of Endemic Species *Oryzias celebensis*. Journal of Physics: Conference Series, 979(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/979/1/012004>
- Cabrita, E., Pacchiarini, T., Sarasquete, C., y Herraéz, M. P. (2010). 141. Development of a cryopreservation protocol for *Senegalese sole* testicular germ cells. Cryobiology, 61(3), 405–405. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.10.145>
- Cinalli, R. M., Rangan, P. y Lehmann, R. (2008). Germ cells are forever. Cell, 132(4), 559–562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.003>
- Cisneros-Mata, M.A., Botsford, L.W. y 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](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0968:PVOTMA]2.0.CO)
- Cunningham R. E. (2010). Immunocytochemical methods and protocols P. 588. Capítulo 32 Pp. 327–330. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0>
- Devireddy R. V. (2011). The use of calorimetry for subzero cryobiological measurements. En: Cryopreservation in aquatic species, 2nd edition. T. R. Tiersch and C. C. Green, editores. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. 325-335.
- Escuredo-Vielba, R., Del Río-Portilla, M. A., Mata-Sotres, J. A., Barón-Sevilla, B., Guerrero-Rentería, Y., y Paniagua-Chávez, C. G. (2018). Characterization and localization of primordial germ cells in *Totoaba macdonaldi*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 225, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.07.001>
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. <https://doi.org/978-92-5-306675-9>
- Findley, L. (2010). *Totoaba macdonaldi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T22003A9346099. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T22003A9346099.en>. Downloaded on 21 November 2018.
- 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.
- Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujić, J., Marinović, Z., Horváth A., Kašpar V. y Pšenička, M. (2019). Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. Cryobiology. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2019.01.016>
- Herráez Paz M. (2009). La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. En: Capítulo 7, Criopreservación de gametos y embriones. Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de acuicultura. Pp. 477-530.

- Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., Kagawa, N., Kuwayama, M y Takahashi, Y. (2010a). Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction*, 139(4), 733–740. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0549>
- Higaki, S., Kawakami, Y., Eto, Y., Yamaha, E., Nagano, M., Katagiri, S. y Takahashi, Y. (2013). Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. *Cryobiology*, 67(3), 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.10.006>
- Higaki, S., Mochizuki, K., Akashi, Y., Yamaha, E., Katagiri, S. y Takahashi, Y. (2010b). Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Reproduction and Development*. *Reprod. Dev*, 56(56), 9–136. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-136E>
- Higuchi, K., Takeuchi, Y., Miwa, M., Yamamoto, Y., Tsunemoto, K., y Yoshizaki, G. (2011). Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) spermatogonia in nibe croaker (*Nibea mitsukurii*) recipient. *Fisheries Science*, 77(1), 69–77. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0314-7>
- Izadyar, F., Matthijs-Rijssenbilt, J. J., Den Ouden, K., Creemers, L. B., Woelders, H., y De Rooij, D. G. (2002). Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *Journal of Andrology*, 23(4), 537–545. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02276.x>
- Jenkins, J. A., Bart, H. L., Bowker, J. D., Bowser, P. R., Macmillan, J. R., Nickum, J. G. y Whitley, G. W. (2014). Guidelines for the use of fishes in research. Library of Congress Control Number. Recuperado de: <https://fisheries.org/docs/wp/Guidelines-for-Use-of-Fishes.pdf>
- Jin-Chywan G. (2011) Cryopreservation of eggs and embryos from aquatic organisms. En: *Cryopreservation in aquatic species 2<sup>nd</sup> edition*. Tiersch, Terrence. R. y Green Christopher C., editores. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Kawakami, Y., Ishihara, M., Saito, T., Fujimoto, T., Adachi, S., Arai, K. y Yamaha, E. (2012a). Cryopreservation of green fluorescent protein (GFP)-labeled primordial germ cells with GFP fused to the 3' UTR of the nanos gene by vitrification of Japanese eel (*Anguilla japonica*) somite-stage embryos. *Journal of Animal Science*, (Marzo), 4256–4265. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4884>
- Kawakami, Y., Saito, T., Fujimoto, T., Goto-Kazeto, R., Takahashi, E., Adachi, S. y Yamaha, E. (2012b). Technical note: Viability and motility of vitrified/thawed primordial germ cell isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) somite embryos. *Journal of Animal Science*, 90(2), 495–500. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4329>
- Kobayashi Teremusa, Takeuchi Yutaka y Takeuchi Toshio (2007). Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 4(74), 207–213. <https://doi.org/10.1002/mrd>

- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G. y Takeuchi, T. (2003). Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1–4), 479–480. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030634.37486.fa>
- Lacerda, S. M. (2006). Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental (Tesis de Maestría). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. 91 p.
- Lacerda, S. M. (2010). Transplante singênico e xenogênico de espermatogônias-tronco em tilápias-nilóticas (*Oreochromis niloticus*) adultas, 1–102 (Tesis de doctorado). Universidade Federal De Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. 102 p.
- Lacerda, S. M., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P. H. A., Segatelli, T. M., Yazawa, R., Takeuchi, Y. y França, L. R. (2013). Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9606-4>
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., Greenacre, C., Gwaltney-Brant S., McCrackin M., Meyer, R., Miller, D., Shearer, J. y Yanong, R. (2013). AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2013 Edition members of the panel on euthanasia. Recuperado de: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>
- Linhartová, Z., Rodina, M., Guralp, H., Gazo, I., Saito, T., y Pšenička, M. (2014). Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). In *Czech J. Anim. Sci* (Vol. 59). Recuperado de: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/130016.pdf>
- Majhi, S. K., Hattori, R. S., Rahman, S. M. y Strüssmann, C. A. (2014). Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095294>
- Majhi, S. K., Hattori, R. S., Yokota, M., Watanabe, S. y Strüssmann, C. A. (2009). Germ cell transplantation using sexually competent fish: An approach for rapid propagation of endangered and valuable germlines. *PLoS ONE*, 4(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006132>
- Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T. y Cabrita, E. (2017). Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472, 156–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>
- Mckenzie, J. R. (2014). Review of productivity parameters and stock assessment options for kingfish (*Seriola lalandi lalandi*). Recuperado a partir de <http://fs.fish.govt.nz>
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (2010). Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. Revisado en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle\\_popup.php?codigo=5173091](http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091) el 3 de agosto de 2019.

- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi T. y Yoshizaki, G. (2008). Spermatogonial Transplantation in Fish: Production of Trout Offspring from Salmon Parents. *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 209–219. <https://doi.org/10.1126/science.1145626>
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T. y Yoshizaki, G. (2006a). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2725–2729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509218103>
- Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y. y Yoshizaki, G. (2006b). Manipulation of Fish Germ Cell: Visualization, Cryopreservation and Transplantation. *Journal of Reproduction and Development*, 52(6), 685–693. <https://doi.org/10.1262/jrd.18096>
- Paniagua-Chávez, C. G., Ortíz-Gallarza, S. M., y Aguilar-Juárez, M. (2011). Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México. *Hidrobiológica*, 21(3), 415–429.
- Perera, D. A., Alsaqufi, A., Shang, M., Wade, D. C., Su, B., Elaswad, A. y Dunham, R. A. (2017). Xenogenesis-Production of Channel Catfish × Blue Catfish Hybrid Progeny by Fertilization of Channel Catfish Eggs with Sperm from Triploid Channel Catfish Males with Transplanted Blue Catfish Germ Cells. *North American Journal of Aquaculture*, 79(1), 61–74. <https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1221008>
- Pertoft, H., Laurent, T. C., Låås, T. y Kågedal, L. (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical Biochemistry*, 88(1), 271–282. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90419-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90419-0)
- Pšenička, M., Saito, T., Linhartová, Z. y Gazo, I. (2015). Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology*, 83(6), 1085–1092. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.010>
- Pšenička, M., Saito, T., Rodina, M. y Dzyuba, B. (2016). Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells. *Cryobiology*, 72(2), 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.005>
- Raz, E. (2000). The function and regulation of vasa -like genes in germ-cell development. *Genome Biology*, 1(3), 1–6. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017>
- Riesco, M. F., Martínez-Pastor, F., Chereguini, O. y Robles, V. (2012). Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology*, 77(1), 122–130.e2. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.024>
- Robles, V., Riesco, M. F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D. G., Cabrita, E., y Herráez, P. (2017). Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*, 472, 4–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.004>
- Rojas-Bracho, L. y Taylor, B.L. 2017. *Phocoena sinus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T17028A50370296. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T17028A50370296>

- Shang, M., Su, B., Lipke, E. A., Perera, D. A., Li, C., Qin, Z. y Dunham, R. A. (2015). Spermatogonial stem cells specific marker identification in channel catfish, *Ictalurus punctatus* and blue catfish, *I. furcatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(6), 1545–1556. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0106-1>
- Shang, M., Su, B., Perera, D. A., Alsaqufi, A., Lipke, E. A., Cek, S. y Dunham, R. A. (2018). Testicular germ line cell identification, isolation, and transplantation in two North American catfish species. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(2), 717–733. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0467-3>
- Silva, M. A., Costa, G. M. J., Lacerda, S. M. S. N., Brandão-Dias, P. F. P., Kalapothakis, E., Silva Júnior, A. F. y França, L. R. (2016). Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *General and Comparative Endocrinology*, 230–231, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.012>
- Smith-Vaniz, W.F. y Williams, I. (2015). *Seriola lalandi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T195097A43155921. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T195097A43155921.en>. Consultado el 21 de Noviembre de 2018.
- Sudagar, M., Keivanloo, S. y Hajibeglou, A. (2018). Effect of different permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Aquaculture International*, 26(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0192-4>
- Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M. y Yoshizaki, G. (2009). Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biology of Reproduction*, 81(6), 1055–1063. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077701>
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G. y Takeuchi, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *biology of reproduction*, 69(4), 1142–1149. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017624>
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G. y Takeuchi, T. (2004). Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 430 (7000), 629–630. <https://doi.org/10.1038/430629a>
- Thornton, P. K. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853–2867. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>
- Tiersch, T. R. (2011). Introducción de la segunda edición. En: *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2da Edición. T. R. Tiersch and C. C. Green, editores. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, Estados Unidos de América. Pp. 1-17.
- Tucker, M. J., y Liebermann, J. (2007). *Vitrification in assisted reproduction*. Informa Healthcare. Londres, Inglaterra; P. 299
- UNPD (United Nations Population Division) (2017). The 2017 revision and world urbanization prospects: Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat, *World Population Prospects*. Recuperado el 15 de marzo de 2018 de <http://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>

- 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.
- Wong, T.-T., Saito, T., Crodian, J. y Collodi, P. (2011). Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biology of Reproduction*, 84(6), 1190–1197. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088427>
- Yanong, R. P. E. (2003). Necropsy techniques for fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 12(2), 89–105. <https://doi.org/10.1053/saep.2003.127885>
- Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N. y Yoshizaki, G. (2010). Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic Germ Cells1. *Biology of Reproduction*, 82(5), 896–904. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081281>
- Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Ishida, M. y Yoshizaki, G., (2013). The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) *dead end* gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. *Mol. Reprod. Dev.* 80, 871–880.
- Yoshikawa, H., Morishima, K., Fujimoto, T., Saito, T., Kobayashi, T., Yamaha, E. y Arai, K. (2009). Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish. *Biology of Reproduction*, 80(5), 973–979. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075150>
- Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M. y Takeuchi, Y. (2010). Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Animal Reproduction*, 7(3), 187–196.
- Zhang y Lubzens (2009). Cryopreservation of fish oocytes. En: *Methods in reproductive aquaculture marine and freshwater species*. Cabrita, E., Robles, V. y Paz, H., editores. Taylor y Francis Group, LLC. New York, UEA. P. 574.

## Anexos

### Anexo 1. Diseño de sistemas de recirculación acuícola construidos para el mantenimiento de jureles y totoabas.

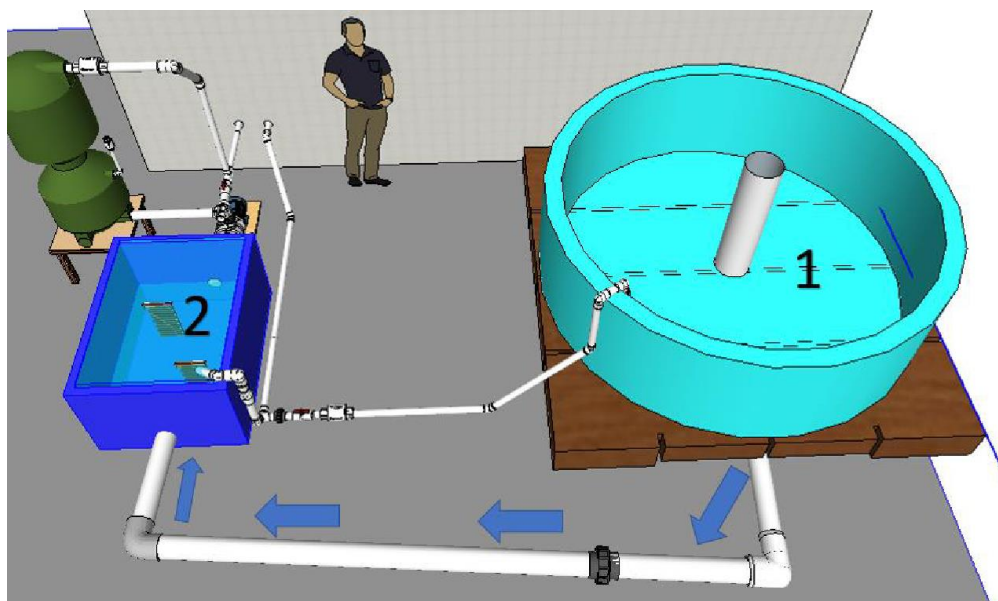
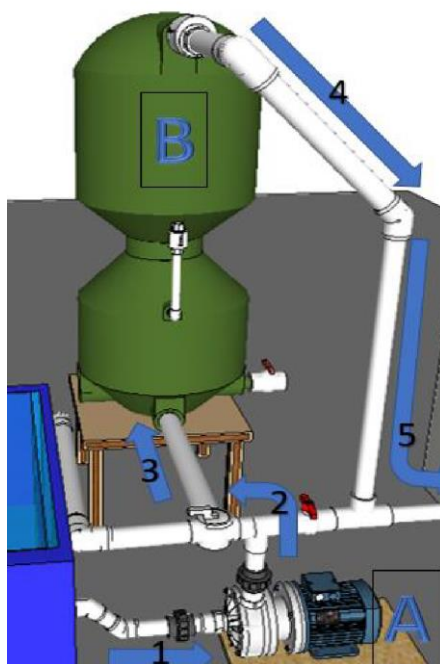
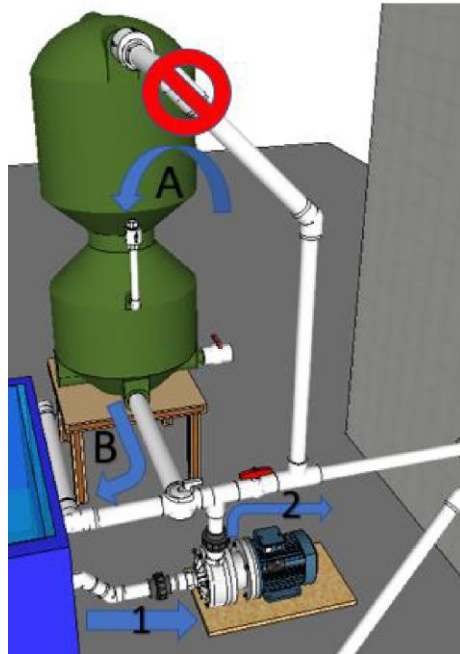


Diagrama de flujo del agua del tanque de cultivo. (1) al tanque de compensación (2) a través de tubería de pvc de 4" (Flechas azules).

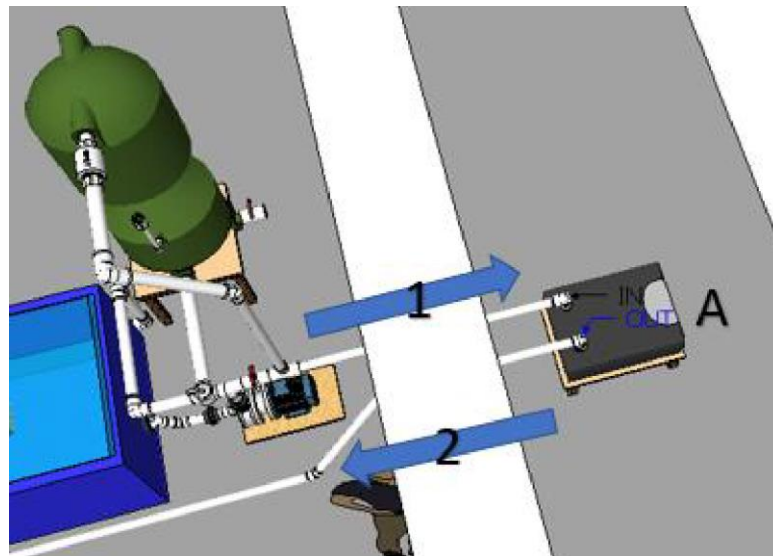


Flujo del agua efluente del tanque de compensación. (1) con dirección al biofiltro (B), la dirección está regulada por el acomodo de las válvulas (2 y 3). Al salir del biofiltro, el agua se direcciona (4 y 5) hacia el intercambiador de calor. La bomba centrífuga (A) se encuentra conectada a 220v.

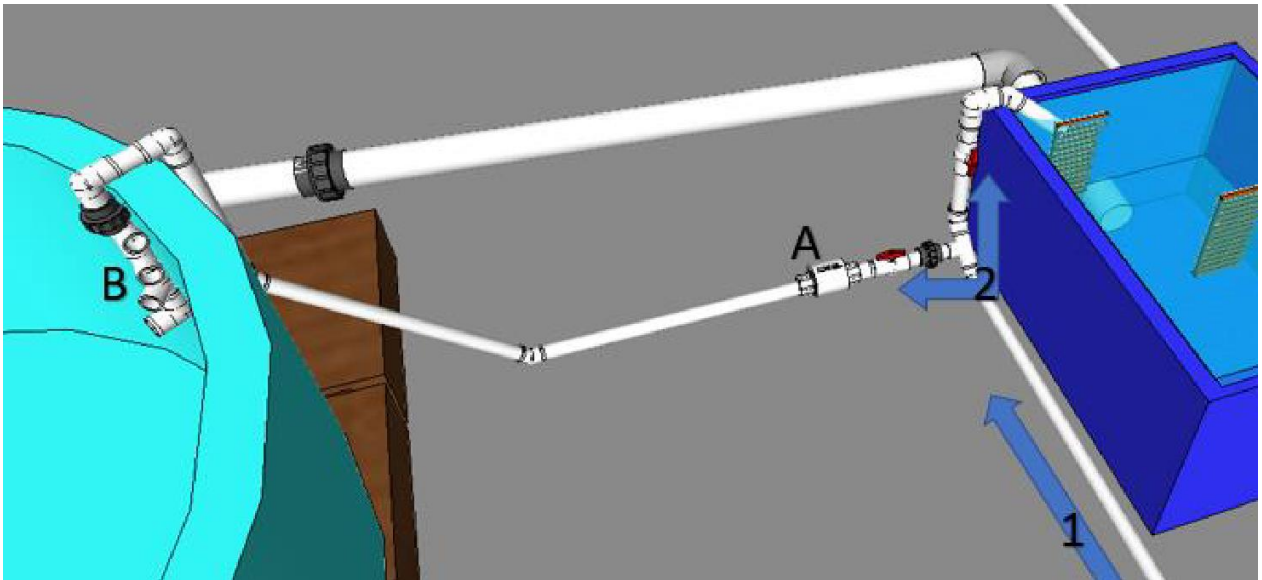




**Flujo del agua efluente del tanque de compensación.** (1) con dirección al intercambiador de calor (2), la dirección está regulada por el acomodo de las válvulas. El acomodo que se muestra en el diagrama es para realizar el retrolavado, sin interrumpir el flujo. La válvula “check” que se encuentra en la tubería superior del biofiltro interrumpe el flujo (círculo rojo) de la bomba hacia el biofiltro. El agua dentro del biofiltro sale con dirección al desagüe (B) cuando entra aire (A) por la válvula “check” del biofiltro.



**Flujo del agua proveniente del intercambiador de calor.** Entrada (1) al intercambiador de calor (A) y salida (2) hacia el sistema, para distribuirla con opción al tanque de compensación o al tanque de cultivo.



**Flujo del agua proveniente del intercambiador de calor.** (1) que se distribuye al tanque de compensación o al tanque de cultivo regulando las válvulas (2). La válvula “check” (A) se encuentra por seguridad; si el flujo se interrumpe, la válvula interrumpe que el “manifold” (B) actúe como sifón.

## Anexo 2. Anestesia y toma de muestra sanguínea

---

Este protocolo fue desarrollado en totoaba, jurel y trucha variedad steelhead. Los organismos utilizados pesaron entre 250 g y 1 kg.

### Anestesia:

- Preparar dos baños de 99 L con **aireación constante**, agua limpia y a la temperatura que se encuentren los organismos a trabajar.
- Pesar 5g de MS222 para obtener una concentración final de 50mg / L
- Diluir en 1 L de agua marina o dulce, según la especie a trabajar
- Medir pH de la solución y ajustar de ser necesario con carbonato de sodio (el agua marina tiene la capacidad de amortiguar la acidez del anestésico)
- Diluir el litro con anestesia en un baño de 99 L
- Dejar el otro baño para recuperación
- Tomar tiempo e introducir los peces en el baño de anestesia
- Aproximadamente a los 3 min los peces perderán el equilibrio
- Aproximadamente a los 5 min los peces perderán el reflejo de huida
- Retirar cuidadosamente del agua y poner sobre una toalla

**Notas:** Asegurarse que el pez haya perdido el reflejo de huida, para evitar traumas en el organismo. No mantener al pez más de 2 min fuera del agua. Si no es posible encontrar la vena caudal en ese tiempo, introducirlo al baño de recuperación y seleccionar otro pez.

**Toma de muestra de sangre:**

- Colocar al pez anestesiado en posición supina
- Introducir una jeringa de 3 mL o tubos de muestra con aguja del 21 X 1<sup>1/2</sup> en dirección perpendicular a la columna vertebral, en el área próxima caudal a la aleta dorsal
- Al sentir que la aguja topa con la vértebra, buscar el punto donde la cámara de la jeringa se llene de sangre
- Extraer la cantidad de muestra necesaria y retirar la aguja, haciendo presión con una gasa o algodón para evitar hemorragias
- Introducir al pez en el baño de recuperación hasta que recupere el equilibrio (cada pez tardará diferente tiempo)

Una vez que el pez haya recuperado el equilibrio, regresar al tanque de cultivo



**Pez en posición supina.** La flecha blanca se encuentra en dirección de las vértebras caudales. La flecha roja señala la dirección y la zona en la que se debe introducir la aguja.

## Anexo 3. Inmunocitoquímica

---

### Preparación de portaobjetos:

- Incubar portaobjetos de dos anillos para anticuerpos (Goldseal) en HCl 1 N durante 12 h
- Lavar dos veces con etanol al 100%
- Sumergir en agarosa o Poli-L-Lisina al 0.1% en agua desionizada durante 10 min
- Secar en estufa durante 1 h a 70°C
- Colocar cada portaobjeto en caja Petri estéril (preferentemente de vidrio)

### Inmunocitoquímica:

- Fijar la suspensión celular a analizar en PFA al 4% en PBS
- Colocar 100 µL de suspensión celular en PFA en cada anillo de los portaobjetos
- Dejar asentar las células durante 3 h
- Lavar agregando PBS al centro del portaobjeto, no directo en los anillos
- Agregar PBS hasta que la gota se derrame fuera del anillo
- Escurrir el exceso
- Colocar las cajas Petri sobre gel congelado o hielo
- Agregar 100 µL de Tritón (Sigma) al 0.3 % en PBS (PBS-T)
- Incubar durante 15 min
- Lavar 3 veces con PBS
- Agregar 100 µL de ASB al 1 % y Tween 20 al 0.05 % en PBS (Solución de bloqueo)
- Incubar durante 1 h a 4°C
- Lavar 1 vez con PBS
- Agregar 100 µL de anticuerpo primario (Anti-DDX4/MVH, Abcam, ab13840) diluido 300 veces en solución de bloqueo
- Cubrir el anillo del portaobjeto con parafilm para evitar que se deshidrate la suspensión
- Incubar durante 18 h a 4°C
- Retirar cuidadosamente el Parafilm
- Lavar 3 veces con solución de bloqueo
- Agregar 100 µL de anticuerpo secundario (AlexaFluor488, Abcam, ab150077) diluido 800 veces en solución de bloqueo
- Envolver en papel aluminio

- Incubar durante 1 h a 4°C
- Lavar 3 veces
- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de DAPI (Sigma) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS-T
- Lavar 5 veces con PBS y escurrir el exceso
- Agregar 2 gotas de medio de montaje (Sigma)
- Colocar los cubreobjetos cuidadosamente y tratando de evitar las burbujas
- Dejar reposar por 2 horas
- Sellar las orillas de los cubreobjetos con esmalte para uñas
- Observar al microscopio

**Notas:** Todas las soluciones deberán estar a pH 7.2 – 7.4. Renovar todas las soluciones cada 30 días.

Realizar los procedimientos en campana de flujo laminar.

## Anexo 4. Gradiente discontinuo de densidades con Percoll

---

### Preparación de soluciones:

- Diluir 10mL de Percoll 1 X en SSBH (Previamente ajustada a la osmolaridad del suero sanguíneo del pez) hasta igualar la osmolaridad del suero sanguíneo.
- Para igualar la osmolaridad del Percoll y el suero sanguíneo se utiliza la [ecuación 2](#). Sin embargo, se recomienda monitorear la osmolaridad constantemente antes de diluir por completo.
- El Percoll diluido hasta alcanzar la osmolaridad del suero sanguíneo del pez se denominará Percoll al 100%
- Diluir el Percoll al 100% en HBSS al 40% y al 10%
- Percoll 40%: 6 mL HBSS y 4 mL Percoll 100%
- Percoll 10%: 9 mL HBSS y 1 mL Percoll 100%

### Preparación del gradiente:

- Colocar un tubo cónico de 10 mL por cada muestra en una gradilla y evitar movimientos fuertes
- Colocar 3 mL de Percoll al 40% en el fondo, evitando salpicaduras de Percoll
- Justo por encima de la superficie del Percoll al 40% colocar con la pipeta **muy lentamente** 3 mL de Percoll al 10%, evitando en lo posible que se mezclen las dos concentraciones
- Justo por encima de la superficie del Percoll al 40% colocar con la pipeta **muy lentamente** 100  $\mu$ L recuperados de la disgregación enzimática ([Ver sección 2.4](#))
- Colocar los tubos en la centrífuga a 4°C
- Activar la función “slow rotor acceleration”
- Centrifugar 30 min a 500 g
- Para convertir fuerza g a RPM utilizar la [calculadora de velocidad para centrífugas eppendorf](#)

### Recuperación de las bandas de Percoll

- Descartar el sobrenadante de la concentración del 10%
- Recuperar el precipitado formado a la mitad de la suspensión (en la base de la concentración del 10% y la superficie de la concentración del 40%)
- Diluir 1:10 en SSBH y centrifugar durante 30 min a 4°C
- Descartar el sobrenadante y el pellet formado se resuspenderá en la solución con la que se desee trabajar (crioprotectante, fijador, diluyente, medio de cultivo etc.)

## Anexo 5. Tasas de congelación

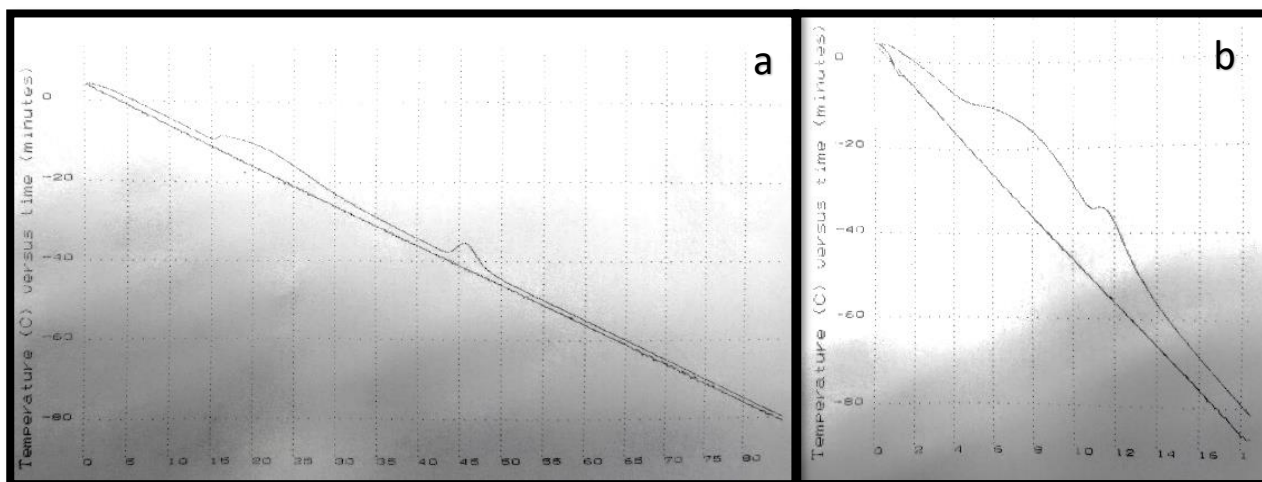
### Tasas de congelación controladas:

- El gabinete de congelación programable deberá estar listo para iniciar el protocolo a 10°C
- Llenar los crioviales o las pajillas y dejar incubar con el crioprotectante durante 10 min
- Durante la incubación se deben acomodar las muestras en las cañas de criopreservación
- Sujetar los crioviales con una tira de parafilm
- Introducir a la cámara del gabinete hasta que pasen los 10 min de incubación
- Iniciar el protocolo (-1°C o -5°C) y detener a la temperatura de -80°C
- Retirar las cañas del gabinete e introducir cuidadosamente en los tanques de criopreservación

### Tasa de congelación no controlada:

- Rellenar 3 cm de nitrógeno líquido en una hielera de poliestireno de 27.5 cm x 20.5 cm y 20 cm de altura
- Colocar una red a los 15 cm de distancia sobre la superficie del nitrógeno
- Monitorear la temperatura con un termopar
- Colocar las muestras en la red
- Cada que la temperatura se estabilice, bajar 1 cm hasta alcanzar -80°C (1 h aproximadamente)
- Colocar las muestras en las cañas e introducir cuidadosamente en nitrógeno líquido

Notas: Rotular cada pajilla, criovial y caña con fecha y contenido. Registrar el número de canastilla y termo donde se resguardó cada muestra.



**Gráfica de congelación.** Temperatura °C (eje Y) contra tiempo min (eje x). (a) Tasa de congelación -1°C. (b) Tasa de congelación -5°C.