

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Criopreservación de tejido gonadal del robalo blanco
Centropomus viridis: efecto de crioprotectores penetrantes y
no penetrantes en la viabilidad de las células germinales**

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

Presenta:

Galilea de Jesús Fonseca González

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Galilea de Jesús Fonseca González

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de tesis

Dra. Marisela Aguilar Juárez
Codirectora de tesis

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dr. Marco Antonio De León Nava



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Galilea de Jesús Fonseca González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Criopreservación de tejido gonadal del robalo blanco *Centropomus viridis*: efecto de crioprotectores penetrantes y no penetrantes en la viabilidad de las células germinales

Resumen aprobado por:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de tesis

Dra. Marisela Aguilar Juárez
Codirectora de tesis

El robalo blanco *Centropomus viridis* es una de las pesquerías artesanales más importantes en el noroeste de México, por lo que se busca optimizar su cultivo en cautiverio para satisfacer la demanda comercial. La criopreservación permite conservar el germoplasma por tiempo ilimitado, y en conjunto con técnicas de trasplante, podría contribuir a apoyar los programas de reproducción asistida en peces. Dadas las complicaciones para criopreservar huevos y larvas de peces y que la conservación de material genético del esperma es incompleta, por ser células haploides, se ha propuesto la criopreservación de las células germinales (CG). Sin embargo, los protocolos de criopreservación de CG para peces marinos son escasos. Por tanto, el objetivo de esta tesis fue desarrollar un protocolo de criopreservación de tejido gonadal de robalo. La criopreservación se realizó con etilenglicol (EG) o dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones de 1.5 M o 2 M, o la combinación de 1.5 M DMSO, lactosa (0.1 o 0.2 M) y 10% yema de huevo. El tejido gonadal se congeló a -80°C durante 10, 15 o 30 minutos. La disgregación del tejido se realizó con tripsina (0.25%, 0.30%, 0.40% o 0.50%), y las CG se aislaron con un gradiente de densidades del 10% y 40% de Percoll. La viabilidad celular se evaluó con diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio. Las CG se identificaron con el marcador VASA mediante inmunocitoquímica. En el tejido gonadal descongelado de robalo, la mayor viabilidad (72%) se observó cuando se congelaron con 2 M DMSO a -80°C por 15 minutos. La concentración de tripsina 0.25% fue elegida para la disgregación celular. Las CG se aislaron en la banda de Percoll al 10%. En dicha banda se observó el 36% de células con expresión de VASA. Este protocolo logró una viabilidad $>50\%$ en todos los tratamientos, y una alta concentración celular. Por lo tanto, este estudio establece una línea base para realizar futuros protocolos de criopreservación de tejido gonadal de peces marinos. Se propone como futuros estudios el trasplante de CG criopreservadas de robalo en organismos subrogados además de estudios de criopreservación de otras especies de robalo.

Palabras clave: Criopreservación, *Centropomus viridis*, tejido gonadal, células germinales, VASA

Abstract of the thesis presented by **Galilea de Jesús Fonseca González** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Cryopreservation of gonadal tissue of White snook *Centropomus viridis*: Effect of penetrant and non-penetrant cryoprotectants on the viability of germ cells

Abstract approved by:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Thesis Co-director

Dra. Marisela Aguilar Juárez
Thesis Co-director

The white snook *Centropomus viridis* is one of the most important artisanal fisheries in the northwest of Mexico. Therefore, it sought to optimize its culture in captivity to satisfy commercial demand. Cryopreservation allows germplasm to be preserved for an unlimited time, and together with transplant techniques, it could contribute to supporting assisted reproduction programs in fish. Given the complications of freezing fish eggs and larvae and the preservation of genetic material in sperm is incomplete, as they are haploid cells, cryopreservation of germ cells (GCs) has been proposed. However, GCs cryopreservation protocols for marine fish are scarce. Therefore, the objective of this thesis was to develop a cryopreservation protocol for White snook gonadal tissue. Cryopreservation was performed with ethylene glycol (EG) or dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentrations of 1.5 M or 2 M, or the combination of 1.5 M DMSO, lactose (0.1 or 0.2 M), and 10% egg yolk. Gonadal tissue was frozen at -80°C for 10, 15, or 30 minutes. Tissue disaggregation was performed with trypsin (0.25%, 0.30%, 0.40% or 0.50%), and GCs were isolated with a density gradient of 10% and 40% Percoll. Cell viability was assessed with fluorescein diacetate and propidium iodide. The GCs were identified with the VASA marker by immunocytochemistry. In thawed White snook gonadal tissue, the highest viability (72%) was observed when frozen with 2 M DMSO at -80°C for 15 minutes. A trypsin concentration of 0.25% was chosen for cell disaggregation. GCs were isolated on the 10% Percoll band, and 36% of cells with VASA expression were observed. This protocol achieved >50% viability in all treatments and high cell concentration. Therefore, this study establishes a baseline for future gonadal tissue cryopreservation protocols in marine fish. The transplantation of cryopreserved GCs of White snook in surrogate organisms and the conservation of other snook species are suggested as future research.

Keywords: Cryopreservation, *Centropomus viridis*, gonadal tissue, germ cells, VASA

Dedicatoria

Al tío Pepe

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California por admitirme y permitirme realizar mis estudios de posgrado. Asimismo, al posgrado de Ciencias en Acuicultura por el apoyo económico otorgado para participar y exponer este trabajo de tesis en el congreso de World Aquaculture Society (WAS) en Mérida.

Al Programa de Promoción y Apoyo de Proyectos de Investigación de la Universidad Autónoma de Sinaloa (PROFAPI-UAS) proyecto PRO A7-056 y a la Facultad de Ciencias del Mar de la UAS por los recursos otorgados para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Dra. Carmen Paniagua, por siempre de estar al pendiente de mi progreso, compartir su conocimiento, asegurarse que no faltara nada para los experimentos y mantener un agradable ambiente laboral en laboratorio. Gracias por la motivación y experiencia para participar en el congreso de la WAS.

A la Dra. Marisela Aguilar, mi referencia de mujer en la ciencia. Gracias por estar pendiente durante el desarrollo de este proyecto, el apoyo en los experimentos cruciales, el aprendizaje continuo, motivarme a dar lo mejor de mí y siempre comunicarse con respeto.

A mis sinodales, Dr. Miguel Del Rio y Dr. Marco De León, por aceptar ser parte de mi comité de tesis, compartir su conocimiento y sus aportaciones para enriquecer este trabajo.

A mis padres, gracias por siempre demostrarme su amor y apoyo en todo lo que hago, haciendo más ligera esta etapa de mi vida. A mis hermanos, mis personas favoritas, gracias por su cariño y siempre estar para mí.

A Adolfo por siempre estar presente dándome tu compañía, apoyo y amor. Gracias por siempre animarme diciéndome que lo lograría, aunque realmente no tuviéramos prueba de que eso se cumpliría.

A Celina, por alentarme, guiarme y darme las herramientas para continuar en este camino.

A Jessica y Yadrissia por estos años de amistad que, a pesar de la distancia, me ayudaban a continuar con este proyecto. Las quiero mucho.

A Edgar, gracias por el apoyo a lo largo de toda la maestría, la compañía y la ayuda durante los largos experimentos en laboratorio que nos tomaban día y noche.

A mis compañeros de laboratorio Andrés, Erika y Salvador, por su ayuda dentro y fuera de laboratorio, su apoyo y compañía hicieron más amena las jornadas de trabajo. Las risas no faltaron.

A Diego Delgado de la Unidad de Microscopía Avanzada de CICESE por su tiempo para ayudarme a obtener las fotografías en el microscopio confocal y apoyarme con las dudas que me surgieron en su momento. Gracias a la Dra. Mónica Hernández por la donación de peces para avanzar en mis experimentos. Asimismo, agradezco al personal de biblioteca por su amable disposición para apoyarme a terminar esta tesis. Finalmente, gracias a la granja Maricultura del Pacífico por permitirme realizar los muestreos para llevar a cabo todos mis experimentos, y por siempre ofrecer un trato de respeto.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Generalidades de la especie robalo blanco <i>Centropomus viridis</i>	3
1.1.1.1 Taxonomía y distribución	3
1.1.1.2 Sistema de reproducción.....	4
1.1.1.3 Importancia económica.....	5
1.1.2 Criopreservación de tejido gonadal de peces	6
1.1.3 Agentes crioprotectores.....	8
1.1.4 Gradiente de densidades de Percoll	9
1.1.5 Identificación molecular de células germinales	10
1.2 Justificación	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos	12
1.4.1 Objetivo general	12
1.4.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. Metodología	13
2.1 Obtención de organismos	13
2.2 Preparación de solución extensora	13
2.3 Extracción de las gónadas	14
2.4 Disgregación de la gónada inmadura de <i>C. viridis</i>	14
2.5 Enriquecimiento de CG de <i>C. viridis</i> por método de Percoll	15
2.6 Evaluación de viabilidad celular	16
2.7 Identificación molecular de CG	16

2.7.1	Preparación de los portaobjetos para anticuerpos.....	17
2.7.2	Inmunocitoquímica de suspensión celular gonadal.....	17
2.8	Criopreservación del tejido gonadal con ACP: EG o DMSO	18
2.9	Criopreservación del tejido gonadal con DMSO y los ACP no penetrantes de lactosa y yema de huevo.....	19
2.10	Análisis estadístico	19
Capítulo 3. Resultados		21
3.1	Osmolaridad y pH del plasma sanguíneo de <i>Centropomus viridis</i>	21
3.2	Disgregación enzimática de la gónada inmadura de <i>Centropomus viridis</i>	21
3.3	Criopreservación de tejido gonadal	22
3.3.1	Efecto del EG y DMSO en la viabilidad de las células del tejido gonadal	22
3.3.2	Efecto del DMSO adicionado con yema de huevo y lactosa en la viabilidad celular del tejido gonadal	23
3.4	Enriquecimiento de CG de <i>C. viridis</i> por método de Percoll	25
3.5	Identificación molecular de CG	25
Capítulo 4. Discusión		27
Capítulo 5. Conclusiones		34
Literatura citada		35
Anexos		44

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Robalo blanco <i>Centropomus viridis</i> (Recuperado de: https://bioqodb.stri.si.edu/sftep/es/thefishes/species/1091).....	3
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Centropomus viridis</i> (Lyons et al., 2019).....	4
Figura 3. Ciclo de vida de robalo blanco <i>Centropomus viridis</i> (CONAPESCA, s.f.).....	5
Figura 4. Formación de bandas por el gradiente de densidades de Percoll para separación de células de tejido gonadal de medaka <i>Oryzias latipes</i> (Recuperado de Ryu et al., 2020).	9
Figura 5. Inmunocitoquímica de la suspensión de CG de la gónada descongelada de <i>Centropomus viridis</i> . Suspensión celular teñida con el anticuerpo primario anti-VASA, conjugada con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 y el fluorocromo DAPI. Las CG (flechas blancas) fluorescen en color azul en el núcleo y color verde en el citoplasma. Las células somáticas (flechas rojas) fluorescen en azul en el núcleo. 600X.	18
Figura 6. Viabilidad celular de gónada fresca después de haber sido disgregada enzimáticamente con 0.25, 0.30, 0.40 o 0.50 % de tripsina (n=3).	21
Figura 7. Viabilidad celular (promedio \pm desviación estándar) de la gónada criopreservada con ACP permeables (EG o DMSO) a diferentes concentraciones (1.5 M o 2 M) (n=6).	22
Figura 8. Concentración celular (promedio \pm desviación estándar) de gónada criopreservada con ACP permeables (EG o DMSO) a diferentes concentraciones (1.5 M o 2 M) (n=6).	23
Figura 9. Concentración celular (promedio \pm desviación estándar) de gónada criopreservada con DMSO 1.5 M, yema de huevo al 10% y lactosa (0.1 M o 0.2 M) (n=3).	24
Figura 10. Viabilidad celular (promedio \pm desviación estándar) de gónada criopreservada con 1.5 M DMSO, 10 % yema de huevo y lactosa (0.1 M o 0.2 M) (n=3).	24
Figura 11. Separación celular del tejido gonadal con el método de gradiente de Percoll.	25
Figura 12. Suspensión de CG de la gónada descongelada de <i>Centropomus viridis</i> . Núcleos de las células teñidas con DAPI (a). Citoplasma de las CG teñido con anti-DDX4 conjugado con Alexa Fluor 488 (b). Fusión de células con los fluorocromos DAPI y Alexa Fluor 488 (c). Micrografías en microscopio confocal Olympus fv 1000. 400x.	26

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Estudios de criopreservación de tejido gonadal en especies acuáticas.	7
Tabla 2. Preparación del medio de disgregación a diferentes concentraciones de tripsina (0.25 %, 0.30 %, 0.40 % y 0.50 %) y DNAsa 0.05 % en SSBH	14
Tabla 3. Muestras descongeladas y analizadas con inmunocitoquímica. Los valores VASA corresponden al promedio \pm desviación estándar de las CG encontradas.....	26
Tabla 4. Resumen del análisis de varianza de una vía para la comparación entre los tratamientos (0.2 M lactosa + 1.5 M DMSO + 10 % yema de huevo, o DMSO 2 M) con respecto al número de células germinales. GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; F: distribución F; P: probabilidad. Significancia estadística de $P < 0.05$	49
Tabla 5. Recopilación de datos de organismos seleccionados para la criopreservación de tejido gonadal.	51

Capítulo 1. Introducción

El robalo blanco *Centropomus viridis* (Lockington, 1877) es un pez de la familia Centropomidae cuya distribución comprende las zonas tropicales de América, desde el golfo de California hasta Perú (Lyons *et al.*, 2019). A la fecha, el robalo blanco constituye una de las pesquerías artesanales de mayor importancia en el noroeste del país (Perera-García *et al.*, 2008; Abdo-de la Parra *et al.*, 2020). Sin embargo, la abundancia relativamente baja de estos peces en áreas costeras y bahías, la falta de optimización en las condiciones de cultivo y la falta de literatura sobre su biología y ecología, permitieron a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) considerar al robalo blanco como una especie en peligro, en un estatus de preocupación menor (Vanacor-Barroso *et al.*, 2002; Vergara-Chen, 2014; Labastida *et al.*, 2013; Lyons *et al.*, 2019). Además, el cultivo de estos peces no ha sido completamente desarrollado. En 2018, se logró por primera vez con éxito el desarrollo del cultivo en cautiverio a nivel piloto por el personal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) (INAPESCA, 2020) en Mazatlán, Sinaloa. De esta manera, la primera producción de alevines de robalo blanco, se trasladó a la granja de Maricultura del Pacífico, empresa que se ubica en el municipio de Mazatlán, la cual tiene el objetivo de continuar con el desarrollo de estos alevines e iniciar el cultivo y comercialización de robalo blanco; lo que resulta en la apertura de un importante mercado para estos peces. Por tal motivo, la investigación sobre la biotecnología reproductiva que permita optimizar la reproducción de *C. viridis* ayudaría significativamente a mejorar la intensidad y capacidad de los cultivos de estos peces para la actual demanda que existe en el mercado. Proceso que además contribuiría a generar nuevas fuentes de empleo y con esto incrementar los ingresos de la localidad (Díaz & Neira, 2005; Ibarra-Castro *et al.*, 2017).

Una estrategia que ha tomado importancia en los últimos años para facilitar la reproducción de peces en cultivo es la criopreservación de los gametos de estos organismos (Morrell & Mayer, 2017; Cabrita *et al.*, 2010). La técnica consiste en enfriar y almacenar los gametos a ultrabajas temperaturas (-196 °C) y extender la viabilidad celular por tiempo indefinido, sin alterar sus funciones fisiológicas (Diwan *et al.*, 2010; Ventura-Juncá, 2013). No obstante, los protocolos de criopreservación son considerados especie-específicos (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Fickel *et al.*, 2007), por lo que es necesario el desarrollo de protocolos acordes a los requerimientos fisiológicos de la especie que se desea criopreservar. Por tanto, es necesario la elaboración de estrategias que permitan incrementar los resultados de viabilidad del tejido o célula a conservar en condiciones criogénicas (Wolkers y Oldenhof, 2007).

Así mismo, la técnica de criopreservación podría contribuir a la optimización de la reproducción del robalo blanco en condiciones de cautiverio. El objetivo de la técnica es preservar el germoplasma de las especies que presenten potencial para el cultivo y utilizar este material genético en el momento requerido para procesos de reproducción asistida o diferentes estudios como trasplantes alogénicos o xenogénicos. Esta estrategia podría contribuir a mantener o mejorar las condiciones de supervivencia de una especie, durante su mantenimiento en condiciones controladas. Además, la criopreservación de células germinales (CG) (Kobayashi *et al.*, 2003; Psenicka *et al.*, 2015), tejidos (Golpour *et al.*, 2016), embriones (Franěk *et al.*, 2019a) y espermatozoides (Andriani *et al.*, 2018), podrían ayudar en los programas de producción acuícola, repoblamiento, conservación de especies en peligro de extinción y mejoramiento genético de las especies (Martínez-Paramo *et al.*, 2017; Paniagua-Chávez *et al.*, 2011). Hasta la fecha se sabe que existen más de 200 protocolos de criopreservación de esperma para diferentes especies de peces (Tiersch *et al.*, 2007). Sin duda, la androgénesis permite producir un organismo por medio de células sexuales masculinas, sin embargo, esta técnica al proporcionar solo herencia paterna impide conservar el total de características genéticas deseables (Komen y Thorgard, 2007). Asimismo, la técnica se ha visto limitada durante la preservación de huevos y embriones (Rawson, 2005). En el caso de los huevos de peces marinos, por ejemplo, el tamaño (0.24 mm a 6.5 mm de diámetro) y la impermeabilidad de su membrana, son factores que han limitado la penetración de los agentes crioprotectores (ACP), por lo que el congelamiento no se logra de manera uniforme y ocasiona la formación de cristales de hielo, los cuales suelen provocar daño celular y tisular (Edashige *et al.*, 2006; Diwan *et al.*, 2010; Barneche *et al.*, 2018).

En la actualidad, la criopreservación de las CG, podría ser una mejor alternativa para la preservación de la diversidad genética de especies con importancia comercial y ecológica (Pšenička *et al.*, 2015; Franěk *et al.*, 2019b). Lo anterior se debe a que las CG tienen aún la capacidad de poder diferenciarse en células sexuales masculinas o femeninas, por lo que pueden ser trasplantadas a un organismo receptor, migrar a la gónada, proliferar y diferenciarse en esperma u ovocito, según las necesidades. Este procedimiento podría ser relevante en la optimización de los programas de reproducción (Cinalli *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2013; Robles *et al.*, 2016).

En este contexto, este trabajo pretende desarrollar un protocolo para la criopreservación de tejido gonadal del robalo blanco *Centropomus viridis*, lo que podría contribuir a optimizar el cultivo de estos peces en sistemas controlados para establecer un programa de su reproducción en cautiverio. Además, este proyecto serviría de base para la preservación de esta y otras especies de la familia Centropomidae, y daría la pauta para futuros estudios genéticos para el mejoramiento de esta especie.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades de la especie robalo blanco *Centropomus viridis*

1.1.1.1 Taxonomía y distribución

El robalo blanco *Centropomus viridis* (Lockington 1877) es un pez de la familia Centropomidae. Dentro de la familia existen dos subfamilias, Latinae y Centropominae. En esta última se encuentra el género *Centropomus*, el cual tiene un total de 12 especies (Carvalho-Filho *et al.*, 2019) de características muy similares (Figura 1).



Figura 1. Robalo Blanco *Centropomus Viridis* (Recuperado de: <https://biogeodb.stri.si.edu/sfstep/es/thefishes/species/1091>).

El cuerpo de estos peces es alargado de una coloración plateada y una característica línea lateral de color negro que recorre longitudinalmente el cuerpo. Tienen 2 aletas dorsales, una caudal y una aleta anal de color oscuro (Maldonado, 2004). Actualmente, la literatura para la identificación morfológica de *C. viridis* es escasa. Sin embargo, es posible identificar a esta especie por la forma triangular de su primera aleta dorsal y el número de radios (8 o 9) en la segunda aleta dorsal (Martínez-Brown *et al.*, 2021).

El tamaño comercial de estos peces es de 60 cm, aunque pueden llegar hasta 120 cm y alcanzar un peso de 23.8 kg (Taylor *et al.*, 2000). La distribución (Figura 2) de estos organismos va desde las costas de Baja California Sur hasta el sur de Paita en Perú (Lyons *et al.*, 2019).



Figura 2. Distribución geográfica de *Centropomus viridis* (Lyons et al., 2019).

1.1.1.2 Sistema de reproducción

En general, los robalos son organismos que se caracterizan por un ciclo de vida catádromo (Figura 3), es decir, permanecen gran parte de su vida en bahías, esteros y partes bajas de los cauces de aguas dulces. Para su reproducción se desplazan a aguas marinas y una vez formadas las larvas, estas migran a estuarios y ríos, donde se desarrollan hasta alcanzar la madurez sexual (INAPESCA, 2014; Gassman *et al.*, 2016). El robalo blanco *C. viridis* alcanza la madurez sexual hasta llegar a los 70 cm en machos y 72 cm en hembras (Ortega-Lizárraga *et al.*, 2014). En el ciclo de vida protándrico de estos peces todos los organismos crecen como machos y después de aproximadamente 3 años, los peces comienzan a madurar y algunos se diferenciarán como hembras (Taylor *et al.*, 2000).

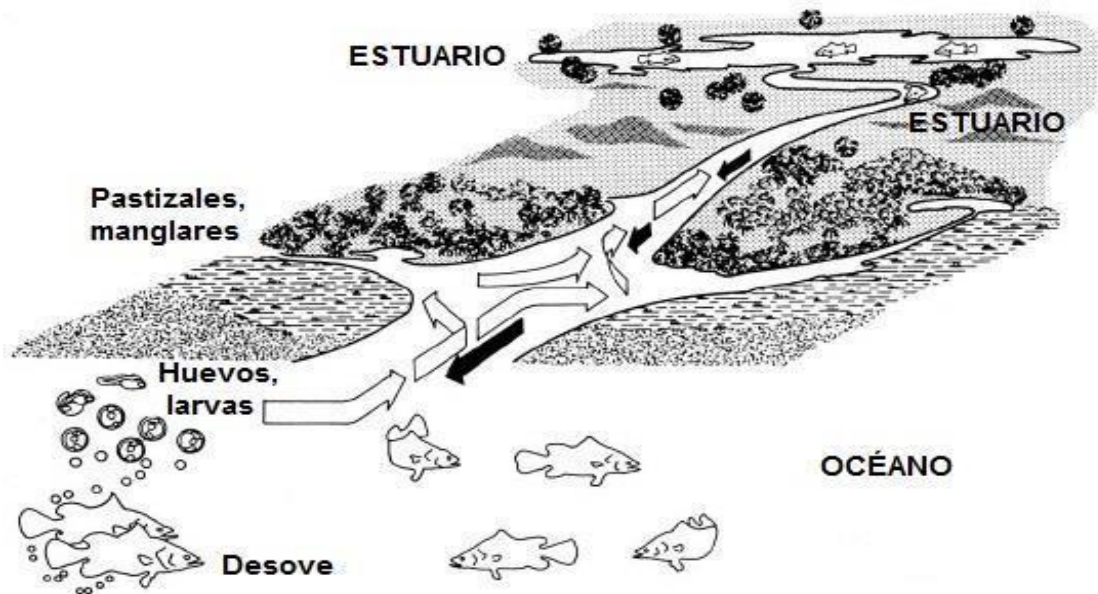


Figura 3. Ciclo de vida de robalo blanco *Centropomus viridis* (CONAPESCA, s.f.).

1.1.1.3 Importancia económica

En México, el robalo constituye una de las principales pesquerías artesanales (Perera *et al.*, 2008; Abdo-de la Parra *et al.*, 2020). La producción de estos peces durante 2017 osciló entre las 16 mil toneladas con un valor de producción de 755 millones de pesos (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019), por lo que esta especie es considerada un importante recurso pesquero para el país. La demanda de estos organismos se debe al buen sabor de su filete, y a los precios en el mercado, los cuales oscilan en los \$224 pesos mexicanos por kilo, hasta \$574 si se trata de filete (Secretaría de Pesca, 1994; Labastida-Che *et al.*, 2013; INAPESCA, 2014; PROFECO, 2019; Martínez *et al.*, 2021). No obstante, la pesquería del robalo es estacional, por lo que existe una gran inconsistencia de este producto en el mercado a lo largo del año (Secretaría de Pesca, 1994; Joris *et al.*, 2018). Debido a su creciente demanda y en respuesta a la presión pesquera, la talla mínima de pesca para hembras de *C. viridis* ha sido reajustada, pasando de 88 cm a 67 cm en 5 años (Tapia-Varela *et al.*, 2020). Este cambio ha generado un desequilibrio en la población de hembras con respecto a la de machos. Por tanto, la pesca no controlada y el ajuste en talla mínima de pesca ha provocado que los individuos de esta especie no alcancen a madurar sexualmente. Es por ello que, debido al interés en el desarrollo de cultivo de robalo en condiciones controladas, actualmente en México, se han implementado programas de regulación para la explotación sostenible de la pesquería de robalo en el Pacífico mexicano (Ibarra-Castro *et al.*, 2017; Tapia-Varela *et al.*, 2020).

1.1.2 Criopreservación de tejido gonadal de peces

La criopreservación de esperma de peces ha sido exitosa para un gran número de especies de peces (Tiersch *et al.*, 2007). Sin embargo, la criopreservación de ovocitos, embriones y larvas ha sido uno de los retos más importantes para el desarrollo de esta técnica (Odintsova *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2012). Entre las limitaciones observadas se encuentra el tamaño de la célula, la gran cantidad de vitelo, la toxicidad de los ACP y la sensibilidad de los ovocitos, larvas y embriones al choque térmico al que se someten en la criopreservación (Okutsu *et al.*, 2006; Edashige *et al.*, 2006; Asturiano *et al.*, 2017; Martínez-Paramo *et al.*, 2017). Además, es importante considerar que las características fisiológicas de los organismos varían entre especies y, por lo tanto, la criopreservación al depender de dichas características se convierte en una técnica especie-específica (Park y Chapman, 2005). Por lo que cabe la posibilidad de que un protocolo establecido para una especie no podría funcionar para otra. Incluso se ha sugerido que la técnica debe ser realizada de manera específica según el tipo de célula o tejido (Fickel *et al.*, 2007).

De esta manera, se ha optado por otras opciones como la criopreservación de las CG, las cuales tienen ventajas como: (1) transmitir información genética a las próximas generaciones, (2) su tamaño pequeño les permite ser criopreservadas y (3) son precursoras de gametos tanto masculinos como femeninos (Kawakami *et al.*, 2012; Yoshizaki y Lee, 2018; Routray, 2020). A la fecha, la criopreservación de las CG ha sido realizada en diversas especies (Tabla 1) como en la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Kobayashi *et al.*, 2007) donde etilenglicol (EG) fue el ACP con mayor resultado de células viables (~51 %). Asimismo, la criopreservación de espermatogonias en el pez cebra *Danio rerio* (Marinovic *et al.*, 2019) y el bagre *Ictalurus furcatus* (Abualreesh *et al.*, 2020) resultó con una viabilidad de aproximadamente 40 %, utilizando una combinación de dimetilsulfóxido (DMSO), trehalosa y ASB, y una mezcla de DMSO, lactosa y extracto de yema de huevo respectivamente. Sin embargo, en el caso de la criopreservación de oogonias del tejido gonadal, las investigaciones son escasas y solo algunos trabajos con especies como *Anguilla anguilla* presentaron resultados favorables, utilizando una combinación de DMSO, glucosa y ASB (Šćekić *et al.*, 2020). Estos resultados, reflejan la variabilidad que puede existir con el uso de diferentes ACP utilizados en las diferentes especies.

Actualmente, el material genético, tal como el tejido gonadal de especies acuáticas como el pez cebra *Danio rerio* y la tilapia, *Oreochromis niloticus*, entre otras, es mantenido en los criobancos, los cuales tienen el objetivo de preservar el germoplasma de organismos en peligro de extinción o de interés comercial (Luvoni y Colombo, 2020). A la fecha, se ha criopreservado el tejido gonadal de distintos peces con el objetivo de apoyar a los programas de investigación genética, y de optimizar los procesos de reproducción

en condiciones de cautiverio o conservación de especies en peligro de extinción (Labbé *et al.*, 2013; Martínez-Paramo *et al.*, 2017).

Tabla 1. Estudios de criopreservación de tejido gonadal en especies acuáticas.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	FAMILIA HÁBITAT	MATERIAL BIOLÓGICO CRIOPRESERVADO	CITA
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia de Nilo	Cichlidae Agua dulce	Espermatogonias	Lacerda <i>et al.</i> , 2010
<i>Tinca tinca</i>	Tenca	Cyprinidae Agua dulce	Espermatogonias y espermatocitos	Linhartová <i>et al.</i> , 2014
<i>Gnathopogon caerulescens</i>	Honmoroko	Cyprinidae Agua dulce	Espermatogonias	Higaki <i>et al.</i> , 2017
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	Cyprinidae Agua dulce	Espermatogonias y oogonias	Lujčić <i>et al.</i> , 2018
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	Cyprinidae Agua dulce	Espermatogonias	Franěk <i>et al.</i> , 2019a
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	Cyprinidae Agua dulce	Oogonias	Franěk <i>et al.</i> , 2019b
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Cyprinidae Agua dulce	Oogonias	Higaki <i>et al.</i> , 2013
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Cyprinidae Agua dulce	Espermatogonias	Marinovic <i>et al.</i> , 2018
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Cyprinidae Agua dulce	Oogonias	Marques <i>et al.</i> , 2019
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Cyprinidae Agua dulce	Espermatogonias	Marinovic <i>et al.</i> , 2019
<i>Acipenser baerii</i>	Esturión siberiano	Acipenseridae Anádromo	Espermatogonias y oogonias	Pšenička <i>et al.</i> , 2016
<i>Brachymystax lenok</i>	Lenok	Salmonidae Anádromo	Espermatogonias	Lee y Yoshizaki, 2016
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoíris	Salmonidae Anádromo	Oogonias	Lee <i>et al.</i> , 2016

<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoíris	Salmonidae Anádromo	PGCs, oogonias y espermatogonias	Yoshizaki y Lee, 2018
<i>Anguilla Anguilla</i>	Anguila común	Anguillidae Catádromo	Oogonias	Ščekić <i>et al.</i> , 2020
<i>Ictalurus furcatus</i>	Bagre azul	Ictaluridae Agua dulce	Espermatogonias	Abualreesh <i>et al.</i> , 2020
<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	Pez arcoíris australiano	Melanotaeniidae Agua dulce	Espermatogonias	Rivers <i>et al.</i> , 2020

1.1.3 Agentes crioprotectores

En el desarrollo de la criopreservación intervienen distintos factores, entre ellos los ACP, los cuales son sustancias químicas necesarias para brindar protección a la célula contra los daños al momento de someterse a bajas temperaturas (Tiersch *et al.*, 2007; Yang y Tiersch, 2008). Por ejemplo, durante este proceso, la célula se deshidrata y se comienzan a formar cristales de hielo que provocan daño a la membrana (Whaley *et al.*, 2021). Los ACP ayudan a disminuir el punto eutéctico (temperatura a la cual el líquido y solutos comienzan a solidificarse) de la solución celular. De este modo, las células se deshidratan rápidamente (impidiendo la formación de cristales) y el gradiente osmótico disminuye (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Por tanto, en función de su permeabilidad los ACP se suelen clasificar en: (1) penetrantes (DMSO, glicerol, metanol, etilenglicol) que actúan en el interior de la célula, y (2) no penetrantes (sacarosa, glucosa, yema de huevo, lactosa) que ejercen su función fuera de la célula. Es común la utilización de ACP de manera individual o en combinación de ACP penetrantes y no penetrantes para intentar otorgarle mayor proyección a las células (Whaley *et al.*, 2021). Sin embargo, los ACP pueden llegar a ser tóxicos para las células por lo que es necesario optimizar el tipo y la concentración del (los) ACP de acuerdo con el tipo de célula a criopreservar. Estas evidencias confirman la característica especie-específica de la técnica de criopreservación (Tiersch, 2007).

1.1.4 Gradiente de densidades de Percoll

El enriquecimiento celular consiste en el aislamiento de un tipo de célula que se encuentra en una suspensión heterogénea, de tal manera que se aumenta la representatividad de la línea celular deseada (Huang *et al.*, 2017; Goetz *et al.*, 2018). El tejido gonadal de los peces está compuesto principalmente por células somáticas y germinales (Parenti y Grier, 2004). Por lo que las técnicas de enriquecimiento celular como el gradiente de densidades de Percoll son necesarias para aislar estas células de manera sencilla y económica (Linhartova *et al.*, 2014). El Percoll es un compuesto formado por esferas sólidas de sílice recubiertas de polivinilpirrolidona que permiten la separación de poblaciones de células según su densidad (Pertoft *et al.*, 1978; Hae-Lee *et al.*, 2009), lo que genera la formación de bandas por gradiente de densidades celulares (Figura 4). Sin embargo, la formación de este gradiente de densidad puede verse alterado por factores técnicos como el tiempo y la velocidad de centrifugación, la inclinación del rotor, el tamaño del tubo, y el disolvente utilizado, entre otros (Pertoft *et al.*, 1978; Hernández-Pichardo *et al.*, 2015).

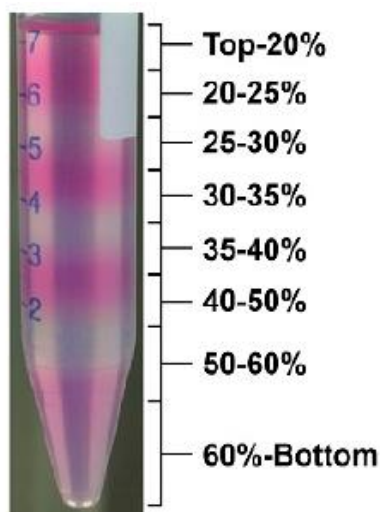


Figura 4. Formación de bandas por el gradiente de densidades de Percoll para separación de células de tejido gonadal de medaka *Oryzias latipes* (Recuperado de Ryu *et al.*, 2020).

A la fecha, el gradiente de densidades por Percoll ha sido utilizado con éxito para la separación de las CG a partir de una mezcla heterogénea de células. Los resultados sugieren que la mayor cantidad de las CG se concentran en las bandas de Percoll del 10 %, 20 % o 30 %. Esta observación, ha sido reportada en peces como el esturión siberiano *Acipenser baerii*, especie en la que se encontró la mayor cantidad de CG en la banda de Percoll al 10 % y 20 %, donde se obtuvo un 81 % y 78 % de CG, respectivamente (Psenicka *et al.*, 2015).

Mientras que en la medaka común, *Oryzias latipes*, en la banda de Percoll al 30-35 % fue donde se observó la mayor concentración de CG (Ryu y Gong, 2020), similar a lo encontrado en el bagre negro, *Rhamdia quelen*, donde se obtuvo aproximadamente un 70 % de CG en la banda de Percoll al 30 % (Lacerda *et al.*, 2018).

1.1.5 Identificación molecular de células germinales

El trasplante de CG se ha catalogado como una herramienta importante en la reproducción asistida. En la acuicultura, el trasplante de CG en conjunto con la criopreservación, son técnicas que se utilizan para preservar material genético de especies de interés económico o en peligro de extinción (Brinster, 2007).

Las CG criopreservadas se trasplantan en la cavidad peritoneal de receptores alogénicos (misma especie) o xenogénicos (especies diferentes pero filogenéticamente cercanas) para posteriormente migrar a la gónada y diferenciarse en gametos masculinos o femeninos (Kobayashi *et al.*, 2003; Cooper, 2012)).

Es necesario conocer el porcentaje de CG que migran y logran colonizar en la gónada del organismo receptor. Por lo que se utilizan marcadores genéticos específicos para realizar la identificación molecular de las células. El germoplasma contiene determinantes que ayudan en el desarrollo de la línea germinal. De los genes que intervienen en la diferenciación de las CG de la línea germinal podemos mencionar el gen Vasa, Nanos-1, Dazl y Bucky ball, entre otros (Franěk y Pšenička, 2020).

En estudios anteriores los marcadores moleculares han sido útiles para la identificación de las CG. Tal es el caso del esturión siberiano *Acipenser baerii* y el esturión ruso *Acipenser gueldenstaedtii*, en dichas especies se utilizó la proteína VASA para confirmar la presencia de CG en el tejido gonadal (Rzepakowska *et al.*, 2013). Asimismo, se han tenido resultados exitosos para identificar espermatogonias aisladas de la corvina, *Argyrosomus regius*, al utilizar los anticuerpos antioc4 y antivasa (Zupa *et al.*, 2020).

1.2 Justificación

El robalo blanco es una especie con potencial económico en México y Estados Unidos, su principal importancia radica en las pesquerías artesanales del noroeste de México. Sin embargo, el cultivo en cautiverio de esta especie necesita ser optimizada para satisfacer la demanda comercial. Además, la

literatura acerca del estatus ecológico de la especie es escasa por lo que el nivel de la población de robalo es incierto.

La criopreservación es una técnica que permite detener procesos biológicos mediante la reducción de la actividad metabólica al someter y preservar las células a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por tanto, esta técnica posibilita la conservación de material genético de un organismo a través de tejido o células. A la fecha existen protocolos para la criopreservación de esperma de aproximadamente más de 200 especies de peces. No obstante, los espermatozoides son células haploides, por lo que se limita la conservación de material genético completo. En el caso de la criopreservación de huevos, larvas y embriones de peces, los protocolos de criopreservación se ven limitados debido al gran tamaño celular, impermeabilidad de la membrana celular y susceptibilidad a daños de la célula al ser congeladas, lo que genera complicaciones para su criopreservación.

Una alternativa para la conservación de germoplasma de peces es la criopreservación de CG, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en gametos masculinos o femeninos y de esta manera conservar el material genético completo. Asimismo, en conjunto con el trasplante de las CG en organismos receptores, estas valiosas técnicas contribuirán a optimizar los programas de reproducción en sistemas de cultivo controlados.

Por consiguiente, este proyecto pretende lograr el desarrollo y estandarización de un protocolo de criopreservación del tejido gonadal del robalo blanco, *Centropomus viridis*, con el fin de obtener CG viables para contribuir a la investigación genética y apoyar a los programas de reproducción asistida de robalo blanco. Al mismo tiempo, se podrán establecer las bases para estandarizar los protocolos de criopreservación de germoplasma de especies filogenéticamente cercanas al robalo blanco.

1.3 Hipótesis

La viabilidad de las CG obtenidas del tejido gonadal descongelado, será mayor al 50 % cuando se criopreserven con una mezcla de ACP penetrantes como el DMSO y ACP no penetrantes como la lactosa y la yema de huevo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar un protocolo de criopreservación para el tejido gonadal del robalo blanco *Centropomus viridis*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Criopreservar el tejido gonadal de robalo blanco *Centropomus viridis*.
- Determinar el crioprotector óptimo para la criopreservación del tejido gonadal del robalo blanco *Centropomus viridis*.
- Evaluar el efecto de diferentes tiempos de congelación (10, 15 y 30 minutos) a -80 °C en la viabilidad celular.
- Determinar la concentración óptima de tripsina (0.25 %, 0.30 %, 0.40 % o 0.50 %) para la disgregación enzimática del tejido gonadal.
- Evaluar la viabilidad celular utilizando la tinción doble de diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (YP).
- Identificar la presencia de CG mediante la técnica inmunocitoquímica utilizando el marcador VASA.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención de organismos

Todos los protocolos realizados fueron aprobados (ORGA_ACUA_2020_3) por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de CICESE. Los peces de 1.5-2.0 kg sexualmente inmaduros fueron seleccionados de manera aleatoria de la granja de Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. ubicada en el Ejido Gregorio Vázquez Moreno en Mazatlán, Sinaloa. Los organismos fueron medidos (ver anexo F) en su longitud total (LT) y longitud caudal (LC) con un ictiómetro. Además, se registró el peso de los organismos con una balanza digital (Rhino Barag-40).

2.2 Preparación de solución extensora

Se seleccionaron 3 organismos aleatoriamente, los cuales previamente se les aplicó la eutanasia con una rápida punción craneo cerebral y corte de agallas. A los organismos seleccionados se les extrajeron 3 mL de sangre mediante una punción directa en el corazón, la cual fue realizada con una jeringa de 3 cc, previamente (1 día) preparada con heparina (solución 1000 UI/mL). Las jeringas con la muestra de sangre obtenida fueron colocadas en una hielera portátil de poliestireno sobre una cama de hielo y transportadas (1.5 h) para su análisis al laboratorio de Conservación de Germoplasma de Especies Acuáticas (CGEA), ubicado en la Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR) de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS).

En el laboratorio, el pH del plasma sanguíneo de cada organismo se determinó mediante tiras de papel indicadoras de pH (MQuant) y la osmolalidad se evaluó con un osmómetro de presión de vapor (Wescor, VAPRO 5600). Brevemente, muestras de 1 mL de sangre fueron colocadas en microtubos de 1.5 mL y centrifugadas a 8000 rpm por 10 min a 16 °C (Hettich, Mikro 200R), y una alícuota de 10 µL del plasma sanguíneo fue utilizada para evaluar la osmolalidad y pH. Este procedimiento fue realizado por triplicado. Los resultados obtenidos fueron utilizados para ajustar el pH y la osmolalidad de la solución salina balanceada de Hanks (SSBH): NaCl 0.137 M; KCl 5.4 mM; Na₂HPO₄ 0.25 mM; KH₂PO₄ 0.44 mM; NaHCO₃ 4.2 mM; C₆H₁₂O₆ (glucosa) 5.5 mM. A la SSBH se le añadió 0.1 % [v/v] de antibiótico y antimicótico (penicilina 10000 U.I. y estreptomina 10 mg/mL, Sigma).

2.3 Extracción de las gónadas

Una vez que los organismos fueron medidos (cm) y pesados (g), se les practicó la eutanasia y se les extrajo la gónada por medio de una incisión longitudinal en el abdomen. Cada gónada extraída se colocó en un tubo de 50 mL con la solución extensora SSBH. Las muestras obtenidas fueron colocadas inmediatamente en una hielera portátil de poliestireno sobre una cama de hielo (~4 °C) y transportadas al laboratorio CGEA en FACIMAR-UAS, donde se midió y pesó cada una de las gónadas recolectadas.

2.4 Disgregación de la gónada inmadura de *C. viridis*

Un día previo a la recolección de las gónadas se preparó la solución SSBH con antibiótico (ajustada a pH y osmolalidad de la sangre de *C. viridis*), así como la solución de tripsina 1X (Sigma) a las diferentes concentraciones: 0.25 %, 0.30 %, 0.40 % y 0.50 % de acuerdo con la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación del medio de disgregación a diferentes concentraciones de tripsina (0.25 %, 0.30 %, 0.40 % y 0.50 %) y DNAsa 0.05 % en SSBH

	Tripsina			
	0.25 %	0.30 %	0.40 %	0.50 %
Tripsina	2.25 µL	2.7 µL	3.6 µL	4.5 µL
DNAsa 0.05 %	0.45 µL	0.45 µL	0.45 µL	0.45 µL
SSBH	897.3 µL	896 µL	895.95 µL	895.05 µL
Volumen total	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL

En laboratorio, las gónadas fueron lavadas con SSBH, pesadas (g) en una balanza digital (Ohaus, Pioneer, PA214) y medidas en su longitud (cm) con ayuda de una regla común. Las gónadas fueron colocadas en un vidrio de reloj puesto sobre una cama de hielo (~4 °C). Cada gónada se cortó de manera transversal en partes equitativas y cada uno de los fragmentos de la gónada fue sumergido en 900 µL en alguno de los medios de disgregación (MD) (Tabla 2).

Las muestras fueron colocadas en una placa de agitación orbital (Thermo Scientific, 4625) con agitación constante (200 rpm) e incubadas durante 2.5 h a temperatura ambiente (~16 °C). Transcurrido el tiempo, a cada muestra se le añadieron 100 µL de SSBH con albúmina de suero bovino (ASB) al 10 % (p/v), con el fin de detener la reacción enzimática, finalmente se procedió a realizar la disociación mecánica de las muestras. Brevemente, el contenido de la gónada en las diferentes concentraciones de tripsina fue colocado en un tamiz de 40 µm situado sobre un tubo de 50 mL y con una varilla de vidrio la muestra fue disociada mecánicamente por aproximadamente 5 minutos mediante movimientos circulares alrededor del tamiz. Finalmente, cada muestra fue enjuagada con 1 mL de SSBH para conseguir que la mayor cantidad de células pasara a través del tamiz. Una porción de gónada por organismo suspendida en SSBH sin adición de enzima fue usada como control. La disgregación de las gónadas del robalo blanco fue realizada por triplicado.

La suspensión de células disgregadas resultante de las diferentes concentraciones de tripsina fue colocada en tubos de 2 mL y centrifugada a 500 *g* durante 15 minutos a 4 °C (Hettich, Mikro 200R). Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 1 mL de SSBH con ASB al 0.75 % (p/v). Finalmente, la viabilidad de la suspensión de células fue evaluada de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 2.6. El protocolo, así optimizado, fue aplicado en las muestras descongeladas.

2.5 Enriquecimiento de CG de *C. viridis* por método de Percoll

El enriquecimiento de las CG fue realizado con un gradiente discontinuo de Percoll. Para realizar el gradiente de densidades, en el fondo de un tubo de 2 mL se agregaron 600 µL de Percoll 40 %, después en la parte superior se añadieron 600 µL de Percoll 10 % y por último se añadieron 100 µL de la suspensión celular recuperada de la disgregación gonadal (inciso 2.4). Las muestras fueron centrifugadas a 500 *g* por 30 min (4 °C), con una aceleración lenta del rotor para no deshacer el gradiente de densidades. Después de la centrifugación, cada banda formada fue recuperada cuidadosamente con una pipeta y suspendida en un tubo de 2 mL con SSBH (dilución 1:10 células recuperadas: SSBH).

Después se realizó una segunda centrifugación de la muestra por 30 min a 4 °C a una velocidad de 500 *g* (aceleración lenta del rotor) y el precipitado fue suspendido en 1 mL de SSBH. Finalmente, se caracterizó el tipo de células presentes en cada banda formada considerando las características de las CG que miden entre ~10-15 µm, y se observó una alícuota (10 µL) de cada banda en un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse N-i).

2.6 Evaluación de viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada revisando la integridad de la membrana de las células teñidas con diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (YP). Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 80i) y aquellas que fluorescieron color verde fueron designadas como células con membrana plasmática intacta (células viables), mientras que las células que presentaron fluorescencia de color rojo, fueron clasificadas como células con membrana plasmática dañada (células no viables).

De la suspensión celular obtenida en la disgregación enzimática, se tomó 1 mL de muestra y se le añadió 1 µL de FDA (2.4 mM), la muestra se dejó incubar durante 5 minutos; se le añadieron 3.08 µL de YP (7.4 µM) y se mantuvo en reposo por otros 5 min. Este proceso de tinción se llevó a cabo en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente (16 °C). Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó por 15 min a 500 g (4 °C) y el exceso de colorante fue eliminado al suspender el precipitado en 1 mL de SSBH y agitarlo por 10 segundos en un vortex (IKA, lab dancer). Una vez que la suspensión fue homogenizada, se tomó una alícuota de 10 µL, se colocó en un hematocitómetro y se visualizó en el microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 80i) mediante un láser para inducir una excitación con longitud de onda entre 510-560 nm, se procedió a realizar el conteo celular (100 células). El porcentaje de células viables fue determinado por duplicado y de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células viables}}{\text{Células viables} + \text{células no viables}} (100) \quad (1)$$

La concentración celular (células/mL) fue determinada contando (por duplicado) el número total de células presentes en los cuatro cuadrantes externos del hematocitómetro y calculada con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células totales}}{4} (10)(10000) \quad (2)$$

2.7 Identificación molecular de CG

De acuerdo con los objetivos de estudio, el método utilizado para la identificación de CG por medio de inmunocitoquímica fue un diseño modificado con base en los protocolos de Pšenička *et al.* (2015) y Escuredo-Vielba *et al.* (2018).

2.7.1 Preparación de los portaobjetos para anticuerpos

Los portaobjetos de dos anillos (Gold Seal) fueron incubados en HCl 1 N durante 3 h, transcurrido el tiempo se lavaron dos veces con etanol al 100 %. Después, los portaobjetos fueron sumergidos en Poli-L-Lisina al 0.1 % durante 40 min. Finalmente, se colocaron en una estufa (70 °C) por 1 h para que se secan, y se colocaron en una caja Petri de vidrio hasta su uso.

2.7.2 Inmunocitoquímica de suspensión celular gonadal

La suspensión celular recuperada del enriquecimiento de CG fue fijada 1:1 con paraformaldehído (PFA) en un amortiguador fosfato salino (PBS) al 4 % (ver anexo A y B) y se dejó reposar una alícuota de 100 µL en cada anillo del portaobjetos durante 3 h. Los portaobjetos se lavaron una vez con PBS 1X y se retiró el exceso de líquido. Después, las cajas Petri fueron colocadas sobre una cama de hielo y se añadieron 100 µL de Tritón 100X (Sigma) al 0.3 % en PBS (PBS-T) para realizar la permeabilización de membranas, y se incubaron durante 20 min. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS y se añadieron 100 µL de solución de bloqueo que contenía 1 % ASB y 0.05 % Tween 20 (Sigma) en PBS, incubándose durante una hora a 4 °C. Después, se realizó un lavado con PBS y se agregaron 100 µL de anticuerpo primario anti VASA (Anti-DDX4/MVH, Abcam, ab13840) diluido 300 veces en solución de bloqueo. Para evitar la deshidratación de las células, cada portaobjetos fue incubado a 4 °C por 18 h en una caja Petri. Posterior a las 18 h, se realizaron 3 lavados de 5 min con solución de bloqueo. Acto seguido, se añadieron 100 µL del anticuerpo secundario (AlexaFluor488, Abcam, ab150077) diluido 800 veces en solución de bloqueo y se incubó en condiciones de oscuridad a 4 °C durante 1 h.

Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se realizó la tinción de núcleos con 50 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) a una concentración 10 µg/mL en PBS-T. Las muestras se dejaron incubar durante 20 min en oscuridad y para eliminar el exceso de la tinción se lavaron cinco veces con PBS. Finalmente, se añadieron 2 gotas de medio montaje (alcohol polivinílico con DABCO, Sigma) y los cubreobjetos se colocaron cuidadosamente en reposo durante aproximadamente 2 h en oscuridad a temperatura ambiente (16 °C).

Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal (Olympus FV1000) en la Unidad de Microscopía Avanzada de CICESE (UMAC), excitando los fluorocromos DAPI (405 nm) y Alexa Fluor (488 nm).

Por último, las micrografías fueron tomadas y procesadas en el software FV10-ASW 4.2 (Figura 5). El conteo de células totales y células con expresión positiva de VASA se realizó por duplicado.

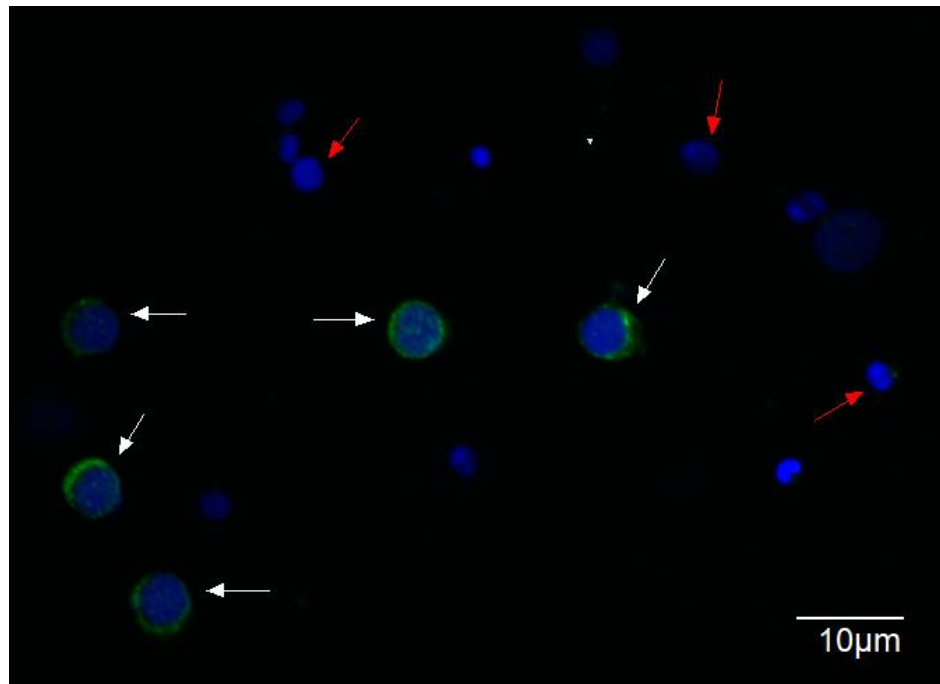


Figura 5. Inmunocitoquímica de la suspensión de CG de la gónada descongelada de *Centropomus viridis*. Suspensión celular teñida con el anticuerpo primario anti-VASA, conjugada con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 y el fluorocromo DAPI. Las CG (flechas blancas) fluorescen en color azul en el núcleo y color verde en el citoplasma. Las células somáticas (flechas rojas) fluorescen en azul en el núcleo. 600X.

2.8 Criopreservación del tejido gonadal con ACP: EG o DMSO

Se seleccionaron 6 organismos y se les extrajo la gónada de acuerdo con lo mencionado en los incisos 2.1 y 2.3. Las gónadas extraídas fueron lavadas y fraccionadas en 9 porciones equitativas de aproximadamente 0.05 g a 0.08 g. Cada porción se colocó en un criovial de 1.5 mL, el cual contenía alguna de las siguientes soluciones crioprotectoras: etilenglicol (EG) 1.5 M o 2 M, o dimetilsulfóxido (DMSO) 1.5 M o 2 M. Las soluciones crioprotectoras fueron preparadas previamente con SSBH, 0.5 % ASB, 0.1 % antibiótico-antimicótico y 50 mM de glucosa. Una muestra de tejido gonadal se congeló sin ACP y fue utilizada como control. El procedimiento fue llevado a cabo en una cama de hielo a ~ 4 °C.

Los crioviales que contenían las porciones de las gónadas fueron colocados en una caja de poliestireno (ver anexo C), la cual contenía una malla de plástico sujeta en los extremos para permitir la movilidad (arriba/abajo), y una termocupla (VWR) para monitorear la temperatura. La caja de poliestireno fue

llenada aproximadamente con 5 cm de nitrógeno líquido (N_2L) y la malla ajustada sobre el N_2L sin tocarlo. La altura de la malla fue adecuada hasta obtener una temperatura de $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Una vez estabilizada la temperatura, las muestras suspendidas en los diferentes tratamientos, se congelaron por 10, 15 o 30 min. Posterior al tiempo de congelación, las muestras fueron rápidamente colocadas en medias de nylon y sumergidas en N_2L ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) hasta su análisis.

2.9 Criopreservación del tejido gonadal con DMSO y los ACP no penetrantes de lactosa y yema de huevo

Se seleccionaron 3 organismos y se les extrajo la gónada de acuerdo con lo mencionado en los incisos 2.1 y 2.3. Cada gónada se fraccionó en 9 porciones equitativas. Cada porción fue colocada en un criovial de 1.5 mL el cual contenía una mezcla de los ACP: DMSO al 1.5 M, 0.1 M o 0.2 M de lactosa y 10 % (v/v) de yema de huevo suspendidos en SSBH que contiene 0.5 % ASB, 0.1 % antibiótico-antimicótico y 50 mM de glucosa. Se utilizó como control una muestra de tejido gonadal sin ACP. El procedimiento fue llevado a cabo en una cama de hielo ($4\text{ }^\circ\text{C}$) y la congelación se realizó bajo las mismas condiciones descritas en el inciso 2.8.

Una vez congeladas las muestras de los incisos 2.8 y 2.9, fueron transportadas al Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA) en el CICESE y mantenidas en N_2L hasta su análisis. Posteriormente las muestras fueron descongeladas (ver anexo D) en un baño de agua a $30\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 min en constante agitación, disgregadas y enriquecidas de acuerdo a la metodología descrita en los incisos 2.4 y 2.5. La suspensión celular fue utilizada para determinar la viabilidad de las CG y su identificación con inmunocitoquímica de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 2.7.

2.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en porcentaje fueron transformados en raíz cuadrada del arcoseno para normalizar la distribución de los datos y estabilizar las varianzas. El efecto de las diferentes concentraciones de tripsina en la disgregación enzimática fue evaluado mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía. Para el experimento 2.8, se realizó un ANOVA de 3 vías para evaluar si existían diferencias significativas entre el efecto de los diferentes ACP (EG y DMSO), las diferentes concentraciones de los ACP (1.5 M o 2 M) y el

tiempo (10, 15 o 30 min) de congelación a -80°C en la viabilidad celular. Para el experimento 2.9, se realizó un ANOVA de 2 vías para determinar si existían diferencias significativas en el efecto de las diferentes concentraciones (0.1 M o 0.2 M) de lactosa y el tiempo (10, 15 o 30 min) de congelación a -80°C en la viabilidad celular. Se realizó un ANOVA de una vía para evaluar si existían diferencias significativas con respecto al número de CG entre los tratamientos analizados con inmunocitoquímica. Los datos fueron procesados en R Studio, utilizando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Cada organismo utilizado fue seleccionado de manera aleatoria, así como también la asignación de los tratamientos. En todos los tratamientos se examinaron los supuestos de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks y homogeneidad de varianzas con una prueba de Levene.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Osmolaridad y pH del plasma sanguíneo de *Centropomus viridis*

La osmolaridad (Media \pm Desviación estándar) del plasma sanguíneo de robalo blanco *C. viridis* fue 374.33 ± 7.76 y el pH fue 7.08 ± 0.14 (n=3). La solución extensora utilizada durante los experimentos fue ajustada a la media obtenida de osmolaridad y pH.

3.2 Disgregación enzimática de la gónada inmadura de *Centropomus viridis*

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.716$) entre los tratamientos (tripsina 0.25 %, 0.30 %, 0.40 % o 0.50 % con 0.05 % de DNAsa) utilizados para disgregar la gónada de *Centropomus viridis*. La mayor viabilidad (98.25 %) celular se detectó con el tratamiento enzimático de tripsina 0.25 % y esta fue la concentración utilizada para disgregar el tejido gonadal descongelado (Figura 6).

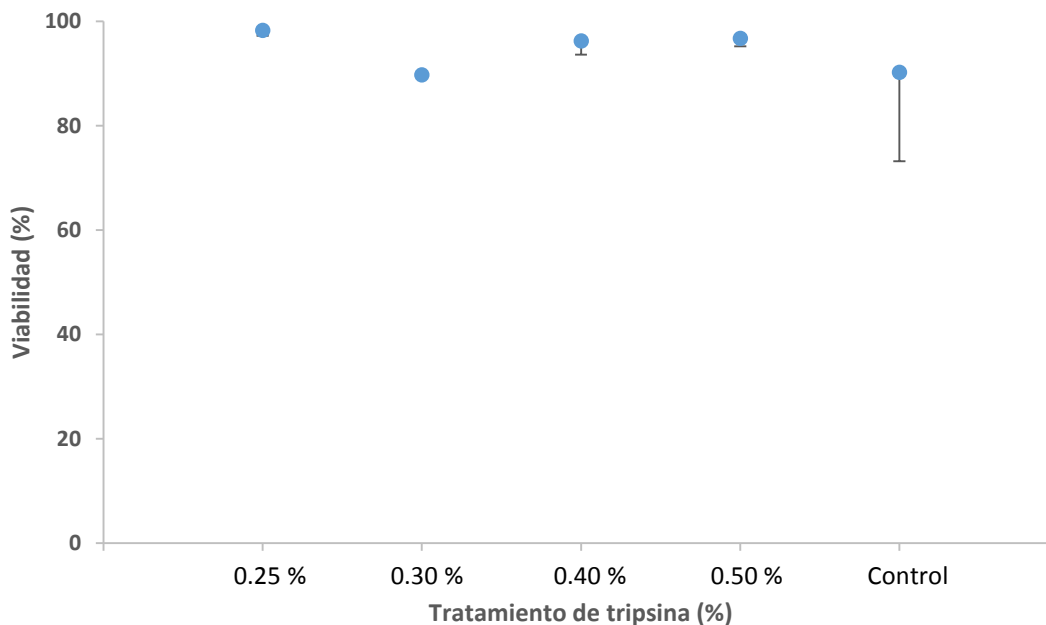


Figura 6. Viabilidad celular de gónada fresca después de haber sido disgregada enzimáticamente con 0.25, 0.30, 0.40 o 0.50 % de tripsina (n=3).

3.3 Criopreservación de tejido gonadal

3.3.1 Efecto del EG y DMSO en la viabilidad de las células del tejido gonadal

No se encontraron diferencias significativas entre los ACP penetrantes (EG y DMSO), la concentración de los mismos o el tiempo de congelamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P = 0.057$) en la viabilidad celular del tejido gonadal. Sin embargo, las muestras mantenidas con EG y DMSO presentaron diferencias significativas ($P = 2e-16$) con el control (muestra congelada sin ACP).

La mayor viabilidad (71.83 %) se registró cuando el tejido gonadal fue criopreservado con DMSO 2 M y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min (Figura 7). Mientras que la mayor concentración celular (3.43×10^6 cel/mL) se encontró cuando el tejido fue conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min y criopreservado en DMSO 1.5 M (Figura 8).

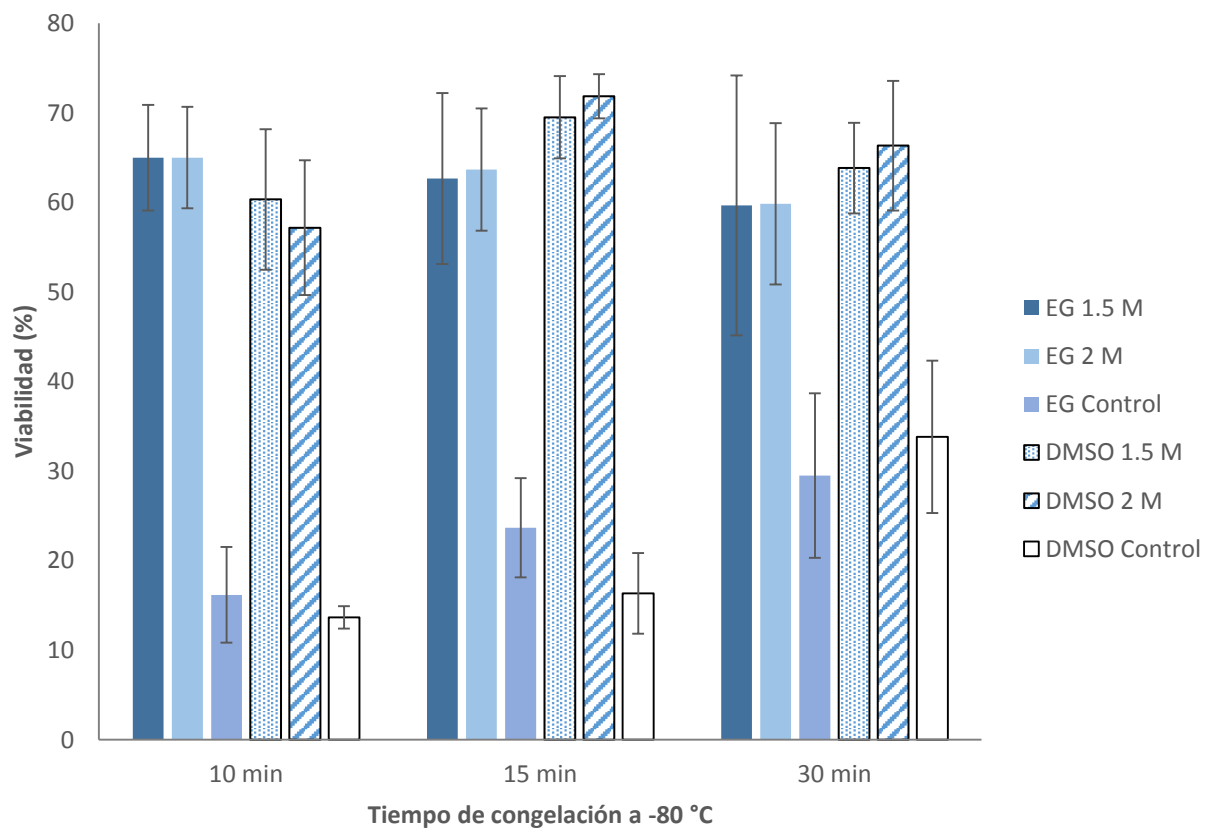


Figura 7. Viabilidad celular (promedio \pm desviación estándar) de la gónada criopreservada con ACP permeables (EG o DMSO) a diferentes concentraciones (1.5 M o 2 M) ($n=6$).

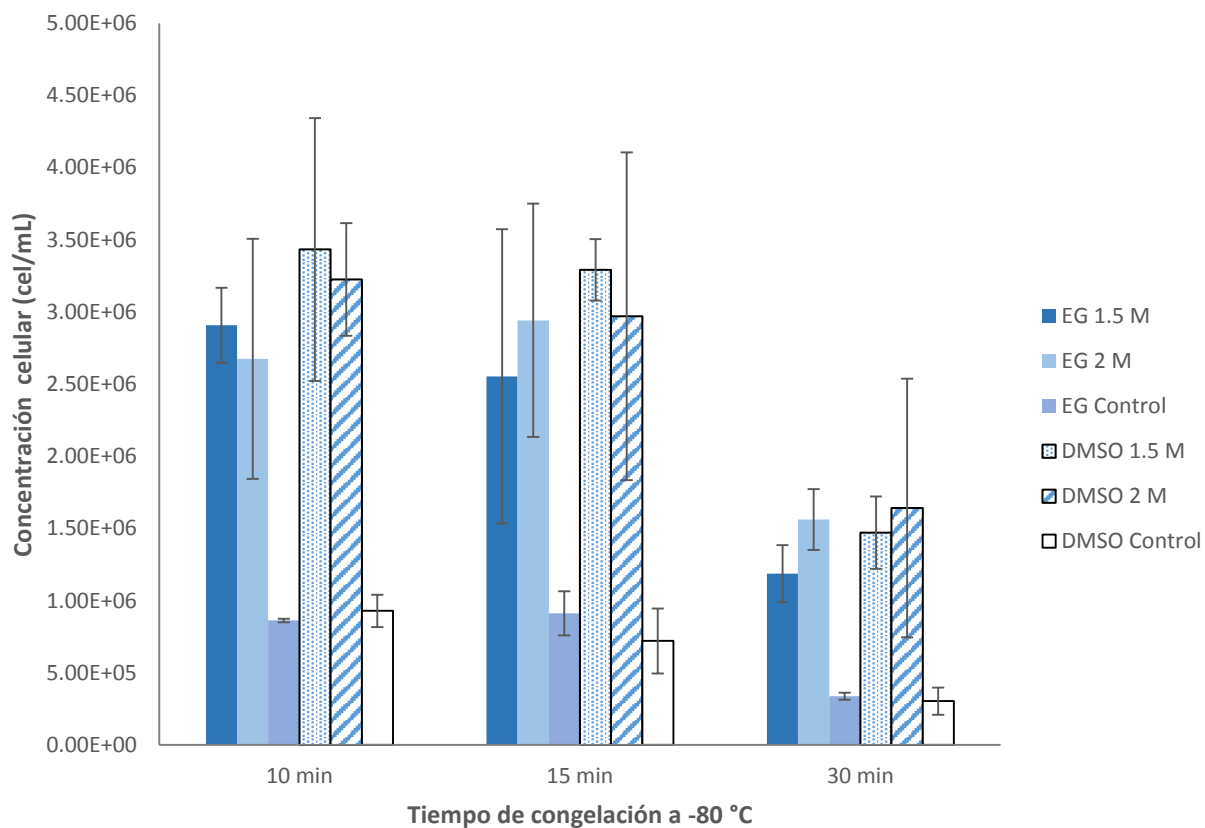


Figura 8. Concentración celular (promedio \pm desviación estándar) de gónada criopreservada con ACP permeables (EG o DMSO) a diferentes concentraciones (1.5 M o 2 M) ($n=6$).

3.3.2 Efecto del DMSO adicionado con yema de huevo y lactosa en la viabilidad celular del tejido gonadal

La adición de yema de huevo y lactosa tuvo un efecto significativo ($P = 8.6e-13$) en la viabilidad celular en comparación con el control. La mayor viabilidad (70.33 %) y concentración celular (4.95×10^6 cel/mL) se obtuvo cuando las muestras fueron criopreservadas con 1.5 M DMSO, 10 % yema de huevo y 0.2 M lactosa y mantenidas a -80 °C por 15 min antes de ser sumergidas en N_2L (Figura 9 y 10).

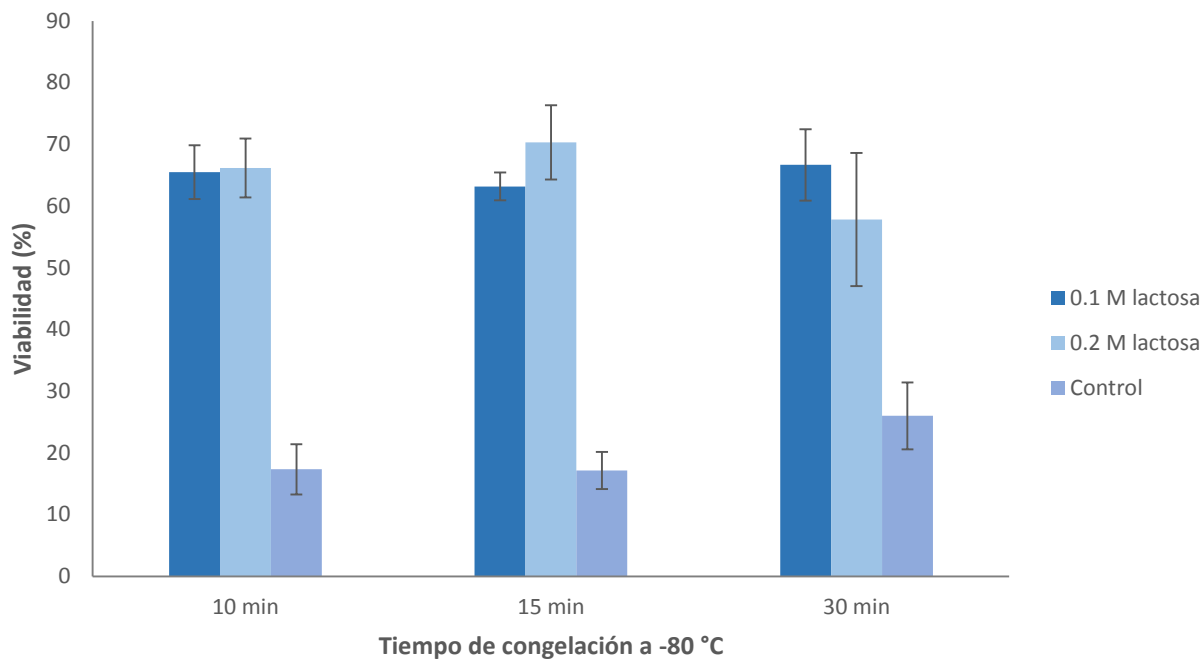


Figura 9. Concentración celular (promedio \pm desviación estándar) de gónada criopreservada con DMSO 1.5 M, yema de huevo al 10% y lactosa (0.1 M o 0.2 M) (n=3).

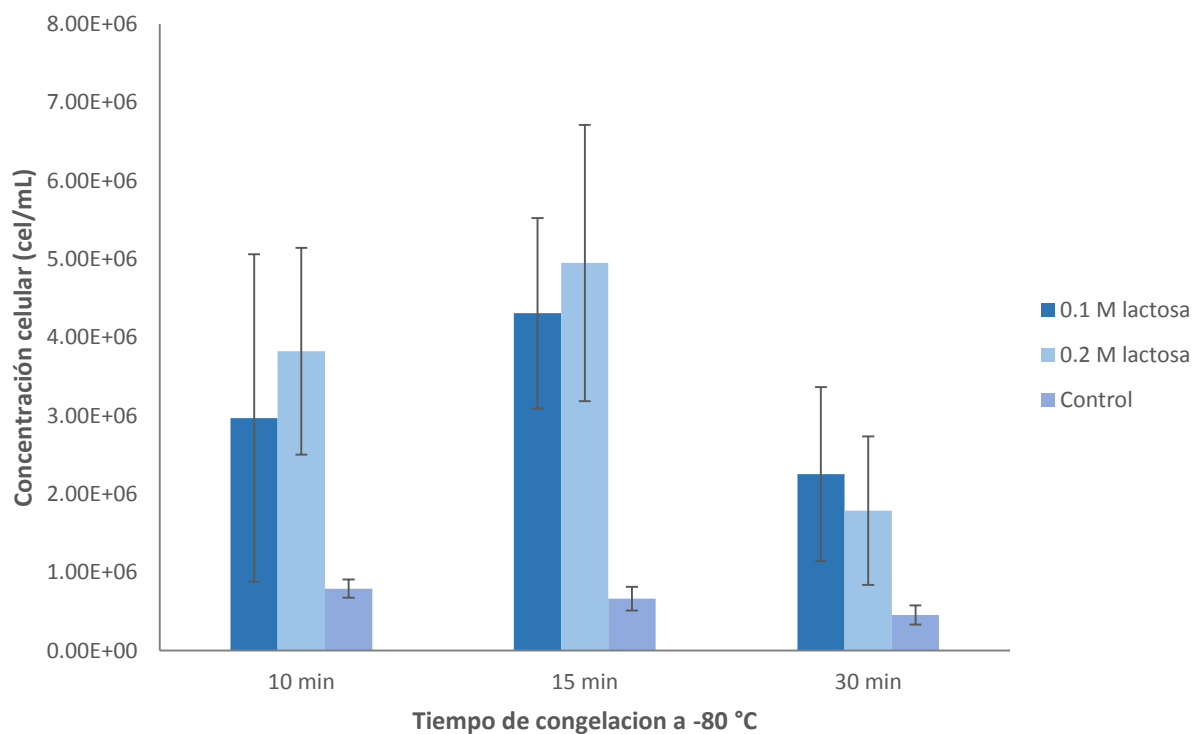


Figura 10. Viabilidad celular (promedio \pm desviación estándar) de gónada criopreservada con 1.5 M DMSO, 10 % yema de huevo y lactosa (0.1 M o 0.2 M) (n=3).

3.4 Enriquecimiento de CG de *C. viridis* por método de Percoll

El método de Percoll diferenció 2 bandas celulares y un precipitado (Figura 11). En las bandas superiores (A y B) se observaron células de morfología y tamaño similar a las CG. Las bandas fueron recuperadas para la identificación molecular de CG.

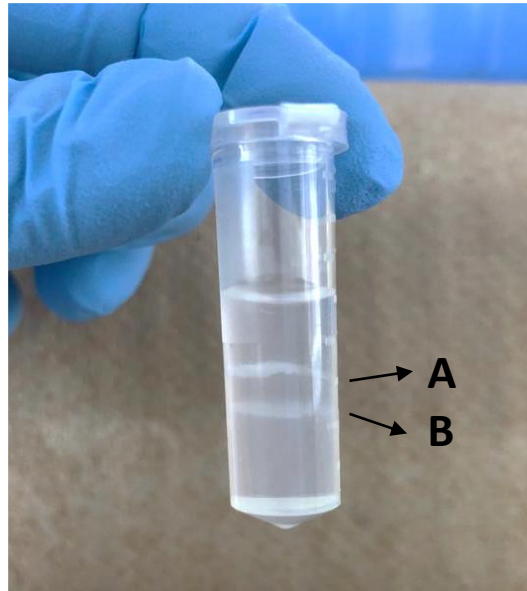


Figura 11. Separación celular del tejido gonadal con el método de gradiente de Percoll.

3.5 Identificación molecular de CG

Se identificaron las CG de 4 muestras de los tratamientos donde se obtuvieron los mejores porcentajes de viabilidad (tratamientos de DMSO al 2 M y DMSO al 1.5 M combinado con 10 % de yema de huevo y lactosa al 0.1 M congelados por 15 min a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

La suspensión celular recuperada de la banda de Percoll al 10 % fue utilizada para confirmar la presencia de CG en el tejido gonadal por la técnica de inmunocitoquímica. Se mostró la presencia de células con fluorescencia verde en el citoplasma por la expresión de la proteína VASA y fluorescencia azul en el núcleo por el fluorocromo DAPI. Las células con dichas características fueron identificadas como CG mediante inmunocitoquímica (Figura 12). El porcentaje de CG encontrado en los 2 tratamientos analizados fue significativamente diferente ($P = 0.0326$; Anexo E). El mayor porcentaje (36.87 %) de células con expresión positiva a VASA fue encontrado en las muestras criopreservadas en lactosa 0.2 M con DMSO 1.5 M y 10 % yema de huevo (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras descongeladas y analizadas con inmunocitoquímica. Los valores VASA corresponden al promedio \pm desviación estándar de las CG encontradas.

ACP	Tiempo a -80 °C	VASA (%)
0.2 M lactosa + 1.5 M DMSO + 10 % yema de huevo	15 min	36.87 \pm 1.84
2 M DMSO		24.63 \pm 4.31

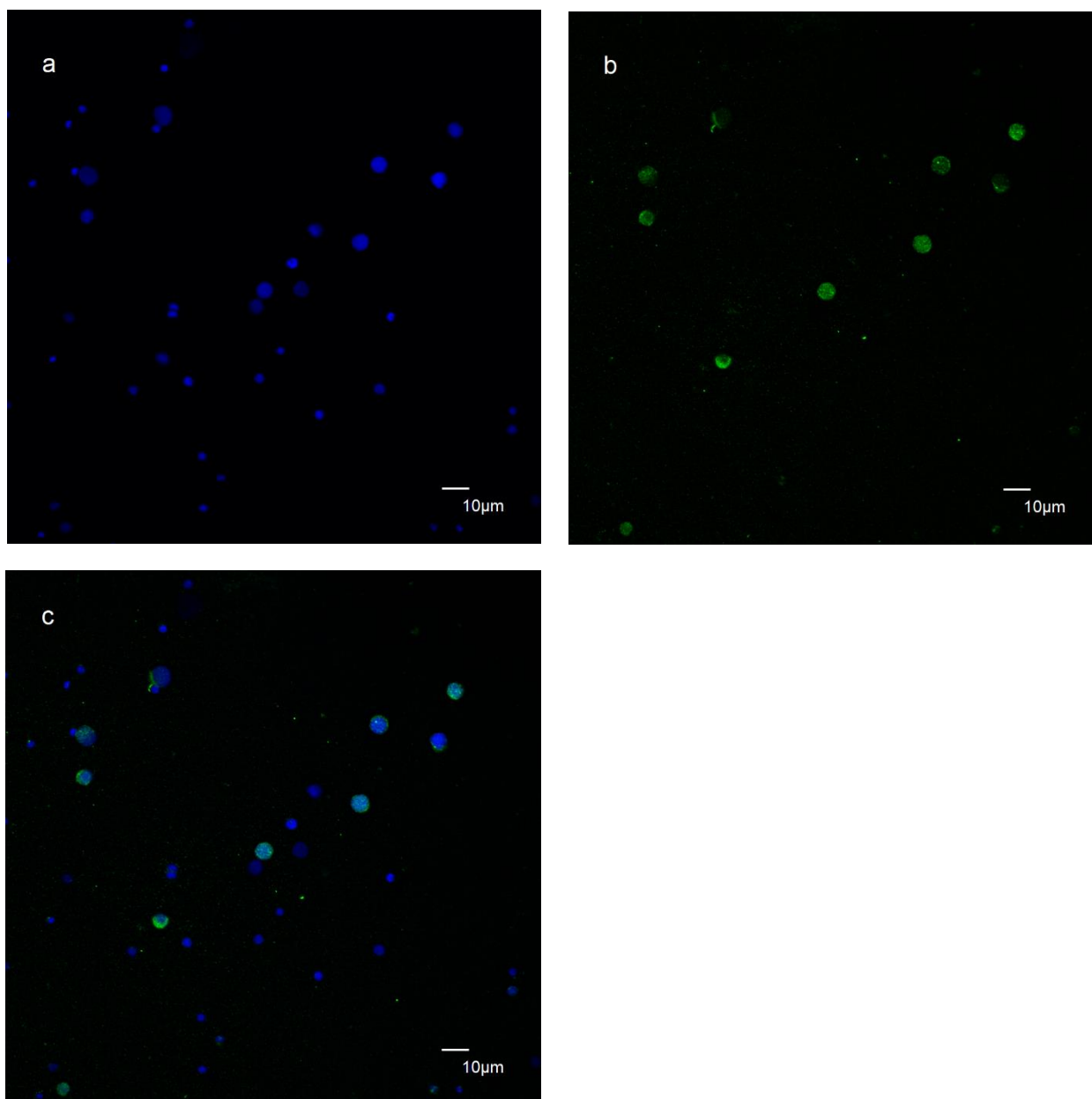


Figura 12. Suspensión de CG de la gónada descongelada de *Centropomus viridis*. Núcleos de las células teñidas con DAPI (a). Citoplasma de las CG teñido con anti-DDX4 conjugado con Alexa Fluor 488 (b). Fusión de células con los fluorocromos DAPI y Alexa Fluor 488 (c). Micrografías en microscopio confocal Olympus fv 1000. 400x.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se diseñó un protocolo para la criopreservación de tejido gonadal del robalo blanco, *Centropomus viridis*, una especie que forma parte de las principales pesquerías artesanales en el noroeste de México y con potencial acuícola en México y Estados Unidos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2019). El protocolo de este estudio incluye desde las técnicas de obtención de la gónada, disgregación enzimática con tripsina, disociación mecánica, enriquecimiento de CG por el método de Percoll, identificación molecular de las CG con inmunocitoquímica, criopreservación del tejido gonadal con tasa de congelación no controlada y evaluación de la viabilidad celular.

La criopreservación es una valiosa herramienta para conservar el germoplasma por tiempo ilimitado. Sin embargo, las limitaciones para criopreservar huevos o embriones de peces, así como la incapacidad del esperma de proliferar al ser células haploides, ha motivado a buscar alternativas. Es por ello que se han desarrollado protocolos para la criopreservación de tejido gonadal inmaduro o suspensión de CG. Esta nueva herramienta ha proporcionado avances en las técnicas de reproducción y en la conservación de recursos genéticos (Lujic *et al.*, 2018). La importancia de esta técnica radica en criopreservar CG de especies en peligro de extinción o con valor económico, y trasplantar las CG en la gónada estéril de organismos de la misma o de diferentes especies filogenéticamente cercanas. Comúnmente las CG de la especie donadora son criopreservadas para ser trasplantadas posteriormente a especies receptoras que ya han sido adaptadas a reproducción artificial. Una vez trasplantadas, las CG se diferenciarán sexualmente de acuerdo al sexo del organismo receptor y se obtendrán los gametos de la especie donadora (Okutsu *et al.*, 2006).

El objetivo principal de la criopreservación es conservar las células viables por tiempo indefinido. No obstante, durante la congelación ocurren cambios en el volumen intracelular y daños de la membrana celular (Herraiz *et al.*, 2016). Los ACP ayudan a disminuir la formación de cristales de hielo y, por lo tanto, aumentar la viabilidad celular. Asimismo, durante el procedimiento de congelación la célula se deshidrata permitiendo que los crioprotectores penetren la membrana celular. Una vez dentro de la célula, los crioprotectores modifican y disminuyen la formación de los cristales de hielo (Tiersch *et al.*, 2007; Herraiz *et al.*, 2016). Sin embargo, aunque se conoce la función de los ACP durante la congelación, el mecanismo de acción no está completamente entendido (Jawahar y Betsy., 2000; Tiersch *et al.*, 2007).

La criopreservación de tejido gonadal de peces se ha enfocado en especies de agua dulce (Tabla 1) como en la tilapia *Oreochromis niloticus*, pez cebra *Danio rerio* y la carpa *Cyprinus carpio* (Lacerda *et al.*, 2010; Higaki *et al.*, 2013; Lujic *et al.*, 2018). Sin embargo, los protocolos de criopreservación de especies marinas son escasos. Algunos protocolos de criopreservación de gónada se han realizado en especies marinas como *Anguilla japonica*, *Asterropteryx semipunctata* y *Seriola quinqueradiata* (Kawakami *et al.*, 2012; Hagedorn *et al.*, 2018; Morita *et al.*, 2021). En peces catádromos como las anguilas *A. anguilla* y *A. japónica* se ha logrado criopreservar el tejido gonadal obteniendo después de su descongelación un 90 % y 64 % de células viables, respectivamente (Scekic *et al.*, 2020; Kawakami *et al.*, 2012). En este estudio se obtuvo la mayor viabilidad (72 %) al criopreservar tejido gonadal de *C. viridis* con DMSO, por lo que este trabajo podría ser una guía para desarrollar futuros protocolos de criopreservación de CG de especies marinas de interés.

Es importante destacar que la combinación de DMSO con otros ACP no penetrantes, tales como trehalosa, glucosa, lactosa, entre otros, ha resultado eficiente para congelar el tejido gonadal de peces (Scekic *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2021), ya que podría contribuir a disminuir el daño celular causado por el congelamiento (Silva *et al.*, 2015). En el caso de la yema de huevo, las lipoproteínas de baja densidad, colesterol y otros lípidos, pueden causar un efecto positivo en la protección celular, ya que puede ayudar a estabilizar la membrana celular durante el enfriamiento. Además, ayuda a disminuir la formación de cristales de hielo extracelulares (Bergeron *et al.*, 2004; Anzar *et al.*, 2019). En el caso de la lactosa, es un disacárido constituido por glucosa y galactosa (Gilat *et al.*, 1972). Los disacáridos tienen un papel importante en la protección de la estructura celular, ya que ayudan a la célula a deshidratarse antes de la congelación, lo que reduce la formación de cristales de hielo (Garde *et al.*, 2008; Hinch *et al.*, 2008). Asimismo, la glucosa presente en la lactosa contribuye energéticamente para que las células no sufran estrés osmótico (Garde *et al.*, 2008). Por ejemplo, en la criopreservación de tejido gonadal del bagre *Ictalurus furcatus* con 1 M DMSO, se obtuvo un 37 % de células intactas. Sin embargo, al combinar 1 M DMSO con 0.2 M lactosa y 10 % yema de huevo la viabilidad aumentó al 67 % (Abualreesh *et al.*, 2021). Estos resultados coinciden con los de la presente tesis ya que, de acuerdo con los datos, la viabilidad de las CG criopreservadas con la misma combinación resultó en el 70 % de células viables, sugiriendo que la combinación de ACP penetrantes y no penetrantes podría brindar mayor protección a las células que cuando se utiliza un solo crioprotector. Sin embargo, los resultados de viabilidad obtenidos al combinar DMSO, lactosa, y yema de huevo no fueron significativamente diferentes a los resultados obtenidos utilizando solo DMSO. Esto puede deberse a que los ACP actúan de manera específica en cada especie y célula, y el diseño de un protocolo de criopreservación para una especie, no necesariamente puede

funcionar para otra. Por lo tanto, los protocolos deben de diseñarse seleccionando a prueba y error todos los componentes del mismo.

Durante la congelación, las células pasan por etapas que les pueden ocasionar estrés y daño por la formación de cristales de hielo, por lo que la tasa y el método de congelación son factores importantes durante este proceso. La determinación de las temperaturas de congelación y descongelación dependen del tipo, tamaño y permeabilidad del tejido o célula a criopreservar, al igual que se indica para la selección de los ACP (Tiersch *et al.*, 2007). Por tanto, el objetivo es seleccionar una tasa óptima de congelación que ayude a disminuir la formación de cristales de hielo o disminuir su tamaño para que no dañe a la membrana celular (Herraiz *et al.*, 2016; Franěk y Pšenička, 2020.). En este trabajo la criopreservación fue realizada mediante el método de congelación simplificado. Este método consiste en congelar a las muestras en una caja de poliestireno exponiendo a las células al vapor de nitrógeno líquido. El vapor del nitrógeno asciende hacia la parte donde se encuentran las muestras, entonces, la temperatura de las muestras comienza a descender hasta los $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. De esta manera se asegura que las muestras se enfrían conjuntamente. Este método se ha utilizado con éxito en la criopreservación de semen de peces como el bagre *Pelteobagrus fulvidraco* (Pan *et al.*, 2008) y moluscos como el abulón *Haliotis rufescens* (Salinas-Flores *et al.*, 2005). Aunque, la congelación simplificada a pesar de ser un método sencillo con resultados favorables, este método no es muy utilizado ya que, al no controlar la tasa de congelamiento, los resultados son difíciles de reproducir (Salinas-Flores *et al.*, 2005). En cambio, el método de congelación programada es utilizado con mayor frecuencia debido a que hay mayor control sobre las tasas de congelación. No obstante, la aplicación de estas cámaras en granjas de pequeña y mediana escala no podría ser una alternativa considerada. Lo anterior se debe a que estas cámaras de congelación son costosas, se requiere de tiempo de capacitación y de personal calificado para el uso de estos aparatos (Wayman y Tiershc, 2000).

En este trabajo, utilizando el método simplificado de congelación, los mejores porcentajes de viabilidad (72 %) fueron observados cuando la gónada fue congelada por 15 min a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En las cámaras programables las tasas de congelamiento más utilizadas para tejido gonadal de peces van desde $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Scekic *et al.*, 2020; Rivers *et al.*, 2020; Abualreesh *et al.*, 2020; Marinovic *et al.*, 2021). Por ejemplo, en la trucha de Manchuria, *Brachymystax lenok*, se utilizó una tasa de congelación de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para espermatogonias y se obtuvo una viabilidad del 80 % (Lee y Yoshizaki, 2016), que es un porcentaje de viabilidad muy similar a lo registrado en este trabajo. Lo anterior nos deja ver que la viabilidad registrada con ambos métodos no es muy diferente, por lo que el uso de ambos métodos puede ser considerado según el alcance del proyecto. Sin embargo, podría ser recomendable realizar futuros estudios para comparar la tasa de congelación programada con el método simplificado bajo las mismas

condiciones (especie, ACP, concentración molar y método de disgregación), a fin de tener un resultado certero acerca del efecto del método de congelación en la viabilidad celular, bajo las condiciones establecidas en este estudio.

El método simplificado utilizado en el presente estudio da la posibilidad de realizar el congelamiento de muestras de forma sencilla, económica y rápida. Asimismo, este método que anteriormente solo había sido demostrado ser eficaz para congelar esperma es, de acuerdo con los resultados obtenidos, también práctico para criopreservar tejido gonadal o incluso CG en suspensión. Lo cual podría ser ideal para utilizarlo en las granjas de cultivo de pequeña y mediana escala, en comparación con el método programable, cuyo uso está orientado a aplicarse únicamente dentro del laboratorio. Por lo que, debido a los resultados logrados en este estudio y a los beneficios mencionados anteriormente, se podría sugerir impulsar el uso del método simplificado en los futuros protocolos de criopreservación de tejido gonadal de peces de importancia comercial.

Debido a que en este trabajo se realizó la criopreservación de tejido gonadal y no de células germinales en suspensión, una vez descongelado el tejido se tiene la necesidad de disgregarlo con el fin de disponer de una suspensión celular necesaria para los experimentos posteriores. La disgregación celular es comúnmente realizada en 2 partes: disgregación con enzimas y disociación mecánica. Las enzimas generalmente usadas son colagenasa, DNAsa, tripsina y dispasa. Cabe destacar que en múltiples protocolos la enzima tripsina ha mostrado resultados favorables para disgregar tejido gonadal de peces (Kobayashi *et al.*, 2003; Lee y Yoshizaki, 2016; Franek *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha encontrado que a concentraciones de tripsina mayores a 0.50 % podrían dañar la membrana celular (Sigma-Aldrich, 2022). Otras enzimas, aunque en menor proporción, se han utilizado para la disgregación del tejido gonadal. En la gónada del jurel aleta amarilla *Seriola quinqueradiata* y el pez espátula *Polyodon spathula* se utilizó dispasa y colagenasa, dichas enzimas fueron eficaces para disgregar el tejido gonadal y obtener una suspensión celular; no obstante, no se evaluó el efecto de estas enzimas en la viabilidad celular (Morita *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2021).

En el presente estudio se utilizó tripsina en vez de las enzimas antes mencionadas, ya que la eficacia de tripsina para disociar tejidos ha sido confirmada por diversos autores en los protocolos de criopreservación de tejido gonadal de peces. Asimismo, esta enzima presenta una relación costo-beneficio positiva, debido a su bajo costo en comparación a las otras enzimas, y a su vez ofrece resultados efectivos para la disociación de tejidos. La mejor concentración enzimática que dio como resultado la mejor viabilidad celular fue tripsina al 0.25 %. En el bagre *Ictalurus furcatus* y la tilapia *Oreochromis niloticus* se utilizó la

misma concentración de tripsina (0.25 %) para disgregar el tejido gonadal y se obtuvieron resultados favorables de células viables (Abualreesh *et al.*, 2021; Lacerda *et al.*, 2010). En la gónada fresca del esturión, *Acipenser baerii*, se obtuvo un 90 % de viabilidad celular al disociar el tejido gonadal con 0.30% de tripsina (Psecicka *et al.*, 2016). Mientras que para la carpa, *Cyprinus carpio*, al utilizar 0.15 % de tripsina y DNAsa al 0.05 % en PBS para disociar el tejido gonadal se obtuvo 65 % de viabilidad celular (Franek *et al.*, 2019). Comúnmente se selecciona la enzima y se realizan experimentos para encontrar la concentración adecuada. Sin embargo, no se encontraron estudios en donde se comparen distintas enzimas disgregadoras entre sí. Por lo que, podría ser favorable realizar experimentos con distintas enzimas, evaluar su efecto en la viabilidad celular y posteriormente seleccionar la mejor opción.

La disgregación celular da como resultado una suspensión que contiene diferentes tipos de células, por lo que si queremos determinar la cantidad de CG que se pudieron obtener de esa suspensión es necesario aislar a las CG y corroborar su presencia. La efectividad del método de gradiente de densidad por Percoll para la separación de CG ha sido utilizado en especies como el pez tenca, *Tinca tinca*, y en medaka, *Oryzias latipes*, donde la mayor cantidad de CG se concentró en las bandas del 25 % y 30 % (Linhartová *et al.*, 2014; Ryu *et al.*, 2020). Aunque en el presente trabajo el método de Percoll permitió separar a las células por su densidad, aún se observaron células de menor tamaño (posiblemente somáticas o sanguíneas) en la misma banda de las CG. Este problema también fue observado en la separación por Percoll de CG de la tilapia, *Oreochromis niloticus*, y el esturión, *Acipenser baerii*, donde posterior a la separación todavía se observaban células de Sertoli, mioides peritubulares y células de Leydig (Lacerda *et al.*, 2006; Psenicka *et al.*, 2015). Dadas las complicaciones para separar únicamente las CG, se ha optado por buscar otros métodos, tal es el caso de la citometría de flujo, que permite la identificación de células por tamaño, complejidad y marcadores fluorescentes. Sin embargo, en esta tesis no fue posible transportar las gónadas frescas del sitio de recolección (Mazatlán, Sinaloa) al laboratorio de análisis (Ensenada, Baja California). Por lo que, no se disponían de muestras frescas de tejido gonadal para estandarizar la técnica y analizar mediante citometría de flujo.

El método de gradiente discontinuo de Percoll y la citometría de flujo se han comparado para analizar la eficiencia de separación celular. El método de citometría ha mostrado mayor eficiencia para aislar células en comparación con el método de Percoll (Dias *et al.*, 2020). Sin embargo, la citometría de flujo es una técnica compleja que requiere tiempo de capacitación al personal y equipo especializado, el cual es costoso (Ichida *et al.*, 2017). Por otra parte, la concentración celular obtenida con el método de Percoll puede llegar a ser la idónea según los objetivos del estudio. No obstante, para estudios de mayor alcance,

la eficacia del método de Percoll puede no ser la ideal. En este trabajo, el enriquecimiento de CG por Percoll resultó ser un método eficaz y económico que no requirió de equipo sofisticado.

En la suspensión celular recuperada de la banda de Percoll se logró identificar mediante inmunocitoquímica a las CG de la gónada de *C. viridis* por la expresión de la proteína VASA en el citoplasma. Como se muestra en las Figuras 5 y 12C, las células con expresión de VASA mostraron características morfológicas similares; diámetro de aproximadamente 10 μm , núcleo grande y citoplasma granuloso. Para identificar las CG del tejido gonadal del pez arcoíris, *Melanotaenia fluviatilis*, se utiliza anti VASA conjugado con Alexa Flúor (Rivers *et al.*, 2020). Asimismo, en estudios previos se ha empleado VASA para la identificación celular en trasplantes de CG de la corvina, *Argyrosomus regius* (Zupa *et al.*, 2020) y la carpa común, *Cyprinus carpio* (Franek *et al.*, 2019). VASA se ha catalogado como un marcador molecular eficaz para la identificación de CG en el tejido gonadal de peces, ya que la secuencia de aminoácidos de esta proteína está bien conservada en la línea germinal de distintos organismos (Raz, 2000).

En este trabajo se desarrolló un protocolo para criopreservar tejido gonadal y disgregación de gónada para posteriormente aislar las CG del robalo blanco. Por consiguiente, en futuras aplicaciones, como el trasplante de CG en organismos subrogados, es recomendable que al menos el 50 % de las células criopreservadas sean viables, dado que aproximadamente solo el 30-50 % de las células trasplantadas lograrán incorporarse en las gónadas receptoras, para finalmente producir gametos (Marinovic *et al.*, 2021). Con respecto al presente estudio se obtuvo una viabilidad celular de aproximadamente 60-70 %, por lo que estos resultados, según los estudios previos, podrían ser óptimos para en el futuro realizar trasplantes de CG de robalo blanco.

En relación con la concentración celular, como se mencionó anteriormente, en este trabajo posterior al descongelamiento de muestras se obtuvieron 4.95×10^6 células/mL, de las cuales aproximadamente 1.78×10^6 eran CG (36 %). De acuerdo a estudios previos de trasplantes de CG en peces, la concentración celular inyectada por organismo puede variar. Por ejemplo, en trasplantes de la tilapia *Oreochromis niloticus*, sexualmente maduro, se inyectaron 1×10^7 CG y en el 89 % de las gónadas receptoras se observó proliferación de las CG trasplantadas (Lacerda *et al.*, 2010). En larvas de corvina nibe, *Nibe mitsukurii*, y jurel aleta amarilla, *Seriola quinqueradiata*, se trasplantaron 2×10^4 células, de las cuales lograron proliferar el 30 % y 94 % respectivamente (Takeuchi *et al.*, 2009; Morita *et al.*, 2021). Lo anterior indica que, para trasplantes con alto porcentaje de proliferación, es recomendable realizar experimentos para encontrar el estadio ideal del organismo receptor (Takeuchi *et al.*, 2009). La concentración obtenida de CG en el presente trabajo de investigación (1.78×10^6 cel/mL), podría indicar un número ideal para realizar

trasplantes. Sin embargo, como antes mencionado, la concentración celular necesitada para un trasplante exitoso podría variar según el estadio del organismo receptor. Por lo que es recomendable considerar futuros estudios para determinar el número adecuado de células para trasplantes. Así mismo, una alternativa es cultivar las CG *in vitro* para aumentar la concentración celular, y posteriormente ser trasplantadas a los organismos receptores.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían ser una guía para desarrollar futuros protocolos de criopreservación de CG de especies cercanas al robalo blanco, e incluso, ayudar a establecer una base para protocolos de especies marinas. Asimismo, la criopreservación del tejido gonadal de robalo, y el posterior aislamiento de las CG podría permitir realizar trasplantes en organismos subrogados. El conjunto de estas herramientas presenta una posible alternativa para conservar especies con potencial acuícola, tal es el caso del robalo blanco.

Capítulo 5. Conclusiones

El tejido gonadal de robalo blanco, *Centropomus viridis*, puede ser criopreservado en EG, DMSO o en la combinación de DMSO, lactosa y yema de huevo y mantener una viabilidad entre el 60 y 72 %. La criopreservación de tejido gonadal de robalo blanco en DMSO 2 M y congelado a -80 °C durante 15 min mostró mayor viabilidad celular (72 %) en comparación a los otros tratamientos. Asimismo, el método simplificado es un método de congelación práctico en la criopreservación de muestras de tejido gonadal de *C. viridis*. Sin embargo, es recomendable realizar más pruebas para evaluar la reproducibilidad de los resultados de este método. El medio de disgregación óptimo para el tejido gonadal de robalo blanco está compuesto por tripsina 0.25 % y DNAsa 0.05 % diluido en la SSBH, esta combinación permitió una disgregación enzimática eficiente para obtener la suspensión celular. Las CG fueron aisladas en la concentración de Percoll al 10%. del resto de células de la suspensión celular Por lo que el gradiente de densidades al 10 % y 40 % de Percoll es un método económico y eficiente para lograr una suspensión enriquecida de CG. La proteína VASA es un marcador molecular eficiente en la técnica de inmunocitoquímica para la identificación de CG en el tejido gonadal de *C. viridis*. La concentración obtenida de CG es similar a la utilizada en estudios de trasplantes de CG en peces. No obstante, es necesario realizar experimentos para asegurar la proliferación de las CG en las gónadas receptoras. El desarrollo de este trabajo establece una guía para futuros protocolos de criopreservación de tejido gonadal de peces marinos, e incluso apoyar en estudios de trasplantes de CG. De esta manera se pretende contribuir en la reproducción de peces en cautiverio, y a su vez mejorar el estatus comercial o ecológico, según sea el caso.

Literatura citada

- Abdo-de la Parra, M.A., Rodríguez-Ibarra, L.E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J.M., y Velasco-Blanco, G. 2020. Efecto de la frecuencia y la hora de alimentación sobre el crecimiento, la eficiencia alimenticia, los índices somáticos y la supervivencia en juveniles de robalo blanco *Centropomus viridis*. *Ciencias Marinas*, 46 (3), pp. 155-163.
- Abualreesh, M., Myers, J.N., Gurbatow, J., Johnson, A., Xing, D., Wang, J., Li, S., Coogan, M., Vo, K., Husseini, N.E., Creamer, D., Dunham, R.A., y Butts, I.A.E. 2021. Development of an effective cryopreservation protocol for blue catfish oögonia. *North American Journal of Aquaculture*. Doi: 10.1002/naaq.10203
- Abualreesh, M., Myers, J.N., Gurbatow, J., Johnson, A., Xing, D., Wang, J., Li, S., Coogan, M., Vo, K., Husseini, N.E., Dunham, R.A., y Butts, I.A.E. 2020. Development of a spermatogonia cryopreservation protocol for blue catfish, *Ictalurus furcatus*. *Cryobiology*. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.10.010.
- 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. Doi :10.1088/1742-6596/979/1/012004
- Anzar, M., Rajapaksha, K., y Boswall, L. 2019. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *Plos One*, 10. Doi: 10.1371/journal.pone.0223977
- Asturiano, J., Cabrita, E., y Horváth, A. 2017. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 1(245), pp. 69–76. Doi: 10.1016/j.ygcen.2016.06.019
- Ávila-Portillo, L.M., Madero, J.I., López, C., León, M.F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L.G., Gómez, C., Lozano, J.M., y Reguero, M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57 (4), pp. 291-300.
- Barneche, D.R, Burgess, S.C, y Marshall, D.J. 2018. Global environmental drivers of marine fish egg size. *Global Ecology and Biogeography*, 27, pp. 890– 89. Doi: 10.1111/geb.12748
- Bergeron, A., Crete, M-H., Brindle, Y., y Manjunath, P. 2004. Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins from Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biology of reproduction*, 70, pp. 708-717. Doi: 10.1095/biolreprod.103.022996
- Brinster, R.L. 2007. Male germline stem cells: From mice to men. *Science*, 316, pp. 404-405. Doi: 10.1126/science.1137741
- Carvalho-Filho, A., De Oliveira, J., Soares, C., y Arapipe, J. 2019. A new species of snook, *Centropomus* (Teleostei: Centropomidae), from northern South America, with notes on the geographic distribution of other species of the genus. *Zootaxa*, 4671(1), pp. 81-92. Doi: 10.11646/zootaxa.4671.1.6
- Cinalli, R. M., Rangan P., y Lehmann, R. 2008. Germ cells are forever. *Cell*, 132, pp. 559–562. Doi: 10.1016/j.cell.2008.02.003

- CONAPESCA. S.F. Ordenamiento de la pesquería de robalo en el golfo de México. Recuperado de: <https://docplayer.es/59886976-Ordenamiento-de-la-pesqueria-de-robalo-en-el-golfo-de-mexico.html>
- Cooper, D.K. 2012. A brief history of cross-species organ transplantation. Proceedings (Baylor University Medical Center), 25(1), pp. 49-57. Doi: 10.1080/08998280.2012.11928783
- Dias, G.C.M., Batlouni, S.R, Cassel, M., Chehade, C., De Jesus L.W.O., Branco, G.S., Camargo, M.C., y Borella, M.I. 2020. Isolation, in vitro study, and stem cell markers for type A spermatogonia in a Characiformes species. Molecular Reproduction Development, 87(2). Doi: 10.1002/mrd.23394
- Díaz, N., y Neira, R. 2005. Biotechnology Applied to Aquaculture I. Classic Biotechnologies Applied to the Reproduction of Cultivated Species. International Journal of Agriculture and Natural Resources, 32(1), pp. 39-52. Doi: 10.7764/rcia.v32i1.306
- Diwan, A.D., Ayyappan, S., Lal, K., y Lakra, W.S. 2010. Cryopreservation of fish gametes and embryos. Indian Journal of Animals Sciences, 80(4), pp. 109-124.
- Edashige, K., Valdez, D.M., Hara, T., Saida, N., Seki, S., y Kasai, M. 2006. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. Cryobiology, 53, pp. 96-106.
- 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, pp. 29-37. Doi: 10.1016/j.cbpb.2018.07.001
- Fickel, J., Wagener, A., y Ludwig, A. 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. European Journal of Wildlife Research, 53, pp. 81-89.
- Franěk, R., Marinovic, Z., Lujíé, J., Urbány, B., Fučíková, M., Kaspar, V., Psenicka, M., y Horváth, A. 2019a. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. Plos One 14(4). Doi: 10.1371/journal.pone.0205481
- Franěk, R., y Pšenička, M. 2020. Cryopreservation of germ stem cells in fish. En J. Betsy, y S. Kumar (Eds.), Cryopreservation of fish gametes. Springer, Singapore.
- Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujíé, J., Marinovic, Z., Horváth, A., Kaspar, V., y Psenicka, M. 2019b. Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. Cryobiology, 87, pp. 78-85. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.01.016
- Garde, J.J., del Olmo, A., Soler, A.J., Espeso, G., Gomendio, M., y Roldan, E.R.S. 2008. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). Animal Reproduction Science, 108, pp. 384-401. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.09.010
- Gassman, J., López-Rojas, H., y Padrón, D. 2016. Reproducción de los róbalo *Centropomus undecimalis* y *C. ensiferus* (Perciformes: Centropomidae) en una laguna costera tropical. Revista Biología tropical, 65(1), pp. 181-194.
- Gilat, T., Russo, S., Gelman-Malachi, E., y Aldor, T.A. 1972. Lactase in man: a nonadaptable enzyme. Gastroenterology, 62(6), pp. 1125-1127

- Goetz, C., Hammerbeck, C., Wyman, A., y Huh, J.B. 2018. Cell enrichment. En: C. Goetz, C. Hammerbeck y J. Bonnevier (Eds.), *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Springer, Suiza.
- Golpour, A., Siddique, M.A., Rodina, M., y Pšenička, M. 2016. Short-term storage of sterlet *Acipenser ruthenus* testicular cells at -80 °C. *Cryobiology*, 72, pp. 154-156.
- Hagedorn, M.M., Daly, J.P., Carter, V.L., Cole, K.S., Jaafar, Z., Lager, C.V.A., y Parenti, L.R. 2018. Cryopreservation of fish spermatogonial cells: The future of natural history collections. *Scientific Reports*, 8(6149). Doi: 10.1038/s41598-018-24269-3
- Hernández-Pichardo, J.E., Rodríguez-Suástegui, J.L., Sánchez-Martínez, C., y Ramírez-Franco, R. 2015. Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. *Revista de Salud Animal*, 1(37), pp. 15-20
- Herraiz, S., Diaz-Garcia, C., y Pellicer, A. 2016. Ovarian tissue cryopreservation: Slow freezing. En: N. Suzuki y J. Donnez (Eds.), *Gonadal tissue cryopreservation in fertility preservation*. Springer, Kanagawa.
- Higaki, S., Kawakami, Y., Eto, Y., Yamaha, E., Nagano, M., Katagiri, S., Takada, T., 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, pp. 374-382. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.10.006
- Higaki, S., Kuwata, N., Tanaka, K., Tooyama, I., Fujioka, Y., Sakai, N., y Takada, T. 2017. Successful vitrification of whole juvenile testis in the critically endangered cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caeruleus*). *Zygote*. Doi:10.1017/S0967199417000430
- Hincha, D.K., Popova, A.V., y Cacela, C. 2006. Effects of sugars on the stability and structure of lipid membranes during drying. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 3, pp. 189-217. Doi: 10.1016/S1554-4516(05)03006-1
- Huang, L., Bian, S., Cheng, Y., Shi, G., Liu, P., Ye, X., y Wang, W. 2017. Microfluidics cell sample preparation for analysis: Advances in efficient cell enrichment and precise single cell capture. *Biomicrofluidics*, 11(1). Doi: 10.1063/1.4975666
- Ibarra-Castro, L., Navarro-Flores, J., Sánchez-Téllez, J.L., Martínez-Brown, J.M., Ochoa-Bojórquez, L.A., y Rojo-Cebreros, A.H. 2017. Hatchery production of pacific White snook at CIAD-unity Mazatlan, Mexico. *World aquaculture*.
- Ichida, K., Kise, K., Morita, T., Yazawa, R., Takeuchi, Y., y Yoshizaki, G. 2017. Flow-cytometric enrichment of Pacific bluefin tuna type A spermatogonia based on light-scattering properties. *Theriogenology*, 101, pp. 91-98. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.06.022
- Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). 2014. Plan de manejo pesquero de robalo (*Centropomus undecimalis*) del golfo de México y Mar Caribe. Diario oficial. 2ed.
- Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). 2020. Avances tecnológicos en el cultivo de Robalo blanco en México.
- Joris, A., y Olvera, S.A. 2018. Genética y taxonomía de los robalos (*Centropomus* spp.) del Golfo de California, México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.

- Kawakami, K., Ishihara, M., Saito, T., Fujimoto, T., Adachi, S., Arai, K., y Yamaha, E. 2012. Cryopreservation of green fluorescent protein (GFP)-labeled primordial germ cells with GFP fused to the 3`untranslated region of the manos gene by vitrification of Japanese eel (*Anguilla japonica*) somite stage embryos. American Society of Animal Science, 90(12), pp. 4256-4265. Doi: 10.2527/jas.2011-4884
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., y Yoshizaki, G. 2007. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. Molecular Reproduction and Development, 74, pp. 207-213. Doi: 10.1002/mrd.20577
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., y Takeuchi, T., 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. Fish Physiology and Biochemistry, 28, pp. 479-480. Doi: 10.1023/B:FISH.0000030634.37486.fa
- Komen, H., y Thorgaard, G.H. 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. Aquaculture, 269(1-4), pp. 150-173. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.009
- Labastida, A., Núñez, A.D., y Oviedo, J.A. 2013. Aspectos biológicos del robalo hocicudo *Centropomus viridis*, en el sistema lagunar Chantuto-Panzacola, Chiapas, México. Ciencia Pesquera, 21(2), pp. 21-28.
- Labbé, C., Robles, V., y Herráez, M.P. 2013. Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation. En: G. Allan, y G. Burnell (Eds.), Advances in Aquaculture Hatchery Technology, Woodhead. Doi: 10.1533/9780857097460.1.76
- Lacerda, S.M.S.N. 2006. Transplante de 38 spermatogonias: 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, Brasil.
- Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R, Costa, G.M.J., Segatelli, T.M., Quirino, B.R., Queiroz, B.M., Kalapothakis, E., y Franca, L.R. 2010. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. Plos One 5(5). Doi: 10.1371/journal.pone.0010740
- Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R, Silva, S.B.G., Homem, C.S.P., y França, L.R. 2006. Germ cell transplantation in fish: the Nile-tilapia model. Animal Reproduction, 3(2), pp. 146-159.
- Lacerda, S.M.S.N., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P.A.H., Segatelli, T. M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., y França L. R. 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. Fish Physiology and Biochemistry, 39(1), pp. 3–11.
- Lacerda, S.M.S.N., Martínez, E.R.M., Mura, I.L.D.D, Doretto, L.B., Costa, G.M.J., Silva, M.A., Digmayer, M., Nóbrega, R.H., y Franca, L.R. 2019. Duration of spermatogenesis and identification of stem cell genes in a Neotropical catfish, Jundiá (*Rhamdia quelen*) testis. General and Comparative Endocrinology. Doi: 10.1016/j.ygcen.2018.10.018
- Lee, H.L., Kim, S.H., Ji, D.B., y Kim, Y.J. 2009. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. Veterinary Science, 10(3), pp. 249-255. Doi: 10.4142/jvs.2009.10.3.249
- Lee, S., Bang, W.Y., Yang, H.S., Lee, D.S., y Song, H.Y. 2021. Production of juvenile masu salmon (*Oncorhynchus masou*) from spermatogonia-derived sperm and oogonia-derived eggs via

- intraperitoneal transplantation of immature germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 535, pp. 6-11. Doi: 10.1016/j.bbrc.2020.12.021.
- Lee, S., Katayama, N., y Yoshizaki, G. 2016. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.156.
- Lee, S., y Yoshizaki, G. 2016. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology*, 72, pp. 165-168. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.01.004
- Linhartová, Z., Rodina, M., Guralp, H., Saito, G.T., y Pšenička, M. 2014. Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). *Czech Journal of Animal Science*, 59(8), pp. 381-390. Doi: 10.17221/7589-CJAS
- Lockington, W.N. 1877. Notas sobre algunos peces marinos de California, con descripción de una nueva especie. *Actas de la Academia de Ciencias de California (Serie 1)* 7, pp. 108-110
- Lujić, J., Marinovic, Z., Kása, E., Ščekić, I., Urbányi, B., y Horváth, Á. 2018. Preservation of common carp germ cells under hypothermic conditions: Whole tissue vs isolated cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5), pp. 1253-1258. Doi: 10.1111/rda.13220
- Luvoni, G.C., y Colombo, M. 2020. Cold case: Small animal gametes cryobanking. *Theriogenology*, 150, pp. 445-451. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.047
- Lyons, T.J., Cotto, A., Acero, A., Rojas, P., y Van-Heiden, A. 2019. *Centropomus viridis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019. Doi: 10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T178067A1526469.en
- Marinovic, Z., Li, Q., Lujić, J., Iwasaki, Y., Csenki, Z., Urbányi, B., Yoshizaki, G., y Horváth, Á. 2019. Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation. *Scientific Reports*, 9. Doi: 10.1038/s41598-019-50169-1
- Marinovic, Z., Lujic, J., Kása, E., Csenki, Z., Urbányi, B., y Horváth, A. 2018. Cryopreservation of zebrafish spermatogonia by whole testes needle immersed ultra-rapid cooling. *Journal of Visualized Experiments* (133). Doi: 10.3791/56118
- Marinović, Z., Lujić, J., Li, Q., Iwasaki, Y., Urbányi, B., Yoshizaki, G., y Horváth, Á. 2021. Cryopreservation and Transplantation of Spermatogonial Stem Cells. En: R. Dosch (eds.), *Methods in molecular biology*. Springer, Clifton. Doi: 10.1007/978-1-0716-0970-5_4
- Marques, L.S., Fossati, A.A.N., Rodrigues, R.B., Da Rosa, H.T., Izaguirry, A.P., Ramalho, J.B., Moreira, J.C.F., Santos, F.W., Zhang, T., y Streit Jr., D.P. 2019. Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. *Scientific Reports*, 9. Doi: 10.1038/s41598-019-51696-7
- Martínez-Brown, J.M., Navarro-Flores, J., García-Rodríguez, F.J., Ibarra-Castro, L., Vargas-Peralta, C.E., Del Río-Portilla, M.A., y Martínez-Moreno, R. 2021. Revision of the diagnostic characters of two morphologically similar snook species, *Centropomus viridis* and *C. nigrescens* (Carangiformes: Centropomidae). *Zootaxa*, 3, pp. 326-338

- Martínez-Parámo, S., Horvath, A., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráes, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R., y Cabrita, E. 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472, pp. 156–177. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.05.042
- Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., Higuchi, K., Takeuchi, Y., y Yoshizaki, G. 2012. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biology of Reproduction*, 86(6), pp. 1-11. Doi: 10.1095/biolreprod.111.097873
- Morita, T., Miwa, M., Kumakura, N., Morishima, K., Miki, T., Takeuchi, Y., y Yoshizaki, G. 2021. Production of functional sperm from cryopreservation testicular germ cells following intraperitoneal transplantation into allogeneic surrogate in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Cryobiology*, 100, pp. 32-39. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.04.001
- Morrell, J.M., y Mayer, I. 2017. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote*. Doi:10.1017/S0967199417000442
- Odintsova, N., Boroda, A.V., Velansky, P.V., y Kostetsky, E. 2009. The fatty acid profile changes in marine invertebrate larval cells during cryopreservation. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.09.006
- Ortega-Lizárraga, G.G., Danemann, G., Cortés-Hernández, M., Rodríguez-Domínguez, G., Torrescano-Castro, G.C., Torres-Covarrubias, A.L., y Zárate-Becerra, M.E. 2014. Estimación de parámetros de crecimiento y talla de primera madurez para tres especies de robalo en la zona de marismas nacionales Nayarit y sur de Sinaloa (período 2009 a 2012). VII Foro Científico de Pesca Ribereña.
- Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., y Yoshizaki, G. 2006. Manipulation of fish germ cell: visualization, Cryopreservation and transplantation. *Journal of Reproduction and Development*, 52(6), pp. 685-693.
- Pan, J., Ding, S., Ge, J., Yan, W., Hao, C., Chen, J., y Huang, Y. 2008. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. *Aquaculture*, 279, pp. 173-176. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.037
- Paniagua-Chávez, C.G., Ortiz-Gallarza, S.M., y Aguilar-Juárez, M. 2011. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación de los recursos genéticos acuáticos en México. *Hidrobiología*, 21(3), pp. 415-429
- Parenti, L.R., y Grier, H.J. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44(5), pp. 333-348. Doi: 10.1093/icb/44.5.333
- Park, C., y Chapman, F.A. 2005. An extender solution for the short-term storage of Sturgeon semen. *North American Journal of Aquaculture*, 67, pp. 55-57.
- Perera-García, M., Mendoza-Carranza, M., y Páramo-Delgadillo, S. 2008. Dinámica reproductiva y poblacional del robalo, *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae), en barra San Pedro, Centla, México. *Universidad y ciencia*, 24(1), pp. 49-59.
- Pertoft, H., Torvard, C.L., Laas, T., y Kagedal, L. 1978. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical Biochemistry*, 88, pp. 271-282.

- Pšenička, M., Saito, T., Linhartová, Z., y Gazo, L. 2015. Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ. *Theriogenology*. Doi: 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*. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.02.005.
- Rawson, D.M., y Zhang, T. 2005. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos. *The Role of Biotechnology*, pp. 209-210
- Rivers, N., Daly, J., Jones, R., y Temple-Smith, P. 2020. Cryopreservation of testicular tissue from Murray River Rainbowfish, *Melanotaenia fluviatis*. *Scientific Reports*, 10. Doi: 10.1038/s41598-020-76378-7
- Robles, V., Riesco, M. F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D. G., Cabrita, E., y Herráez, P. 2016. Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*, 472, pp. 4–20.
- Routray, P. 2020. Cryopreservation and short duration storage of germ cells and male gametes of freshwater fish. En: J. Betsy, y S. Kumar (Eds.), *Cryopreservation of Fish Gametes*. Springer, Singapore.
- Ryu, J.H., y Gong, S.P. 2020. Enhanced enrichment of medaka ovarian germline stem cells by a combination of density gradient centrifugation and differential plating. *Biomolecules*, 10(11). Doi: 10.3390/biom10111477
- Rzepakowska, M., y Ostaszewska, T. 2014. Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture*, 6, pp. 75-88. Doi: 10.1111/raq.12027
- Salinas-Flores, L., Paniagua-Chavez, C.G., Jenkins, J.A., y Tiersch, T.R. 2005. Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*). *Journal of Shellfish Research*, 24(2), pp. 415-420. Doi: 10.2983/0730-8000(2005)24[415: COSORA]2.0.CO;2
- Šćekić, I., Marinovic, Z., Lujic, J., Müller, T., Kitanovic, N., Urbányi, B., y Horváth, A. 2020. A novel strategy for conservation of European eel (*Anguilla anguilla*) genetic resources: Cryopreservation of ovarian stem cells. *Cryobiology*. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.009
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2019. La importancia del robalo en la pesca y acuicultura. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-importancia-del-robalo-en-la-pesca-y-la-acuicultura?idiom=es>
- Secretaria de Pesca. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de robalo. Centro de Investigación Biológicas del Noroeste, SC. Pp.
- Setioko, A.R., Tagami, T., Tase, H., Nakamura, Y., Takeda, K., y Nirasawa, K. 2007. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) from White leghorn embryos using commercial cryoprotectants. *The Journal of Poultry Science*, 44, pp. 73-77
- 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), pp. 1545-1556. Doi: 10.1007/s10695-015-0106-1

- Silva, C.G., Cunha, E.R., Blume, G.R., Malaquias, J.V., Bao, S.N., y Martins, C.F. 2015. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*, 70(2), pp. 90-94. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.01.001
- Soto-Rodríguez, S.A., Lozano-Olvera, R., Abad-Rosales, S.M., Martínez-Brown, J.M., y Ibarra-Castro, L. 2019. Susceptibility of Pacific White snook *Centropomus viridis* to *Vibrio* species. *Diseases of Aquatic Organisms*, pp. 189-195. Doi: 10.3354/dao03370
- 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*. Doi: 10.1095/biolreprod.109.077701
- Tapia-Varela, J.R., Palacios-Salgado, D.S., Romero-Bañuelos, C.A., Ruiz-Bernés, S., Padilla-Noriega, R., y Nieto-Navarro, J.T. 2020. Length-weight relationship and condition factor of *Centropomus viridis* (Actinopterygii: Perciformes: Centropomidae) in the north coast of Nayarit. *Acta Universitaria*, (30). Doi: 10.15174/au.2020.2123
- Taylor, R.G., Whittington, J.A., Grier, H.J., y Crabtree, R.E. 2000. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. *National Marine Fisheries Service*, 98(3), pp. 612-624.
- Tiersch, T.R., Yang, H., Jenkins, J.A., y Dong, Q. 2007. *Sperm cryopreservation in fish and shellfish*. Spermatology, Nottingham.
- Tsai, S., y Lin, C. 2012. Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 55(3), pp. 425–434. Doi:10.1590/s1516-89132012000300014
- Vanacor-Barroso, M., Carvalho-Castro, J., Marim-Aoki, P.C., y Helmer, J.L. 2002. Valor nutritivo de algunos ingredientes para Robalo (*Centropomus parallelus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(6), pp. 2157-2164.
- Vergara-Chen, C. 2014. Los robalos (Pisces, Centropomidae) del Pacífico de Panamá: desafíos emergentes en investigación y conservación. *Tecnociencia*, 16(1), pp. 15-40.
- Ventura-Juncá, P. 2013. ¿Es ético utilizar la criopreservación como técnica para hacer más eficiente la fertilización in vitro? *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 78(5), pp. 405-406.
- Wayman, W.R., y Tiersch, T.R. 2000. Research methods for cryopreservation of sperm. En: T.R. Tiersch y P.M. Mazik (eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Whaley, D, Damyar, K., Witek, R.P., Mendoza, A., Alexander, M., y Lakey, J.R. 2021. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 30. Doi: 10.1177/0963689721999617
- Wolkers, F.W., y Oldenhof, H. 2007. Principles underlying cryopreservation and freeze-drying of cells and tissues. En: F.W. Wolkers y H. Oldenhof (eds.), *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press, New York.
- Yang, H., y Tiersch, T.R. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), pp. 224-232. Doi: 10.1016/j.cbpc.2008.07.005

- Yanong, R. 2003. Necropsy Techniques for fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 12(2), pp. 89-105
- Ye, H., Zhou, C., Yue, H., Wu, M., Ruan, R., Du, H., Li, C., y Wei, Q. 2021. Cryopreservation of germline stem cells in American paddlefish (*Polyodon spathula*). *Animal Reproduction Science*, 224. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106667
- 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), pp. 973-979. Doi: 10.1095/biolreprod.108.075150
- Yoshizaki, G., y Lee, S. 2018. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. *Stem Cell Research*, 29, pp. 103-110. Doi: 10.1016/j.scr.2018.03.015
- Zupa, R., Martino, N. A., Marzano, G., Dell'Aquila, M. E., y Corriero, A. 2020. Meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) Stem Spermatogonia: Histological Characterization, Immunostaining, In Vitro Proliferation, and Cryopreservation. *Animals*, 10(5). Doi: 10.3390/ani10050851

Anexos

Anexo A: Preparación de paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS

Material:

Vaso de precipitado

Probeta

Agitador magnético

Placa de calefacción

Termómetro

Espátula

Gotero

Filtros

Frasco de vidrio con tapa

PBS 1X (10X Biotech, pH 7.4-7.6)

NaOH

Procedimiento:

1. Para preparar 50 mL, añadir 30 mL de PBS 1X en un vaso de cristal con agitador magnético sobre una placa de calefacción y comenzar a calentar. Monitorear con un termómetro que la temperatura no exceda los 60 °C.
2. Añadir 2 g de paraformaldehído a los 30 mL de PBS previamente calentados.
3. Añadir gota a gota NaOH 1N a la disolución de PFA hasta que dicha disolución se clarifique.
4. Ajustar volumen a 50 mL con PBS.
5. Una vez que la disolución se haya enfriado, proceder a filtrarla.
6. Ajustar pH a 7.2 – 7.4
7. Almacenar en frasco de vidrio durante una semana a 4 °C o congelarlo durante un mes.

Nota: Preparar solución en campana de extracción. Utilizar equipo de seguridad (lea hoja de seguridad del PFA).

Anexo B: Inmunotinción de suspensión celular

Material:

Portaobjetos de dos anillos Gold Seal

Pinzas

Cajas Petri de vidrio

Micropipetas

Pipetas Pasteur

Cubreobjetos

Criocaja

DAPI

Anti-DDX4/MVH

AlexaFluor488

HCl

Etanol

Poli-L-lisina

PFA al 4 %

PBS 1X

Tritón 100X al 0.3 % en PBS (PBS-T)

BSA 1 % y Tween20 al 0.05 % en PBS (solución de bloqueo)

Medio de montaje de alcohol polivinílico con DABCO

Procedimiento:

1. Incubar los portaobjetos de dos anillos sumergidos en HCl 1 N durante 3 h o toda la noche.
2. Lavar 2 veces con etanol al 100 %
3. Sumergir e incubar portaobjetos en Poli-L-lisina al 0.1 % en agua desionizada durante 40 min.
4. Colocar portaobjetos en una gradilla o caja no totalmente cerrada
5. Secar portaobjetos en estufa a 70 °C durante 1 h
6. Una vez secos los portaobjetos, colocar cada uno en una caja Petri de vidrio.
7. Fijar la suspensión celular (previamente recuperada y procesada del gradiente de Percoll) con PFA al 4 % en PBS en una proporción 1:1
8. Tomar alícuota de 100 µL y colocarla en cada anillo del portaobjetos. Lo ideal es que se forme una gota y esta se mantenga dentro del anillo.
9. Incubar durante 3 h a temperatura ambiente

10. Lavar una vez con PBS 1X. Utilizar una pipeta Pasteur para realizar los lavados. Agregar PBS desde la orilla o centro del portaobjetos.
11. Escurrir el exceso de líquido y situar la caja Petri sobre una gel congelado o hielo
12. Permeabilizar membranas con 100 μ L de PBS-T e incubar 20 min.
13. Realizar 3 lavabos con PBS y escurrir exceso de líquido
14. Bloquear con 100 μ L de solución de bloqueo e incubar durante 1 h a 4 °C
15. Escurrir exceso de solución de bloqueo.
16. Añadir 100 μ L del anticuerpo primario (Anti-DDX4/MVH, Abcam, ab13840) diluido 300 veces en solución de bloqueo.
17. Incubar portaobjetos en caja Petri por 18 h a 4 °C
18. Realizar 3 lavados de 5 min con solución de bloqueo
19. Añadir 100 μ L de anticuerpo secundario (AlexaFluor488, Abcam, ab150077) diluido 800 veces. Guardar cajas Petri en una criocaja o cualquier caja oscura e incubar muestras por 1 h a 4 °C.
20. Realizar 3 lavados de 5 min con PBS
21. Teñir núcleos con 50 μ l de DAPI 10 μ g/mL en PBS-T
22. Incubar 20 min
23. Lavar 5 veces con PBS y retirar el exceso de líquido
24. Agregar 2 gotas de medio montaje sobre cada anillo
25. Colocar los cubreobjetos previamente limpiados
26. Dejar reposar 2 h o hasta que el medio montaje este seco
27. Si es necesario sellar con esmalte de uñas
28. Observar al microscopio
29. Tomar fotografía y realizar conteo de CG y células totales

Nota: Trabajar todo el protocolo en campana de extracción, y utilizar equipo de seguridad. Todas las soluciones deben ser preparadas con agua desionizada y posteriormente filtradas. Realizar los lavados con pipetas Pasteur y añadir la solución de lavado desde la orilla o centro del portaobjetos. Se recomienda conocer las funciones de los reactivos para el entendimiento de la técnica.

Anexo C: Método simplificado para la congelación de muestras a -80 °C

Procedimiento:

1. Verter nitrógeno líquido hasta aproximadamente 5 cm de profundidad en la hielera de poliestireno.
2. Colocar cuidadosamente la malla a 15 cm sobre el nitrógeno líquido.
3. Colocar el termopar de la termocupa sobre la malla, y cerrar la hielera.
4. Monitorear la temperatura hasta que mantenga en los -80 °C. si es necesario verter más nitrógeno líquido.
5. Una vez establecida la temperatura en -80 °C, colocar los crioviales con las muestras sobre la malla y tapar la hielera.
6. Poner el cronometro según el tiempo de congelación que se requiera (10, 15 o 30 min).
7. Mantener la temperatura de -80 °C durante todo el tiempo de congelación.
8. Para regular la temperatura se puede destapar la hielera o verter más nitrógeno líquido cuidadosamente de que no caiga directamente sobre los crioviales.
9. Una vez transcurrido el tiempo de congelación, colocar los crioviales en mallas de nylon y almacenar en tanque de nitrógeno líquido.

Nota: Se recomienda rotular cada criovial y utilizar códigos de colores para identificarlos (color del criovial, color de malla de nylon, color de etiqueta, entre otros).

Anexo D: Descongelación de muestras

Material:

Placa calefactora

Agitador magnético

Vaso de 500 mL

Solución SSBH

Pinzas

Pipeta Pasteur

Tubos de 1.5 mL

Gradilla

Procedimiento:

1. Llenar un vaso de 500 mL a dos tercios de su capacidad con agua destilada y mantener en agitación constante sobre placa calefactora
2. Calentar agua a 30 °C
3. Sacar muestras del tanque de criopreservación
4. Descongelar muestras en un baño maría durante aproximadamente 2 min a 30 °C en agitación constante
5. Sacar muestra de tejido del criovial con pinzas
6. Sumergir tejido descongelado en un tubo con 1 mL de SSBH
7. Incubar durante 5 min lavar el exceso de ACP
8. Lavar las pinzas con SSBH cada vez que se cambie de muestra
9. Colocar muestra de tejido en el medio de disgregación

Nota: La disgregación enzimática para muestras frescas se realizó con una incubación de 2.5 h, para el caso de muestras descongeladas la incubación fue de 1 h.

Anexo E: Análisis estadístico de células con expresión de VASA.

Tabla 4. Resumen del análisis de varianza de una vía para la comparación entre los tratamientos (0.2 M lactosa + 1.5 M DMSO + 10 % yema de huevo, o DMSO 2 M) con respecto al número de células germinales. GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; F: distribución F; P: probabilidad. Significancia estadística de $P < 0.05$.

	GL	SC	F	P
CG*tratamiento	1	300.1	7.65	0.0326
Residuales	6	235.4		

Anexo F: Formato de muestreo

Tabla 5. Recopilación de datos de organismos seleccionados para la criopreservación de tejido gonadal.



PROYECTO RÓBALO

Registro de campo para el muestreo biológico de *Centropomus viridis*

Responsable del muestreo:	Galilea Fonseca	Nota	Criopreservación de tejido gonadal
Fecha del muestreo:	27/09/2021	Lugar de muestreo	Maricultura del Pacífico
Hora de inicio del muestreo	10:05:00 a.m.	Término del muestreo	10:41 a. m.
Talla 4: 1.5-2kg			

G ó n a d a s

No.	Longitud total (cm)	Longitud horquilla (cm)	Peso total (kg)	Peso (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)
1	59	54	1.50	0.94	5.50	0.40
2	61	56	2.02	0.80	5.60	0.50
3	67	61	2.14	0.85	8.00	0.50
4	68	62	2.06	0.66	8.00	0.40
5	64	59	2.06	0.59	5.25	0.40
6	64	59	1.88	0.57	7.50	0.40
7	61	53	1.68	0.52	5.25	0.50
8	73	63	2.12	0.62	7.50	0.30
9	61	58	1.58	0.76	5.80	0.40
Promedio	64.22	58.33	1.89	0.70	6.49	0.42

