



Universidad de León

---

**Aplicación de nuevas herramientas  
biotecnológicas en la línea germinal del pez  
cebra (*Danio rerio*).**

Application of new biotechnological tools in  
zebrafish (*Danio rerio*) germ line.

---

**Departamento de Biología Molecular**

**Memoria presentada por la Licenciada en Biología Marta Fernández  
Riesco para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de León**

León, 2013

## **Financiación**

---

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral Marta Fernández Riesco ha sido beneficiaria del programa “Contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria” de la Consejería de Educación (Junta de Castilla y León) y del Fondo Social Europeo. Junta de Castilla y León (E-24-2009-0036681).

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Ramón Areces y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN AGL2009-06994).



**INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS**  
**(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

La Dra. D. Vanesa Robles Rodríguez, Directora de la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas en la línea germinal del pez cebra (*Danio rerio*)” realizada por la Lcda. Dña. Marta Fernández Riesco, en el Departamento de Biología Molecular, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005,

en León a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

La Directora de la Tesis Doctoral

**Fdo: Vanesa Robles Rodríguez**

*A mis padres,*

***"Caminando en línea recta***

***"no puede uno llegar muy lejos"***

El Principito

## **Índice**

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>  | <b>1</b>  |
| <br>   |           |
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>   | <b>5</b>  |
| <br>   |           |
| <b>1. El pez cebra como especie modelo en ciencia:</b>   |           |
| el empleo de ESCs y PGCs como herramienta biotecnológica.....  | 6         |
| <b>2. Desarrollo de la línea germinal en teleósteos.....</b>   | <b>7</b>  |
| 2.1 Especificación de las PGCs y desarrollo de marcadores para su identificación.....  | 7         |
| 2.2 Migración de las PGCs hacia el Reborde Genital.....  | 11        |
| <b>3. Cultivo y generación <i>in vitro</i> de PGCs.....</b>  | <b>16</b> |
| 3.1 Cultivo de PGCs .....  | 16        |
| 3.2 Generación <i>in vitro</i> de PGCs a partir de células embrionarias.....   | 18        |
| <b>4. Trasplante de PGCs.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>5. Criopreservación de PGCs.....</b>  | <b>23</b> |
| 5.1 Principios básicos de la criopreservación.....   | 25        |
| 5.2 Evaluación del daño genético tras la criopreservación.....   | 26        |
| <b>Bibliografía.....</b>   | <b>29</b> |
| <br>   |           |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>45</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO 1: Diseño de protocolos de criopreservación y vitrificación de PGCs de pez cebra.....</b>                        | <b>48</b> |
| <br>   |           |
| Evaluation of zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols..... | 49        |
| Abstract.....  | 50        |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| Introduction.....         | 51 |
| Material and Methods..... | 52 |
| Results.....              | 56 |
| Discussion.....           | 60 |
| Acknowledgements.....     | 63 |
| References.....           | 64 |

**CAPÍTULO 2: Análisis del efecto de la criopreservación sobre promotores,  
genes y transcritos concretos.....68**

|  |    |
|--|----|
| <b>Quantification of DNA damage by q-PCR in cryopreserved<br/>zebrafish Primordial Germ Cells.....69</b> |    |
| Abstract.....  | 70 |
| Introduction.....  | 71 |
| Material and Methods.....  | 72 |
| Results.....   | 75 |
| Discussion.....  | 77 |
| Acknowledgements.....  | 79 |
| References.....  | 79 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic<br/>Changes in Zebrafish Genital Ridges.....83</b> |    |
| Abstract.....  | 84 |
| Introduction.....  | 85 |
| Material and Methods.....  | 87 |
| Results.....   | 93 |

|  |            |
|--|------------|
| Discussion.....  | 97         |
| Acknowledgements.....  | 101        |
| References.....  | 101        |
| <br>   |            |
| <b>CAPÍTULO 3: Generación <i>in vitro</i> de PGCs.....</b>         | <b>108</b> |
| <br>   |            |
| <b><i>In vitro</i> generation of zebrafish PGC-like cells.....</b> | <b>109</b> |
| Summary.....   | 110        |
| Introduction.....  | 111        |
| Results.....   | 112        |
| Discussion.....  | 120        |
| Experimental Procedures.....                                       | 124        |
| Acknowledgements.....  | 129        |
| References.....  | 129        |
| <br>   |            |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>  | <b>135</b> |
| <br>   |            |
| <b>Bibliografía.....</b>   | <b>150</b> |
| <br>   |            |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>157</b> |
| <br>   |            |
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>  | <b>159</b> |
| <br>   |            |
| <b>ANEXOS.....</b>   | <b>163</b> |

## **Resumen**

---

Durante los últimos años, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha consolidado como especie modelo en ciencia. Esto ha traído consigo el aumento exponencial de las líneas transgénicas y mutantes que han sido generadas en esta especie. Dichas líneas tienen un enorme valor biotecnológico y han de ser conservadas. A pesar de que la criopreservación espermática puede realizarse con éxito, esta técnica sólo permite la conservación del genoma paterno. En el **primer capítulo** de esta Tesis Doctoral se aborda la criopreservación de las células primordiales germinales (PGCs) como alternativa posible a la criopreservación del esperma. La conservación de dichas células, garantizaría la preservación de ambos genomas (materno y paterno) y tras el trasplante en un embrión o larva receptora, aseguraría la colonización del reborde genital y la contribución a la línea germinal. En este capítulo, se presentan diversos protocolos de criopreservación y vitrificación de estas células que tras la descongelación proporcionan viabilidades semejantes al control sin criopreservar. Se ha constatado que los protocolos seleccionados preservan la integridad del ADN en términos de fragmentación. Además, se ha evaluado la funcionalidad de las PGCs, mediante la técnica de *time lapse*, confirmando que tras la criopreservación dichas células mantienen la capacidad de emisión de pseudópodos que les permitirá colonizar el reborde genital en la larva receptora. Estos estudios constituyen el primer artículo derivado de esta Tesis Doctoral, que ha sido publicado en *Theriogenology*.

El **segundo capítulo** está constituido por dos artículos científicos (*Journal of Applied Ichthyology* y *PLoS One*) en los que se realiza una valoración molecular del efecto de la criopreservación sobre regiones genómicas, genes y promotores génicos concretos, así como sobre transcritos clave en la biología de las células objeto de estudio (PGCs). Estos trabajos han utilizado por primera vez, como método para valorar un protocolo de criopreservación, la técnica de PCR a tiempo real (qPCR) para la cuantificación del número de lesiones en secuencias o genes concretos. Esta novedosa tecnología ha permitido discriminar diferentes regiones y genes con mayor susceptibilidad al daño producido por la criopreservación. Además, se ha constatado el efecto de la criopreservación en la disminución o incluso desaparición de transcritos. Dicho efecto puede explicarse por la inducción de hipermethylación en los

promotores de algunos de los genes estudiados, pero, sorprendentemente, dicho efecto también ha sido constatado en células espermáticas (transcripcionalmente inactivas). Estos hechos han motivado que, por primera vez, haya sido emitida una hipótesis que contempla el efecto de la criopreservación sobre la desestabilización de transcritos mediante la alteración de la interacción de dichos ARNms con proteínas estabilizadoras. Es importante destacar que tanto las técnicas utilizadas como los resultados obtenidos tienen gran relevancia en otros campos, como el de la reproducción humana, en el que es frecuente la criopreservación de las células germinales y embriones.

En el **tercer** y último **capítulo** de esta Tesis Doctoral se estudia la generación *in vitro* de PGCs de pez cebra. La posibilidad de disponer de un método de diferenciación de células embrionarias hacia PGCs solventaría el único problema que presenta este tipo celular para su empleo en la creación de bancos de germoplasma, que es el escaso número de estas células presente en el embrión. Pero lo que es más importante, sería una poderosa herramienta biotecnológica que permitiría, por vez primera en peces, realizar tecnologías de *knock-out*, y *knock-in* en cultivos de células embrionarias (fácilmente manipulables genéticamente) y tras su selección forzar su diferenciación hacia PGCs. El trasplante de una sola de estas PGCs en una larva estéril permitiría la reconstitución la gónada y daría lugar a todos los gametos del individuo transplantado, garantizando así la trasmisión de la modificación genética a la progenie. La diferenciación de células embrionarias hacia PGCs ha sido lograda en humano y en ratón, pero nunca ha creído ser posible en peces. La razón por la que este proceso no se ha considerado factible es la diferencia en el proceso de especificación de las PGCs que existe entre las especies anteriormente citadas y cualquier especie de telósteo. En humano y en ratón, la diferenciación de PGCs es un mecanismo inducible mientras que en peces, la determinación de las PGCs depende de la existencia del germoplasma heredado por vía materna. No obstante, en el cuarto trabajo derivado de esta Tesis Doctoral, que constituye el tercer capítulo de la misma, se ha logrado, por vez primera en teleósteos, la generación *in vitro* de PGCs. La caracterización de las células diferenciadas se ha llevado a cabo mediante estudios de expresión y trasplante, y se ha confirmado mediante análisis por citometría de flujo y análisis de

Imagen. Además se realizaron estudios de ciclo celular que confirmaron que el aumento de las PGCs en cultivo se debió a un proceso de diferenciación y no a un incremento en la proliferación celular. A pesar de que este trabajo rompe con toda idea preconcebida sobre la imposibilidad de generar PGCs *in vitro* en peces, consideramos que no contradice los estudios previos sobre la especificación *in vivo*. De hecho, en este trabajo argumentamos que es debido a los cambios que el cultivo *in vitro* ejerce sobre la población de células madre embrionarias (principalmente cambios a nivel epigenético y de expresión) los que permiten que, contra todo pronóstico, dichas células puedan ser forzadas a diferenciarse hacia PGCs. Consideramos que un posible aumento en la expresión de genes codificantes para proteínas estabilizadoras de ARNm podría explicar que la diferenciación sea posible. DND-1 es una proteína que se une a ARNms cruciales para la supervivencia de PGCs. De hecho, el bloqueo del ARNm *dnd-1* con un morfolino genera un individuo estéril. Consideramos que si el cultivo *in vitro* generase una sobreexpresión de este gen podría explicarse que células que en embrión en desarrollo no se diferencian hacia PGC puedan hacerlo *in vitro*. De hecho, nuestros resultados avalan esta hipótesis, al detectar un aumento de *dnd-1* con el empleo de los tratamientos de diferenciación, y en particular con DFT4, el tratamiento seleccionado como óptimo entre los ensayados.

## **Introducción**

---

## **1. El pez cebra como especie modelo en ciencia: el empleo de ESCs y PGCs como herramienta biotecnológica.**

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo consolidado en Biología del Desarrollo debido a que posee tiempos de generación cortos, alta prolificidad, rápido desarrollo embrionario y fecundación externa, que junto con la transparencia de los embriones, permite observar el desarrollo embrionario (Fishman, 2001; Nusslein-Volhard, 1994; Streisinger et al., 1981). Recientemente, este modelo ha adquirido gran importancia otros campos científicos, ya que ha resultado ser un excelente modelo en el estudio de diversas patologías y enfermedades humanas, entre las que se encuentra el cáncer (Konantz et al., 2012; Mimeault and Batra, 2013).

El desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas ha sido decisivo en la consolidación de este organismo como modelo. Por ejemplo, la creación de individuos *knockdown* mediante el uso de morfolinos (oligonucleótidos antisentido creados sintéticamente que inhiben la expresión de manera transitoria) ha tenido un papel clave en estudios de funcionalidad de genes concretos (Currie, 1996; Ekker and Larson, 2001; Golling et al., 2002; Nasevicius and Ekker, 2000; van Eeden et al., 1999). El pez cebra también es un excelente modelo en estudios de toxicidad, y en el descubrimiento de nuevos fármacos. Como ejemplo, la línea transgénica *TG(fli-1:EGFP)* (Lawson and Weinstein, 2002) es una valiosa herramienta para valorar la inhibición de la angiogénesis en el estudio de fármacos antitumorales (Lee et al., 2009). Otras técnicas, como la transferencia nuclear, han sido aplicadas con éxito en esta especie (Lee et al., 2002) pero sólo recientemente se ha logrado realizar mutagénesis dirigida mediante el uso de nucleasas de dedos de zinc (*Zinc finger nucleases*, ZFNs) (Schier, 2008; Yannick Doyon et al., 2008), artificial *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) (Bedell et al., 2012; Sander et al., 2011; Xiangdong Meng et al., 2008) o el sistema CRISPR/Cas9 (Hwang et al., 2013). No obstante, el empleo de estas tecnologías tan novedosas se ve limitado a este organismo, puesto que no han sido utilizadas con éxito sobre cultivos estables de células madre embrionarias (*Embryonic Stem Cells*, ESCs). Algunos estudios confirman la posibilidad de cultivar células pluripotentes de pez cebra (Fan et al., 2004; Fan et al., 2004; Fan et al., 2006; Robles et

al., 2011), e incluso logran modificar genéticamente dichas células por recombinación homóloga (Fan et al., 2006). No obstante, la contribución de esas células modificadas a la línea germinal, una vez trasplantadas en el embrión receptor, es escasa. Si dichas modificaciones pudieran llevarse a cabo en las células primordiales germinales (*Primordial Germ Cells*, PGCs), su contribución a la línea germinal sería del 100%. Las PGCs, precursoras de las células germinales, son las únicas células del embrión en desarrollo capaces de transmitir a la descendencia la información genética tanto materna como paterna (Goto-Kazeto et al., 2010). De esta forma, las PGCs que constituyen originalmente un pequeño número de células diploides, aseguran la creación de individuos nuevos, dando lugar a los gametos masculinos y femeninos (Braat et al., 1999). No obstante, la manipulación genética de las PGCs es compleja puesto que a pesar de que estas células pueden mantenerse en cultivo son mucho más difíciles de transfectar que las células embrionarias.

## **2. Desarrollo de la línea germinal en teleósteos**

### **2.1 Especificación de las PGCs y desarrollo de marcadores para su identificación.**

Los estudios clásicos sobre el desarrollo de la línea germinal en peces se han centrado en tres aspectos clave: origen embrionario, proliferación y migración de la línea germinal (Johnston, 1951).

La ausencia de marcadores de PGCs en peces hizo que en un primer momento la identificación de la línea germinal se basara en una simple identificación morfológica, usando microscopía óptica y electrónica. En comparación con las células somáticas, las PGCs presentan un tamaño mayor (10-20  $\mu\text{m}$ ) y un núcleo de mayores dimensiones (6-10  $\mu\text{m}$ ). Los análisis ultraestructurales de las PGCs, han revelado la presencia de una estructura denominada “nuage” o germoplasma (Braat et al., 1999), que aparece como una inclusión citoplasmática electro-densa, a menudo observada en asociación con las mitocondrias (Eddy, 1975). Esta estructura, ha sido observada además de en las PGCs, en las oogonias, oocitos, espermatogónias, espermatocitos y espermátidas y ha sido

descrita en al menos 8 filos animales (Eddy, 1975), lo que sugiere que tiene un papel clave en el desarrollo de la línea germinal. Se ha demostrado que estas estructuras electro-densas representan un almacenamiento del ARN y de las proteínas necesarias para la diferenciación y/o determinación de las PGCs, probablemente actuando a niveles de regulación de la transcripción y traducción de la línea germinal (Seydoux et al., 1996; Seydoux and Dunn, 1997; Seydoux and Strome, 1999; Williamson and Lehmann, 1996). Uno de los componentes básicos del germoplasma es *vasa*. VASA es una ARN helicasa, inicialmente identificada en *Drosophila* (Hay, Jan, & Jan, 1988). En esta especie modelo, se comprobó que dicho marcador es de herencia materna, puesto que mutaciones en el gen *vasa* produjeron, en los mutantes femeninos, embriones carentes de PGCs (Schupbach and Wieschaus, 1986). La identificación de *vasa* como el primer marcador de la línea germinal en el pez cebra (Olsen et al., 1997), supuso un avance significativo en el estudio desde un punto de vista molecular de la línea germinal en peces (Braat et al., 1999; Braat et al., 2000; Knaut et al., 2000; Krovel and Olsen, 2002; Yoon et al., 1997).

En pez cebra, el transcripto *vasa* se identificó por hibridación *in situ* en oocitos (Braat et al., 1999), y en huevos fertilizados (Braat et al., 1999; Yoon et al., 1997). Estos análisis mostraron que en el estadio de cuatro células el ARN de *vasa* está enriquecido en cuatro posiciones a lo largo de los planos de división (Figura 1). No obstante, además de estar presente en las citadas agrupaciones, *vasa* también es expresado en algunas células embrionarias. Las moléculas de ARN de *vasa* que están localizadas en los surcos de segmentación son heredadas por las PGCs, mientras que el resto de los ARN de *vasa* desaparecen, presentando por tanto una menor estabilidad. Knaut et al en 2002 (Knaut et al., 2002) ya previeron que podría existir un mecanismo de protección selectiva del ARN de *vasa* en las células germinales. Hoy en día es sabido que existen unas regiones en el extremo 3' de la molécula ARN, denominadas 3'UTR, que no se traducen, y que son claves para esta estabilidad. Estas regiones 3'UTR suelen tener un elevado grado de conservación. Por ejemplo, la región 3'UTR del ARN de *vasa* de pez cebra presenta una gran homología con la de *Xenopus*. Es sabido que los ARNm de *vasa* (Wolke et al., 2002) y *nanos1* (Saito et al., 2006) son selectivamente degradados en las células somáticas (cuyos ARNm no presentan la región 3'UTR) pero

son estables y traducidos en las PGCs. Además, también existen proteínas de unión al ARN como el DND-1 que evitan la degradación del mismo por los microARNs, permitiendo así la estabilización de ARNm fundamentales para las PGCs (Kedde et al., 2007).

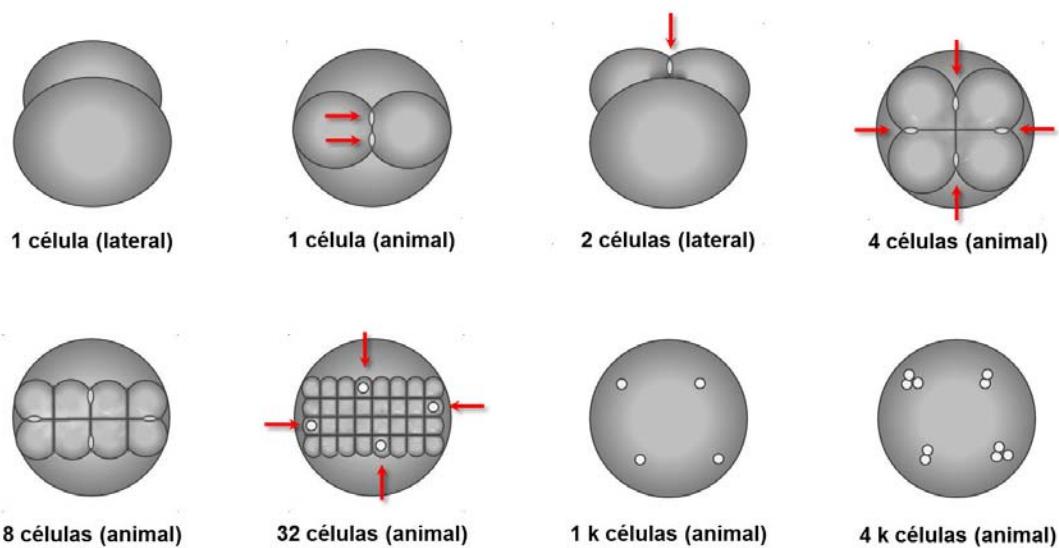
En el pez cebra, el número de células que contienen ARN de *vasa* no aumenta hasta el estadio de 1000 células (1K) (cuatro primeras horas del desarrollo) (Figura 1). Este hecho se debe a la herencia asimétrica de la estructura del germoplasma, que sólo es heredada por uno de los dos blastómeros en división, manteniendo el número de células que contienen el ARN de *vasa* constante (Knaut et al., 2000). En estadios posteriores al de 1000 células, el germoplasma se vuelve más difuso y se extiende en el citoplasma de las células que lo albergan. A partir de este momento, el germoplama es simétricamente distribuido entre los blastómeros en división, dando como resultado un aumento en el número neto de células que contienen el ARN de *vasa* (Yoon et al., 1997). En el estadio de esfera, justo antes de la transcripción zigótica de *vasa*, el número de células que contienen el ARN de *vasa*, se encuentra entre 25 y 50 (Braat et al., 1999; Knaut et al., 2002).

El gen *vasa* ha sido clonado en diferentes especies de peces (Shinomiya et al., 2000; Yoshizaki et al., 2000). Su secuencia es muy conservada, no sólo con la de otros teleósteos sino también con especies con gran distancia evolutiva como el ratón (Chuma et al., 2003). Esto ha permitido la creación de anticuerpos recombinantes que reconocen la proteína VASA en diferentes especies de peces (Xu et al., 2005). La caracterización de los marcadores moleculares de las células germinales en peces ha ido aumentando progresivamente, y otros marcadores como *nanos*, *dnd-1*, *dazl* y *sdf1/cxcr4b* han sido descubiertos. El conocimiento de estos marcadores moleculares, ha permitido generar diversas líneas transgénicas para la detección *in vivo* de las PGCs. En peces, la generación de transgénicos presenta algunas dificultades. La introducción de una construcción génica mediante microinyección tiene como resultado una muy baja integración en el genoma del hospedador, que acaba resultando en una escasa eficiencia de la producción de transgénicos. Consecuentemente, aunque se han generado líneas transgénicas en peces, estas suelen estar restringidas a las especies modelo: pez cebra y medaka (*Oryzias latipes*). En el caso del pez cebra, la generación

de la línea transgénica *vasa*, *vasa EGFP zf45 strain, tg{vas:egfp}* (Krovel and Olsen, 2002), se realizó clonando el locus de *vasa* y sus regiones reguladoras unido a la proteína verde fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) (Krovel and Olsen, 2002). Como excepción a la creación de transgénicos asociados sólo a organismos modelo, está el caso de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En este organismo se ha conseguido crear transgénicos con el promotor de *vasa* (VAS) y *nanos* (NOS), ambos de expresión específica en la línea germinal. Combinaciones entre NOS o VASA y GFP o RFP (*Red Fluorescent Protein*) respectivamente, han generado construcciones transgénicas que se han utilizado en esta especie, en medaka y en pez cebra (Li et al., 2009).

Otras técnicas de marcaje de las PGCs han sido desarrolladas por primera vez en el pez cebra. Por ejemplo, la técnica basada en la microinyección de una construcción de ARNm con un *reporter* (GFP o RFP). El *reporter* de ARN es sintetizado como una fusión de la región 3'UTR de un marcador de la línea germinal como puede ser *nanos* (Ciruna et al., 2002; Koprunner et al., 2001). El 3'UTR *nos1* controla la expresión específica en varias especies de peces (Herpin et al., 2007; Saito et al., 2006). Esta técnica de localización de PGCs (*Localized RNA expression*, LRE) mediante la microinyección de construcciones como la anteriormente citada (*GFPnos3'UTR*) no permite la expresión estable que presenta una línea transgénica, pero presenta numerosas ventajas. Además de la rapidez y la simplicidad, esta herramienta posee la ventaja adicional de la versatilidad: una construcción para la localización de las PGCs de una especie, puede ser utilizada con éxito en otras especies de peces. Esto ha sido demostrado con la construcción de pez cebra *nanos 3'UTR*, que marcó con éxito PGCs de embriones de medaka tras su microinyección (Herpin et al., 2007).

El descubrimiento de los diferentes marcadores en las PGCs del pez cebra, ha supuesto una auténtica revolución en el avance hacia la identificación y caracterización de estas PGCs a lo largo del desarrollo embrionario, siendo una valiosa herramienta en el estudio del modo de determinación de estas PGCs.



**Figura 1. Especificación de las PGCs en pez cebra.** Esquema de la distribución del ARN de *vasa* en la línea germinal durante el desarrollo. El ARN de *vasa* se localiza en el estadio de cuatro células a lo largo de los dos primeros planos de división (flechas rojas). Los cuatro cúmulos se mantienen hasta el estadio de 1000 células (1 K). En el estadio 4 K, las células que heredan el ARN de *vasa*, empiezan a dividirse y el número de PGCs aumenta.

## 2.2 Migración de las PGCs hacia el reborde genital

En la mayoría de los animales, las PGCs aparecen durante el desarrollo embrionario temprano y migran al reborde genital (*Genital Ridge*, GR) en estadios más avanzados del desarrollo embrionario. En las especies en las que esta migración ha sido estudiada, se han encontrado patrones de similitud. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo en mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), ratón (*Mus musculus*) y pez cebra (*Danio rerio*).

En *Drosophila*, las células somáticas dirigen la translocación inicial de las PGCs junto con la invaginación del intestino primordial posterior, siendo las PGCs conducidas pasivamente junto con las células del endodermo. Sin embargo, en la siguiente fase, las PGCs migran activamente por el intestino. Este proceso aún es dependiente de las células somáticas que forman los espacios intercelulares junto con la monocapa epitelial (Callaini et al., 1995; Jaglarz and Howard, 1995). Se han identificado diferentes moléculas necesarias para la migración activa de las PGCs (Coffman et al., 2002; Moore

et al., 1998; Starz-Gaiano et al., 2001; Stein et al., 2002; Van Doren et al., 1998; Zhang et al., 1997). Por ejemplo, la migración activa a través del epitelio intestinal depende de la función de *trapped in endoderm-1* (Kunwar et al., 2003). Este gen, es expresado en las PGCs y codifica para el dominio receptor de las citoquinas. En pez cebra y ratón se ha demostrado que la señalización a través de estos tipos de receptores podría representar un mecanismo evolutivamente conservado para la señalización de la migración en las PGCs. Además, la migración *trans*-epitelial requiere la función de pequeñas GTP-asas Rho1, que permiten las alteraciones específicas que tendrán lugar en el citoesqueleto de actina. Tras atravesar el epitelio intestinal, dos actividades aparentemente independientes y distintas guían el movimiento de las PGCs; *Wunen* and *Wunen-2*, homólogos a las fosfatasas de lípido-fosfato de mamíferos, que generan un ambiente repulsivo que dirige las PGCs a través del mesodermo (Coffman et al., 2002; Moore et al., 1998; Starz-Gaiano et al., 2001; Van Doren et al., 1998; Zhang et al., 1997). Después, una 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCoAR) es responsable de generar un ambiente atractivo en la región diana (Van Doren et al., 1998). En conclusión, estos estudios remarcán la importancia de las interacciones entre las células somáticas y la migración de las PGCs. Las células somáticas, pueden tener un papel permisivo, por ejemplo alterando el epitelio intestinal y por ello permitiendo la migración de las PGCs, o por el contrario pueden tener un papel indicativo, por ejemplo, produciendo señales atractivas y repulsivas.

En ratón, tras la invaginación del endodermo para formar el intestino posterior, las PGCs se encuentran a lo largo de la cara ventral del órgano en formación. Una vez abandonan esta posición, las PGCs migran activamente a través de la cara dorsal del intestino y llevan a cabo una migración activa hacia el GR (Anderson et al., 2000; Molyneaux et al., 2001). Al igual que en *Drosophila*, el papel de los tejidos somáticos como soporte directo para la migración de las PGCs también ha sido demostrado en ratón. Por ejemplo, las PGCs que han perdido la integrina-b1 no son capaces de colonizar la gónada eficientemente (Anderson et al., 1999). Este hallazgo pone de manifiesto la importancia de las interacciones entre las PGCs y la matriz extracelular. Es más, los últimos estudios publicados en ratón demuestran que, la proliferación de las PGCs es regulada por las células somáticas del GR durante los diferentes estadios

del desarrollo gonadal. Las células somáticas del GR son probablemente dispensables para la migración direccional, pero se requieren para el posicionamiento preciso de las PGCs en el paso final de migración (Chen et al., 2013).

Numerosas moléculas adicionales han sido relacionadas con el direccionamiento de las PGCs en ratón. Por ejemplo el receptor tirosin quinasa c-kit. Este es expresado en las PGCs mientras que su ligando, *Steel*, que es expresado por las células somáticas a lo largo de la ruta de migración. Se ha sugerido que estas interacciones ligando-receptor son necesarias para la migración y supervivencia de las PGCs (De Miguel et al., 2002; Matsui et al., 1990). Otra molécula importante para la señalización de la migración de las PGCs en ratón es el la quimiocina: factor 1 derivado de las células estromales (*Stromal cell-derived factor 1*, SDF-1). En el contexto de la migración de las PGCs, esta molécula fue originariamente identificada en el pez cebra (Doitsidou et al., 2002). El receptor para SDF-1 es el dominio CXCR4 de la proteína 7-TM y es expresado en las células germinales de ratón, mientras que la expresión de su ligando es alta en los sitios diana para la migración de las PGCs (GR y gónada) (Ara et al., 2003; Molyneaux et al., 2003). Los requerimientos para la colonización de la gónada por las PGCs fueron demostrados estudiando la migración en ratones deficientes en la actividad de este receptor (Molyneaux et al., 2003) o de su ligando (Ara et al., 2003). En ambos casos, el número de PGCs que colonizaron el reborde genital fue inferior que en ratones control. Los autores demostraron, que dichas mutaciones afectaron no sólo al proceso de migración sino que también redujeron la supervivencia y proliferación celular.

En resumen, a pesar de las diferencias entre los embriones de ratón y *Drosophila* y el diferente modo de señalización de PGCs, el patrón de migración de estas células murinas depende de las interacciones permisivas con las células somáticas y de las señales inductivas que las guían hacia el lugar diana (GR) (Tabla 1).

En el pez cebra el proceso de migración es un proceso único. A diferencia de la migración de las PGCs iniciada en un solo punto descrita en ratón y *Drosophila*, las PGCs del pez cebra tienen cuatro posiciones orientadas con respecto al eje del embrión (Yoon et al., 1997). Independientemente de esta inusual posición de

orientación, prácticamente todas las PGCs llegan al sitio de inicio de desarrollo de la gónada durante el primer día de desarrollo embrionario. Los análisis preliminares sobre la migración de las PGCs en embriones de pez cebra demostraron que durante el proceso de migración de las células predomina un desplazamiento activo (Knaut et al., 2002; Weidinger et al., 2002). A diferencia de lo que ocurre en *Drosophila* y aves, cuyas PGCs son desplazadas pasivamente a través del movimiento de los tejidos o células adyacentes durante el desarrollo del intestino posterior y la translocación vía sistema circulatorio, respectivamente (Warrior, 1994). Además, analizando la migración de las PGCs en mutantes, se confirmó que el desarrollo anormal de los tejidos diana resulta en una migración anormal de las PGCs. Por el contrario, el desarrollo anormal de los tejidos de origen, no tuvo consecuencias en este proceso (Weidinger et al., 2002).

Por último, otra peculiaridad de este proceso migratorio único de las PGCs en pez cebra consiste en que las PGCs, en lugar de dirigirse directamente al sitio diana final, se agrupan primero en sitios diana intermedios para luego migrar todas juntas al GR que alcanzan durante el primer día de desarrollo.

Todos estos principios de migración de PGCs en el pez cebra fueron demostrados a través de experimentos de trasplante. Por ejemplo, se constató que PGCs transplantadas en una región destinada a dar lugar a la estructuracefálica eran, sin embargo, capaces de colonizar la gónada (Sano et al., 2005). Mediante estudios de monitorización de las PGCs se concluyó que el movimiento de las PGCs depende de las señales de orientación enviadas por las células somáticas, que las señales direccionales son atractivas y que en el camino al GR, las células pasan a través de dominios en el embrión que constituyen los objetivos intermedios previos a la colonización del GR (Deshpande and Schedl, 2005; Sano et al., 2005) (Tabla 1). Estas observaciones están en concordancia con la idea de que las PGCs del pez cebra son guiadas por señales de atracción emitidas por las células somáticas a través de su recorrido hacia el GR. Otras citoquinas como SDF-1a (Doitsidou et al., 2002) y SDF-1b (Knaut et al., 2003) han sido sugeridas como ligandos de CXCR4B en la migración de las PGCs. Para avalar la idea de que las PGCs son atraídas hacia los lugares donde hay expresión de estas citoquinas, se manipularon genéticamente células somáticas para expresar SDF-1a (Doitsidou et al.,

2002) o SDF1-b (Knaut et al., 2003) en posiciones ectópicas, y se constató que las PGCs eran atraídas hacia dichas posiciones.

SDF-1, y su receptor transmembrana-7 CXCR4B, desempeñan un papel relevante en la migración de las PGCs independientemente del organismo de estudio (Kunwar et al., 2003; Molyneaux et al., 2003; Stebler et al., 2004). Sin embargo, una diferencia importante entre el papel del SDF- 1 en pez cebra y los demás organismos, es que en el pez cebra, este citoquina presenta un papel central en la migración de las PGCs, mientras que el escenario de migración en otras especies es mucho más complicado, tal como se ha explicado anteriormente. La población de PGCs que coloniza el primordio de gónada tras este fenómeno de migración, será el origen de los gametos femeninos y masculinos. La proliferación de las PGCs a través de divisiones mitóticas y su diferenciación dará lugar a las oogonias o espermatogonias dependiendo del sexo del individuo. Y finalmente, con la última división mitótica, las gonias entrarán en meiosis para dar lugar a los oocitos y espermatocitos.

**Tabla 1. Migración de PGCs en *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Danio rerio*: principales moléculas de señalización.**

| Especie                        | Moléculas Importantes   | Tipo de molécula  | Función  | Principales características de la migración   |
|--------------------------------|---|---|--|---|
| <i>Drosophila melanogaster</i> | <i>trapped in endoderm-1</i><br><i>GTP-asas Rho 1</i><br><i>Wunen and Wunen 2</i><br><i>HMGCoAR</i> | Receptor de citoquinas<br>Hidrolasas<br>Homólogos a las fosfatases de lípido-fosfato<br>Reductasa | Señalización en la migración de las PGCs<br>Alteraciones en el citoesqueleto de actina<br>Creen ambiente repulsivo; dirige a las PGCs<br>Genera un ambiente atractivo en la región diana | Interacciones permisivas con las células somáticas<br>Señales induktivas hacia el lugar diana |
| <i>Mus musculus</i>            | <i>Steel/Tiroxina quinasa c-kit</i><br><i>SDF1/cxcr4b</i>   | Ligando/receptor<br>Ligando/receptor  | Papel principal de esta molécula sobre la motilidad de las PGCs<br>Señalización y proliferación de las PGCs  |   |
| <i>Danio rerio</i>             | <i>SDF1/cxcr4b</i><br><i>Proteínas Gi</i><br><i>PI3K</i>  | Ligando/receptor<br>Proteína<br>Fosfoquinasa  | Migración direccional y atracción de las PGCs hacia estas citoquinas<br>Migración direccional<br>Reducción de la polaridad y migración de las PGCs                                       | Diferentes puntos de origen de migración<br>Papel central del SDF1 en la migración            |

### 3. Cultivo y generación vitro de PGCs

El cultivo y la generación *in vitro* de PGCs han sido logrados con éxito en algunas especies modelo como el ratón (Hayashi et al., 2011; Matsui et al., 1992; Shirazi et al., 2012). En el pez cebra, el cultivo de PGCs no fue logrado hasta el 2008 (Fan et al., 2008) y la generación *in vitro* de *PGC like cells*, no ha sido descrita hasta el momento. Tal como se mencionó con anterioridad, la posibilidad de forzar la diferenciación de ESCs hacia PGCs sería una potente herramienta biotecnológica. Dicha herramienta permitiría aprovechar las ventajas que presentan los dos tipos celulares: la mayor susceptibilidad a la manipulación genética que presentan las ESCs y la contribución a la línea germinal, que quedaría garantizada con el trasplante de PGCs (Saito et al., 2008).

#### 3.1 Cultivo de PGCs

Las células embrionarias germinales se aislaron por primera vez en ratón. Matsui y colaboradores (Matsui et al., 1992), cultivaron PGCs de ratón en un medio suplementado con el factor de células madre (*Stem Cell Factor*, SCF), el factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia inhibitory factor*, LIF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (*Basic fibroblast growth factor*, bFGF). De esta forma no sólo lograron mantener el cultivo de PGCs sino que consiguieron que dichas células proliferaran. A partir de dichos cultivos, se originaron colonias de células que presentaban las características de las células embrionarias pluripotentes. La pluripotencia celular pudo ser constatada con la microinyección de células en los blastocistos del hospedador y observando su contribución a la línea germinal. Además dicha pluripotencia también fue confirmada mediante la formación de teratomas tras la microinyección de las células en los testículos del ratones inmunodeprimidos (Matsui et al., 1992).

Los cultivos de PGCs también han sido descritos en pollo (van de Lavori et al., 2006). En este trabajo van de Lavori y colaboradores, cultivaron PGCs de la sangre

utilizando *feeders* en presencia de LIF, SCF, bFGF y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like growth factor 1*, IGF-1). En estos cultivos, se encontraron dos poblaciones celulares con comportamientos diferentes. Por un lado, identificaron una primera población que permaneció sin adherirse al sustrato, proliferó y expresó marcadores propios de la línea germinal, como son *vasa* y *dazl*. Dicha población, contribuyó a la línea germinal con una frecuencia variable al ser trasplantada pero no contribuyó en el desarrollo de los tejidos somáticos. La segunda población se identificó al transferir las PGCs cultivadas a un medio en ausencia de bFGF, SCF y suero. Las células se adhirieron y mostraron características de células embrionarias germinales. Más tarde, se pudo constatar que el bFGF es un factor clave en la proliferación de las PGCs *in vitro* (Choi et al., 2010). Esta segunda población estaba constituida por células embrionarias sin capacidad de contribución a la línea germinal, pero con contribución a diferentes tejidos somáticos tras su trasplante en el embrión receptor (van de Lavor et al., 2006).

Años más tarde del experimento de van de Lavor en pollo (van de Lavor et al., 2006), Fan y colaboradores (Fan et al., 2008) lograron el marcaje, aislamiento y posterior cultivo de PGCs de pez cebra. Para ello fue necesaria la generación de una línea transgénica que confirió resistencia a un antibiótico (neomicina) así como la expresión de la RFP bajo el control del promotor de *vasa*. Esta línea transgénica, hizo posible la identificación las PGCs en los cultivos primarios. En estos cultivos de células transgénicas fue posible además la eliminación de las células somáticas de manera gradual, puesto que la resistencia al antibiótico sólo se presentaba en la línea germinal. En este estudio, se valoró el efecto de los factores de crecimiento Kit ligando y SDF-1 sobre la proliferación de las PGCs, para ello, las *feeders* usadas en los cultivos se electroporaron con construcciones para la producción recombinante de estos factores. Se observó un efecto aditivo y positivo de los factores mencionados anteriormente sobre la proliferación de las PGCs *in vitro*. Bajo condiciones óptimas de cultivo, estas PGCs fueron capaces de proliferar durante cuatro meses en cultivo.

### 3.2 Generación *in vitro* de PGCs a partir de células embrionarias

Los primeros experimentos realizados en ratón y en humano para abordar la generación de PGCs y gametos *in vitro* a partir de células madre embrionarias, no lograron la generación de gametos completamente funcionales. Las diferentes metodologías empleadas en estos trabajos se basaban en técnicas de selección más que en una diferenciación directa hacia la línea germinal. De esa forma, se seleccionaban aquellas células que expresaban marcadores de la línea germinal en los cuerpos embrionarios diferenciados espontáneamente tras un tiempo prolongado en cultivo y bajo condiciones no definidas. Consecuentemente, estos primeros intentos, resultaron poco eficientes. (Geijsen et al., 2004; Hubner et al., 2003; Nayernia et al., 2006; Toyooka et al., 2003). Años después, se experimentó un considerable y rápido progreso en el entendimiento de las bases moleculares del desarrollo de las células germinales en humano y en ratón (Eguizabal et al., 2009; Hayashi et al., 2011), incluyendo la especificación de las PGCs. Basándose en estos conocimientos se ha obtenido con éxito la generación de gametos derivados de células madre pluripotentes en cultivo.

En humano, las células madre embrionarias y las células germinales embrionarias procedentes de seis líneas diferentes, fueron diferenciadas eficientemente hacia PGCs *in vitro* mediante la adición de BMP4 (*Bone Morphogenetic Proteins type 4*). Estas *PGC like cells* fueron identificadas por la coexpresión de *vasa* y *oct 4*. Estos experimentos demostraron que la capacidad de generar PGCs *in vitro*, fue similar en el caso de utilizar células madre embrionarias y células germinales embrionarias (Eguizabal et al., 2009).

En ratón, se comprobó que también era posible la inducción de *PGC-like cells* a partir de células madre pluripotentes (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Estos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la familia de proteínas BMP, al constatar la inhibición de la aparición de la población de *PGC like cells* bloqueando la vía de señalización del BMP. Además, se logró inducir el incremento de esta población mediante la adición de BMP4 al medio. En ratón, por tanto, se asumió que esta vía de señalización que opera *in vivo* es la responsable de la inducción de las *PGC like cells* en

cultivo (Hayashi and Surani, 2009). Sin embargo, en estos estudios previos, la funcionalidad de estas *PGC like cells* no fue demostrada de manera definitiva por ensayos de trasplante, por lo que no quedó demostrada su contribución a la línea germinal.

Ha sido recientemente cuando Hayashi y colaboradores (Hayashi et al., 2011), fueron capaces de comprobar la capacidad de transmisión a la línea germinal de las PGCs generadas *in vitro*. La generación de *PGC like cells* en ratón, desde células madre embrionarias, la realizaron mediante un proceso de diferenciación en cultivo que incluía los factores BMP4, BMP8b y EGF. En este sistema de cultivo *in vitro*, la generación de *PGC like cells* comenzó ya a las 24 horas en cultivo. Este trabajo representó un gran avance en la biología reproductiva en ratón y facilitó una herramienta muy valiosa a la hora de poder estudiar los mecanismos implicados en la inducción de las *PGCs like cells* en esta especie.

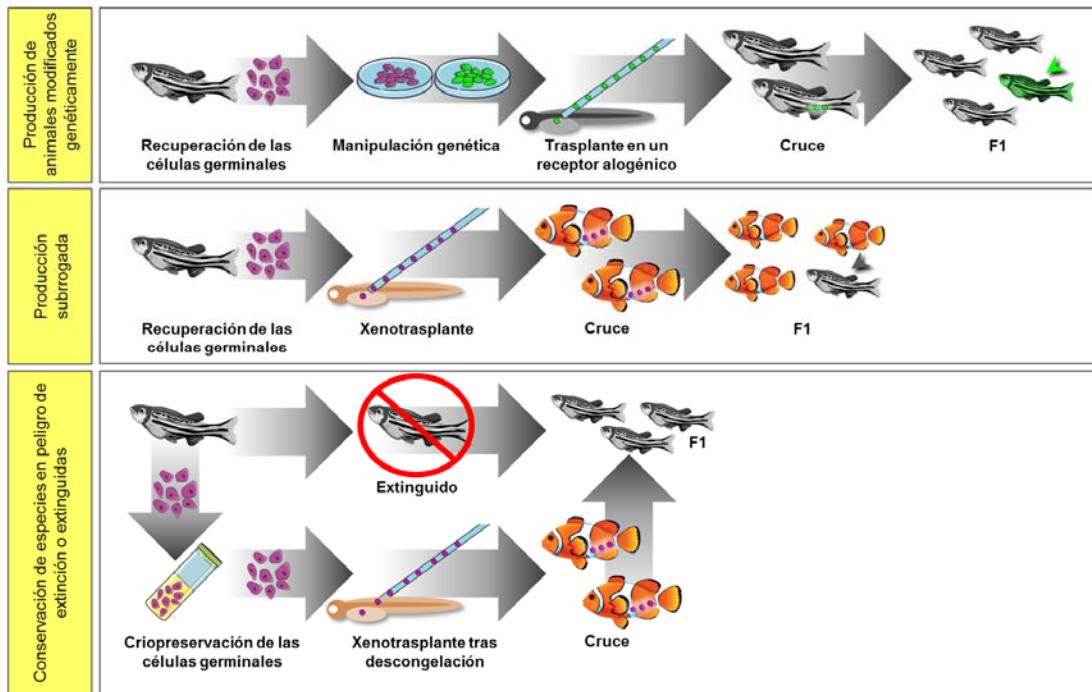
La generación de PGCs de peces *in vitro*, es un objetivo central de esta Tesis Doctoral y no había sido lograda anteriormente. Sin embargo, sí se ha logrado mantener células embrionarias en cultivo. En los primeros cultivos de células embrionarias se demostró cómo estas células eran capaces de producir quimeras de la línea germinal una vez trasplantadas en el embrión receptor (Ma et al., 2001). En estudios posteriores, estos mismos autores desarrollaron un sistema de cultivo que permitía mantener dichas células durante varias semanas y pases en cultivo sin perder las características de pluripotencia. Tras el trasplante, estas células embrionarias contribuyeron a la línea germinal tal como se constató al observar expresión de EGFP en la región gonadal. Además, contribuyeron en diferentes tejidos del embrión hospedador, entre los que se incluía el músculo, hígado, intestino y aleta (Fan et al., 2004; Fan and Collodi, 2006). El mismo grupo de investigación logró además introducir un vector de ADN por recombinación homóloga en los cultivos de células embrionarias (Fan et al., 2004; Fan et al., 2006).

A pesar de la posibilidad de cultivar y modificar *in vitro* las células madre embrionarias, en peces nunca se ha logrado inducir su diferenciación hacia PGCs *in vitro*. En un trabajo reciente, Kobayashi (Kobayashi, 2010) ha explorado la

diferenciación *in vitro* hacia PGCs de aquellas células embrionarias que inicialmente estaban determinadas a serlo (aquellas que poseen el germoplasma de herencia materna), pero sin lograr inducir la diferenciación de aquellas otras que no tenían dicha determinación. La razón por la que la generación de PGCs *in vitro* no ha sido lograda hasta el momento puede radicar en las diferencias en la especificación de las PGCs entre mamíferos y peces (ver sección 3.1). Mientras que en mamíferos es un proceso inducible, en peces está determinado por la herencia materna y es asumido que aquellas células que no estén inicialmente predeterminadas a ser PGCs no pueden ser inducidas a serlo.

#### **4. Trasplante de PGCs**

El trasplante de las PGCs en un embrión o larva receptora, es un paso clave sea cual sea el fin perseguido: (1) un fin biotecnológico, por ejemplo con la generación de líneas transgénicas o mutantes a partir de células manipuladas y diferenciadas *in vitro* y posteriormente transplantadas en el embrión para la colonización del GR; (2) un fin relacionado con la conservación, si estas células se emplean en la generación de bancos de germoplasma; o (3) un fin relevante en el campo de la acuicultura, como es la producción subrogada (Figura 2).



**Figura 2. Resumen de las principales aplicaciones del trasplante en la Biotecnología y Acuicultura:** Creación de animales transgénicos, producción subrogada y conservación de especies en peligro de extinción en peces.

Las PGCs son consideradas como candidatos ideales a la hora de establecer quimeras de la línea germinal. Estas células, son las únicas con potencial de transmitir a la siguiente generación toda la información genética, y por ello tienen un gran valor en la creación de bancos de germoplasma, puesto que con su trasplante se asegura la producción de quimeras de la línea germinal (Kawakami et al., 2010). Las PGCs se caracterizan porque cuando son trasplantadas en la posición adecuada en el embrión hospedador, migran de manera precisa al GR que dará lugar a la gónada de igual forma que lo haría una PGC endógena (ver sección 3.2). Takeuchi y colaboradores describieron por primera vez la producción de quimeras de la línea germinal en salmonídos dando lugar a espermatozoides (Takeuchi et al., 2004) que además lograron fertilizar oocitos dando lugar con éxito a descendencia (Takeuchi et al., 2003) (Takeuchi et al., 2003). En sus estudios, las PGCs fueron cultivadas del GR de las larvas eclosionadas y trasplantadas en la cavidad peritoneal de las larvas receptoras por microinyección. Además, Takeuchi y colaboradores publicaron el establecimiento de un sistema de producción subrogada en salmonídos, mediante el xenotrasplante de

PGCs de trucha arcoíris en salmón japonés (*Oncorhynchus masou*) (Takeuchi et al., 2004). Estos resultados demostraron que las PGCs exógenas fueron satisfactoriamente aceptadas en el microambiente del receptor sin rechazo inmune. Además, este estudio concluyó que el control de la velocidad de maduración de las PGCs depende de la especie receptora y no de la donante. De hecho, las PGCs de trucha arcoíris que normalmente tardan dos años en diferenciarse a espermatozoides, en el salmón japonés (organismo receptor) tan sólo tardan un año.

En varias especies de peces, las quimeras de la línea germinal han sido desarrolladas a través del trasplante de blastómeros y PGCs (Ciruna et al., 2002; Giraldez et al., 2005; Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2003; Takeuchi et al., 2004). Fueron Saito y colaboradores en 2008 (Saito et al., 2008) los que describieron un nuevo método que conseguía un reemplazamiento total de la línea germinal en el embrión hospedador de pez cebra, tras el trasplante de una sola PGC. Con este trabajo se demostró además, que las PGCs trasplantadas tuvieron comportamientos de migración similares en el GR a las PGCs del hospedador. Estos resultados indican que las PGCs del donante responden a señales y están bajo el control del ambiente del embrión hospedador una vez transplantadas, no sólo en lo referente a la maduración (mencionada anteriormente) sino también en lo referente a la migración. En este mismo estudio, se constató que las PGCs que provenían de embriones hospedadores en estadios más avanzados pueden responder a señales de un embrión hospedador menos avanzado. Estos experimentos de trasplante también pusieron de manifiesto que la capacidad de las PGCs para migrar al GR disminuye a medida que avanza el estadio de desarrollo embrionario. En contraposición de estos hallazgos, Okutsu y colaboradores (Okutsu et al., 2005) describieron en trucha cómo una espermatogonia del testículo de un animal adulto, podía ser incorporadas en la gónada de una larva eclosionada. Lo que corrobora que en peces, las células germinales en estadios de desarrollo más avanzados pueden ser incorporadas con éxito en la gónada de una larva recién eclosionada.

Saito y sus colaboradores (Saito et al., 2010) compararon las eficiencias en la formación de quimeras de la línea germinal tras el trasplante de una sola PGC (*Single PGC Transplantation*, SPT) y de blastodermos (*Blastomere Transplantation*, BT), entre

diferentes especies. En el caso del BT, el fenómeno de agregación de células somáticas supuso un problema puesto que impedían la migración de las PGCs, y sólo podía ser evitado cuando el trasplante se realizaba entre individuos de la misma especie. Sin embargo, en el caso del SPT, al no existir este fenómeno de agregación de las células somáticas, la eficiencia de migración de las PGCs fue mucho mayor, incluso cuando el trasplante se realizaba entre distintas especies. En general, con el trasplante de SPT observaron una mayor transmisión de la línea germinal y menor daño en los embriones receptores. Además, la técnica de SPT presenta una gran ventaja con respecto al BT, y es que no requiere un elevado número de embriones donantes. Este es un aspecto importante puesto que durante el período de segmentación los embriones de peces poseen tan sólo docenas de PGCs (Saito et al., 2006) y es especialmente relevante en la producción de quimeras xenogénicas de la línea germinal en especies en peligro de extinción. Por otro lado, en una quimera procedente del trasplante SPT las células germinales pueden ser estudiadas sin contaminación con células somáticas del donante, y estos estudios han permitido observar que la PGC transplantada comienza a proliferar al mismo tiempo de desarrollo (6 o 7 dpf) que las PGCs endógenas del receptor. De esta forma, es posible realizar el seguimiento de una sola PGC en el pez adulto cuando se usan PGCs marcadas provenientes de una línea transgénica o microinyectadas con la construcción vasa unida a GFP.

## **5. Criopreservación de PGCs**

La criopreservación representa una herramienta de gran valor tanto a la hora de preservar el acerbo genético de especies en peligro de extinción como a la hora de mantener de forma indefinida líneas de gran valor biotecnológico. Además, es una técnica ampliamente utilizada en acuicultura, puesto que facilita el suministro constante de animales y permite la creación de bancos de genes útiles en programas de selección.

En peces, la criopreservación de embriones y oocitos no ha sido lograda con éxito, y la gran mayoría de protocolos de criopreservación se han diseñado para la conservación de espermatozoides. Este hecho hace que la conservación se limite a la preservación del genoma paterno. Tanto los oocitos como los embriones de teleósteos comparten características que dificultan su criopreservación: (1) el gran tamaño que resulta en una proporción muy pequeña superficie-volumen, lo que retrasa mucho el flujo de agua y crioprotectores (2) alto contenido en vitelo y (3) elevada sensibilidad a bajas temperaturas. Además, tras la criopreservación, los oocitos necesitan ser sometidos a maduración *in vitro* y fertilización, por lo que unos resultados aceptables en términos de viabilidad, no significan necesariamente un éxito en el proceso.

La criopreservación de blastómeros se presenta como una alternativa para la conservación del genoma diploide de los peces. Se ha descrito que los blastómeros de estadíos más avanzados en el desarrollo presentan una mayor tolerancia a las altas concentraciones de crioprotectores y a la congelación (Harvey, 1983). La criopreservación de blastómeros y su posterior colonización de la gónada tras la descongelación y trasplante se ha logrado con éxito formando quimeras de la línea germinal (Lin et al., 1992). No obstante la contribución de las células transplantadas a la línea germinal es escasa. Es por ello, que la criopreservación de PGCs se presenta como la mejor alternativa para la conservación de ambos genomas en peces. Estas células ya han sido criopreservadas con éxito en algunas especies de peces. Kobayashi y colaboradores (Kobayashi et al., 2007) lograron, con éxito, criopreservar GR conteniendo las PGCs en salmón. Tras la descongelación y trasplante de las PGCs en la cavidad peritoneal de una larva de trucha, se constató que dichas células dieron lugar a oocitos. Los huevos fueron fertilizados con esperma criopreservado dando lugar a una F1 fétil. Higaki y colaboradores (Higaki et al., 2009) mediante la vitrificación de embriones de pez cebra sin vitelo, lograron recuperar PGCs viables que fueron transplantadas con éxito.

La criopreservación de PGCs, representa por tanto una herramienta muy valiosa en la creación de bancos de germoplasma en peces hasta que la criopreservación de embriones se desarrolle.

## 5.1 Principios básicos de la criopreservación

El éxito de un protocolo de criopreservación depende, de los crioprotectores utilizados, de las rampas de congelación-descongelación y de las características inherentes al material biológico objeto de la criopreservación. Hay una gran variedad de crioprotectores que pueden ser clasificados como permeables (DMSO, etilenglicol, propanodiol etc) y no permeables (sacarosa, polivinilpirrolidona etc). El tiempo y la temperatura de exposición, junto con el tipo de crioprotector utilizado, son parámetros que deben de ser considerados en detalle para obtener una apropiada penetrabilidad del compuesto en las células, evitando los efectos tóxicos. Las rampas de congelación-descongelación dependen del protocolo de criopreservación utilizado (por ejemplo, dependen del tiempo de permanencia de la muestra en los vapores de nitrógeno antes de ser sumergida, de la distancia de la muestra a la superficie del nitrógeno líquido etc) pero también del envase utilizado para la criopreservación.

En el caso de los embriones de peces, y a pesar de no haber sido desarrollados protocolos eficientes para su criopreservación, una congelación ultrarrápida (vitrificación) ha sido considerada más eficiente que una criopreservación lenta (Hagedorn et al., 1997). Sin embargo, los protocolos de vitrificación requieren el uso de altas concentraciones de crioprotectores (Arakawa et al., 1990). Las soluciones de vitrificación generalmente están compuestas por una combinación de crioprotectores internos y externos, que hace posible mantener el estado vítreo de la solución a bajas temperaturas y permite reducir la concentración final de cada crioprotector individual, disminuyendo, por tanto, el efecto tóxico sobre las células (Cabrita et al., 2003). La vitrificación ha sido empleada con éxito en embriones de mamífero logrando altas tasas de viabilidad tras el proceso, ya que la congelación y descongelación ultrarrápidas de la muestra ayudan a prevenir la formación de hielo (Kasai and Mukaida, 2004).

El efecto de las proteínas anticongelación (*Antifreeze protein*, AFP) como aditivos en el medio de criopreservación, es algo que se ha estudiado durante los últimos años. Estas proteínas, procedentes, entre otros organismos, de especies de

peces subárticas como el Winter flounder (*Pleuronectes americanus*) se adhieren a la superficie de los cristales de hielo bloqueando su crecimiento. Algunas de ellas se intercalan entre componentes de la membrana plasmática con un posible efecto estabilizador (Fletcher et al., 2001). Algunos autores, han demostrado la actividad beneficiosa de añadir AFPs a la solución crioprotectora en los protocolos de congelación. Robles y colaboradores, vieron que la adición de la AFP I mejoró significativamente la resistencia de los embriones de dorada (*Sparus aurata*) a las bajas temperaturas (Robles et al., 2007). Además el mismo tipo de proteína anticongelación mejoró la viabilidad de los blastómeros de pez cebra tras la criopreservación a una concentración de 10 mg/mL (Martinez-Paramo et al., 2009). Estas proteínas, han sido utilizadas en otras especies con los mismos propósitos, obteniendo resultados muy satisfactorios. Por ejemplo, en embriones ovinos preservados a 4°C en AFP I durante 4 días se ha obtenido una viabilidad semejante al control de embriones frescos (Arav et al., 1993). Diferentes estudios, han atribuido a estas proteínas un papel clave en la inhibición de la recristalización (Knight et al., 1995), en la estabilización de la membrana celular y en la protección frente a la sensibilidad al frío (Rubinsky et al., 1991). El fenómeno de recristalización sucede con frecuencia durante la descongelación y provoca grandes daños celulares. Por ello, la presencia de las AFPs en la solución crioprotectora podría tener un efecto altamente beneficioso al poder inhibir dicho fenómeno (Robles et al., 2007).

## **5.2 Evaluación del daño genético tras la criopreservación**

La ausencia de alteraciones en el ADN es particularmente importante en la creación de bancos de germoplasma. Es bien sabido que durante el proceso de criopreservación, las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden producir fragmentación del ADN en el material de partida (Fuku et al., 1995; Mullen et al., 2004; Saunders and Parks, 1999; Wu et al., 1999). El daño por fragmentación tras la criopreservación espermática ha sido estudiado en varias especies de teleósteos: trucha arcoíris (Labbe et al., 2001), lubina (Zilli et al., 2003), dorada (Cabrita et al., 2005), locha (Kopeika et al., 2003). El Comet Assay, inicialmente descrito por Ostling y

Johanson (Ostling and Johanson, 1984), ha sido una técnica muy empleada para la valoración del daño tras la criopreservación y proporciona información acerca de la fragmentación del ADN. Usando marcadores fluorescentes, los fragmentos de ADN pueden ser visualizados en la cola del cometa, mientras que el ADN que no presenta fragmentación permanece intacto en la cabeza. Esta técnica ha sido muy utilizada en espermatozoides de peces para la valoración del efecto de la criopreservación o de la exposición a mutágenos sobre la fragmentación del ADN (Cabrita et al., 2005; Lee and Steinert, 2003). Otras técnicas frecuentemente utilizadas para el análisis del DNA, son el TUNEL (*transferase-mediated dUDP Nick-end-labeling assay*) y el SCSA (*sperm chromatin structure assay*) (Bungum et al., 2011; Chohan et al., 2006; Gorczyca et al., 1993). Estas técnicas permiten conocer el estado de fragmentación global del ADN, es decir aportan información acerca del estado de la integridad global de la cromatina. No obstante, el daño por fragmentación no es el único que puede ser inducido por la criopreservación. Tras los últimos estudios en espermatozoides de diferentes especies, se ha visto, que el incremento de los ROS tras el proceso de criopreservación, puede crear sitios abásicos, delecciones, o recombinaciones “cross-linking”. Dichos daños pueden acabar generando bases nitrogenadas que se traducen en algunas ocasiones, pero no siempre, en fragmentación del ADN (Aitken and De Iuliis, 2007; Perez-Cerezales et al., 2011; Slupphaug et al., 2003). Por otro lado, se ha visto que tras el proceso de criopreservación, se generan roturas simples en el ADN telomérico. El incremento de estas roturas ha sido correlacionado con el aumento en el acortamiento de los telómeros durante el proceso de replicación y la aceleración de la entrada en el proceso de senescencia (Hiyama and Hiyama, 2007). Pérez Cerezales y colaboradores demostraron la existencia de acortamiento telomérico y fragmentación del ADN tras la criopreservación de espermatozoides de trucha arcoíris (Perez-Cerezales et al., 2011). No obstante, la aparición de este tipo de lesiones es dependiente del tipo celular, de la especie y del protocolo de criopreservación utilizado. En nuestro grupo también se ha analizado la longitud de los telómeros en espermatozoides de dorada tras la criopreservación, observando que, en este caso, a diferencia de lo que sucede en trucha arcoíris, no se producía un acortamiento de los telómeros (Cartón-García et al., 2013).

En estudios recientes, la técnica de PCR a tiempo real (qPCR) ha sido utilizada con éxito en líneas celulares humanas para la detección de lesiones en regiones concretas de la cromatina tras la exposición a peróxido de hidrógeno. Estos análisis están basados en la habilidad de ciertas lesiones en el ADN, para provocar una reducción de la progresividad de la polimerasa o bloquear su avance, lo cual se traduce en un retraso del *Threshold Cycle* (*C<sub>t</sub>*) (Rothfuss et al., 2010). Estos análisis proporcionan información específica sobre regiones concretas del DNA, ofreciendo en este caso un análisis más detallado del estado del ADN y de las diferentes susceptibilidades al daño en distintas regiones (Ayala-Torres et al., 2000; San Gabriel et al., 2006; Santos et al., 2006).

Además de poder inducir daño genético, la criopreservación puede causar también alteraciones epigenéticas. Existen pocos estudios al respecto, pero este hecho se ha constatado en oocitos humanos y de ratones (Denomme and Mann, 2012; Trapphoff et al., 2010). Las modificaciones epigenéticas relacionadas con la alteración del patrón de metilación de promotores génicos pueden reflejarse en cambios significativos en la expresión de los genes (Sorensen et al., 2010). Existen estudios que demuestran que la simple exposición de células al DMSO, uno de los crioprotectores más utilizados, podría alterar dicho patrón de metilación. Kawai y colaboradores, detectaron un incremento en la metilación de citosinas tras la exposición de células epiteliales al DMSO (Kawai et al., 2010). Otro grupo de investigación, también constató que la exposición a bajas concentraciones de DMSO, incrementó la expresión de dos subtipos de metiltransferasas causando la hipermetilación de dos tipos de secuencias repetidas en los cuerpos embrionarios de ratón (Iwatani et al., 2006).

Hasta el momento, en peces, la valoración del efecto de la criopreservación sobre el ADN se ha limitado a evaluar el grado de fragmentación (mediante comet assay) (Cabrita et al., 2005; Ostling and Johanson, 1984) y sólo en algunos casos se ha valorado la longitud de telómeros tras el proceso (Cartón-García et al., 2013; Pérez-Cerezales et al., 2011). Esta Tesis pretende profundizar en este campo, utilizando técnicas que permitan realizar una valoración más detallada y precisa del impacto molecular causado por los protocolos de criopreservación con el fin de mejorar su eficacia y seguridad.

## Bibliografía

Aitken, R.J., and De Iuliis, G.N. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. Biomed. Online* *14*, 727-733.

Anderson, R., Copeland, T.K., Scholer, H., Heasman, J., and Wylie, C. (2000). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech. Dev.* *91*, 61-68.

Anderson, R., Fassler, R., Georges-Labouesse, E., Hynes, R.O., Bader, B.L., Kreidberg, J.A., Schaible, K., Heasman, J., and Wylie, C. (1999). Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* *126*, 1655-1664.

Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5319-5323.

Arakawa, T., Carpenter, J., Kita, Y., and Crowe, J. (1990). The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. *27*,

Arav, A., Ramsbottom, G., Baguisi, A., Rubinsky, B., Roche, J., and Boland, M. (1993). Vitrification of bovine and ovine embryos with MDS technique and antifreeze proteins. *30*,

Ayala-Torres, S., Chen, Y., Svoboda, T., Rosenblatt, J., and Van Houten, B. (2000). Analysis of gene-specific DNA damage and repair using quantitative polymerase chain reaction. *Methods* *22*, 135-147.

Braat, A.K., van de Water, S., Goos, H., Bogerd, J., and Zivkovic, D. (2000). Vasa protein expression and localization in the zebrafish. *Mech. Dev.* *95*, 271-274.

- Braat, A.K., Zandbergen, T., van de Water, S., Goos, H.J., and Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* **216**, 153-167.
- Braat, A.K., Zandbergen, T., Van De Water, S., Goos, H.J.T., and Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics* **216**, 153-167.
- Bungum, M., Bungum, L., and Giwercman, A. (2011). Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J. Androl.* **13**, 69-75.
- Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., and Herraez, M.P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* **47**, 204-213.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., and Herraez, M.P. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* **50**, 144-153.
- Callaini, G., Riparbelli, M.G., and Dallai, R. (1995). Pole cell migration through the gut wall of the *Drosophila* embryo: analysis of cell interactions. *Dev. Biol.* **170**, 365-375.
- Cartón-García, F., Riesco, M.F., Cabrita, E., Herráez, M.P., and Robles, V. (2013). Quantification of lesions in nuclear and mitochondrial genes of *Sparus aurata* cryopreserved sperm. *Aquaculture* **402–403**, 106-112.
- Chen, S.R., Zheng, Q.S., Zhang, Y., Gao, F., and Liu, Y.X. (2013). Disruption of genital ridge development causes aberrant primordial germ cell proliferation but does not affect their directional migration. *BMC Biol.* **11**, 22-7007-11-22.
- Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromoise, M., De Jonge, C.J., and Carrell, D.T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J. Androl.* **27**, 53-59.

Choi, J.W., Kim, S., Kim, T.M., Kim, Y.M., Seo, H.W., Park, T.S., Jeong, J.W., Song, G., and Han, J.Y. (2010). Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS One* 5, e12968.

Chuma, S., Hiyoshi, M., Yamamoto, A., Hosokawa, M., Takamune, K., and Nakatsuji, N. (2003). Mouse Tudor Repeat-1 (MTR-1) is a novel component of chromatoid bodies/nuages in male germ cells and forms a complex with snRNPs. *Mech. Dev.* 120, 979-990.

Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., and Schier, A.F. (2002). Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14919-14924.

Coffman, C.R., Strohm, R.C., Oakley, F.D., Yamada, Y., Przychodzin, D., and Boswell, R.E. (2002). Identification of X-linked genes required for migration and programmed cell death of *Drosophila melanogaster* germ cells. *Genetics* 162, 273-284.

Currie, P.D. (1996). Zebrafish genetics: mutant cornucopia. *Curr. Biol.* 6, 1548-1552.

De Miguel, M.P., Cheng, L., Holland, E.C., Federspiel, M.J., and Donovan, P.J. (2002). Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10458-10463.

Denomme, M.M., and Mann, M.R. (2012). Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction* 144, 393-409.

Deshpande, G., and Schedl, P. (2005). HMGCoA reductase potentiates hedgehog signaling in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell.* 9, 629-638.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Koprunner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647-659.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Koprucker, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647-659.

Eddy, E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43, 229-280.

Eguizabal, C., Shovlin, T.C., Durcova-Hills, G., Surani, A., and McLaren, A. (2009). Generation of primordial germ cells from pluripotent stem cells. *Differentiation* 78, 116-123.

Ekker, S.C., and Larson, J.D. (2001). Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* 30, 89-93.

Fan, L., Alestrom, A., Alestrom, P., and Collodi, P. (2004). Development of cell cultures with competency for contributing to the zebrafish germ line. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 14, 43-51.

Fan, L., and Collodi, P. (2006). Zebrafish embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 418, 64-77.

Fan, L., Crodian, J., Liu, X., Alestrom, A., Alestrom, P., and Collodi, P. (2004). Zebrafish embryo cells remain pluripotent and germ-line competent for multiple passages in culture. *Zebrafish* 1, 21-26.

Fan, L., Moon, J., Crodian, J., and Collodi, P. (2006). Homologous recombination in zebrafish ES cells. *Transgenic Res.* 15, 21-30.

Fan, L., Moon, J., Wong, T.T., Crodian, J., and Collodi, P. (2008). Zebrafish primordial germ cell cultures derived from vasa::RFP transgenic embryos. *Stem Cells Dev.* 17, 585-597.

Fishman, M.C. (2001). Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science* 294, 1290-1291.

- Fletcher, G.L., Hew, C.L., and Davies, P.L. (2001). Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 359-390.
- Fuku, E., Xia, L., and Downey, B.R. (1995). Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 32, 139-156.
- Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., and Daley, G.Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427, 148-154.
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P., and Schier, A.F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-838.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., *et al.* (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.* 31, 135-140.
- Gorczyca, W., Gong, J., and Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53, 1945-1951.
- Goto-Kazeto, R., Saito, T., Takagi, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2010). Isolation of teleost primordial germ cells using flow cytometry. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1487-1492.
- Hagedorn, M., Kleinhans, F.W., Wildt, D.E., and Rall, W.F. (1997). Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology* 34, 251-263.
- Harvey, B. (1983). Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to -196 degrees C. *Cryobiology* 20, 440-447.

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146, 519-532.

Hayashi, K., and Surani, M.A. (2009). Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline. *Cell. Stem Cell.* 4, 493-498.

Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., and Schartl, M. (2007). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev. Biol.* 7, 3.

Higaki, S., Mochizuki, K., Baba, H., Akashi, Y., Yamaha, E., Katagiri, S., and Takahashi, Y. (2009). Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jpn. J. Vet. Res.* 57, 119-128.

Hiyama, E., and Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *Br. J. Cancer* 96, 1020-1024.

Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., Boiani, M., and Scholer, H.R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251-1256.

Iwatani, M., Ikegami, K., Kremenska, Y., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., and Shiota, K. (2006). Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 24, 2549-2556.

Jaglarz, M.K., and Howard, K.R. (1995). The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* 121, 3495-3503.

Johnston, P.M. (1951). The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides* (Lacépède). *J. Morphol.* 88, 471-542.

Kasai, M., and Mukaida, T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed. Online* 9, 164-170.

Kawai, K., Li, Y.S., Song, M.F., and Kasai, H. (2010). DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *20*, 260-265.

Kawakami, Y., Goto-Kazeto, R., Saito, T., Fujimoto, T., Higaki, S., Takahashi, Y., Arai, K., and Yamaha, E. (2010). Generation of germ-line chimera zebrafish using primordial germ cells isolated from cultured blastomeres and cryopreserved embryoids. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 1493-1501.

Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.

Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., and Nusslein-Volhard, C. (2000). Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* *149*, 875-888.

Knaut, H., Steinbeisser, H., Schwarz, H., and Nusslein-Volhard, C. (2002). An evolutionary conserved region in the vasa 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. *Curr. Biol.* *12*, 454-466.

Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., Nusslein-Volhard, C., and Tubingen 2000 Screen Consortium. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* *421*, 279-282.

Knight, C.A., Wen, D., and Laursen, R.A. (1995). Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice. *Cryobiology* *32*, 23-34.

Kobayashi, T. (2010). In vitro germ cell differentiation during sex differentiation in a teleost fish. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 105-111.

Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2007). Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* *74*, 207-213.

Konantz, M., Balci, T.B., Hartwig, U.F., Dellaire, G., Andre, M.C., Berman, J.N., and Lengerke, C. (2012). Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1266**, 124-137.

Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D.M., and Holt, W.V. (2003). Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. *Cryobiology* **46**, 43-52.

Koprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* **15**, 2877-2885.

Krovel, A.V., and Olsen, L.C. (2002). Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech. Dev.* **116**, 141-150.

Kunwar, P.S., Starz-Gaiano, M., Bainton, R.J., Heberlein, U., and Lehmann, R. (2003). Tre1, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of Drosophila germ cells. *PLoS Biol.* **1**, E80.

Kunwar, P.S., Starz-Gaiano, M., Bainton, R.J., Heberlein, U., and Lehmann, R. (2003). Tre1, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of Drosophila germ cells. *PLoS Biol.* **1**, E80.

Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., and Maisse, G. (2001). Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* **60**, 397-404.

Lawson, N.D., and Weinstein, B.M. (2002). In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**, 307-318.

Lee, K.Y., Huang, H., Ju, B., Yang, Z., and Lin, S. (2002). Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 795-799.

Lee, R.F., and Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* **544**, 43-64.

Lee, S.L., Rouhi, P., Dahl Jensen, L., Zhang, D., Ji, H., Hauptmann, G., Ingham, P., and Cao, Y. (2009). Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19485-19490.

Li, M., Hong, N., Xu, H., Yi, M., Li, C., Gui, J., and Hong, Y. (2009). Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mech. Dev.* **126**, 366-381.

Lin, S., Long, W., Chen, J., and Hopkins, N. (1992). Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4519-4523.

Ma, C., Fan, L., Ganassin, R., Bols, N., and Collodi, P. (2001). Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2461-2466.

Martinez-Paramo, S., Barbosa, V., Perez-Cerezales, S., Robles, V., and Herraez, M.P. (2009). Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology* **58**, 128-133.

Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**, 841-847.

Matsui, Y., Zsebo, K.M., and Hogan, B.L. (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* **347**, 667-669.

Mimeault, M., and Batra, S.K. (2013). Emergence of zebrafish models in oncology for validating novel anticancer drug targets and nanomaterials. *Drug Discov. Today* *18*, 128-140.

Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., and Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.* *240*, 488-498.

Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., and Lehmann, R. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* *130*, 4279-4286.

Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., and Lehmann, R. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* *130*, 4279-4286.

Moore, L.A., Broihier, H.T., Van Doren, M., Lunsford, L.B., and Lehmann, R. (1998). Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila*. *Development* *125*, 667-678.

Mullen, S.F., Agca, Y., Broermann, D.C., Jenkins, C.L., Johnson, C.A., and Critser, J.K. (2004). The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum. Reprod.* *19*, 1148-1154.

Nasevicius, A., and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* *26*, 216-220.

Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., *et al.* (2006). In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev. Cell.* *11*, 125-132.

Nusslein-Volhard, C. (1994). Of flies and fishes. *Science* *266*, 572-574.

Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2005). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish.*103*,

Olsen, L.C., Aasland, R., and Fjose, A. (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* *66*, 95-105.

Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *123*, 291-298.

Perez-Cerezales, S., Gutierrez-Adan, A., Martinez-Paramo, S., Beirao, J., and Herraez, M.P. (2011). Altered gene transcription and telomere length in trout embryo and larvae obtained with DNA cryodamaged sperm. *Theriogenology* *76*, 1234-1245.

Robles, V., Barbosa, V., Herraez, M.P., Martinez-Paramo, S., and Cancela, M.L. (2007). The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology* *68*, 284-289.

Robles, V., Marti, M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Study of pluripotency markers in zebrafish embryos and transient embryonic stem cell cultures. *Zebrafish* *8*, 57-63.

Rothfuss, O., Gasser, T., and Patenge, N. (2010). Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. *Nucleic Acids Res.* *38*, e24.

Rubinsky, B., Arav, A., and Fletcher, G.L. (1991). Hypothermic protection-a fundamental property of "antifreeze" proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *180*, 566-571.

Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2006). Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* *50*, 691-699.

Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2006). Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* *50*, 691-699.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., and Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* *78*, 159-166.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., and Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* *78*, 159-166.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., and Yamaha, E. (2010). Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 1481-1486.

San Gabriel, M., Zhang, X., and Zini, A. (2006). Estimation of human sperm gene-specific deoxyribonucleic acid damage by real-time polymerase chain reaction analysis. *Fertil. Steril.* *85*, 797-799.

Sano, H., Renault, A.D., and Lehmann, R. (2005). Control of lateral migration and germ cell elimination by the *Drosophila melanogaster* lipid phosphate phosphatases Wunen and Wunen 2. *J. Cell Biol.* *171*, 675-683.

Sano, H., Renault, A.D., and Lehmann, R. (2005). Control of lateral migration and germ cell elimination by the *Drosophila melanogaster* lipid phosphate phosphatases Wunen and Wunen 2. *J. Cell Biol.* *171*, 675-683.

Santos, J.H., Meyer, J.N., Mandavilli, B.S., and Van Houten, B. (2006). Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* *314*, 183-199.

Saunders, K.M., and Parks, J.E. (1999). Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* **61**, 178-187.

Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1986). Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **113**, 443-448.

Seydoux, G., and Dunn, M.A. (1997). Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**, 2191-2201.

Seydoux, G., Mello, C.C., Pettitt, J., Wood, W.B., Priess, J.R., and Fire, A. (1996). Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* **382**, 713-716.

Seydoux, G., and Strome, S. (1999). Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development* **126**, 3275-3283.

Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Hamaguchi, S. (2000). The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* **42**, 317-326.

Shirazi, R., Zarnani, A.H., Soleimani, M., Abdolvahabi, M.A., Nayernia, K., and Ragerdi Kashani, I. (2012). BMP4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells. *Cell Biol. Int.* **36**, 1185-1193.

Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H.E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* **531**, 231-251.

Sorensen, A.L., Timoskainen, S., West, F.D., Vekterud, K., Boquest, A.C., Ahrlund-Richter, L., Stice, S.L., and Collas, P. (2010). Lineage-specific promoter DNA methylation patterns segregate adult progenitor cell types. *Stem Cells Dev.* **19**, 1257-1266.

Starz-Gaiano, M., Cho, N.K., Forbes, A., and Lehmann, R. (2001). Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development* **128**, 983-991.

Stebler, J., Spieler, D., Slanchev, K., Molyneaux, K.A., Richter, U., Cojocaru, V., Tarabykin, V., Wylie, C., Kessel, M., and Raz, E. (2004). Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev. Biol.* **272**, 351-361.

Stein, J.A., Broihier, H.T., Moore, L.A., and Lehmann, R. (2002). Slow as molasses is required for polarized membrane growth and germ cell migration in *Drosophila*. *Development* **129**, 3925-3934.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**, 293-296.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004). Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* **430**, 629-630.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* **69**, 1142-1149.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2001). Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol. Reprod. Dev.* **59**, 380-389.

Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., and Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11457-11462.

Trapphoff, T., El Hajj, N., Zechner, U., Haaf, T., and Eichenlaub-Ritter, U. (2010). DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting

patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. *Hum. Reprod.* 25, 3025-3042.

van de Lervoir, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P.A., Mather-Love, C., Heyer, B.S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L.T., Gessaro, T.M., Swanberg, S.E., Delany, M.E., and Etches, R.J. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441, 766-769.

Van Doren, M., Broihier, H.T., Moore, L.A., and Lehmann, R. (1998). HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* 396, 466-469.

van Eeden, F.J., Granato, M., Odenthal, J., and Haffter, P. (1999). Developmental mutant screens in the zebrafish. *Methods Cell Biol.* 60, 21-41.

Warrior, R. (1994). Primordial germ cell migration and the assembly of the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev. Biol.* 166, 180-194.

Weidinger, G., Wolke, U., Koprucker, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2002). Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. *Development* 129, 25-36.

Williamson, A., and Lehmann, R. (1996). Germ cell development in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 365-391.

Wolke, U., Weidinger, G., Koprucker, M., and Raz, E. (2002). Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish. *Curr. Biol.* 12, 289-294.

Wu, B., Tong, J., and Leibo, S.P. (1999). Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 54, 388-395.

Xu, H., Gui, J., and Hong, Y. (2005). Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexual and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev. Dyn.* 233, 872-882.

Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124, 3157-3165.

Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., and Takeuchi, T. (2000). Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 364-371.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

Zhang, N., Zhang, J., Purcell, K.J., Cheng, Y., and Howard, K. (1997). The Drosophila protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature* 385, 64-67.

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., and Vilella, S. (2003). Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47, 227-235.

## **Objetivos**

---

La criopreservación de células primordiales germinales (PGCs) se presenta como la mejor alternativa para preservar el genoma diploide de los peces a la hora de elaborar bancos de germoplasma y preservar líneas transgénicas de alto valor, hasta que la criopreservación de embriones en peces se logre con éxito. Para desarrollar protocolos eficientes y seguros, es necesario implementar nuevas herramientas moleculares que permitan analizar en detalle el impacto del proceso de criopreservación a nivel molecular. Además, el número de PGCs en el embrión es reducido, siendo este el mayor inconveniente a la hora de utilizar estas células como recurso en la creación de bancos de germoplama. A diferencia de lo que sucede en mamíferos, la posibilidad de diferenciar células embrionarias hacia PGCs no se ha considerado factible en teleósteos al asumir que la especificación de las PGCs en peces no es un mecanismo inductivo. De lograrse la generación de PGCs *in vitro*, se solventaría el problema del escaso número de PGCs presentes en el embrión. Además este logro proporcionaría una herramienta de gran valor biotecnológico al permitir la posibilidad de realizar técnicas de manipulación genética en células embrionarias de peces (más susceptibles a dichas modificaciones) y posteriormente forzar su diferenciación hacia PGCs, garantizando así su contribución a la línea germinal tras el trasplante en un embrión receptor. La consecución de estos objetivos, supone un gran avance biotecnológico y es sin duda un respaldo importante en la consolidación del pez cebra como especie modelo en ciencia.

Por todo ello, los objetivos son:

1. Desarrollar protocolos de criopreservación eficaces para la conservación a largo plazo de PGCs de pez cebra. Valorar la toxicidad a los crioprotectores y la eficacia de distintas rampas de congelación-descongelación, utilizando distintas muestras de partida (células aisladas, rebordes genitales o embriones). Analizar tras la criopreservación la viabilidad celular, la capacidad migratoria de las PGCs y el daño por fragmentación en el DNA.
2. Implementar nuevas técnicas moleculares en la valoración de protocolos de criopreservación, determinando el impacto de la criopreservación sobre transcriptos y promotores de génicos y cuantificando el número de lesiones en genes concretos.

***Objetivos***

3. Desarrollar métodos de diferenciación *in vitro* de células embrionarias hacia PGCs. Caracterizar la población de células diferenciadas tras el empleo de los distintos tratamientos.

.

# **Capítulo 1: Diseño de protocolos de criopreservación y vitrificación de PGCs de pez cebra**

---

## **Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols**

**M.F. Riesco<sup>a</sup>, F. Martínez-Pastor<sup>a</sup>, O. Chereguini<sup>b</sup>, V. Robles<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Indegsal and Department of Molecular Biology, University of León, León, Spain

<sup>b</sup> IEO, Santander, Spain

Theriogenology

Received 19 April 2011; received in revised form 20 June 2011; accepted 8 July 2011

## Abstract

Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) is a better alternative for the conservation of the diploid genome in fish until embryo cryopreservation is achieved. A good cryopreservation protocol must guarantee high survival rates but also absence of genetic damage. In this study, a cell toxicity test using several internal and external cryoprotectants was carried out. The best combination of cryoprotectants (DMSO 5 mol/L, ethylene glicol (EG) 1 mol/L, polyvinyl pyrrolidone (PVP) 4%) was used with and without antifreeze proteins (AFPs) at two different concentrations (10 mg/mL and 20 mg/mL) for cryopreservation trials. Different cryopreservation methods were used with single PGCs, genital ridges, and whole zebrafish embryos using cryovials, 0.5 mL straws, microcapsules, and microdrops. All embryos were obtained from the vasa EGFP zf45 transgenic line and viability was evaluated using trypan blue. High cell viability rates after cryopreservation in 0.5 mL straws were obtained (around 90%) and a decrease in viability was only observed when cells were cryopreserved in microcapsules and when AFP at 20 mg/mL was added to the freezing media. Genetic damage was determined by comet assay and was compared in cells cryopreserved in 0.5 mL straws and microcapsules (lowest viability rate). There were significantly more DNA strand breaks after cryopreservation in the cells cryopreserved without cryoprotectants and in those cryopreserved in microcapsules. Genetic damage in the cells cryopreserved with cryoprotectants in 0.5 mL straws was similar to fresh control samples, regardless of the concentration of AFP used. The decrease in PGC viability with the addition of AFP 20 mg/mL did not correlate with an increase in DNA damage. This study reported a successful method for zebrafish PGC cryopreservation that not only guarantees high cell survival but also the absence of DNA damage.

## Introduction

Embryo cryopreservation has yet to be achieved in fish, due to the particular structure and characteristics of fish embryos [1,2]. Cryopreservation of blastomeres [3,4], or primordial germ cells (PGCs) [5] are possible alternatives for the preservation of the fish diploid genome. Among all these alternatives, primordial germ cells represent the most promising option for germplasm banking. These cells retain their migration capacity after transplantation in a receptor embryo and can easily give rise to functional sperm and oocytes via germline chimerism [6,7].

Different biological samples required different methods for cryopreservation. In particular, in fish embryos, vitrification rather than cryopreservation has been recommended to increase the probability of success [1]. However, higher concentrations of cryoprotectants are required for vitrification protocols [8]. Vitrification solutions are usually formulated as a combination of internal and external cryoprotectants. This combination enables the vitreous state of the solution to be reached at low temperatures, but also allows the concentration of each individual cryoprotectant to be reduced, therefore decreasing the toxic effects on cells [9]. Some authors have reported the benefits of adding antifreeze proteins to the traditional cryoprotectant cocktail in samples exposed to low temperatures or cryopreserved. Robles and colleagues found that type I antifreeze protein (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryo tolerance to low temperatures [10], and improves zebrafish blastomere viability after cryopreservation at the concentration of 10 mg/mL [11]. These proteins have also been successfully used in other species: ovine embryos can be stored in AFP I at 4 °C for 4 days, yielding similar pregnancy and embryo survival rates as fresh embryos [12].

PGC cryopreservation has been studied in some fish species [5] and transplantation assays have been successfully achieved in some of them [13]. However, the evaluation of genetic damage has not been studied in these cells yet. It is known that during cryopreservation reactive oxygen species (ROS) can be produced provoking DNA damage in samples [14–17]. Cryopreservation protocols must

guarantee good viability rates but also provide a protection at this level. Different levels of DNA damage can be reported with the use of different cryopreservation protocols [18]. Absence of DNA damage is particularly important for gene banking purposes. Unlike PGCs, DNA damage in spermatozoa has been studied in several species: rainbow trout [19], sea bass [20], gilthead sea bream [21], Pacific oyster [22], and loach [23]. One of the main possible damages that can occur during cryopreservation is DNA breakage. The comet assay technique measures DNA breakage in individual cells [24] combining electrophoresis with fluorescence microscopy to visualize DNA migration from the individual cells in an agarose microgel [25].

In this study, the toxicity of the cryoprotectant solution used, which includes external (PVP 4%) and internal cyoprotectants (DMSO 5 mol/L, EG 1 mol/L) with and without AFP (10 and 20 mg/mL) was determined. Primordial germ cell viability after cryopreservation was tested using single cells, genital ridges, and embryos loaded in different containers and DNA damage was evaluated using the comet assay. Results demonstrated that PGC viability after genital ridge and polyvinyl pyrrolidone (PVP) 4% was very high (90%). Moreover, no genetic damage was detected in frozen/thawed cells that were cryopreserved using this protocol embryo cryopreservation in 0.5 mL straws using DMSO 5 mol/L, ethylene glicol (EG) 1 mol/L, and polyvinyl pyrrolidone (PVP) 4% was very high (90%). Moreover, no genetic damage was detected in frozen/thawed cells that were cryopreserved using this protocol.

## Material and methods

### Zebrafish maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) vasa EGFP zf45 strain, were maintained in tanks with a recirculating water system (AquaticHabitats, Apopka, FL, USA) under standard conditions [26]. Fish were fed twice daily with dry food (200 mg) at 9 AM and 6 PM and live artemia (100 mg) at 1 PM.

### **Embryo collection and genital ridges dissection**

For embryo collection, males and females were transferred to a breeding tank at a rate of 1 male to 2 females. The embryos were collected and washed for 2 min with a 0.5% bleach solution, rinsed twice with embryo medium (EM) (NaCl 13.7 mmol/L, KCl 0.54 mmol/L, NaHPO<sub>4</sub> 0.025 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.044 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mmol/L) and kept in fresh EM at 28 °C until they reached 24-h post-fertilization (hpf).

The genital ridges (GRs) were manually excised from earlier than 24-hpf embryos using fine watchmakers forceps under a dissecting microscope (Nikon, Tokyo, Japan), as described by Kobayashi et al. [27]. The migration capacity of PGCs obtained from later stages could decrease, as was reported by Saito and colleagues [7]. The excised GRs and embryos were collected and placed in modified Leibovitz medium (L15) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) in a culture dish at room temperature (RT) until further use. Each experiment was done in triplicate using 10 embryos or GRs in each replicate (approximately 200 PGCs in each replicate).

### **Cryoprotectant exposure and toxicity assay**

Samples (embryos or GRs) were exposed to cryo- protectants in a three-step manner. First, they were placed in a pretreatment solution with DMSO 2 mol/L and EG 0.5 mol/L in Hank's premix (NaCl 138.28 mmol/L, KCl 5.42 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.255 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.455 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mmol/L) for 10 min. In samples treated with AFP, the protein was incorporated from the first step at two different concentrations (10 mg/mL or 20 mg/mL). Second, samples were exposed to DMSO 5 mol/L and EG 1 mol/L in Hank's premix for 2 min. In the last step, samples were exposed to the vitrifying solution: DMSO 5 mol/L, EG 1 mol/L, and PVP 4% for 2 min. for 2 min.

### **Assessment of PGC viability**

Ten GR or embryos, fresh (control) and cryopreserved, were dissociated with collagenase 0.1% (in Hank's premix solution) by pipetting. PGCs were identified by their bright fluorescence and relatively large size. For PGC viability assessment 0.5% trypan blue was added and the number of enhanced green fluorescent protein (EGFP)-

positive and negative cells for trypan blue were counted under an inverted and fluorescence microscope (Nikon). Results were expressed related to the fresh control. The experiment was done in triplicate. All procedures were carried out at RT.

### **Cryopreservation trials**

After the toxicity test, the PGCs (for embryos and GRs earlier than 24 hpf) were cryopreserved using three different cryoprotective solutions: (1) DMSO 5 mol/L, EG 1 mol/L, and PVP 4%; (2) DMSO 5 mol/L, EG 1 mol/L, PVP 4%, and AFP (10 mg/mL); and (3) DMSO 5 mol/L, EG 1 mol/L, PVP 4%, and AFP (20 mg/mL). Four different containers, providing different freezing/thawing rates, were used: cryovials, 0.5 mL straws, microcapsules, and microdrops. PGCs from 20 dissociated GRs were cryopreserved in microcapsules, GRs were cryopreserved in 0.5 mL straws, and cryovials, and vitrified in microdrops (5 GRs per microdrop) (Fig.1A), and embryos were cryopreserved in 0.5 mL straws and cryovials (10 embryos per replicate). Experiments were done in triplicate.

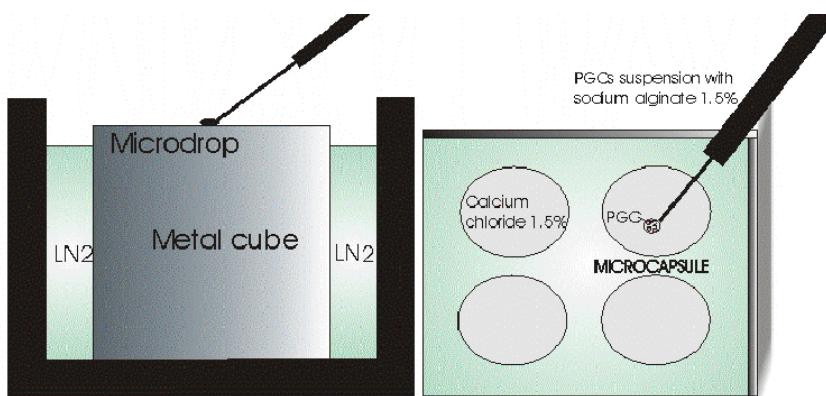


Fig. 1. (A) Primordial germ cells (PGCs) vitrified in microdrops over a solid surface (metal cube) in liquid nitrogen. (B) PGCs microencapsulated in sodium alginate.

### **Cell microencapsulation**

Microencapsulation procedures developed for bovine, porcine, and canine sperm [28] were used with minor modifications. Cell suspensions were digested with collagenase 0.1% in Hank's premix solution by pipetting. They were then diluted in L15 with 1.5% (wt/vol) sodium alginate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). The solution was dissolved in physiologic saline to reach a final concentration of 0.75%. The

cell suspension was forced through a needle attached to a 1 mL syringe into a 60-mm plastic dish containing 1.5% (wt/vol) calcium chloride dissolved in physiological saline. The cell suspension suffered solidification immediately upon contact with the calcium chloride solution forming a high-viscosity microgel (Fig.1B). The microgels were swayed gently and allowed to react with calcium ions for 30 sec. After freezing/thawing, microcapsules were placed in sodium citrate solution and were vortexed to release cells from the microcapsules.

### **Freezing and thawing**

The samples were exposed to cryoprotectants as previously described, and loaded in the above mentioned containers. Cells loaded in 0.5 mL straws and cryovials were exposed to liquid nitrogen vapor for 20 min and then plunged into liquid nitrogen, whereas microdrops were vitrified in liquid nitrogen over a metal surface and then were stored in a cryovial to be plunged into liquid nitrogen. Cryovials and 0.5 mL straws were thawed in a water bath for 20 sec at 25 °C and 6 sec at 63 °C, respectively, and washed with Hank's premix solution. After thawing, cell viability was analyzed as it was previously described and DNA fragmentation damage was determined by comet assay.

### **DNA damage determination by neutral comet assay**

Fragmentation damage of DNA was determined in fresh and cryopreserved samples (in 0.5 mL straws and microcapsules). As a negative control, genital ridges frozen without cryoprotective agents were processed. Fresh and cryopreserved genital ridges were dissociated and the resulting pellets were resuspended in L15 medium supplemented with 5% fetal bovine serum. The comet assay was performed according to Olive and Bánath (2006) [23] with the following modifications. Cell suspensions were mixed with 1% low melting point agarose in PBS, and cell suspension was rapidly placed onto a precoated slide and immediately covered with a coverslip. The slides were left for 20 min at 4 °C to allow the agarose to solidify and to ensure that it was fully set before submerging in lysis solution. After removing the coverslips, the slides were submerged in freshly prepared lysis solution at 4 °C (sarkosyl 2%, Na<sub>2</sub> EDTA 0.5 mol/L, proteinase K 25ug/mL [pH 8]) for DNA separation in the dark. After overnight

lysis, the slides were submerged in neutral rinse and electrophoresis solution (Tris buffer 90 mmol/L, boric acid 90 mmol/L, Na<sub>2</sub> EDTA [pH 8.5]) for 30 min at RT. Electrophoresis was conducted at 25V/300A for 25 min. After electrophoresis, the slides were neutralized in distilled water and fixed with methanol for 3 min. Finally, the slides were stained with DAPI, covered with a coverslip and analyzed using a fluorescence microscope (Nikon). At least 50 comet images were analyzed from each slide, three slides from each replicate were done, and three replicates from each treatment or cryopreservation method were done. Approximately 100 cells per slide were photographed. Comet analysis was performed using the software Tritek Comet Score Freeware v.1.5. The percentage of tail DNA (% DNAt) was obtained.

### **Data analysis**

Viability data was subjected to logarithm transformation and statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey HSD as a post hoc test. Significant differences in DNA fragmentation damage (percentage of DNA in tail [% DNAt]) were analyzed using the Tukey HSD test. All the statistics were conducted using the R software 2.12.

## **Results**

### **Cryoprotectant toxicity**

Exposure to cryoprotectants did not affect PGCs survival (Fig. 2). There were no significant differences among the 3 different solutions tested and PGC survival rates were, in some cases close to 100% (GRs treatment with cryoprotectant [CPA] and AFP 10 mg/mL or AFP 20 mg/mL plus internal and external cryoprotectants) and in all cases higher than 70% (Fig. 2).

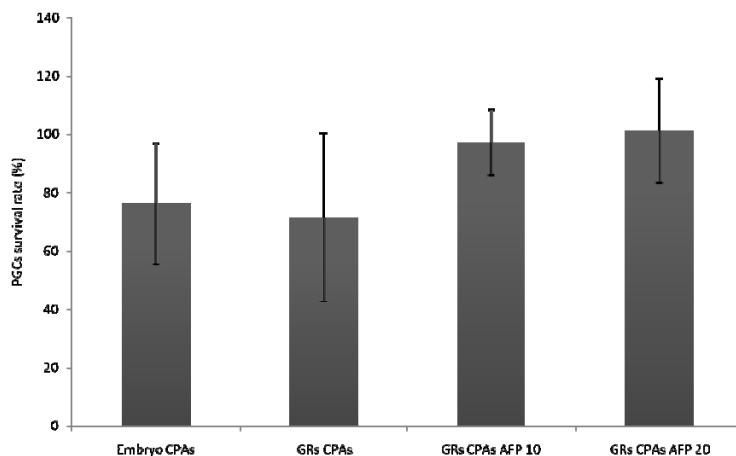


Fig. 2. Primordial germ cell (PGC) survival rates (%) after embryo and genital ridges (GRs) were exposed to cryoprotectants (CPAs) and cryoprotectants supplemented with antifreeze protein (AFP) 10 mg/mL (AFP 10) or 20 mg/mL (AFP 20). Embryos or GRs per trial= 10, N=3. Significant differences were not observed among treatments.

### **PGC viability after cryopreservation**

Primordial germ cell viability after cryopreservation (Fig. 3) did not differ significantly among treatments, except for the microcapsules and those samples cryopreserved with AFP 20 mg/mL. The use of whole embryos or GRs provided similar viability rates (higher than 90%) in the 0.5 mL straws method, as shown in Figure 4. The addition of AFP 10 mg/mL did not have any positive or negative effect on viability. However the use of AFP 20 mg/mL significantly decreased PGC viability after cryopreservation (less than 50%). With regard to the obtained viability rates and the manipulation requirements, 0.5 mL straws were chosen as the best loading container for PGC cryopreservation (Fig. 4, and Supplementary Table 1). This method provided 90% of PGC survival and significantly simplified genital ridge manipulation during the cryopreservation protocol.

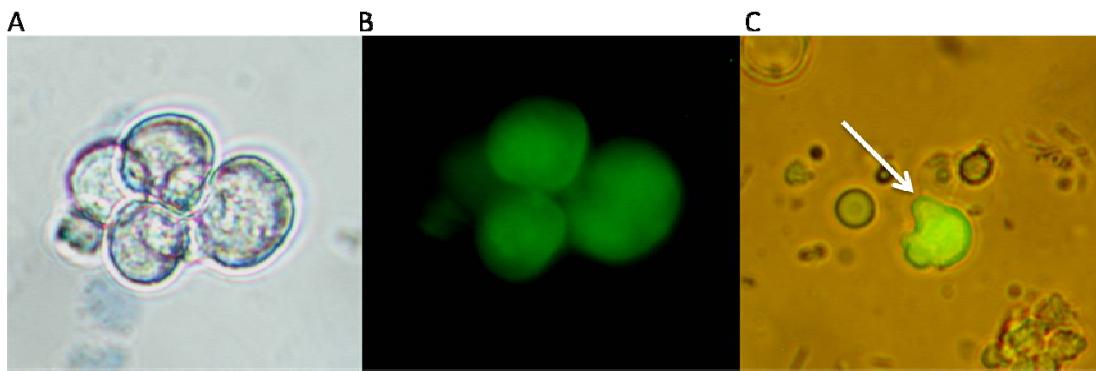


Fig. 3. (A) Primordial germ cells (PGC) from *vasa* EGFP zf45 zebrafish embryo after freezing/thawing stained with trypan blue and observed under light microscope. (B) Primordial germ cells from *vasa* EGFP zf45 zebrafish embryo after freezing/thawing stained with trypan blue and observed under fluorescence. (C) Primordial germ cells show green fluorescence and pseudopodia emission (arrow).

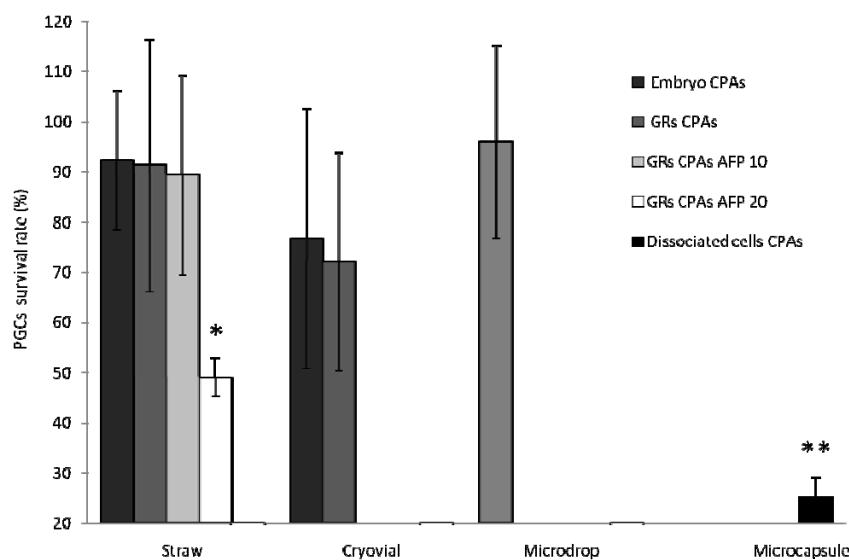


Fig. 4. Primordial germ cell (PGC) survival rates (%) after embryo and genital ridge (GR) cryopreservation using different loading containers. Embryos or GRs per trial=10, N=3. Significant differences among different cryoprotectant solutions used in 0.5 straws are represented with one asterisk. Significant differences among different cryopreservation protocols are represented with two asterisks.

## **Damage of DNA**

Fragmentation damage of DNA after cryopreservation, using the above-mentioned three different cryoprotectant combinations, was compared in samples that were cryopreserved in 0.5 mL straws (chosen as the best cryopreservation protocol) and in microcapsules (which reported the lowest viability rates in this study). Cells cryopreserved in the absence of cryoprotectants showed the largest tails and therefore the highest percentage of DNA damage (Fig. 5). However, DNA fragmentation did not differ significantly in the cells cryopreserved in 0.5 mL straws and fresh control (less than 10% in all treatments) (Fig. 6). The cells cryopreserved in microcapsules showed greater damage (more than 25%), which was significantly different to the fresh samples (less than 5%) and cryopreserved cells without CPAs (40%) (Fig. 6). Regarding DNA damage using the different combination of cryoprotectants, we observed that the addition of AFP at any of the concentrations used did not significantly modify DNA damage (Fig. 6, and Supplementary Table 2).

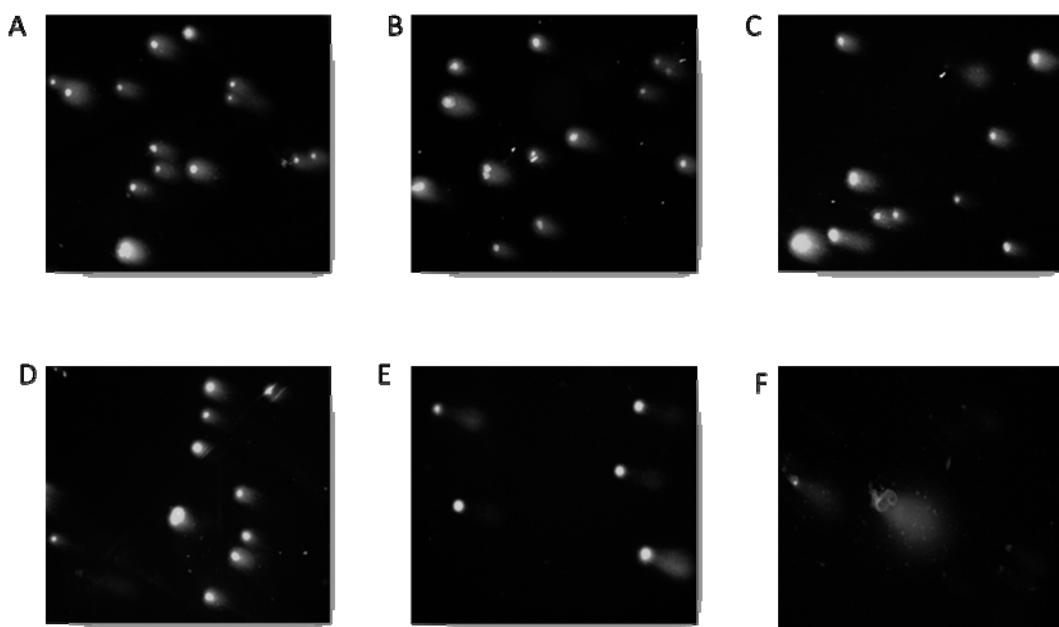


Fig. 5. Comet gel electrophoresis of fresh sample (control) (A) treated with cryoprotectant solution DMSO 5 mol/L, ethylene glicol (EG) 1 mol/L, polyvinyl pyrrolidone (PVP) 4%, without antifreeze protein (AFP) addition (B), cryoprotectant solution supplemented with AFP 10 mg/mL (C), cryoprotectant solution supplemented with AFP 20 mg/mL (D), microencapsulated

samples (E), and samples without cryoprotectants (F). The comet head is the high-molecular-weight DNA (undamaged DNA) and the tail represent DNA fragments (damaged DNA).

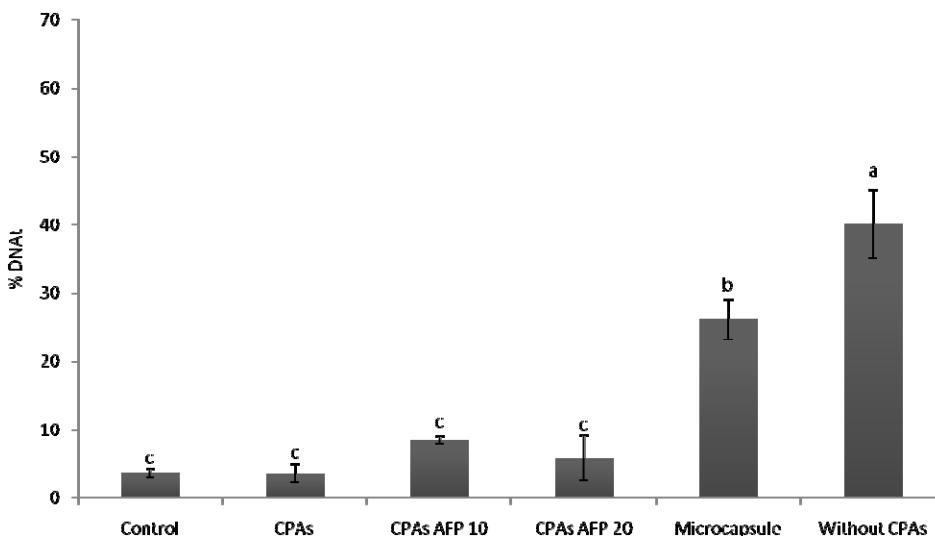


Fig. 6. Percentage of DNA in tail (% DNA<sub>t</sub>) in control and cryopreserved primordial germ cells (PGCs). Samples were cryopreserved in 0.5 mL straws and microcapsules, using DMSO 5 mol/L, ethylene glicol (EG) 1 mol/L, and polyvinyl pyrrolidone (PVP) 4% (cryoprotectants; CPAs) with or without antifreeze protein (AFP) at 10 mg/mL (AFP 10) or 20 mg/mL (AFP 20). Genital ridges (GRs) per trial = 20, N = 3. Letters represent significant differences among treatments.

#### 4. Discussion

Primordial germ cell cryopreservation is a useful alternative for preserving the diploid fish genome [29]. Some cryopreservation trials have been assayed with different fish species [5] and [13]. However, none of them have evaluated genetic damage. It is well known that reactive oxygen species production is induced during cryopreservation. These radicals can cause an increase in peroxidation, and DNA fragmentation occurs [30]. Taking into account that one of the main advantages of cryopreservation is the possibility of preserving genetic material (either for

conservation purposes of endangered species or preservation of valuable biotechnological lines), absence of genetic damage is a very important point to be considered in the choice of a suitable cryopreservation protocol. The effect of cryopreservation on sperm and oocyte DNA has been evaluated in several species [18]. Cabrita and colleagues [21] observed that cryopreservation can induce DNA fragmentation damage in rainbow trout and gilthead sea bream sperm, and that this fact should be taken into account in the evaluation of cryopreservation protocols. Several authors have detected sperm DNA damage using the comet assay, demonstrating that cryopreservation sperm affected DNA stability through DNA fragmentation [19], [20] and [31].

In previous studies on zebrafish PGC cryopreservation, the exposure times to cryoprotectants was too long (30 min) in order to increase their penetration. These long exposure times caused a decrease in PGC viability [32]. To avoid this negative effect, a combination of external and internal CPAs at lower doses were recommended for fish embryo cryopreservation [8] and recently it has also been used for embryo cryopreservation with the aim of recovering viable PGCs from them [13].

In this work, we compare PGC cryopreservation success using whole embryos, genital ridges, and single cells, and comparing different cryopreservation protocols using three vitrifying solutions and several containers that provided different freezing/thawing rates. Our findings showed that the selected conditions (external and internal CPA combinations, cryoprotectant concentrations, exposure times, temperature of exposure, and freezing/thawing rates) were optimal for zebrafish PGC cryopreservation in all cases except for samples supplemented with AFP 20 mg/mL and those cryopreserved in microcapsules. Survival rates were close to 90% or 100% in samples (GRs and embryos) cryopreserved in 0.5 mL straws and microdrops (GRs). In samples (GRs and embryos) cryopreserved in cryovials the survival was greater than 70%. When PGCs were microencapsulated, survival decreased significantly to 20%. Microencapsulation has also been used in the preservation of canine sperm at 4 °C, maintaining motility and viability for several days [28]. Our results showed a PGC survival rate decrease when microencapsulation was done prior to cryopreservation (Fig. 4). This method was more laborious than the other methods used, and also

subjected the biological material to extra *in vitro* manipulations (for encapsulation and decapsulation), which could have a negative effect on cell viability. Taking into account that PGCs were not lost during the cryopreservation process when GRs were used, this method does not have any real advantage over the other systems used for loading.

The addition of AFPs was not toxic for the cells (Fig. 2) but did not improve PGC viability after cryopreservation, regardless of the concentration used (Fig. 4). It is known that AFPs adhere to ice crystals blocking their further growth, and therefore, under certain conditions, they can produce a decrease in cell damage [33] and [34]. Our previous experiments in zebrafish blastomere cryopreservation indicated that the addition of AFP type I 10 mg/mL as a supplement in the cryoprotective solution significantly increased cell survival after freezing/thawing [10]. However, the same concentration of AFP had no effect on zebrafish PGC cryopreservation (Fig. 4). Moreover, when the concentration was increased to 20 mg/mL, a negative effect on survival was observed (Fig. 4). This could be explained considering the dual effect of AFPs. It is known that, depending on their concentration, AFPs could avoid ice crystal growth, or induce spicule-shaped crystals growth when the concentration is increased [35]. These spicule-shaped ice crystals could be more detrimental for cell survival than the original ones. In fact, high concentration of AFP have been used to induce this type of crystals in order to kill tumor cells [36] and [37]. Although a cryomicroscopy study would be required to test this hypothesis, we think this could be a feasible explanation for what we have observed.

It is interesting to point out, that the decrease in survival when PGCs were microencapsulated was associated with an increase in DNA damage (Figs. 4 and 6) but surprisingly, this did not happens when AFP 20 mg/mL was used (Figs. 4 and 6). This is a very relevant observation because it indicates that the selection of a cryopreservation protocol could not be done taking into account only cell survival.

Viability rates and absence of DNA fragmentation are not the only parameters that should be tested in order to guarantee that a protocol is adequate for PGC cryopreservation. After cryopreservation, PGCs should retain their migration ability in order to be able to colonize the gonad of the recipient embryo when transplanted.

Some important studies indicate a correlation of high viability rates, and in particular, of pseudopodia emission with a good colonization ability [27]. In this work, we have confirmed that PGCs cryopreserved using the 0.5 mL straw method have an active pseudopodia emission (see Time Lapse video in Supplementary data).

In conclusion, this study explored different cryopreservation methods for PGC cryopreservation in zebrafish; most of these methods have never been used in these cells before. The effect of the addition of antifreeze proteins in the cryopreservation media is also considered for the first time in this work, and more importantly, this article has reported the evaluation of DNA fragmentation in cryopreserved PGCs for the first time. We have demonstrated that zebrafish PGCs can be successfully cryopreserved in 0.5 mL straws using the cryoprotectants DMSO 5 mol/L, EG 1 mol/L, and PVP 4%. This cryopreservation method not only guarantees high PGC survival (90%) but also a DNA protection at the fragmentation level. Furthermore, we have observed that a decrease in cell viability after cryopreservation (PGCs cryopreserved in straws using AFP 20 mg/mL) does not necessarily imply an increase in DNA damage. This evidence points out the importance of analyzing DNA damage after cryopreservation, regardless of the cell viability obtained, in order to choose the most adequate protocol for cryopreservation in a specific cell type. In our laboratory, we are currently performing experiments that allow quantification of the genetic damage caused by cryopreservation.

**Appendix A. Supplementary data** Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at

doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.024.

## **Acknowledgments**

This work was supported by MICINN AGL2009-06994, Fundación Ramón Areces and Ramón y Cajal program (RYC-2008-02339 and RYC-2008-02560, MICINN, Spain).

The authors thank JCyl (E-24-2009- 0036681) ZF BioLabs (Spain), Cintia Miranda, Raquel Martínez, Dr. Draper (UC Davis, USA) and Dr. Cerezales.

## **References**

- [1] Hagedorn M, Kleinhans FW, Freitas R, Liu J, Hsu EW, Wildt DE, et al. Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *J Exp Zool* 1997;278:356–71.
- [2] Robles V, Cabrita E, Herráez MP. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. 2009;6:281–93.
- [3] Kopeika J, Zhang T, Rawson DM, Elgar G. Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells. *Mutat Res* 2005;570:49–61.
- [4] Lin C, Zhang T, Rawson DM. Cryopreservation of Zebrafish (*Danio rerio*) blastomeres by controlled slow cooling. *Cryo Letters* 2009;30:132– 41.
- [5] Kobayashi T, Yutaka T, Takeuchi T, Yoshizaki G. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 2007;74:207–13.
- [6] Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, Yamaha E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod* 2008;78:159–66.
- [7] Saito T, Goto-Kazeto R, Fujimoto T, Kawakami Y, Arai K, Yamaha E. Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *Int J Dev Biol* 2010;54: 1481–6.
- [8] Arakawa T, Carpenter J, Kita Y, Crowe J. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology* 1990;27: 401–15.

- [9] Cabrita E, Robles V, Chereguini O, Wallace JC, Herráez MP. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 2003;47:204–13.
- [10] Robles V, Barbosa V, Herráez MP, Martínez-Páramo S, Cancela ML. The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology* 2007;68:284–9.
- [11] Martínez-Páramo S, Barbosa V, Pérez-Cerezales S, Robles V, Herráez MP. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology* 2009;58:128–33.
- [12] Arav A, Ramsbottom G, Baguisi A, Rubinsky B, Roche JF, Boland MP. Vitrification of bovine and ovine embryos with MDS technique and antifreeze proteins. *Cryobiology* 1993;30: 621–2.
- [13] Higaki S, Eto Y, Kawakami Y, Yamaha E, Kagawa N, Kuwayama M, et al. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction* 2010;139:733–40.
- [14] Fuku E, Xia L, Downey BR. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1995;32: 139–56.
- [15] Wu B, Tong J, Leibo SP. Effects of cooling germinal vesicle stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following IVM. *Mol Reprod Dev* 1999;54:388–95.
- [16] Saunders KM, Parks JE. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of IVM bovine oocytes. *Biol Reprod* 1999;61:178–87.
- [17] Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum Reprod* 2004;19:1148–54.
- [18] Stachowiak EM, Papis K, Kruszewski M, Iwanen'ko T, Bartłomiejczyk T, Modlin'ski JA. Comparison of the level(s) of DNA damage using Comet assay in bovine oocytes subjected to selected vitrification methods. *Reprod Domest Anim* 2009;44: 653–8.

- [19] Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. Mol Reprod Dev 2001;60:397– 404.
- [20] Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. Cryobiology 2003;47:227–35.
- [21] Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. Cryobiology 2005;50:144 –53.
- [22] J.C. Gwo, C.Y. Wu, W.S. Chang, H.Y. Cheng. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay Cryo Letters, 24 (2003), pp. 171–180.
- [23] J. Kopeika, E. Kopeika, T. Zhang, D.M. Rawson, W.V. Holt Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine Cryobiology, 46 (2003), pp. 43–52
- [24] P.L. Olive, J.P. Banáth The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells Nat Protoc, 1 (2006), pp. 23–29
- [25] O. Ostling, K.J. Johanson Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells Biochem Biophys Res Commun, 123 (1984), pp. 291–298
- [26] M. Westerfield The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), University of Oregon Press, Eugene, OR, USA (1995), pp. 267–272
- [27] T. Kobayashi, Y. Takeuchi, G. Yoshizaki, T. Takeuchi Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry Mol Reprod Dev, 67 (2004), pp. 91–100
- [28] S. Shah, M. Nagano, Y. Yamashita, M. Hishinuma Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4 degrees C Theriogenology, 73 (2010), pp. 560–567

- [29] B. Harvey Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to -196 degrees C *Cryobiology*, 20 (1983), pp. 440–447
- [30] A. Ahmadi, N. Sonn-Chye Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa *J Exp Zool*, 284 (1999), pp. 696–704
- [31] R.F.S. Lee, S. Steinert Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals *Mutat Res*, 544 (2003), pp. 43–64
- [32] S. Higaki, K. Mochizuki, H. Baba, Y. Akashi, E. Yamaha, S. Katagiri et al. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing *Jpn J Vet Res*, 57 (2009), pp. 119–128

## **Capítulo 2: Análisis del efecto de la criopreservación sobre promotores, genes y transcritos concretos**

---

## **Quantification of DNA damage by q-PCR in cryopreserved zebrafish Primordial Germ Cells**

**M.F. Riesco<sup>a</sup>, V. Robles<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Indegsal and Department of Molecular Biology, University of León, León, Spain

Journal of Applied Ichthyology

Article first published online: 12 NOV 2012 DOI: 10.1111/jai.12089

## **Summary**

Cryopreservation of Primordial Germ Cells (PGCs) for gene banking in fish is very promising considering the limitations that exist in fish embryo. Via germ line chimerism, these cells allow surrogate production in teleost fish. However, cryopreservation involves a range of extreme factors that might be stressful to cells. Moreover, Reactive Oxygen Species (ROS) produced during cryopreservation can damage DNA. Quantitative PCR was validated to quantify DNA damage mediated directly by reactive oxygen species or by cellular consequences of exposure to ROS. In this study, quantitative PCR (q-PCR) was used for the first time to measure mitochondrial and nuclear DNA damage after PGCs cryopreservation. Our data showed that the smallest number of lesions per 10 Kb was observed in one of the regions of the nuclear genome (2.6). However, nuclear genome was generally more sensitive than mitochondrial genome to damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or freezing without cryoprotectants. Using our cryopreservation protocol, the number of DNA lesions per 10 Kb was never higher than 4.68. In summary, q-PCR represents a feasible technique to quantify DNA damage, and this study demonstrates for the first time that it could be successfully applied to analyze PGC protocols.

## Introduction

The zebrafish is a well established model in developmental biology and, in recent years, has become an important model system for science worldwide (Zon and Peterson, 2005). New mutants and transgenic individuals are being created, generating the need to develop tools for their preservation. In this respect, the cryopreservation technique allows germplasm banking of such valuable lines.

Embryo cryopreservation has yet to be achieved in fish, due to the particular structure and characteristics of fish embryos (Hagedorn et al., 1997; Robles et al., 2009). Cryopreservation of Primordial germ cells (PGCs) is a good alternative for the conservation of the diploid genome in fish until embryo cryopreservation is achieved. These cells retain migratory capacity after cryopreservation (Kobayashi et al., 2004; Riesco et al., 2012) and can colonize the genital ridge once transplanted in the recipient embryo, later giving rise to functional gametes in adult fish (Saito et al., 2008).

However, cryopreservation involves a range of extreme factors that might be stressful to cells, such as specific and non-specific effects of cryoprotectants, chemical and physical alterations (mechanical damage by ice crystals, including destruction of cell membrane integrity), redistribution of actin fibers, mitochondrial depolarization, and increased reactive oxygen species (ROS) production, which may then trigger the apoptotic cascade leading to a decrease in the survival rate and in the developmental rate of the embryos (Kopeika et al., 2005). In this respect, Ahn et al. (2002) observed that cryopreserved mouse embryos had a high level of ROS induced by freezing and thawing and considered apoptosis as a cause of post-thaw embryonic cell death *in vitro*. However, the most recent studies have shown that negative correlations between sperm DNA damage and the activation of a family of proteases that induce apoptosis, caspases post-thaw indicate that cryopreservation-induced DNA fragmentation occurs regardless of caspase activation and likely occurs in non-apoptotic cells in human sperm (Thomson et al., 2009). It is well-known that ROS exhibit a high

capacity to impair proteins, lipid membranes, DNA and RNA, which are essential components of functional mitochondria (Rothfuss et al., 2010).

ROS include free radicals, which are active oxidizing agents, and these peroxidation products are highly deleterious and can produce both DNA strand breaks and base modification (Lopes et al., 1998) which includes single- and double-strand breaks, abasic sites, and base damage (Demple and Harrison, 1994; Friedberg et al., 1995).

Recently, Riesco et al. (2012) provide a protocol for zebrafish PGC cryopreservation and we evaluated DNA fragmentation of these cells after the process by Comet Assay. Results showed that using the optimum protocol, DNA fragmentation after cryopreservation remains similar to non-cryopreserved cells. However, there are many other types of DNA damage that this technique cannot detect, such as base modifications. The aim of the present study was to determine DNA damage in zebrafish cryopreserved PGCs using a more sensitive and quantitative method that would also offer the possibility of studying different vulnerability of specific DNA regions to reactive oxygen species after cryopreservation. The technique used in this study is based on the blocking of thermostable DNA polymerase progression by lesions in the DNA template which results in a decrease in DNA polymerase fidelity and amplification efficiency (Sikorsky et al., 2007). Quantitative PCR (q-PCR) was used in this study for the first time to measure DNA damage after PGCs cryopreservation.

## **Materials and methods**

### **Zebrafish maintenance and genital ridge dissection**

Zebrafish (*Danio rerio*) AB wild type, were maintained in tanks under standard conditions (Westerfield, 1995). The genital ridges (GRs) were manually excised from 26-somite embryos using fine watchmaker's forceps under a microscope (Nikon, Tokyo, Japan), as described by Kobayashi et al. (2004). PGCs obtained from later stages could decrease their migration ability as it was reported by Goto-Kazeto et al. (2010), and kept in modified Leibovitz medium (L15) supplemented with 5% fetal bovine

serum (FBS) at room temperature (RT) until further use. Approximately 75 GRs were used in each replicate.

### **Genital ridge cryopreservation**

Genital ridges were exposed to cryoprotectants; dimethyl sulfoxide (DMSO) 5M, ethylene glycol (EG)1M, polyvinyl-pyrrolidone (PVP) 4%, in a three step-wise manner. First, they were placed in a pretreatment solution with DMSO 2 M and EG 0.5 M in Hank $\ddot{\text{s}}$ s premix (NaCl 138.28 mm, KCl 5.42 mm, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.255 mm, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.455 mm, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mm, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mm) for 10 min. Then, samples were exposed to DMSO 5 M and EG 1 M in Hank $\ddot{\text{s}}$ s premix for 2 min. In the last step, external cryoprotectant agent (PVP) was added for 2 min. The PGCs (for GRs earlier than 24 hpf) were loaded in 0.5 mL straws and exposed to liquid nitrogen vapor for 20 min and plunged into liquid nitrogen.

Genital ridges frozen without cryoprotectants were placed in in Hank $\ddot{\text{s}}$ s premix (NaCl 138.28 mm, KCl 5.42 mm, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.255 mm, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.455 mm, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mm, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mm) and loaded in 0.5 mL straws and exposed to liquid nitrogen vapor for 20 min and plunged into liquid nitrogen.

### **Hydrogen peroxide treatment**

GRs were exposed to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1% (Merck, Spain) in L15 for 30 min at room temperature (RT), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was washed twice with L15.

### **DNA isolation and purification**

DNA was extracted from fresh, cryopreserved, frozen without cryoprotectants and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated samples. For DNA extraction DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen, Spain) was used following the instructions described by the manufacturer. DNA quantity and purity was determined using a nanodrop spectrometer (nanodrop 1000; Thermo Scientific). The isolated DNA showed a high purity (A<sub>260</sub>/280 > 1.7) and was stored at 4°C.

### **Quantitative PCR**

The primers for real time PCR were designed in two different mitochondrial and nuclear regions using Primer Express and Primer Select software to study regions with

different vulnerability to DNA damage. To compare the number of DNA lesions between mitochondrial and nuclear genomes, two pairs of mitochondrial primers and two pairs of nuclear primers were tested (Table 1). The amplicon was always over 750 bp. For internal normalization control, a pair of primers (forward and reverse) was designed within each studied amplicon. The primer nucleotide sequences and data base accession number can be found in Table 1.

**Table 1. Sequences and parameters of nuclear and mitochondrial oligonucleotides used for q-PCR**

| Name              | NCBI ref sequence | Sequence               | Size (bp) | T annealing (°C) | t elongation (s) | PCR efficiency (%) | R    |
|-------------------|-------------------|------------------------|-----------|------------------|------------------|--------------------|------|
| ZF_nuc900-F       | NC_007134.5       | CATGTTGGTGTGACTGAATCC  | 900       | 60               |                  | 90.685             | 0.99 |
| ZF_nuc900-R       |                   | GTCCCCCGCGAGTCATACTGT  |           |                  |                  |                    |      |
| ZF_nuc922 F       | NC_007134.5       | GAATGCTGCCAACCACTTAGG  | 922       | 63               |                  | 74.569             | 0.97 |
| ZF_nuc922-R       |                   | GAGTGCGTTATGGAGGGTAAGC |           |                  |                  |                    |      |
| ZF_mit1030-F      | NC_002333         | ACCTGCGCTTCAGATTGC     | 1030      | 60.5             | 50               | 103.783            | 0.99 |
| ZF_mit1030-R      |                   | GCTCGGGTGTACATCCAT     |           |                  |                  |                    |      |
| ZF_mit970-F       | NC_002333         | CCGGCAATAGCTGGTTGTCT   | 970       | 62               |                  | 126.362            | 0.98 |
| ZF_mit970-R       |                   | TAGGCGGGATCGTCTTGG     |           |                  |                  |                    |      |
| * ZF_nuc900int-F  | NC_007134.5       | TAACACGCTGAGCACTGAGG   | 77        | 60               |                  | 112.503            | 0.99 |
| * ZF_nuc900int-R  |                   | AGAAGATGCGGTTGAGACG    |           |                  |                  |                    |      |
| * ZF_nuc922int-F  | NC_007134.5       | CCCCCCTCACAAAGCAGC     | 77        | 60               |                  | 97.121             | 0.97 |
| * ZF_nuc922int-R  |                   | CAGCAAATGCCACCCAGTCT   |           |                  |                  |                    |      |
| * ZF_mit1030int-F | NC_002333         | CGAGGCCATGGTAGAAAAAGG  | 60        | 60               | 10               | 126                | 0.99 |
| * ZF_mit1030int-R |                   | TAGGCGGCGGATTGTAGCT    |           |                  |                  |                    |      |
| * ZF_mit970int-F  | NC_002333         | CCAAACAAAAGAGGGCAATGT  | 75        | 60               |                  | 102.458            | 0.98 |
| * ZF_mit970int-R  |                   | CACTCCAGTGTGGGGTAAC    |           |                  |                  |                    |      |

The real time PCR (qPCR) conditions were optimized for the different primers to achieve similar amplification efficiencies to compare different amplicons. The amplification was monitored and analyzed by the intercalation of the fluorescent dye, SYBR Green, to double-stranded DNA. Product specificity was tested by melting curves and product size was visualized by electrophoresis on agarose gel (data not shown).

Reaction mixtures (total volume = 20 µL) contained 20 ng of template DNA, 1× SYBR Green Master mix (4 µL), 500 nM each forward and reverse primer (2 µL) and of 1× ROX (0.4 µL). Q-PCR was initiated with a preincubation phase of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 95°C denaturation for 10 s and the temperature for primer extension for 10 s. A final extension at 72°C was performed for 10 s (in small amplicons) or 50 s (in large amplicons) at the completion of the profile.

### **Delta-Delta Ct method and lesion rate**

Quantitative PCR amplification and fluorescence detection was carried out in a Step One Plus system (Applied Biosystems) according to guidelines provided. Step One free Software v.2.0 was used to calculate crossing point values. Each sample was analyzed in triplicate and each experiment was done in triplicate.

The difference in the threshold cycle (Cts) between long fragments and small fragments (internal normalization control) was determined. The number of lesions was calculated employing the formulae from Rothfuss and colleagues, previously published (Rothfuss et al., 2010).

Lesion rate [Lesion per 10 kb DNA] = $(1 - 2^{-(\Delta Ct_{long} - \Delta Ct_{short})}) \times 1000$  [bp]/size of long fragment [bp]

### **Data analysis**

DNA lesions were estimated as lesion per 10 kb DNA, including the size of the long amplicon. Each sample was analyzed in triplicate and each experiment was performed in triplicate. Results are represented as the means  $\pm$  SE of the number of lesions per 10 kb of three independent experiments with three replicates for each.

## **Results**

### **Quantitative PCR validation**

For Q-PCR validation, total DNA was isolated at concentrations of 300 ng  $\mu$ l $^{-1}$ , diluted 1 : 5–1 : 15 625 and amplified with primers for long and short fragments. Except for ZFnuc922, q-PCR efficiency was higher than 90% for long fragments, and higher than 97% for short ones (Table 1). The relationship between the threshold cycle and the dilution values of DNA was linear with a correlation coefficient R<sup>2</sup> higher than 0.9 in all cases. Moreover, this method showed linearity over a wide range of template concentrations, therefore it is a precise technique for DNA damage determination.

## Nuclear genome

In the two regions that studied within the nuclear genome (ZFnuc900 and ZFnuc922), treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced about 10 lesions per 10 Kb of nuclear DNA. In those samples frozen without cryoprotectants, more than eight lesions per 10 Kb were observed. However, in appropriately cryopreserved samples, lesions range from 4.68 to 2.6 depending on the nuclear region (Fig. 1).

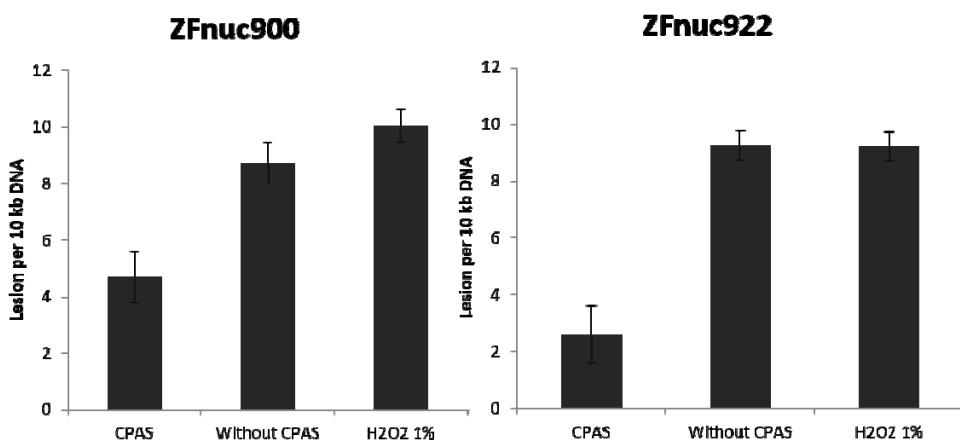


Figure 1. Number of DNA lesions per 10 kb in two different regions of nuclear genome, in cryopreserved (CPAs), frozen without cryoprotectants and exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1% for 30 min) zebrafish PGCs. Nuclear DNA damage was calculated using the  $\Delta 2Ct$  method and transformed into DNA lesion rate.

## Mitochondrial genome

Similarly to the nuclear genome, in the mitochondrial genome, treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced the highest number of DNA lesions, followed by those samples frozen without cryoprotectants (Fig. 2). In this case, the lesion rate for the ZFmit1030 region in samples frozen without cryoprotectants was closer to those obtained in properly cryopreserved cells (4.8 and 4.05 lesions per 10 kb, respectively) whereas for the ZFmit970 region, differences were more evident (6.74 and 4.12 lesions per 10 kb, respectively).

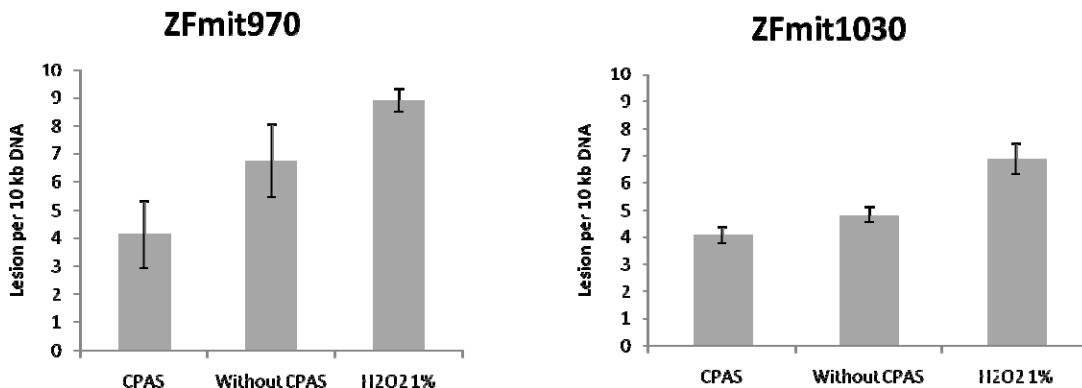


Figure 2. Number of DNA lesions per 10 kb in two different regions of mitochondrial genome in cryopreserved (CPAs), frozen without cryoprotectants and exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1% for 30 min) zebrafish PGCs. Mitochondrial DNA damage was calculated as nuclear DNA damage using the Δ2C<sub>t</sub> method and transformed into DNA lesion rate.

## Discussion

The ROS species produced during cryopreservation can damage DNA (Thomson et al., 2009). The evaluation of DNA damage is very important, especially when cryopreservation is to be applied for Gen Bank purposes (Cabrita et al., 2005). In our previous study on zebrafish PGC cryopreservation (Riesco et al., 2012), we described a successful protocol for zebrafish PGC cryopreservation, and we evaluated for the first time DNA integrity in PGCs after cryopreservation using the Comet assay. Our results demonstrated that our protocol does not induce DNA fragmentation. However, there are many other DNA types of damage that the assay cannot detect. Moreover, this technique does not provide a real quantification of DNA damage and offers information about the whole genome but not about particular regions of interest. In the present study we have used q-PCR to quantify DNA lesions in different regions of the mitochondrial and nuclear genome after GRs cryopreservation for the first time. The Relative Threshold Cycle (RTC) method can quantify differences in amplification efficiency of templates with DNA damage. This method has recently been used to demonstrate that sperm from infertile men contain more DNA lesions than sperm DNA

from fertile men (San Gabriel et al., 2006). Modified templates (DNA damaged regions) result in a delay during the initial cycles of amplification, which in turn results in an increase in the threshold cycle ( $C_t$ ) (Sikorsky et al., 2007). Recently, Rothfuss and co-workers observed, that qPCR was validated to quantify mtDNA damage mediated directly by reactive oxygen species or by cellular consequences of exposure to ROS (Rothfuss et al., 2010).

In this work, we analyzed two nuclear (ZFnuc900 and ZFnuc922) and two mitochondrial (ZFmit750 and ZFmit1030) genome regions (Table 1). The reason for studying both genomes separately was because higher susceptibility of the mitochondrial genome to DNA damage was expected. Some authors attributed the higher susceptibility in the mitochondrial genome to the absence of complex chromatin organization, which may serve as a protective barrier against ROS, ROS reactions due to damage to the electron transport chain and/or through lipid peroxidation (Yakes and VanHouten, 1997). Salazar and colleagues described different rates of DNA damage and repair capacity between mitochondrial and nuclear genomes, using the long-run quantitative PCR method (Salazar and Van Houten, 1997). Our data showed that, in fact, the smallest number of lesions per 10 Kb was observed in one of the regions of the nuclear genome (2.6 lesions in ZFnuc922) (Fig. 1). However, when DNA damage was induced, treating samples with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or freezing the cells without cryoprotectants, nuclear DNA was generally more damaged. The number of DNA lesions per 10 Kb using our cryopreservation protocol was never higher than 4.68.

This technique could be considered as a very important tool for the comparison of cryopreservation protocols studying a parameter of great importance as is DNA integrity. The most important factors to be taken into account for qPCR are template quality, purity and yield. Ayala-Torres and colleagues previously demonstrated that the integrity of DNA template is significant for the successful amplification of semi-long PCR targets (Ayala-Torres et al., 2000). The use of primers to amplify a small fragment within the long amplicon is also recommended for technical validation, since the

probability of lesions occurring in short fragments is minimal, therefore these primers serve as an internal normalization control.

Other techniques have been used to quantify mitochondrial DNA damage. Santos and colleagues (Santos et al., 2006), described a gene-specific quantitative polymerase chain reaction-based assay for the measurement of DNA damage, using amplification of long DNA targets. This method has been applied to measure the integrity of nuclear and mitochondrial genomes exposed to different genotoxins. However, it requires greater optimization and has numerous steps that increase the time necessary for carrying it out.

Taking into account recent advances in PGC isolation from GRs (Saito et al. 2008), it would be very interesting to perform DNA damage quantification exclusively in these cells, avoiding genital ridge somatic cells interference.

In summary, q-PCR represents a feasible technique to quantify DNA damage, and this work demonstrates for the first time that it could be successfully used to analyze cryopreservation protocols, allowing a wider range of DNA damage to be tested from a quantitative point of view, in any specific region of interest.

## **Acknowledgements**

This work was supported by MICINN AGL2009-06994, Fundación Ramón Areces and Ramón y Cajal program (RYC-2008-02339, MICINN, Spain). Authors would like to thank JCyL (E-24-2009-0036681) and Fondo Social Europeo, ZF BioLabs (Spain), Cintia Miranda, Dr. Draper (UCDavis, USA) and Dra. Martínez Guerra.

## **References**

1. Ahn, H. J.; Sohn, I. P.; Kwon, H. C.; Jo, D. H.; Park, Y. D.; Min, C. K., 2002: Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. Mol. Reprod. Dev. 61, 466–476.

2. Ayala-Torres, S.; Chen, Y.; Svoboda, T.; Rosenblatt, J.; Van Houten, B., 2000: Analysis of gene-specific DNA damage and repair using quantitative polymerase chain reaction. *Methods* 22, 135–147.
3. Cabrita, E.; Robles, V.; Rebordinos, L.; Sarasquete, C.; Herráez, M. P., 2005: Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50, 144–153.
4. Demple, B.; Harrison, L., 1994: Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. Annu. Rev. Biochem. 63, 915–948.
5. Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W., 1995: DNA Repair and Mutagenesis. Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 1–698.
6. Goto-Kazeto, R.; Saito, T.; Takagi, M.; Arai, K.; Yamaha, E., 2010: Isolation of teleost primordial germ cells using flow cytometry. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1487–1492.
7. Hagedorn, M.; Kleinhans, F. W.; Freitas, R.; Liu, J.; Hsu, E. W.; Wildt, D. E.; Rall, W. F., 1997: Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *J. Exp. Zool.* 278, 356–371.
8. Kobayashi, T.; Takeuchi, Y.; Yoshizaki, G.; Takeuchi, T., 2004: Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 91–100.
9. Kopeika, J.; Zhang, T.; Rawson, D. M.; Elgar, G., 2005: Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells. *Mutat. Res.* 570, 49–61.
10. Lopes, S.; Jurisicova, A.; Sun, J. G.; Casper, R. F., 1998: Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13, 896–900.
11. Riesco, M. F.; Martínez-Pastor, F.; Chereguini, O.; Robles, V., 2012: Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology* 77, 122–130.

12. Robles, V.; Cabrita, E.; Herráez, M. P., 2009: Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. *Zebrafish* 6, 281–293.
13. Rothfuss, O.; Gasser, T.; Patenge, N., 2010: Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. *Nucleic Acids Res.* 38, 24.
14. Saito, T.; Goto-Kazeto, R.; Arai, K.; Yamaha, E., 2008: Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* 78, 159–166.
15. Salazar, J. J.; Van Houten, B., 1997: Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mutat. Res.* 385, 139–149.
16. San Gabriel, M.; Zhang, X.; Zini, A., 2006: Estimation of human sperm gene-specific deoxyribonucleic acid damage by real-time polymerase chain reaction analysis. *Fertil. Steril.* 85, 797–799.
17. Santos, J. H.; Meyer, J. N.; Mandavilli, B. S.; Van Houten, B., 2006: Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* 314, 183–199.
18. Sikorsky, J. A.; Primerano, D. A.; Fenger, T. W.; Denvir, J., 2007: DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 431–437.
19. Thomson, L. K.; Fleming, S. D.; Aitken, R. J.; De Iuliis, G. N.; Zieschang, J. A.; Clark, A. M., 2009: Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum. Reprod.* 24, 2061–2070.
20. Westerfield, M., 1995: The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press, Eugene, pp. 267–272.
21. Yakes, F. M.; VanHouten, B., 1997: DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 514–519.

22. Zon, L. I.; Peterson, R. T., 2005: In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discovery* 4, 35–44.

## **Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges**

**Marta.F. Riesco, V. Robles<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Indegsal and Department of Molecular Biology, University of León, León, Spain

Plos One

Received November 19, 2012; Accepted May 21, 2013; Published June 21, 2013

## Abstract

Cryopreservation is an important tool routinely employed in Assisted Reproduction Technologies (ARTs) and germplasm banking. For several years, the assessment of global DNA fragmentation seemed to be enough to ensure the integrity of genetic material. However, cryopreservation can produce molecular alterations in key genes and transcripts undetectable by traditional assays, such modifications could interfere with normal embryo development. We used zebrafish as a model to study the effect of cryopreservation on key transcripts and genes. We employed an optimized cryopreservation protocol for genital ridges (GRs) containing primordial germ cells (PGCs) considered one of the best cell sources for gene banking. Our results indicated that cryopreservation produced a decrease in most of the zebrafish studied transcripts (*cxcr4b*, *pou5f1*, *vasa* and *sox2*) and upregulation of heat shock proteins (*hsp70*, *hsp90*). The observed downregulation could not always be explained by promoter hypermethylation (only the *vasa* promoter underwent clear hypermethylation). To corroborate this, we used human spermatozoa (transcriptionally inactive cells) obtaining a reduction in some transcripts (*eIF2S1*, and *LHCGR*). Our results also demonstrated that this effect was caused by freezing/thawing rather than exposure to cryoprotectants (CPAs). Finally, we employed real-time PCR (qPCR) technology to quantify the number of lesions produced by cryopreservation in the studied zebrafish genes, observing very different vulnerability to damage among them. All these data suggest that molecular alterations caused by cryopreservation should be studied in detail in order to ensure the total safety of the technique.

## Introduction

Cryopreservation is a technique widely used in Assisted Reproduction Technologies (ARTs) as well as in germplasm banking. Although this technology has been used for several years, recent studies have pointed out that it can cause molecular alterations in cells at different levels [1] that may interfere with normal embryo development. For several years, the assessment of global DNA integrity (by fragmentation assays) seemed to be enough to ensure the efficiency of cryopreservation in preserving genetic material [2,3]. However, a number of other types of damage are known to occur. Deletions, creation of abasic sites, base modifications or DNA crosslinks are different types of DNA damage [4] that cannot be detected by the above-mentioned methods. It is well documented that spermatozoa DNA damage can lead to poor fertilization, but more importantly, it can also impair embryonic development, increase the number of abortions or even produce childhood diseases [5]. But DNA is not the only crucial factor to be analyzed at molecular level. It is a fact that cryopreserving human sperm decreases or even eliminates the presence of certain transcripts [6]. The importance of spermatozoa mRNAs has only recently been revealed. Recent studies have proposed that some spermatozoa transcripts are crucial for fertilization and even for early embryo development [7]. The potential association of ARTs with a higher incidence in human imprinting disorders, such as Angelman and Beckwith-Wiedemann syndromes [8], has also been suggested. However, to date only a few studies in mouse and human oocytes have investigated cryogenic effects on imprinted methylation [9–11]. The relationship between promoter DNA methylation and gene expression is well described in the literature [12] and any modification potentially produced by cryopreservation in the normal promoter methylation pattern in crucial genes deserves special attention. All these data suggest that the study of molecular modifications potentially produced by cryopreservation on key transcripts could be relevant not only in ARTs in humans but also in any species suitable for cryobanking. To study these questions, we used zebrafish as a model. Zebrafish has become an important animal model for biomedical research and several

transgenic and mutant lines are being created and should be cryopreserved. More importantly, this species is an ideal model for investigating cancer [13,14] and other human diseases, different infectious [15], neurodegenerative disorders [16], and vascular disorders [17]. Several studies have shown a close relationship between zebrafish and the human genome [18–20], and remarkable conservation between human and zebrafish genes has been shown [21]. Moreover, many similar tumor genes and pluripotency factors; nanog homeobox (*nanog*), POU domain, class 5, transcription factor 1 (*oct4/pou5f1*), SRY-box containing gene 2 (*sox2*) and Krüppel-like factor 4b (*klf4*), have a conserved expression pattern in zebrafish and humans [22,23] and similar methylation patterns have been also obtained [24].

The aim of the present study was to determine whether an optimized cryopreservation protocol (in terms of cell survival and DNA fragmentation) produces alterations at genetic and epigenetic levels using a candidate gene approach, since different genome regions are known to have different susceptibility to damage. We carried out this study in zebrafish genital ridges (GRs), which contain primordial germ cells (PGCs), and are suggested by many authors to be the best cellular source for cryobanking in this species, since both paternal and maternal genomes can be preserved [25]. The cryopreservation protocol, developed by our group, was optimal for these cells taking into account viability, DNA integrity and cell functionality [26]. Our work focused on genes and transcripts with important roles in pluripotency and PGC viability. We selected genes expressed in PGCs: Dead end (*dnd*), crucial to PGC survival and migration [27], vasa (*vasa*) relevant in germ cell lineage and PGC development [28], chemokine (C-X-C motif) receptor 4b (*cxcr4b*) involved in PGCs migration [29]; genes with important functions in stem cells pluripotency: POU domain, class 5, transcription factor 1 (*pou5f1*) [30]; and genes involved in differentiation processes in early embryo development: SRY-box containing gene 2 [31] and 3 [32] (*sox2 and 3*) (Supplementary Table 1 (Figure S1)). The effect of cryopreservation on gene expression and promoter methylation was studied. Also, the number of lesions after cryopreservation was quantified in those key genes by real-time PCR (qPCR). This technique is based on blocking thermostable DNA polymerase

progression by lesions in the DNA template which results in a decrease in DNA polymerase fidelity and amplification efficiency [33].

This study represents a step forward in the knowledge of the effects of cryopreservation at molecular level, questioning whether more in-depth molecular studies would be advisable to guarantee the total safety of the technique.

## **Material and Methods**

### **Ethics statement**

The experiments carried out in this study using embryos from zebrafish are part of a project from the Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2009-06994 specifically approved by the University of León Bioethical Committee (<https://www.unileon.es/investigadores/comite-etica>). The University of León is authorized by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food to breed zebrafish. The use of human spermatozoa for RNA extraction and the Written Informed Consent (IC) were approved by the University of León Bioethical Committee as part of another grant application (ERC starting grant). ICs were obtained from donors.

### **Zebrafish maintenance and genital ridge dissection**

Adult zebrafish (*Danio rerio*) *vasa EGFP zf45 strain, tg{vas:egfp}* transgenic line, generated by the Olsen lab [34], were maintained in tanks under standard conditions [35] and were used exclusively for embryo production. For embryo collection, adult zebrafish were kept in glass tanks at 28 °C with 6 fish per tank at the ratio of 1:2 male: female. The GRs were manually excised from 26-somite embryos using fine watchmaker's forceps under a microscope (Nikon, Japan), as described by Kobayashi [36]. PGCs obtained at later stages could decrease their migration ability [37]. The GRs were kept in modified Leibovitz medium (L15) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) at room temperature (RT) until further use.

### **Genital ridge exposure and cryopreservation**

In order to study the effect of cryoprotectants and cryopreservation on gene expression, promoter methylation and DNA damage in PGCs and the surrounding somatic cells, genital ridges were exposed to cryoprotectants; 5 M dimethyl sulfoxide (DMSO), 1 M ethylene glycol (EG), 4% polyvinylpyrrolidone (PVP), in a three step-wise manner. First, they were placed in a pretreatment solution with 2 M DMSO and 0.5 M EG in Hank's premix (138.28 mM NaCl, 5.42 mM KCl, 0.255 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.455 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>) for 10 min. The samples were then exposed to 5 M DMSO and 1 M EG in Hank's premix for 2 m. In the last step, external cryoprotectant agent (PVP) was added for 2 min. The GRs containing PGCs, were loaded into 0.5 mL straws and exposed to liquid nitrogen vapor (2 cm over the surface) for 20 min and plunged into liquid nitrogen [26].

### **Human sperm sample cryopreservation.**

To know the effect of cryopreservation on mRNAs in transcriptionally inactive cells, human sperm samples were cryopreserved as follows: samples were diluted 1:1 in a commercial cryoprotective medium, Sperm Freezing Medium (Irvin, Spain), to a final concentration of 5 million/mL. The mixture was equilibrated for 10 min at RT and loaded into 0.5 mL French straws. Then, the straws were exposed to liquid nitrogen vapors (2 cm over the surface) for 30 min, plunged into liquid nitrogen and stored until used. Thawing was carried out at RT for 5 min. Cell morphology and motility were checked under light microscopy after cryopreservation.

### **DNA damage assay.**

### **Hydrogen peroxide treatment.**

Hydrogen peroxide treatment was carried out as a positive control for DNA damage. Zebrafish GRs containing the PGCs for DNA extraction were exposed to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% (Merck, Spain) in L15 for 30 min at RT, and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was washed twice with L15.

### **DNA isolation and purification.**

DNA was extracted from zebrafish GRs containing PGCs in fresh, cryoprotectant agent (CPAs) exposed, cryopreserved and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated samples. The DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen, Spain) was used following the manufacturer's instructions. Approximately 75 GRs were used per extraction. DNA quantity and purity were determined using a nanodrop spectrometer (nanodrop 1000, Thermo Scientific, Biocompare, Spain). The isolated DNA showed high purity (A<sub>260</sub>/280 > 1.8) and was stored at -20°C until required for analysis.

### **Real time qPCR.**

The primers for qPCR were designed using Primer Express (Software v2.0, Applied Biosystems) and Primer Select (Software v 10.1 DNA Star, Lasergene Core Suit). The amplicon was always over 600 bp. For internal normalization control, a pair of primers (forward and reverse) was designed within each studied amplicon. The primer nucleotide sequences and size of the amplicon can be seen in the supplementary material (Table S2). The qPCR conditions were optimized for the different primers to achieve similar amplification efficiencies to compare different amplicons. The amplification was monitored and analyzed by the intercalation of the fluorescent dye, SYBR Green, to double-stranded DNA. Product specificity was tested by melting curves and product size was visualized by electrophoresis on an agarose gel (data not shown). Reaction mixtures (total volume = 20 µL) contained 3 ng of template DNA, 1X SYBR Green Master mix (4 µL), 500 nM of each forward and reverse primer (2 µL) and of 1X ROX (0.4 µL). QPCR was initiated with a preincubation phase of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 95°C denaturation for 10 sec and the temperature for primer extension for 10 sec. A final extension at 72°C for 10 sec (in small amplicons) or 50 sec (in large amplicons) was performed. The relationship between the threshold cycle and the DNA dilution values was linear with a correlation coefficient R<sup>2</sup> higher than 0.9 in all cases (data not shown). This method showed linearity over a wide range of template concentrations, therefore it is an accurate technique for DNA damage determination.

### **Lesion rate.**

In order to calculate the number of lesions induced by cryopreservation in the studied zebrafish genes, a quantitative PCR amplification and fluorescence detection was carried out in a Step 1 Plus system (Applied Biosystems, Spain), according to guidelines provided by the manufacturer. Step 1 Free Software v.2.0 (Applied Biosystems, Spain) was used to calculate crossing point values. Technical and biological triplicates were done. The difference in the threshold cycle (Cts) between long fragments and short fragments (internal normalization control) was determined. The number of lesions was calculated employing the previously published formula by Rothfuss and colleagues [33]. The zebrafish primer nucleotide sequences, annealing temperatures and sizes of amplicons can be found in the supplementary material (Table S2).

Lesion rate [Lesion per 10 kb DNA] = ( 1–2–(ΔCt<sub>long</sub>–ΔCt<sub>short</sub>)) X 1000 [bp]/size of long fragment [bp]

### **Data analysis.**

DNA lesions were estimated as lesions per 10 kb DNA, including the size of the long amplicon. Results are represented as the means ± SE of the number of lesions per 10 kb of three independent experiments with three replicates for each. Statistical differences in DNA damage were analysed by one way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) method used for comparisons after the performed analysis of variance as a post hoc test. All the statistical analyses were conducted using the Statistical Product and Service Solutions (SPSS), IBM, v.20 software.

### **Gene expression assay**

#### **RNA isolation and DNase treatment.**

RNA was extracted from zebrafish GRs containing PGCs in fresh, cryopreserved and CPAs exposed samples (approximately 75 GRs per replicate) and human sperm (approximately 5 million per replicate) using Trizol reagent (Invitrogen, Madrid) according to the manufacturer's protocol. RNA quantity and purity were determined using a nanodrop spectrometer (nanodrop 1000, Thermo Scientific, Biocompare,

Spain). This protocol also includes a DNase I treatment step. The isolated RNA showed high purity ( $A_{260}/280 > 1.8$ ) and was stored at -80 °C until further use.

### **Reverse transcription.**

Complementary DNA (cDNA) was obtained from RNA (1 $\mu$ g) using the cDNA synthesis kit (Invitrogen, Madrid), following the manufacturer's protocol. The cDNA for zebrafish and human samples was stored at -20 °C before analysis by qPCR. In zebrafish GRs containing PGCs and human sperm, reverse transcription (RT-PCR) conditions were 95°C for 3min, and 35 cycles of: 95°C for 30 sec, 62°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, and a final extension at 72°C for 10 min. In human sperm samples (fresh and cryopreserved), eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha (*eIF2S1*) with an important role in protein synthesis, homeobox B1 (*HOXB1*) reported as marker of pregnancy success and luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (*LHGR*) considered as human male quality marker [6], were analyzed.

### **Real time qPCR.**

In order to measure gene expression in zebrafish GRs containing PGCs (fresh, treated with CPAs and cryopreserved GRs) and in human sperm samples (fresh and cryopreserved), qPCR was performed. The primers for qPCR were designed using Primer Express (Software v2.0, Applied Biosystems) and Primer Select (Software v 10.1 DNA Star, Lasergene Core Suit). The primer nucleotide sequences and annealing temperature from human sperm and zebrafish genes can be found in Supplementary material (Table S3). The qPCR conditions were optimized for the different primers to achieve similar amplification efficiencies to compare different amplicons. Product specificity was tested by melting curves and product size was visualized by electrophoresis on agarose gel (data not shown). Reaction mixtures (total volume = 20  $\mu$ L) contained 2  $\mu$ L of cDNA, 1X SYBR Green Master mix (Applied biosystems, Madrid) (10  $\mu$ L) and 500 nM each forward and reverse primer (2  $\mu$ L). QPCR was initiated with a preincubation phase of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 95°C denaturation for 10 sec and the temperature for primer extension for 60 sec. The relationship between the threshold cycle and the dilution values of DNA was linear with a correlation

coefficient R<sup>2</sup> higher than 0.9 in all cases (data not shown). Each experiment was performed three times and three technical replicates were done per sample.

Expression levels for each zebrafish gene relative to *actb2* and for each human gene relative to human *ACTB*, were calculated for all zebrafish and human samples using the delta delta- Ct (2- $\Delta\Delta C_t$ ) method, which is an algorithm to analyze the relative changes in gene expression. It requires the assignment of one housekeeping gene, which is assumed to be uniformly and constantly expressed in all samples [38]. The *actb2* stability after cryopreservation was validated by our group using qPCR (Supplementary Figure S1).

### **Data analysis.**

Data were analyzed using SPSS V.16 (IBM, USA) and Microsoft Excel. All results were expressed as the means  $\pm$  SE of the 2- $\Delta\Delta C_t$  method of three independent experiments with three replicates for each. The Student's t-test ( $\mu=1$ ) was performed to identify changes in gene expression levels after cryopreservation.

## **Methylation analysis**

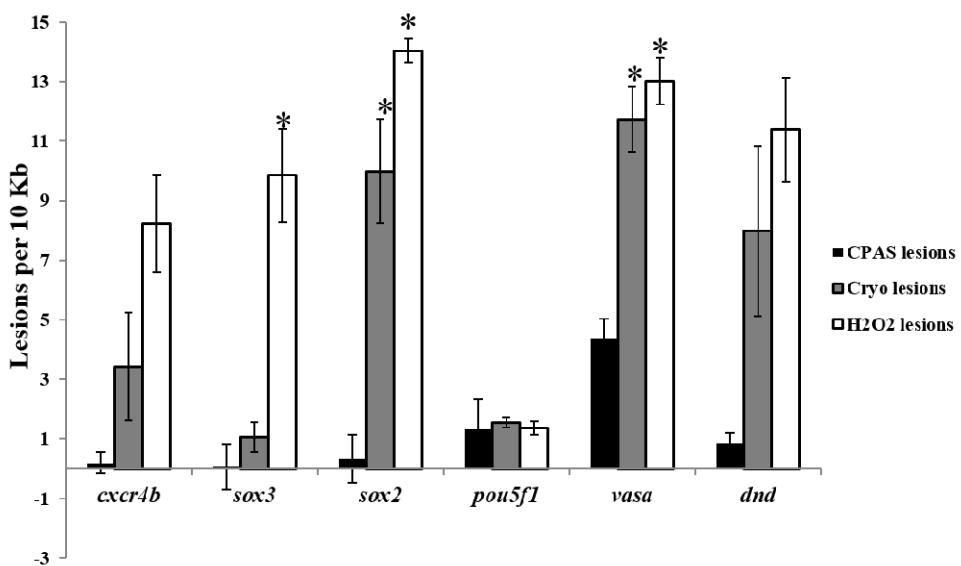
### **DNA conversion with bisulphite.**

Genomic DNA from fresh and cryopreserved zebrafish GRs containing PGCs was bisulphite converted using the EpiTect Bisulphite Kit (Qiagen, Spain). Bisulphite sequencing. Converted DNA was amplified by PCR and nested PCR using primers described by Wu et al. [24] and Lindeman et al. [39]. The sequencing primers and specific annealing temperature are listed in the supplementary material and methods section (Table S3). PCR conditions were 95°C for 7 min and 40 cycles of 95°C for 1 min, annealing temperature (see Table S3) for 2 min and 72°C for 2 min, followed by 10 min at 72°C. Size and sequences of PCR amplicons are listed in Supplementary table S4. PCR products were cloned into *E. coli* DH5α TOPO TA cloning and sequenced. The CpG viewer software for DNA methylation analysis was used [40].

## Results

### **Cryopreservation induces different levels of DNA damage in zebrafish genes**

As expected, the highest number of lesions was found in peroxide treated zebrafish samples, ranging from  $8.24 \pm 1.64$  lesions in *cxcr4b* to  $14.04 \pm 0.41$  lesions in *sox2*. The number of lesions was surprisingly low in *pou5f1* after peroxide treatment ( $1.36 \pm 0.23$  lesions). Cryopreservation significantly increase the number of lesions in 2 of the 6 studied genes (*sox2* and *vasa*). After cryopreservation, the minimum number of lesions was found in *sox3* and *pou5f1* genes ( $1.05 \pm 0.50$  and  $1.55 \pm 0.16$  lesions, respectively). The highest values of DNA damage after cryopreservation were observed in *sox2* and *vasa* gene ( $9.99 \pm 1.75$  and  $11.72 \pm 1.08$  lesions respectively) (Figure 1). The results demonstrated that *pou5f1* and *sox3* were less prone to DNA damage induced after the cryopreservation process, *pou5f1* being particularly resistant even to peroxide treatment.

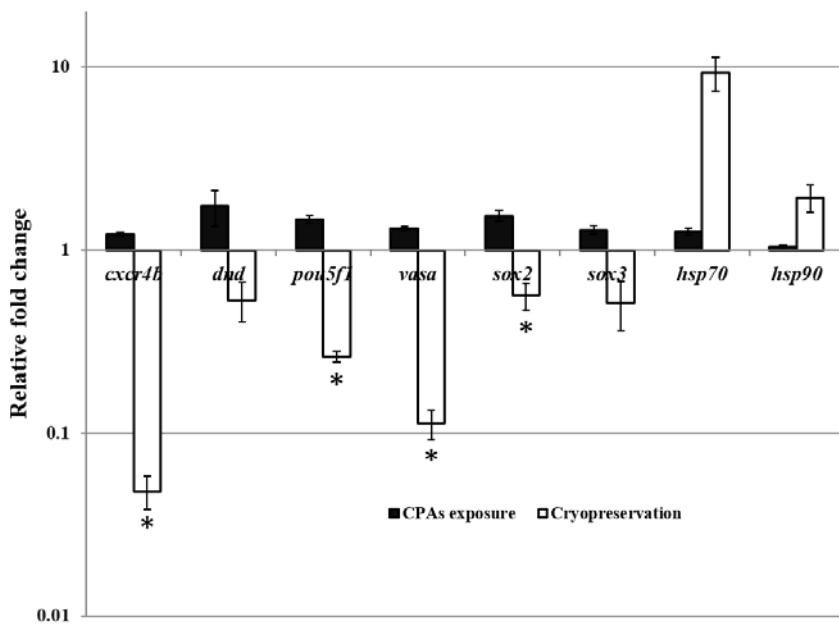


**Figure 1. Number of DNA lesions per 10 kb in specific genes.** Cryopreservation induces different levels of DNA damage in zebrafish genes. DNA was extracted from fresh, incubated in cryoprotectants (CPAs), cryopreserved (Cryo) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated (3% for 30 min) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

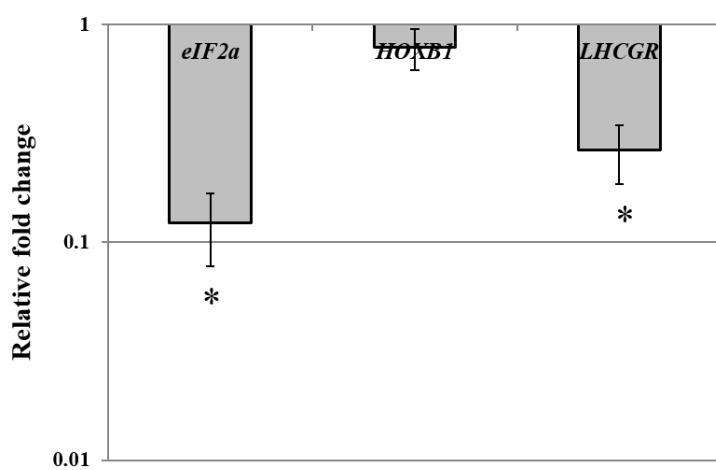
zebrafish genital ridges. The formula employed for lesion rate calculation [33] estimates the number of lesions in different treated samples in comparison with fresh control samples (no lesions). Three independent experiments were done and three replicates were carried out in each of them. Error bars indicate standard error (SE). Results are represented as the mean  $\pm$  SE. Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by SNK as a post hoc test. Asterisks represent significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments for each gene.

### **Cryopreservation affects gene expression levels in zebrafish genital ridge and alters transcripts in human sperm**

In order to study the effect of cryoprotectant exposure and cryopreservation on zebrafish gene expression, qPCR analysis was performed in zebrafish GRs treated with CPAs and GRs cryopreserved. Expression levels were calculated for all samples using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and *actb2* as reference gene. After cryopreservation, all the studied genes (*cxcr4b*, *dnd*, *pou5f1*, *vasa*, *sox2* and *sox3*) were downregulated. The decrease in transcripts was significant for: *cxcr4b*, *pou5f1*, *vasa* and *sox2* genes (Figure 2). However, heat shock proteins (*hsp70* and *hsp90*), associated with osmotic and thermal stress [41], were upregulated (Figure 2). When GRs containing PGCs were incubated with CPAs but not subjected to freezing and thawing, no downregulation was observed in the studied genes and no upregulation in the heat shock proteins was found (Figure 2). In human spermatozoa (transcriptionally inactive cells), qPCR results demonstrated that cryopreservation can affect the presence of some transcripts (*eIF2S1* and *LHCGR*) whereas others could remain intact (*HOXB1* and *ACTB*) (Figure 3).



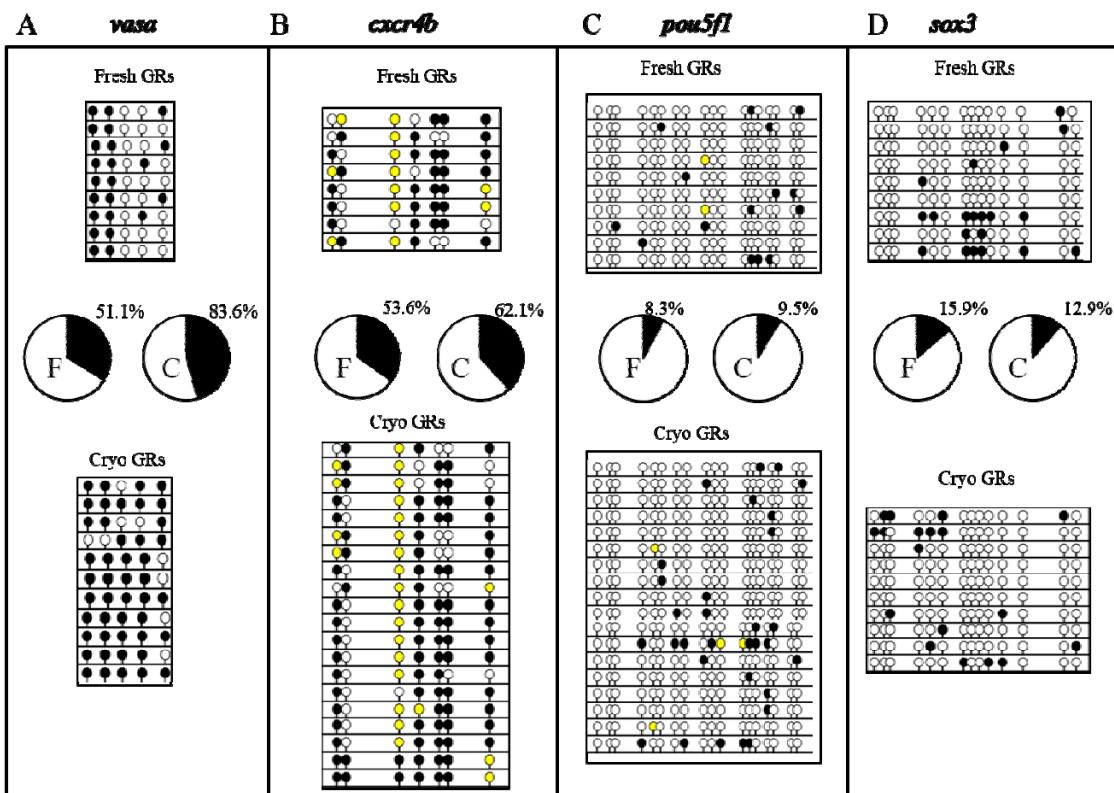
**Figure 2. Relative expression of zebrafish genes after CPAs exposure (CPAs) and cryopreservation (Cryo).** Cryopreservation affects gene expression levels in zebrafish genital ridges. Analysis was carried out in zebrafish genital ridges (GRs) containing primordial germ cells (PGCs). Expression levels for each gene relative to actb2 were calculated for all samples using the  $2-\Delta\Delta Ct$  method. All results were expressed as the means  $\pm$  SE of the  $2-\Delta\Delta Ct$  method of three independent experiments with three replicates for each. The Student's t-test ( $\mu=1$ ) was performed to identify changes in gene expression levels after cryopreservation. Asterisks showed significant ( $p< 0.05$ ) downregulation after cryopreservation (Cryo).



**Figure 3. Relative expression of human genes after cryopreservation (Cryo).** Cryopreservation affects expression of some transcripts in human sperm. Analysis was carried out in human spermatozoa, transcriptionally inactive cells. Expression levels for each gene relative to ACTB were calculated for all samples using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. All results were expressed as the means  $\pm$  SE of the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method of three independent experiments with three replicates for each. The Student's t-test ( $\mu=1$ ) was performed to identify changes in gene expression levels after cryopreservation. Asterisks showed significant ( $p < 0.05$ ) downregulation after cryopreservation (Cryo).

**Different methylation levels were found after cryopreservation of zebrafish GRs, containing PGCS**

To study whether differences in zebrafish gene expression after cryopreservation could be associated with a promoter methylation, we assessed the DNA methylation profile using bisulphite genomic sequencing. The highest methylation levels after cryopreservation were found in *vasa* (83.6%) (Figure 4A) and *cxcr4b* (62.14%) (Figure 4B) promoters, in agreement with their significantly repressed state. In contrast, in *pou5f1*, (Figure 4C) which also presented a significant downregulation profile after cryopreservation, no differences in DNA methylation were found in cryopreserved GRs.



**Figure 4. Bisulphite sequencing analysis of CpG methylation in the promoter of *cxcr4b* (A), *pou5f1* (B), *sox3*(C) and *vasa* (D) genes in fresh and cryopreserved zebrafish genital ridges (GRs) containing primordial germ cells (PGCs).** Different methylation levels were found after cryopreservation of zebrafish GRs. White circles represent methylated CpG and black circles unmethylated islands. The software represented islands with an undetermined methylation pattern with yellow circles. The percentage of methylated CpGs for each promoter was represented.

## Discussion

Cryopreservation is a technique commonly used for gene banking purposes and is routinely employed in ARTs. Human sperm, oocyte and embryos have been cryopreserved for decades. It is well known that reactive oxygen species (ROS) can be produced during the process and these free radicals can damage DNA [42–44]. Possible damage produced in the DNA is fragmentation. In fact, this is almost the only parameter related to DNA status assessed after cryopreservation in routine protocols.

However, it is well known that many other types of DNA damage can occur. This damage could be particularly serious if it affects genes that are important in early embryo development. Recent technology has enabled the quantification of DNA damage in specific genome regions [33]. Our group has employed this technology for the first time in order to quantify the number of lesions produced by cryopreservation in specific nuclear and mitochondrial genome regions [45]. In this candidate gene approach, we used the technique to assess the effect of cryopreservation on the key zebrafish genes being studied. Our results showed that *pou5f1* and *sox3* were less prone to DNA damage induced by the cryopreservation process. In contrast, significant differences in DNA damage after cryopreservation were observed in *sox2* and *vasa* genes (Figure 1). Differences in susceptibility between genes were clearly detected and could be at least partially attributed to the different position that the specific DNA regions have within the nuclei (nuclear territories). It is known that regions closer to the nuclear envelope may be more susceptible to damage [46]. Different panels of genes could be studied by this technique depending on the cell type cryopreserved. In our case, *vasa* is a crucial gene for PGCs since it is involved in germ cell lineage development [28]. In zebrafish, *vasa* transcripts become targeted to the cleavage planes of early embryos and subsequently incorporated into the PGCs [34]. Therefore damage in this gene could have undesirable effects should these cells be used for cryobanking. This is particularly interesting considering that this cryopreservation protocol did not decrease cell survival, DNA integrity or cell functionality in comparison with the fresh control [26]. Similarly, there are several genes considered crucial for early embryo development in humans (*pou5f1*, *nanog*, *sox2*, *klf4*, etc) [47]. Guaranteeing the absence of damage after human gamete and/or embryo cryopreservation in those genes could be particularly important. The reduction of some transcripts or even the elimination of some of them as a consequence of cryopreservation has also been reported by different groups [6]. In our study, we observed a downregulation of all the zebrafish studied genes, *cxcr4b*, *dnd*, *pou5f1*, *vasa*, *sox2* and *sox3* (Figure 2). This downregulation was significant in *cxcr4b*, *pou5f1*, *vasa* and *sox2* (Figure 2). However, taking into account that, GRs containing PGCs were not subjected to further culture after cryopreservation we questioned whether there

was enough time during the process for transcriptional regulation. We assessed the expression of two genes involved in thermal and osmotic shock (*hsp 70* and *90*) [41] after cryopreservation we observed a clear upregulation of those transcripts, suggesting that transcriptional regulation is possible. However, a modification in gene expression could be caused by CPA incubation rather than by freezing/thawing itself. We evaluated gene expression in zebrafish GRs containing PGCs exposed to cryoprotectants but not subjected to cryopreservation, and we observed neither downregulation of the studied genes nor upregulation of the heat shock proteins (Figure 2). All these data suggested that changes in gene expression could occur mainly during freezing/thawing. At this point we questioned whether the decrease in transcripts could always be explained by a repression mechanism of transcription. Methylation of cytosine residues in DNA is considered to be one of the major epigenetic mechanisms controlling gene expression and imprinting [48]. Recent studies have shown a negative correlation of sperm DNA fragmentation and DNA methylation. Tunc and Tremellen [49] suggested that oxidative stress related damage to sperm DNA impedes the process of methylation, while antioxidant supplementation appears to have the potential to reduce DNA damage and normalize sperm DNA methylation. O6-methylguanine and 8-hydroxyl-2'- deoxyguanosine (8-OH-dG) were both reported to interfere with DNA ability to act as a substrate for DNA methyltransferases [50]. Since our cryopreservation protocol guarantees the absence of DNA fragmentation [26], DNA methylation analysis can be carried out avoiding the above mentioned effect. We found that, different methylation levels were found after cryopreservation among the studied genes, however, the epigenetic status (promoter methylation) did not always correlate with gene expression. Only in some genes (*vasa* and *cxcr4b*), did cryopreservation produce an increase in methylation that could be correlated with the downregulation observed (Figure 2 and Figure 4A and 4B). But, what about the other transcripts? Is a decrease in transcripts possible without a decrease in transcription? In order to answer these questions we used transcriptionally inactive cells, human spermatozoa. To study the effect of cryopreservation on human spermatozoa at the level of transcripts, it is extremely important to take into account the importance of some of their transcripts in fertility and early embryo development. Transcriptional

activity has never been demonstrated in spermatozoa [51]. Therefore it can be assumed that mRNA molecules present in spermatozoa are a remnant of the transcripts from spermatogenesis [52] and any decrease in transcripts observed in these cells after cryopreservation could not be explained by epigenetic mechanism. Our results demonstrated that human *HOXB1*, reported to be a marker of pregnancy success, remains stable whereas *eIF2S1*, with an important role in protein synthesis, and *LHCGR*, considered to be a human male quality marker [6], decrease after cryopreservation (Figure 3). This experiment allowed us to conclude that in some cases, modifications in transcripts caused by cryopreservation should be explained by other mechanisms that do not involve methylation modifications. As a possible explanation for this observation, we can hypothesize, that cryopreservation affects mRNA stability making some of these molecules more susceptible to degradation. Recent studies showed that the regulation of some mRNAs involves not only translation inhibition, but also changes in the polyA tail length, which affect both translation efficiency and mRNA stability. It is known that some proteins repress the expression of specific maternal mRNAs. mRNAs associated with CUP (an eIF4E-binding protein) could be either fully degraded or stored in a repressed deadenylated form [52–55]. Similar mechanisms could be acting on paternal mRNAs, since some transcripts should be kept stable to be transferred to the oocyte. It is a fact that cryopreservation can alter the nucleoprotein structure in sperm [56] and, in a similar way, cryopreservation may affect mRNA stability by altering their association with certain proteins.

We can conclude that optimized cryopreservation protocols could have a clear effect, not only causing DNA lesions but also reducing crucial transcripts, in some cases producing hypermethylation. If these modifications occur in the paternal contribution (genes or transcripts) they could perhaps be repaired (in the case of DNA damage by error-free homologous recombination pathway or by non-homologous end-joining) or overcome (in the case of transcript alterations by being compensated by maternal transcripts or after zygotic transcription) in the embryo, however this should be carefully studied in order to ensure the total efficiency and safety of the technique.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr Draper B (CBS, University of California), ZF BioLabs (Spain), Dr Guerra S.M, Valcarce D.G., Cartón-García F. and Miranda C.

## **Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: VR. Performed the experiments: MFR. Analyzed the data: VR MFR. Contributed reagents/materials/analysis tools: VR. Wrote the manuscript: VR MFR. Other: MFR participated in the collection of data, interpretation of results and manuscript writing VR participated in the design of the study, interpretation of results, financial support and manuscript writing.

## **References**

1. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP (2003) Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72: 156-160. doi: 10.1086/346031. PubMed: 12439823.
2. Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP (2005) Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50: 144-153.  
doi:10.1016/j.cryobiol.2004.12.003. PubMed: 15843004.
3. Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S (2003) Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47: 227-235.  
doi:10.1016/j.cryobiol.2003.10.002. PubMed: 14697734.
4. Aitken RJ, De Iuliis GN (2007) Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 14: 727-733. PubMed: 17579989.
5. Xiao J, Liu Y, Li Z, Zhou Y, Lin H et al. (2012) Effects of the insemination of hydrogen peroxide-treated epididymal mouse spermatozoa on γH2AX repair and embryo development. *PLOS ONE* 7: e38742. doi:10.1371/journal.pone.0038742. PubMed: 22745678.

6. García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A et al. (2011) Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 22: 25-36. doi:10.1016/j.rbmo.2010.09.013. PubMed: 21123116.
7. Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA (2004) Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 13: 429-154. PubMed: 15141202
8. Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E et al. (2009) Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 24: 741-747. PubMed: 19073614.
9. Denomme MM, Mann MR (2012) Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction* 144: 393-409. doi:10.1530/REP-12-0237. PubMed: 22956517.
10. Trapphoff T, El Hajj N, Zechner U, Haaf T, Eichenlaub-Ritter U (2010) DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified preantral follicles. *Hum Reprod* 25: 3025–3042. doi:10.1093/humrep/deq278. PubMed: 20940142.
11. Al-Khtib M, Perret A, Khoueiry R, Ibala-Romdhane S, Blachère T et al. (2011) Vitrification at the germinal vesicle stage does not affect the methylation profile of H19 and KCNQ1OT1 imprinting centers in human oocytes subsequently matured in vitro. *Fertil Steril* 95: 1955–1960. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.02.029. PubMed: 21420679.
12. Sørensen AL, Timoskainen S, West FD, Vekterud K, Boquest AC et al. (2010) Lineage-specific promoter DNA methylation patterns segregate adult progenitor cell types. *Stem Cells Dev* 19: 1257-1266. doi:10.1089/scd.2009.0309. PubMed: 19886822.

13. Mimeault M, Batra SK (2013) Emergence of zebrafish models in oncology for validating novel anticancer drug targets and nanomaterials. *Drug Discov Today* 18: 128-140. doi:10.1016/j.drudis.2012.08.002. PubMed: 22903142.
14. Konantz M, Balci TB, Hartwig UF, Dellaire G, André MC et al. (2012) Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1266: 124-137. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06575.x. PubMed: 22901264.
15. Li YJ, Hu B (2012) Establishment of multi-site infection model in zebrafish larvae for studying *Staphylococcus aureus* infectious disease. *J Genet Genomics* 39: 521-534. doi:10.1016/j.jgg.2012.07.006. PubMed: 23021551.
16. Van Hoecke A, Schoonaert L, Lemmens R, Timmers M, Staats KA, et al. (2012) EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nat Med* 18: 1418-1422. doi: 10.1038/nm.2901. PubMed: 22922411.
17. Watkins SC, Maniar S, Mosher M, Roman BL, Tsang M et al. (2012) High resolution imaging of vascular function in zebrafish. *PLOS ONE* 7: e44018. doi:10.1371/journal.pone.0044018. PubMed: 22952858.
18. Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR (2000) Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Hum Mol Genet* 9: 2443-2449. doi:10.1093/hmg/9.16.2443. PubMed: 11005800.
19. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S et al. (2000) The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 10: 1351-1358. doi:10.1101/gr.144700. PubMed: 10984453.
20. Santoriello C, Zon LI (2012) Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 122: 2337-2343. doi:10.1172/JCI60434. PubMed: 22751109.
21. Petzold AM, Balciunas D, Sivasubbu S, Clark KJ, Bedell VM et al. (2009) Nicotine response genetics in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18662-18667. doi:10.1073/pnas.0908247106. PubMed: 19858493.

22. Lam SH, Wu YL, Vega VB, Miller LD, Spitsbergen J et al. (2006) Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotechnol* 24: 73-75. doi:10.1038/nbt1169. PubMed: 16327811.
23. Sánchez-Sánchez AV, Camp E, Mullor JL (2011) Fishing pluripotency mechanisms in vivo. *Int J Biol Sci* 7: 410-417. PubMed: 21547058.
24. Wu SF, Zhang H, Cairns BR (2011) Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm. *Genome Res* 21: 578-589. doi:10.1101/gr.113167.110. PubMed: 21383318.
25. Robles V, Cabrita E, Herráez MP (2009) Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. *Zebrafish* 6: 281-293. doi: 10.1089/zeb.2009.0592. PubMed: 19761380.
26. Riesco MF, Martínez-Pastor F, Chereguini O, Robles V (2012) Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology* 77: 122-130. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.024. PubMed: 21872308.
27. Liu W, Collodi P (2010) Zebrafish dead end possesses ATPase activity that is required for primordial germ cell development. *FASEB J* 24: 2641-2650. doi:10.1096/fj.09-148403. PubMed: 20371629.
28. Miyake A, Saito T, Kashiwagi N, Ando D, Yamamoto A et al. (2006) Cloning and pattern of expression of the shiro-uo vasa gene during embryogenesis and its roles in PGC development. *Int J Dev Biol* 50: 619-625. doi:10.1387/ijdb.062172am. PubMed: 16892175.
29. Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H et al. (2008) Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132: 463-473. doi:10.1016/j.cell.2007.12.034. PubMed: 18267076.
30. Hu Y, Yao JH (2012) [Progress on pluripotency factors in zebrafish]. *Yi Chuan* 34: 1097-1107. PubMed: 23017450.

31. Robles V, Martí M, Izpisua Belmonte JC (2011) Study of pluripotency markers in zebrafish embryos and transient embryonic stem cell cultures. *Zebrafish* 8: 57-63. doi:10.1089/zeb.2010.0684. PubMed: 21563922.
32. Okuda Y, Ogura E, Kondoh H, Kamachi Y (2010) B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish. *PLOS Genet* 6: e67614.
33. Rothfuss O, Gasser T, Patenge N (2010) Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real time PCR approach. *Nucleic Acids Res* 38: e24. doi:10.1093/nar/gkp1082. PubMed: 19966269.
34. Krøvel AV, Olsen LC (2002) Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech Dev* 116: 141-150. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00154-5. PubMed: 12128213.
35. Westerfield M (1995) The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 3rd Edition.
36. Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T (2004) Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP dependent flow cytometry. *Mol Reprod Dev* 67: 91–100. doi:10.1002/ mrd.20003. PubMed: 14648879.
37. Goto-Kazeto R, Saito T, Takagi M, Arai K, Yamaha E (2010) Isolation of teleost primordial germ cells using flow cytometry. *Int J Dev Biol* 54: 1487–1492. PubMed: 21302257.
38. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$  method. *Methods* 25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262. PubMed: 11846609.
39. Lindeman LC, Winata CL, Aanes H, Mathavan S, Alestrom P et al. (2010) Chromatin states of developmentally-regulated genes revealed by DNA and histone methylation patterns in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol* 54: 803-813. doi:10.1387/ijdb.103081II. PubMed: 20336603.
40. Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S (2011) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp* 21: ii: 3170. PubMed: 22042230

41. Guinez C, Lemoine J, Michalski JC, Lefebvre T (2004) 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 21-26. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.144. PubMed: 15158436.
42. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S et al. (1995) Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 26: 145-148. PubMed: 9098477.
43. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA et al. (2009) Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 24: 2061-2070. doi:10.1093/humrep/dep214. PubMed: 19525298.
44. Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR (1997) Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49: 921-925. doi:10.1016/S0090-4295(97)00070-8. PubMed: 9187701
45. Riesco MF, Robles V (2012) Quantification of DNA damage by q-PCR in cryopreserved zebrafish Primordial Germ Cells. *J Appl Ichthyol* 28: 925–929. doi:10.1111/jai.12089.
46. Bermejo R, Kumar A, Foiani M (2012) Preserving the genome by regulating chromatin association with the nuclear envelope. *Trends Cell Biol* 22: 465-473. doi:10.1016/j.tcb.2012.05.007. PubMed: 22771046.
47. Vassena R, Boué S, González-Roca E, Aran B, Auer H et al. (2011) Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 138: 3699-3709. doi:10.1242/dev.064741. PubMed: 21775417.
48. Schaefer CB, Ooi SK, Bestor TH, Bourc'his D (2007) Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* 318: 398–399. PubMed: 17446388

49. Tunc O, Tremellen K (2009) Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 26: 537-544. doi:10.1007/s10815-009-9346-2. PubMed: 19876730.
50. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI (2011) Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res* 711: 167-173. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015. PubMed: 21419141.
51. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA (2002) Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 360: 772-777. doi:10.1016/S0140-6736(02)09899-9. PubMed: 12241836.
52. Steger K (2001) Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol (Berl)* 203: 323-334. doi:10.1007/s004290100176. PubMed: 11411307.
53. Jeske M, Moritz B, Anders A, Wahle E (2011) Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels. *EMBO J* 30: 90-103. doi:10.1038/emboj.2010.283. PubMed: 21081899.
54. Zaessinger S, Busseau I, Simonelig M (2006) Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development* 133: 4573-4583. doi: 10.1242/dev.02649. PubMed: 17050620.
55. Igreja C, Izaurralde E (2011) CUP promotes deadenylation and inhibits decapping of mRNA targets. *Genes Dev* 25: 1955-1967. doi:10.1101/gad.17136311. PubMed: 21937713.
56. Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A et al. (2011) Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology* 76: 1450-1464. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.039. PubMed: 21855992.

## **Capítulo 3: Generación *in vitro* de PGCs**

---

***In vitro generation of zebrafish PGC-like cells***

**Marta F. Riesco<sup>1</sup>, David G. Valcarce<sup>1</sup>, Javier Alfonso<sup>2</sup>, Vanesa Robles**

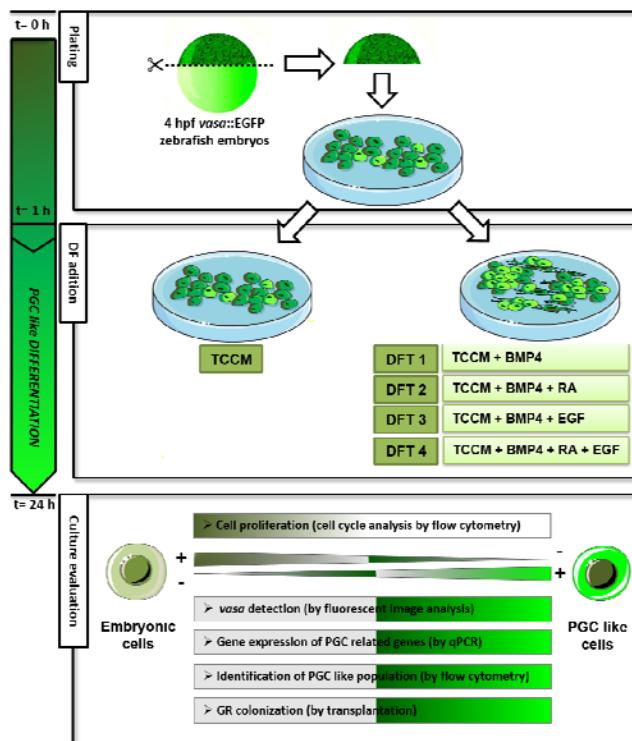
<sup>1</sup> Indegsal and Department of Molecular Biology, University of León, León, Spain

2 Dpt Of Department of Mechanical, Computing and Aerospace Engineering, University  
of León, León, Spain

Sent for Publication

## Summary

The possibility of generating PGCs *in vitro* from non-committed embryonic cells represents an extremely useful tool in current research. PGC *in vitro* differentiation has been successfully reported in mammals. However, contrary to fish, PGC specification in mammals is an inductive mechanism. This study is the first to describe a rapid method for PGC *in vitro* differentiation in teleost. PGC-like cells were characterized by several lines of evidence: gene expression, cell complexity, size, and image analysis for quantification of fluorescence under *vasa* promoter. Moreover, differentiated cells were able to colonize the genital ridge after transplantation. Differentiation treatments increased the number of PGCs in culture, causing a differentiation of cells rather than inducing their proliferation. These results open up the possibility of differentiating genetically modified embryonic cells to PGC like cells to ensure their transmission to the progeny and could be crucial for an in depth understanding of germ line differentiation in teleost.



**Graphical abstract.** Experiment design: Embryonic cell culture and *in vitro* differentiation treatments.

## Introduction

The use of zebrafish as a model species in science has exponentially increased during recent years. One important limitation in this model species, which has recently been overcome, was the inability to readily induce targeted modifications in the genome. Recent technologies such as those related to the use of Zinc finger nucleases (ZFNs) (Doyon et al., 2008; Woods and Schier, 2008), artificial transcription activator-like effector nucleases (TALENs) (Bedell et al., 2012; Sander et al., 2011) and the CRISPR/Cas9 system (Hwang et al., 2013), have been successfully employed to induce targeted genetic modifications in zebrafish embryos. These approaches are essential in functional genomic studies and gene therapy.

A major goal in this field would be to increase the germ-line transmission frequency of genetic modifications in order to guarantee their presence in the progeny. It has been reported that in zebrafish one single primordial germ cell (PGC) can reconstitute a whole gonad after transplantation into a recipient embryo (Saito et al., 2010) and PGCs, spermatogonial stem cells (SSCs) and female germ line stem cells (FGSC) can be successfully cultured (Fan et al., 2008; Wong and Collodi, 2013). However, these cells are quite resilient to genetic manipulations. Unlike PGCs, embryonic cells can be easily modified, but their contribution to the germ line is limited (Alvarez et al., 2007). Embryonic stem (ES) cell-like cultures have been established (Fan et al., 2004; Fan et al., 2004; Fan et al., 2006; Hong et al., 2011; Robles et al., 2011) and homologous recombination has been demonstrated in those cultures (Fan et al., 2006). Considering all these advances, the next logical step would be to take advantage of both cell types, exploring the possibility of differentiating embryonic cells into PGC-like cells to ensure their contribution to the germ line. *In vitro* generation of PGCs from pluripotent cells has been achieved in human (Eguizabal et al., 2009) and mouse (Hayashi et al., 2011; Shirazi et al., 2012) but has never been reported in fish. PGCs in mammals and urodele amphibians are induced through cellular interactions during gastrulation instead of being specified by the inheritance of

maternally provided cytoplasmic determinants (Raz, 2003). It is well known that the inductive process of PGC specification in mouse embryos is mediated by the secretion of factors from the bone morphogenetic protein family (Raz, 2003), but the different PGC specification mechanism in teleost embryos makes *in vitro* generation of fish PGCs much more difficult to achieve. In mice, disruptions in the *BMP4* gene led to defects in mouse PGC specification and in humans the addition of recombinant BMP4 increased the number of human PGCs in a dose-dependent way (Hiller et al., 2011). Retinoic acid (RA) promotes the proliferation of cultured chicken PGCs via the activation of the PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B signaling cascade (Yu et al., 2012) and it is known to induce the differentiation of mouse ES cells into PGCs *in vitro* (Geijsen et al., 2004; Guo et al., 2012; Nayernia et al., 2006). EGF has also been employed for *in vitro* mouse PGC generation (Hayashi et al., 2011) and it has been demonstrated that induced proliferation of chicken primordial germ cells (Ge et al., 2009).

In this work we present a method for *in vitro* generation of zebrafish PGC-like cells from cultured embryonic cells for the first time. For this purpose, different combinations of growth factors were employed. The use of these factors together with a slightly modified testicular cell culture medium (TCCM) initially described by Sakai et al (Sakai, 2002) produced a significant increase in the number of PGC-like cells derived from zebrafish embryonic cell cultures.

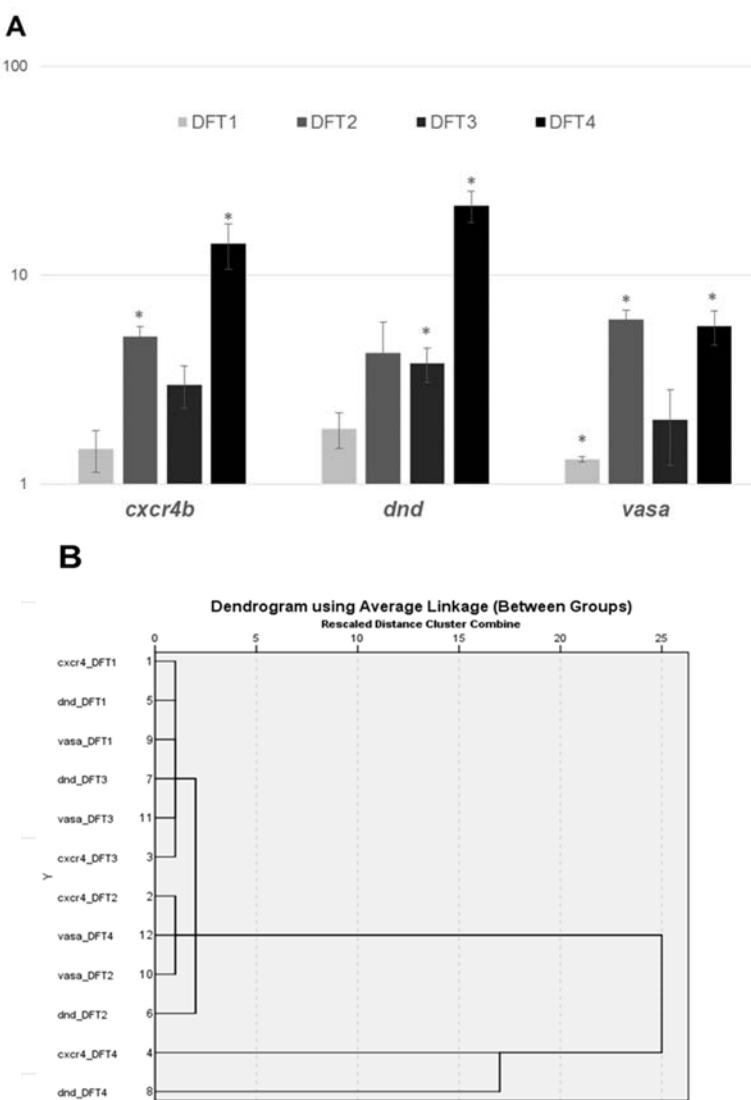
## Results

### **Differentiation treatments increase the expression of PGC related genes**

In order to study the effect of differentiation treatments on zebrafish gene expression, qPCR analysis was carried out on cultured zebrafish embryonic cells from a *vasa::EGFP* transgenic line, treated with four differentiation treatments, and on non-treated cells. Genes specifically expressed in primordial germ cells such as *vasa* and *dnd* (Braat et al., 2000; Chen et al., 2010) were analyzed. *Cxcr4b*, the receptor of SDF-1a, required for PGC migration (Dumstrei et al., 2004), was also studied. Expression levels were calculated for all samples using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, with *actb2* as a reference gene and normalized with non-treated cultured embryonic cells. After 24 h

in culture, all the studied genes (*cxcr4b*, *dnd* and *vasa*) were significantly upregulated for DFT4 treatment. The increase in *cxcr4b* expression was significant for: DFT2 and DFT4 treatments (Fig. 1). However, *dnd* transcript significantly increased in DFT3 and DMF4 treatments. When *vasa* expression was analyzed, a significant upregulation was found in DFT1, DFT2 and DFT4 differentiation treatments (Fig. 1).

Q-PCR results demonstrated that DFT4 differentiation treatment produced an increase in all the studied transcripts (Fig. 1), both those specifically expressed in PGCs (*vasa* and *dnd*), or those required for pro-PGC migration.



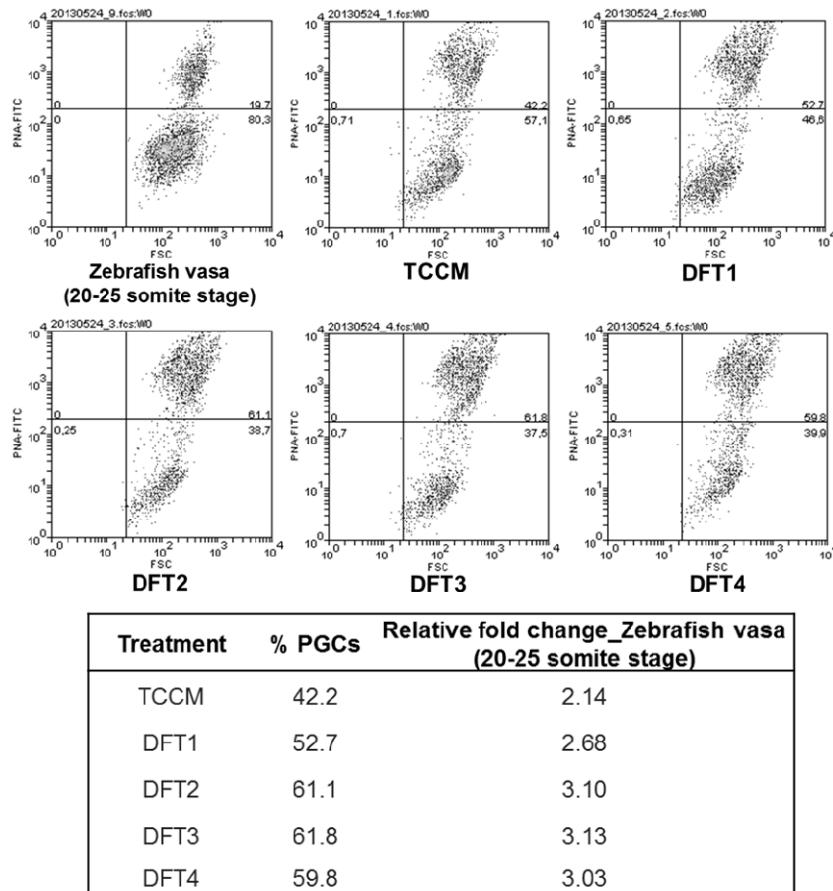
**Fig 1. Relative expression of zebrafish PGC related genes after differentiation treatments (DF1, DF2, DF3 and DF4).** Expression levels for each gene relative to actb2 were calculated for all samples using the  $2-\Delta\Delta Ct$  method. All results were expressed as the means  $\pm$  SE of the  $2-\Delta\Delta Ct$  method of three independent experiments with three replicates for each. The Student

t-test ( $\mu=1$ ) was performed to identify changes in gene expression levels after differentiation. Asterisks show significant upregulation of the studied genes. Dendrogram shows the linkage between the treatment groups.

### **The increase in the expression of PGC-related genes is due to an increase in the PGC-like cell population**

We performed a flow cytometry analysis to test whether the increase observed in the expression of PGC-related genes is due to an increase in cell number or simply to an alteration in the expression of the same cell population. To differentiate PGCs from somatic cells, we analyzed the size, complexity and fluorescence intensity. PGCs are known to differ markedly from other somatic cells in their large size, complexity and bright fluorescence when vasa transgenic line is used (Riesco et al., 2012).

Results demonstrated that PGC-like cells increased from 2 to 3 times with TCCM medium and differentiation treatments in comparison with cells dissociated from vasa 20-25 somite stage embryos (TCCM= 2.14 DMF1= 2.68, DMF2= 3.10, DMF3= 3.13 and DMF4= 3.03) at the same time that the somatic population decreased, particularly when differentiation treatments were used. The highest percentage of PGC-like cells (61.1%, 61.8% and 59.8%) in respect to the somatic population (38.7%, 37.5% and 39.9%) was obtained after treatment with DFT2, DFT3 and DFT4, respectively. In contrast, the embryonic cells cultured in TCCM (without BMP4, RA and EGF), showed the lowest percentage of PGC population (42.7%), as expected (Fig. 3). Among the differentiation treatments, DFT1 showed a low population of PGC-like cells, this result coinciding with gene expression results (Fig. 2).

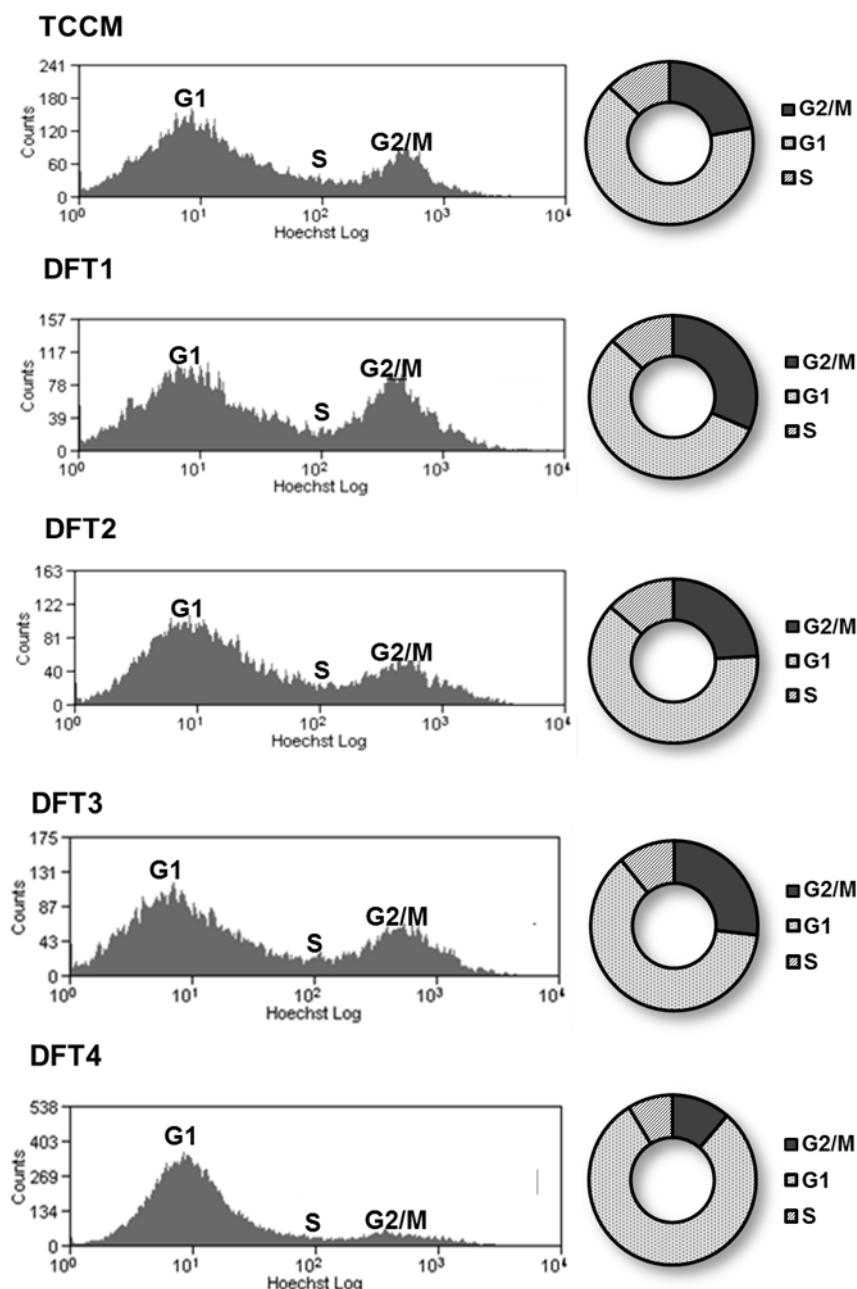


**Fig 2. PGC-like cells and somatic cell populations in TCCM and differentiation treatments (DFT1, DFT2, DFT3 and DFT4.)** TCCM and differentiation treatments increased the PGC population at the same time as the somatic cell population decreased. Analysis was carried out using flow cytometry. A control of 20-25 somite stage vasa embryos was used to establish the GFP positive PGC population (over Log 102 and 103) according to previous studies. All analyses were performed applying Weasel 3.1 free software. A total of 10,000 events were counted for each sample.

### **Treatments induce differentiation rather than cell proliferation**

A cell cycle analysis was performed by flow cytometry to determine whether differentiation treatments increase the PGC-like cell population via a differentiation process or whether they induce proliferation in all cells (somatic and PGC-like cells). DFT2 and DFT3 treatments do not alter the number of cells in G2/M. Moreover, the best differentiation treatment according to previous results (DFT4) obtained the lowest event number in G2/M (Fig.3). These results suggest that the increase in the

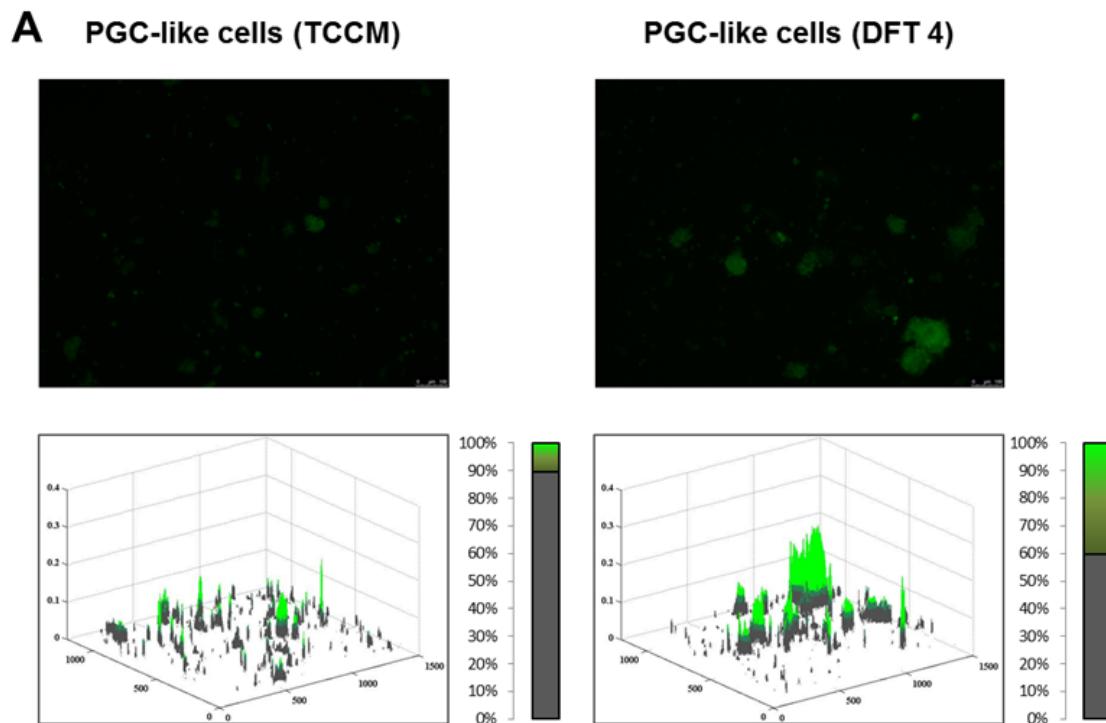
number of PGC-like cells is due to an increase in differentiation rather than an increase in cell proliferation.

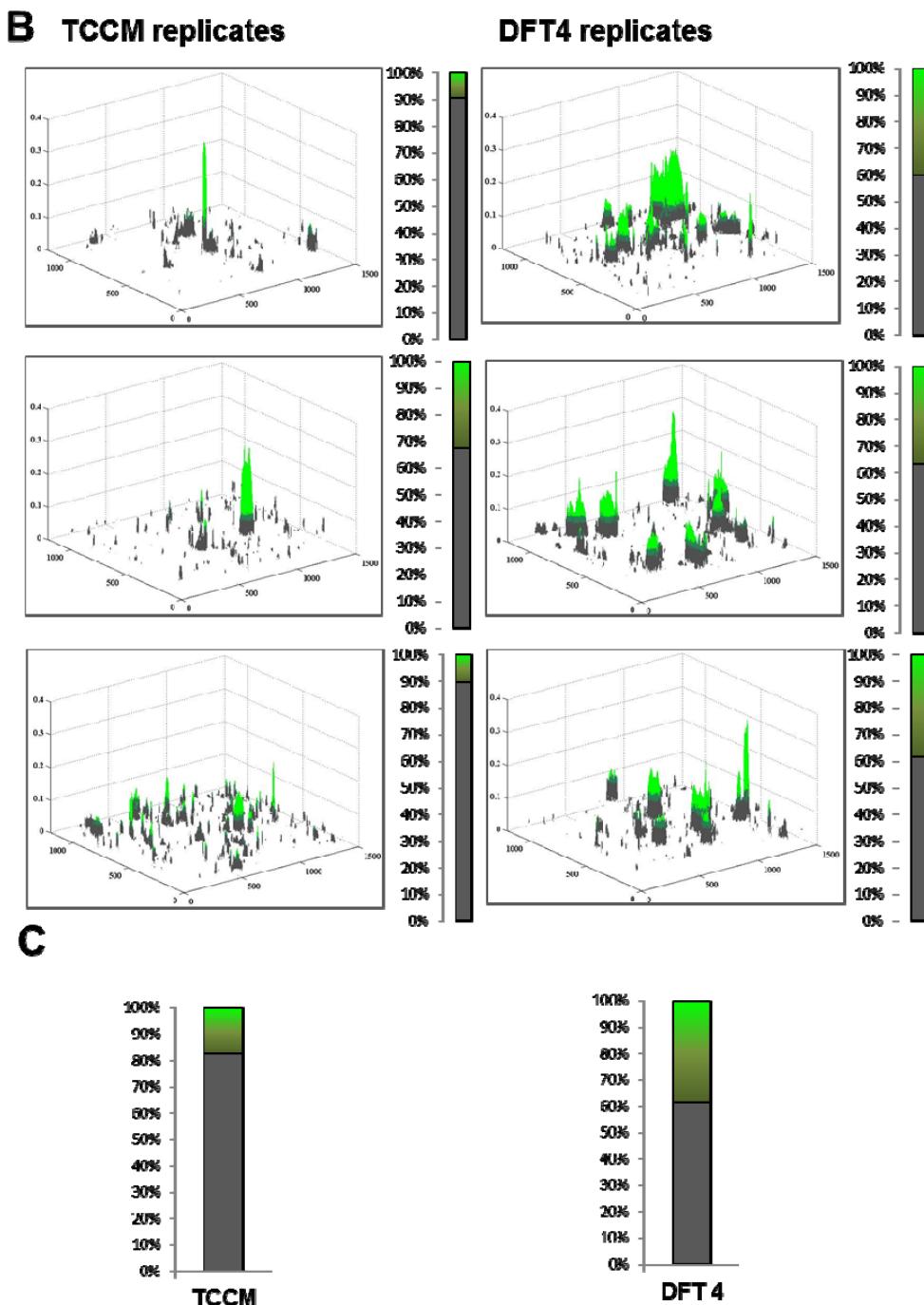


**Fig 3. Cell cycle analysis in TCCM medium and differentiation treatments.** Hoechst 33342 was used for cell cycle analysis, and cells were analyzed by flow cytometry. Except for DFT1, treatments do not increase the number of cells in G2/M and therefore, treatments induce differentiation rather than cell proliferation in cultured cells. The best differentiation treatment according to previous results (DFT4) obtained the lowest event number in G2/M. All analyses were performed applying Weasel 3.1 free software. A total of 10,000 events were counted for each sample.

## **EGFP fluorescence intensity corresponding to PGC like cells increases after DFT4 cultures**

We have developed a software for the quantification of fluorescence pixels before and after differentiation treatments. This software was developed with the aim of providing an open access tool that different laboratories could use to validate differentiation treatments. We consider this kind of tools could help in standardizing the methodology used for the evaluation of different protocols, making results comparable among different laboratories. The bioimaging analysis results were in concordance to flow cytometry ones. Starting from field capture replicates, a total pixel amount, corresponding to total cell population (levels 1-3), was obtained for each field capture in each treatment. Mean values were  $20327.33 \pm 2980.55$  (TCCM) and  $66264 \pm 8900.47$  (DFT4) (mean value  $\pm$  SE). Once selected, pixels with green fluorescence intensity (levels 2 and 3), corresponding to PGC-like cells were sub-selected:  $17.54\% \pm 7.6$  (TCCM) and  $38.55\% \pm 0.91$  (DFT4) (percentage mean value  $\pm$  SE, in respect to total pixels). An increase of 21.01 % was reported with DFT4 field captures comparing with TCCM (Fig. 4).

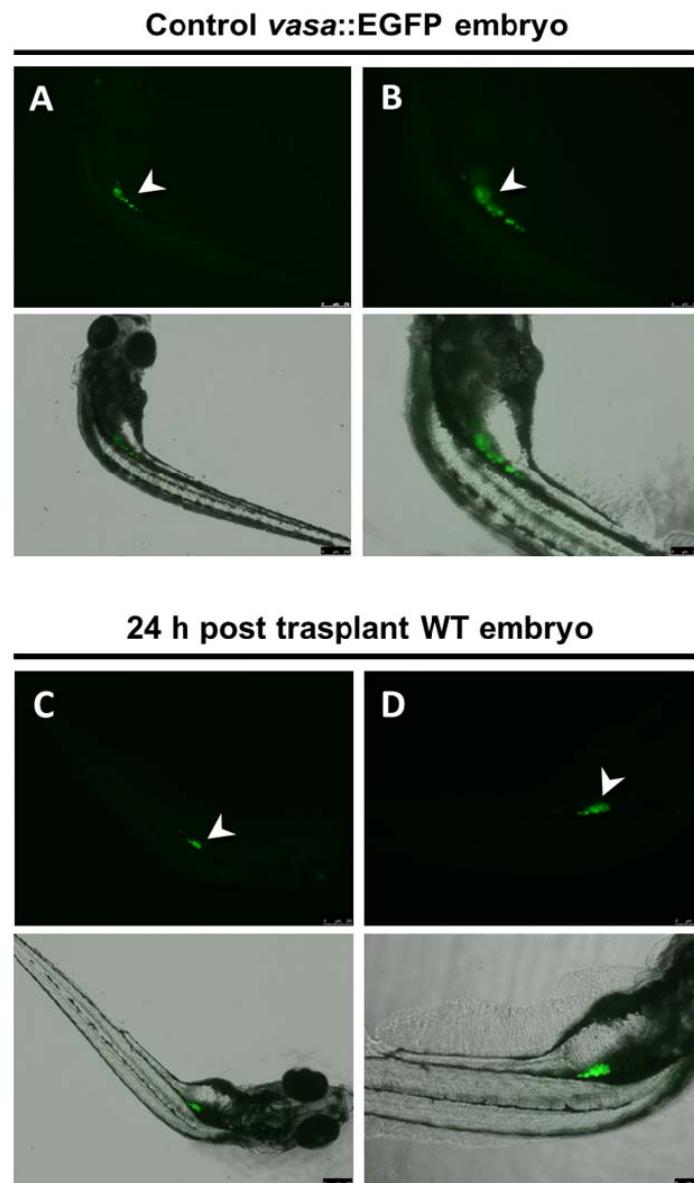




**Fig 4.** Histograms obtained with *Bioimaging Software for PGC like cells detection by fluorescence*. The digital image processing was performed with a Computer Vision Software, for each field capture in TCC and DFT4 cell cultures. Once selected, pixels with green fluorescence intensity, corresponding to PGC-like cells, an increase of percentage was reported with DFT4 field captures comparing with TCCM.

**PGC-like cells can successfully colonize the genital ridge after transplantation in a recipient larva.**

Embryonic cells differentiated into PGC-like cells using the DFT4 treatment were transplanted in *dnd-1* morphant (sterile) 7dpf larva. Control (vasa::EGFP transgenic 7dpf larva) and transplanted larvae were photographically recorded at 24h post-transplantation. Transplanted PGC-like cells migrated to the genital ridge in exactly the same way as the endogenous PGCs in the control larva, showing the same positional pattern during development (Fig. 5).



**Fig 5. PGC-like cells can successfully colonize the genital ridge after transplantation in a recipient larva.** Transplanted PGC-like cells migrated to the genital ridge as the endogenous PGCs. PGC-like cells obtained from the best treatment for PGC differentiation (DFT4) were transplanted into infertile sterilized 7 dpf recipient larvae (injected with dnd-1 morpholino). Control (vasa::EGFP transgenic 7dpf larva) and transplanted larvae were photographically recorded at 24h post-transplantation.

## Discussion

The possibility of generating fish PGC *in vitro* has a huge impact in Biotechnology and Aquaculture. In mammals PGC *in vitro* differentiation has been successfully achieved (Hayashi et al., 2011; Shirazi et al., 2012), but, contrary to fish, PGC specification in mammals is an inductive mechanism. In fish, the development of PGC markers, such as *vasa*, and the use of transgenic lines, were the definitive tools to demonstrate the existence of inherited germ plasm (Raz, 2003), the so called *nuage*, containing *vasa*, *nanos 1*, *H1M*, *dead end*, *ziwi* and other transcripts which drive PGC differentiation (Hashimoto et al., 2004; Houwing et al., 2007). Germ plasm, segregates to four cells through the 1000 cell stage and then zygotic *vasa* expression begins (Knaut et al., 2002). The role of *nuage* in PGCs differentiation was confirmed by Hashimoto et al (Hashimoto et al., 2004), who observed that the ablation of germ plasm at 4 cell stage resulted in a decrease in the number of PGCs and abolished germ line specific gene expression. This inherited pattern of specification has dissuaded from the idea of achieving PGC *in vitro* generation, and the factors commonly used in mammals have not been tried in fish. In fact, until now, fish PGCs were obtained *in vitro* only from the embryonic already committed cells (Takeuchi et al., 2002). However, in this study we were able to induce zebrafish PGC-like cells *in vitro* from cultured embryonic cells. In this study, different combinations of growth factors such as BMP4, EGF and RA were used in order to achieve a significant increase in vitro PGC generation. The use of these three factors together with a slightly modified testicular cell culture medium (TCCM) initially described by Sakai et al (Sakai, 2002) were enough

to significantly increase the number of zebrafish PGC like cells derived from blatomeres *in vitro*.

PGC like cells were characterized by several lines of evidence: Expression of PGC related genes (q-PCR analysis), PGC fluorescence intensity and morphology (image analysis and flow cytometry), and PGC transplantation. Moreover, in order to ensure that the increase in PGC like cells number in the cultures was not due to an increase in cell proliferation, cell cycle analyses were done.

In PGC related gene expression studies, we selected genes expressed in PGCs: Dead end (*dnd*), is crucial to PGC survival and migration (Liu and Collodi, 2010), *vasa* (*vasa*) relevant in germ cell lineage and PGC development (Miyake et al., 2006) and chemokine (C-X-C motif) receptor 4b (*cxcr4b*) involved in PGCs migration (Boldajipour et al., 2008). Q-PCR results demonstrated that DFT4 produced a significant increase in all the studied transcripts, either those specifically expressed in PGCs (*vasa* and *dnd*) or that required for a pro PGC migration (*cxcr4b*). In contrast to DFT1 that produced the lowest expression levels for all studied transcripts, being these results in concordance with the PGC like cell number detected by flow cytometry analysis.

However, an increase in gene expression does not necessarily imply an increase in the number of PGC like cells. Treatments could be inducing an increase in transcription rates without increasing PGC like cells number. For this reason we perform a flow cytometry study in order to assess how the populations of somatic vs PGC like cells were evolving with the different treatments. In this study we use as a control 20-25 somite stage *vasa* embryos. The number of PGCs detected in the control (19.7 %) was in concordance with previous studies (20.5%) (Goto-Kazeto et al., 2010) as well as the GFP intensity of this population (over Log 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup>), demonstrating that the analysis of the results and the cytogram for PGCs and somatic cell populations were correct. Surprisingly for us, flow cytometry results demonstrated that cell culture in TCCM medium produced by itself an increase in PGC like cell population (42.2%). In this respect, TCCM medium has been used (together with different serum and feeders) by Sakai (Sakai, 2002) to induce *in vitro* differentiation from spermatogonia to

functional sperm, and its effect seems to be crucial as well in previous stages of germline differentiation.

The addition of other factors (RA, EGF, BMP4) in the TCCM produced a higher increase in PGC like cell number. The number of PGCs increase 2.68 fold with DFT1 (respect to the control), 3.10 fold with DFT2, 3.13 with DMF3 and 3.03 with DFT4. It is interesting to point out that the increase in PGC like cell population is produced at the same time that the somatic population decreased. According to the expression analysis results, DFT1 showed the lower differentiation capacity compared with other differentiation treatments.

The simultaneous decrease in somatic cells in parallel with the increase in PGC-like cell population clearly indicates that the effect of treatments in cultured cells is to induce differentiation rather than proliferation. However, in order to confirm this evidence, a cell cycle analysis was also performed by flow cytometry. Our results indicated that in all samples most of the cells were in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, according to previous studies in embryonic stem cells (Robles et al., 2011). Except for DFT1 (the less effective treatment), treatments do not increase the number of cells in G<sub>2</sub>/M. Moreover, the best differentiation treatment according to previous results (DFT4), obtained the lowest event number in G<sub>2</sub>/M. These results suggest that the increase in the number of PGC-like cells is due to an increase in differentiation rather than an increase in cell proliferation.

In order to provide more evidence for these observations, image analysis was performed using the Matlab and Stackoverflow software program for square matrix and labelling data points. These results evidenced an increase in EGFP positive cells in treated cultures, in concordance with our previous results. The DFT4 treatment a higher number of EGFP positive cells with high fluorescence. Although the induction of PGC differentiation in fish has been considered impossible until now, due to germ plasm inheritance, this study demonstrates that it could be possible *in vitro*. The tool employed for the confirmation of the different PGC specification mechanisms between mammals and fish, the vasa marker, has also been used in this study as a tool for demonstrating possible PGC generation *in vitro*. However, besides the breaking nature

of this study, it is not contradictory to previous studies in teleost PGC specification. There is strong evidence that embryonic cells once plated and cultured with certain mediums can be significantly altered (Robles et al., 2011). There are two reasons that could explain why these cells can respond *in vitro* rather than *in vivo* to the employed differentiation treatments. In fact, both reasons are not exclusive and could be even complementary. In one way, *in vitro* cultured cells could be suffering epigenetic modifications (such as *vasa* –and other PGC related genes- promoter demethylation) that could produce a sufficient increase in the expression of PGC markers to explain PGC *in vitro* generation. It is well known that the mouse DNA methylation is a key factor in regulating the expression of crucial genes related to PGC (Matsui and Mochizuki, 2013). But, more importantly, it is possible that the alteration in gene expression caused by culture conditions could be affecting molecules involved in mechanisms of transcripts stabilization/degradation. It is well known, that *in vivo* *vasa* transcripts are easily degraded in those cells that are not committed to PGCs. We hypothesized that *in vitro* conditions could artificially increase proteins involved in the stabilization of transcripts relevant for PGC viability. One of the most widely known mRNA binding protein indispensable for PGC viability is DND-1 (Kedde et al., 2007). This protein avoids microRNA degradation by binding of its targeted transcripts. Our results demonstrate that differentiation treatments, in particular DFT4 considered as the best one in this study, significantly increased the amount of dnd-1 transcripts. The different approaches used in this study confirm successful differentiation to PGC-like cells. The successful transplantation of PGC-like cells provided the final evidence of the success of these treatments for *in vitro* PGC generation. Considering the relevance of the obtained results, we envision that future work could address the improvement of differentiation efficiencies using different combinations of factors. In order to have a standardized procedure for PGC differentiation assessment to compare work performed in different laboratories, we have provided the program developed in this study for image evaluation as supplementary material.

The derivation of PGC-like cells has critical implications in Stem Cell Biology and Biotechnology. This work has broken away from the idea that teleost PGC induction cannot be achieved *in vitro*. Once this possibility is open, genetic manipulations can be

performed in embryonic stem-like cell cultures (more easily transfected) and after modification and selection, cells can be forced to differentiate into PGCs using DFT2 and DFT4 rapidly, improving their germ line contribution after transplantation in a recipient embryo. This is even more promising considering that recent studies (Saito et al., 2008) reported methods to ensure complete germ cell replacement using a Single PGC Transplantation (SPT) approach. These technologies are crucial to consolidate zebrafish as a potent model species in science, and we hope this work will be a step forward in this direction.

## **Experimental Procedures**

### **Ethics statement**

The experiments carried out in this study using zebrafish embryos are part of a project from the Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2009-06994 specifically approved by the University of León Bioethical Committee (<https://www.unileon.es/investigadores/comite-etica>). The University of León is authorized by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food to breed zebrafish.

### **Zebrafish maintenance and embryonic cell recovery**

Adult zebrafish (*Danio rerio*) vasa EGFP zf45 strain, tg{vas:egfp} transgenic line, generated by the Olsen lab (Krovel and Olsen, 2002), and Ab line, were kept in tanks (Aquatic Habitats, EEUU) under standard conditions (Westerfield et al., 1995) and were used for embryo production. For embryo collection, adult zebrafish were kept in crossing tanks (Aquatic Habitats, EEUU) at 28 °C with 6 fish per tank at the ratio of 1:2 male: female. The embryos were allowed to develop to the appropriate developmental stage (blastula and 7 dpf) and then they were divided into groups of approximately 50 individuals each. They were rinsed with 70% ethanol for 10 s, and then treated with bleach solution (0.5%) for 2 min. Then, they were immediately washed by rinsing several times with L-15 medium as described by Fan and colleagues (Fan et al., 2004). The blastoderms were manually excised from blastula-stage embryos (3.5 hpf) using

fine watchmaker's forceps under a microscope (Nikon, Japan). The blastomeres were washed in modified Leibovitz medium (L15) supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS), 500 µg/ml ampicillin, 500 µg/ml streptomycin and 500 IU/mL penicillin at room temperature (RT) until further use.

### **Embryonic cell culture and *in vitro* differentiation treatments**

The zebrafish embryonic cells (50 blastoderms per well) were cultured in NUNC high cell binding dish in Testicular Cell Culture Medium (TCCM): human chorionic gonadotropin (final concentration of 5 IU/ml, Sigma), pregnant mare's serum gonadotropin (2 IU/ml, Sigma), L-arginine (0.2 mg/ml from 100× stock solution, Gibco BRL), L-aspartic acid (0.02 mg/ml from 100× stock solution, Gibco BRL), L-histidine (0.015 mg/ml from 100× stock solution, Gibco BRL), L-lysine HCl (0.0725 mg/ml from 100× stock solution, Gibco BRL), L-proline (0.02 mg/ml from 100× stock solution, Gibco BRL), bovine serum albumin (0.5% from 5% w/v stock solution, BSA fraction V, Sigma) and Hepes (10 mM from 1 M stock solution, pH 7.9, Sigma). This medium that was based on zebrafish growth medium (Westerfield, 1995) and has been described as differentiation medium in zebrafish testicular cells by Sakai, 2002 (Sakai, 2002) was slightly modified for the experiment. It was supplemented with 15 % of fetal bovine serum as described (Xing et al., 2008) to maintain zebrafish cell line from zebrafish blastula-stage embryos, 500 µg/ml ampicillin, 500 µg/ml streptomycin and 500 IU/mL penicillin. The concentration of L-15 medium was reduced from 100% to 80% because of the addition of BSA. All supplements were initially dissolved in 80% L-15. 50 blastomeres were plated per treatment and assay.

After plating the cells (blastomeres from 50 embryos per treatment and per well), differentiation factors were added 1h after plating. We studied four differentiation treatments: DFT1: Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) (500 ng/mL), DFT2: BMP4 (500 ng/mL) and Retinoic Acid (RA) (5mM), DFT3: BMP4 (500 ng/mL) and Epidermal Growth Factor (EGF) (50 ng/mL) and DFT4: BMP4 (500 ng/mL), RA (5 mM) and EGF (50 ng/mL). After 24 h of culture, viability and fluorescence were checked and the characterization of the PGCs like cells were done.

## **Characterization of the PGCs like cells**

### ***Gene expression of PGCs related genes by qPCR***

#### *RNA isolation and DNase treatment*

RNA was extracted from zebrafish cultured embryonic cells after 24 h of differentiation treatment, using Trizol reagent (Invitrogen, Madrid) according to the manufacturer's protocol. RNA quantity and purity were determined using a nanodrop spectrometer (nanodrop 1000, Thermo Scientific, Biocompare, Spain). This protocol also includes a DNase I treatment step. The isolated RNA showed high purity ( $A_{260/280} > 1.8$ ) and was stored at -80 °C until further use.

#### *Reverse transcription*

Complementary DNA (cDNA) was obtained from RNA (1 $\mu$ g) using the cDNA synthesis kit (Invitrogen, Madrid), following the manufacturer's protocol. The cDNA for zebrafish embryonic cells was stored at -20 °C before analysis by qPCR. In differentiated and non-differentiated zebrafish cultured embryonic cells, reverse transcription (RT-PCR) conditions were 95 °C for 3min, and 35 cycles of: 95 °C for 30 sec, 62 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec, and a final extension at 72 °C for 10 min.

#### *Real time qPCR*

In order to measure gene expression in zebrafish cultured embryonic cells after differentiation treatments, qPCR was performed. The primers for qPCR were designed using Primer Express (Software v2.0, Applied Biosystems) and Primer Select (Software v10.1 DNA Star, Lasergene Core Suit). The primer nucleotide sequences and annealing temperature from zebrafish PGC related genes can be found in Supplementary material (Supplementary fig S1).

The qPCR conditions were optimized for the different primers to achieve similar amplification efficiencies to compare different amplicons. Product specificity was tested by melting curves and product size was visualized by electrophoresis on agarose gel (data not shown).

Reaction mixtures (total volume = 20 µL) contained 2 µL of cDNA, 1X SYBR Green Master mix (Applied biosystems, Madrid) (10 µL) and 500 nM each forward and reverse primer (2 µL).

QPCR was initiated with a preincubation phase of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 95 °C denaturation for 10 sec and the temperature for primer extension for 60 sec. The relationship between the threshold cycle and the dilution values of DNA was linear with a correlation coefficient  $R^2$  higher than 0.9 in all cases (data not shown). Each experiment was performed three times and three technical replicates were done per sample.

Expression levels for each zebrafish gene relative to *actb2*, were calculated for all zebrafish PGC related genes using the delta-delta-Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) method, which is an algorithm to analyze the relative changes in gene expression. It requires the assignment of one housekeeping gene, which is assumed to be uniformly and constantly expressed in all samples (Livak and Schmittgen, 2001).

#### *Data analysis*

Data were analyzed using SPSS V.16 (IBM, USA) and Microsoft Excel. All results were expressed as the means  $\pm$  SE of the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method of three independent experiments with three replicates for each. The Student's t-test ( $\mu=1$ ) was performed to identify changes in gene expression levels after differentiation treatments and a dendrogram with average linkage between gene expression in each treatment was perform.

#### ***Vasa detection by fluorescent image analysis***

The digital image processing was performed by the development of a Computer Vision Software, called '*Bioimaging Software for PGC like cells detection by fluorescence*'. The software has been developed for MatLab environment (MATrix LABoratory) (The MathWorks, Inc, 2013), which is a mathematical software tool that offers integrated development environment (IDE) with a proprietary programming language (Language M).

The program's goal is to analyse intensities of fluorescence. Firstly the software

converts the images obtained with the microscope to grayscale, codifying in 256 levels of light intensities, was found to be sufficiently identified luminance channel for this study. The precision chosen for the artificial vision analysis is of type Double (Parker, 2010) (Prince, 2012).

After obtaining the values of intensities, these are divided into three brightness levels: Level 1 (low intensity), Level 2 (medium intensity) and Level 3 (high intensity), establishing a colour scale (grey, green, light green). Finally, the software draws a wireframe mesh with the colour scale as set forth above, graphically showing a "topographical map" of intensities.

***Identification of somatic and PGC like populations by flow cytometry***

Zebrafish cultured embryonic cells were maintained for 24 h in TCCM medium and TCCM medium with the different treatments (DFT1-DFT4) as described above. Cells were then prepared for flow cytometry analysis, PGC-like cells were differentiated for higher fluorescence intensity (FITC), large size and complexity (FSC) compared with somatic cells.

Propidium Iodide (PI-Sigma, Spain) was added at 4 mg/mL final concentration to detect dead cells. Immediately after, samples were acquired in a CYAN flow cytometer (CyAn ADP, Beckman Coulter. Fullerton, CA, USA) adjusted for blue excitation (488 nm) and (458nm) lines for the detection of PI (670/30) and FITC (580/30) fluorescence respectively. Data analysis was performed applying Weasel 3.1 free software. A total of 10,000 events were counted for each sample.

***Cell cycle analysis in differentiated and non-differentiated embryonic cells***

For cell cycle analysis, cells were incubated at 29 °C for 30 min using Hoechst 33342 (H342-Sigma, Spain) at 10 mg/mL final concentration. The supernatant was removed and cells were resuspended in 0.5 mL of L15 (RT). Propidium Iodide (PI-Sigma, Spain) was added at 4 mg/mL final concentration to detect dead cells. Immediately after, samples were acquired in a CYAN flow cytometer (CyAn ADP, Beckman Coulter. Fullerton, CA, USA) adjusted for both UV (351 nm) and blue excitation (488 nm) lines for the detection of H342 (450/65) and PI (670/30) fluorescence respectively. All

analyses were performed applying Weasel 3.1 free software. A total of 10,000 events were counted for each sample.

#### ***Transplantation and analysis of genital ridge colonization into recipient larvae***

PGC-like cells obtained from the best treatment for PGC differentiation (DFT4) were transplanted into infertile recipient larvae. To sterilized recipient larvae, wild type embryos at the 1-cell stage were injected with *dnd-1* antisense morpholino (MO) (Ciruna et al., 2002) at 1 $\mu$ g/ $\mu$ L in 0.06% phenol red solution to deplete the endogenous germ cell population. Cell transplant were performed using a glass micropipette needle (0.9 mm diameter borosilicate glass capillaries) under a Leica MZ16F fluorescence stereomicroscope connected to a microinjector (Nanoliter, 2010, Narisigue). PGC like cells were transplanted into the abdominal cavity of each zebrafish larvae following the procedure described by (Wong and Collodi, 2013). The ability of DFT4 differentiated cells to colonize the gonad was confirmed, and photographs were taken to chimeric larvae with a fluorescence microscope equipped with a digital camera. After transplantation, all the recipients were periodically examined (by fluorescence microscopy) and germline chimeras were identified based on the presence of PGC like GFP-positive cells in the gonad region.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Fundación Ramón Areces and Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN AGL2009-06994), Ramón y Cajal Program (RYC-2008-02339), Junta de Castilla y León (E-24-2009-0036681 and E-346-2013) and Fondo Social Europeo. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors would like to thank Dr Draper B (CBS, University of California), ZF BioLabs (Spain), Dr Guerra S.M, Cartón-García F., Sevilla Movilla S and Navarro Lahuerta C.

There is no conflict of interest

#### **Contributions by individual authors:**

**MFR** performed the experiments, analyzed the data, interpreted the results and wrote the manuscript. **DGV** participated in data collection and analysis. **JA** performed image

analysis and provide the informatics program. VR conceived and designed the study, interpreted the results, provided the financial support and wrote the manuscript.

## **References**

- Alvarez, M.C., Bejar, J., Chen, S., and Hong, Y. (2007). Fish ES cells and applications to biotechnology. *Mar. Biotechnol. (NY)* 9, 117-127.
- Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., 2nd, Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y., *et al.* (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 491, 114-118.
- Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132, 463-473.
- Braat, A.K., van de Water, S., Goos, H., Bogerd, J., and Zivkovic, D. (2000). Vasa protein expression and localization in the zebrafish. *Mech. Dev.* 95, 271-274.
- Chen, S., Zeng, M., Sun, H., Deng, W., Lu, Y., Tao, D., Liu, Y., Zhang, S., and Ma, Y. (2010). Zebrafish Dnd protein binds to 3'UTR of geminin mRNA and regulates its expression. *BMB Rep.* 43, 438-444.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., and Schier, A.F. (2002). Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14919-14924.
- Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., *et al.* (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26, 702-708.
- Dumstrei, K., Mennecke, R., and Raz, E. (2004). Signaling pathways controlling primordial germ cell migration in zebrafish. *J. Cell. Sci.* 117, 4787-4795.

- Eguizabal, C., Shovlin, T.C., Durcova-Hills, G., Surani, A., and McLaren, A. (2009). Generation of primordial germ cells from pluripotent stem cells. *Differentiation* 78, 116-123.
- Fan, L., Crodian, J., and Collodi, P. (2004). Culture of embryonic stem cell lines from zebrafish. *Methods Cell Biol.* 76, 151-160.
- Fan, L., Crodian, J., Liu, X., Alestrom, A., Alestrom, P., and Collodi, P. (2004). Zebrafish embryo cells remain pluripotent and germ-line competent for multiple passages in culture. *Zebrafish* 1, 21-26.
- Fan, L., Moon, J., Crodian, J., and Collodi, P. (2006). Homologous recombination in zebrafish ES cells. *Transgenic Res.* 15, 21-30.
- Fan, L., Moon, J., Wong, T.T., Crodian, J., and Collodi, P. (2008). Zebrafish primordial germ cell cultures derived from vasa::RFP transgenic embryos. *Stem Cells Dev.* 17, 585-597.
- Ge, C., Yu, M., Petitte, J.N., and Zhang, C. (2009). Epidermal growth factor-induced proliferation of chicken primordial germ cells: involvement of calcium/protein kinase C and NFKB1. *Biol. Reprod.* 80, 528-536.
- Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., and Daley, G.Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427, 148-154.
- Goto-Kazeto, R., Saito, T., Takagi, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2010). Isolation of teleost primordial germ cells using flow cytometry. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1487-1492.
- Guo, X., Qi, Z.Y., Zhang, Y.M., Qin, J., Cui, G.H., Gui, Y.T., and Cai, Z.M. (2012). Effect of all-trans-retinoic acid on the expression of primordial germ cell differentiation-associated genes in mESC-derived EBs. *Cell Biol. Int.* 36, 491-495.
- Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K., and Inoue, K. (2004). Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* 268, 152-161.

- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* *146*, 519-532.
- Hiller, M., Liu, C., Blumenthal, P.D., Gearhart, J.D., and Kerr, C.L. (2011). Bone morphogenetic protein 4 mediates human embryonic germ cell derivation. *Stem Cells Dev.* *20*, 351-361.
- Hong, N., Li, Z., and Hong, Y. (2011). Fish stem cell cultures. *Int. J. Biol. Sci.* *7*, 392-402.
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., *et al.* (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* *129*, 69-82.
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyne, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* *31*, 227-229.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.
- Knaut, H., Steinbeisser, H., Schwarz, H., and Nusslein-Volhard, C. (2002). An evolutionary conserved region in the vasa 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. *Curr. Biol.* *12*, 454-466.
- Krovel, A.V., and Olsen, L.C. (2002). Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech. Dev.* *116*, 141-150.
- Liu, W., and Collodi, P. (2010). Zebrafish dead end possesses ATPase activity that is required for primordial germ cell development. *FASEB J.* *24*, 2641-2650.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Matsui, Y., and Mochizuki, K. (2013). A current view of the epigenome in mouse primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*

- Miyake, A., Saito, T., Kashiwagi, N., Ando, D., Yamamoto, A., Suzuki, T., Nakatsuji, N., and Nakatsuji, T. (2006). Cloning and pattern of expression of the shiro-uo vasa gene during embryogenesis and its roles in PGC development. *Int. J. Dev. Biol.* *50*, 619-625.
- Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathsack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., *et al.* (2006). In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev. Cell.* *11*, 125-132.
- Parker, J. R. (2010). Algorithms for Image Processing and Computer Vision (Vol. II). Indianapolis, IN, USA: Wiley Publishing, Inc.
- Prince, S. J. (2012). Computer Vision: Models, Learning, and Inference. UK: Cambridge University Press.
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 690-700.
- Riesco, M.F., Martinez-Pastor, F., Chereguini, O., and Robles, V. (2012). Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology* *77*, 122-30, 130.e1-2.
- Robles, V., Marti, M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Study of pluripotency markers in zebrafish embryos and transient embryonic stem cell cultures. *Zebrafish* *8*, 57-63.
- Robles, V., Marti, M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Study of pluripotency markers in zebrafish embryos and transient embryonic stem cell cultures. *Zebrafish* *8*, 57-63.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., and Yamaha, E. (2010). Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 1481-1486.
- Sakai, N. (2002). Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. *Development* *129*, 3359-3365.
- Sakai, N. (2002). Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. *Development* *129*, 3359-3365.

Sander, J.D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R.T., Joung, J.K., and Yeh, J.R. (2011). Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29, 697-698.

Shirazi, R., Zarnani, A.H., Soleimani, M., Abdolvahabi, M.A., Nayernia, K., and Ragerdi Kashani, I. (2012). BMP4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells. *Cell Biol. Int.* 36, 1185-1193.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2002). Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol. Reprod.* 67, 1087-1092.

Wong, T.T., and Collodi, P. (2013). Dorsomorphin promotes survival and germline competence of zebrafish spermatogonial stem cells in culture. *PLoS One* 8, e71332.

Westerfield, M. (1995) The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 3rd Edition

Woods, I.G., and Schier, A.F. (2008). Targeted mutagenesis in zebrafish. *Nat. Biotechnol.* 26, 650-651.

Xing JG, Lee LE, Fan L, Collodi P, Holt SE, Bols NC. (2008). Initiation of a zebrafish blastula cell line on rainbow trout stromal cells and subsequent development under feeder-free conditions into a cell line, ZEB2J. *Zebrafish.* 2008 Spring;5(1):49-63. doi: 10.1089/zeb.2007.0512.

Yu, M., Ge, C., Zeng, W., Mi, Y., and Zhang, C. (2012). Retinoic acid promotes proliferation of chicken primordial germ cells via activation of PI3K/Akt-mediated NF- $\kappa$ B signalling cascade. *Cell Biol. Int.* 36, 705-712.

## **Discusión**

---

Durante los últimos años, el pez cebra se ha consolidado como un importante modelo biológico. La fecundación externa, el rápido desarrollo embrionario y las características translúcidas de sus embriones han hecho de él un excelente modelo en Biología del Desarrollo (Fishman, 2001; Nusslein-Volhard, 1994; Streisinger et al., 1981). Recientemente, esta especie ha comenzado a utilizarse como modelo en estudios que abordan diversas patologías y enfermedades humanas, incluyendo el cáncer (Konantz et al., 2012; Mimeault and Batra, 2013). La multitud de herramientas genéticas que están disponibles, son al menos parcialmente responsables del crecimiento exponencial de los trabajos científicos que utilizan esta especie. La aparición de numerosas líneas mutantes y transgénicas de alto valor biotecnológico, han hecho necesario el empleo de métodos para conservarlas. En la actualidad, la criopreservación espermática es el método elegido para la conservación de estas líneas por las compañías que abastecen de pez cebra a laboratorios de todo el mundo (Varga). No obstante, el volumen de semen obtenido en esta especie es muy escaso (0,8-2 µL) y además esta técnica garantiza exclusivamente la conservación del genoma paterno. Los estudios que abordan la criopreservación de embriones en teleósteos han sido totalmente infructíferos y la criopreservación de oocitos también se muestra esquiva. Es por todo ello que esta Tesis Doctoral aborda la criopreservación de PGCs como la mejor alternativa para preservar tanto el genoma materno como el paterno. Estas células pueden ser trasplantadas en un embrión receptor y lograr colonizar el GR para dar lugar a una quimera de la línea germinal (Saito et al., 2008). De esta manera, cualquier manipulación genética llevada a cabo en estas células de forma previa al trasplante, estaría presente en las células germinales y por tanto, sería transmitida a la progenie. Este trabajo presenta la criopreservación de PGCs como una alternativa factible y útil para la creación de bancos de germoplasma tanto para la preservación de estas líneas transgénicas, como para la conservación de especies de interés en Acuicultura. En ambos casos, es crucial mantener la integridad del ADN, y es por ello que en este trabajo se hace especial hincapié en el desarrollo y empleo de métodos moleculares para la evaluación de los protocolos de criopreservación, buscando garantizar la máxima seguridad a este nivel.

Una de las limitaciones de las PGCs a la hora de crear bancos de germoplasma, es el escaso número estas células presentes en cada embrión (en pez cebra 30-50, (Braat et al., 1999)). En mamíferos se ha logrado con éxito la generación de PGCs *in vitro* a partir de células madre embrionarias (Eguizabal et al., 2009; Hayashi et al., 2011; Shirazi et al., 2012). Tanto en ratón como en humano, la especificación de las PGCs es inducible por factores de la familia BMP. No obstante, al contrario de lo que ocurre en ratón, en peces la determinación de las PGCs es un proceso dependiente de la herencia materna (Schupbach and Wieschaus, 1986). Este hecho ha motivado que hasta el momento no se haya contemplado la posibilidad que el presente trabajo aborda: forzar la diferenciación *in vitro* de cultivos de células embrionarias hacia PGCs. Este logro no sólo representaría poder incrementar significativamente el número de PGCs obtenidas por cada embrión, si no que sería una herramienta totalmente novedosa que facilitaría la creación de transgénicos y *knock out* en esta especie. Con la posibilidad de inducir la diferenciación, se haría posible la manipulación de células embrionarias, y su posterior diferenciación, tras la cual, el trasplante de una sola PGC, sería suficiente para colonizar el GR del embrión receptor, y dar lugar a una quimera de la línea germinal (Kawakami et al., 2010).

### **Diseño de protocolos de criopreservación y vitrificación de PGCs de pez cebra**

El primer objetivo de esta Tesis Doctoral, abordó el diseño de protocolos de criopreservación y vitrificación para PGCs de pez cebra. Se compararon diferentes protocolos de criopreservación usando tres soluciones vitrificantes y diferentes envases de congelación que proporcionaron distintas rampas de congelación-descongelación. En estudios previos de criopreservación de PGCs en pez cebra, los tiempos de exposición a los crioprotectores eran prolongados (30 min) buscando incrementar su penetración (Higaki et al., 2009). Estos tiempos de exposición tan largos tenían efectos perjudiciales para la viabilidad de las PGCs (Higaki et al., 2009). Para evitar la toxicidad de los crioprotectores, en este trabajo se ha empleado una combinación de crioprotectores internos y externos a concentraciones más bajas de

las utilizadas en otros estudios que abordan la criopreservación de embriones de pez cebra con el objetivo de recuperar las PGCs (Arakawa et al., 1990; Higaki et al., 2010). Además, dicha incorporación se ha realizado de forma gradual, en los que la concentración del crioprotector permeable se iba incrementando y el crioprotector impermeable se añadía en el último paso. Se utilizaron diferentes muestras de partida: embriones, GRs y células disociadas de rebordes genitales, enriquecidas en PGCs. Por último, se testó también el efecto de la incorporación de la proteína anticongelación AFP tipo I en el medio de congelación, sobre la viabilidad celular tras la criopreservación.

Los resultados obtenidos, demostraron que las condiciones seleccionadas (la combinación de crioprotectores internos y externos, el protocolo de exposición más corto y progresivo, la temperatura de exposición a los crioprotectores y las rampas de congelación- descongelación) proporcionaron tasas de viabilidad tras la congelación semejantes a las de las muestras frescas en todos los casos, excepto en aquellas muestras suplementadas con AFP 20 mg/mL y aquellas criopreservadas en microcápsulas, en los que la supervivencia de las PGCs disminuyó. La microencapsulación ha sido usada en la preservación de esperma canino a 4 °C, manteniendo su motilidad y viabilidad durante varios días (Shah et al., 2010). En nuestro estudio la microencapsulación se utilizó con el objeto de evitar la pérdida de células disociadas durante el proceso de congelación/descongelación. Cuando la muestra biológica que se manipula son embriones o rebordes genitales, la pérdida de PGCs es improbable, pero la probabilidad aumenta al utilizar células disociadas. El número de PGCs por GR es muy escaso, y se consideró que la microencapsulación evitaría tener pérdidas de esta población celular. No obstante, nuestros resultados demostraron que este método además de ser altamente laborioso, somete al material de partida a una manipulación severa (por el proceso de encapsulación y descapsulación), que tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de las PGCs tras la descongelación. Teniendo en cuenta, que con la manipulación de embriones y de rebordes genitales se previene la pérdida celular y se obtuvo una elevada viabilidad de las PGCs tras la congelación, el método de la microencapsulación fue descartado.

El empleo de AFPs en el medio de criopreservación, no resultó tóxico para las células, pero tampoco mejoró significativamente la viabilidad de las PGCs tras el proceso de criopreservación, independientemente de la concentración utilizada. El efecto de la AFP tipo I nunca antes había sido valorado en la criopreservación de PGCs, pero si había sido testado previamente en la criopreservación de embriones (Robles et al., 2007). Estas proteínas, que se obtienen de la especie subártica *Winter flounder*, tienen la capacidad de adherirse a los cristales de hielo bloqueando su crecimiento, y por ello, bajo ciertas condiciones, pueden producir una disminución en el daño celular. Además las AFPs actúan disminuyendo el punto de congelación, y pueden estabilizar la membrana plasmática de las células a bajas temperaturas gracias a su capacidad de unión con la bicapa lipídica (Beirao et al., 2012). Nuestros experimentos previos en criopreservación de blastómeros de pez cebra, mostraron que la adición de AFP tipo I a una concentración de 10 mg/mL como suplemento a la solución crioprotectora, incrementó significativamente la supervivencia celular tras la descongelación. Se obtuvieron supervivencias superiores al 80 % en las muestras tratadas con AFP tipo I mientras que en los controles la supervivencia nunca superó el 50 % (Robles et al., 2007). Sin embargo, la misma concentración de AFP no tuvo ese efecto sobre la supervivencia de las PGCs de pez cebra. Además, cuando la concentración se incrementó a 20 mg/mL se observó un efecto perjudicial sobre la viabilidad de las PGCs tras el proceso de criopreservación. Este hecho puede ser explicado teniendo en cuenta el efecto dual que poseen las AFPs. Dependiendo de la concentración utilizada, estas proteínas pueden evitar el crecimiento de los cristales de hielo, o por el contrario, inducir la formación de cristales de hielo en forma de espícula (Mugnano et al., 1995). Estos cristales en forma de espícula pueden ser mucho más perjudiciales para la supervivencia de la célula que los que se formarían en ausencia de las AFPs. De hecho, las AFPs a altas concentraciones han sido utilizadas para inducir muerte celular en tumores.

Teniendo en cuenta que la criopreservación es una herramienta muy útil en la conservación del material genético, la ausencia de daño en el ADN es un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de elegir un protocolo de criopreservación. El nivel de fragmentación del ADN tras la criopreservación, ha sido evaluado en

espermatozoides de diferentes especies de peces (Cabrita et al., 2005; Labbe et al., 2001; Lee and Steinert, 2003; Zilli et al., 2003), pero nunca antes había sido valorado en PGCs. Nuestros resultados mostraron un incremento en la fragmentación del ADN utilizando la técnica de la microencapsulación, que tal como se ha discutido anteriormente, reduce significativamente la viabilidad celular tras la criopreservación. No obstante, no siempre se observó una correlación directa entre el descenso en viabilidad y el incremento en la fragmentación del ADN. Las muestras suplementadas con AFP 20 mg/mL mostraron viabilidades significativamente inferiores al control, pero no se observó un ascenso en el índice de fragmentación. El daño genético por fragmentación es por tanto, un factor clave a la hora de evaluar la adecuación de distintos protocolos de criopreservación a un tipo celular concreto.

De los 8 protocolos de criopreservación/vitrificación ensayados en este estudio, 6 de ellos proporcionaron tasas de viabilidad semejantes al control tras la descongelación. De todos ellos se seleccionó el protocolo para criopreservar rebordes genitales en pajuelas de 0,5 mL puesto que, además de resultar menos laborioso, presentó una menor variabilidad en los resultados.

Puesto que un aspecto crucial de la biología de las PGCs es su capacidad migratoria, que garantiza la colonización del GR tras su trasplante en el embrión receptor, se consideró necesario incluir una valoración más funcional del protocolo de criopreservación seleccionado. Se estudió por tanto la capacidad de emisión de pseudópodos de las PGCs criopreservadas usando la técnica *time lapse*, demostrando que la criopreservación no disminuyó dicha capacidad.

Como conclusión, en este primer trabajo se logró diseñar un protocolo de criopreservación que no sólo resultó óptimo en términos de viabilidad celular tras la descongelación, sino que además preservó la integridad del ADN global y la funcionalidad celular tras el proceso. Sin embargo, la criopreservación puede producir numerosas lesiones en el ADN que no son detectadas valorando la fragmentación global. Otros tipos de daños en el ADN asociados a la producción de ROS, han sido descritos, tales como: creación de sitios abásicos, *cross-linking*, y lesiones que dan

como resultado bases nitrogenadas modificadas, (Aitken and De Iuliis, 2007; Baumber et al., 2003; Perez-Cerezales et al., 2009; Slupphaug et al., 2003).

Por lo expuesto, el siguiente objetivo de esta Tesis Doctoral fue implementar, por primera vez en la valoración de muestras criopreservadas, una técnica cuantitativa para analizar daños en regiones y genes concretos. Además, se evaluó el efecto de la criopreservación sobre la metilación de promotores y sobre transcritos clave.

### **Análisis del efecto de la criopreservación sobre promotores, genes y transcritos concretos.**

En el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral, se analizaron las alteraciones moleculares producidas por la criopreservación en PGCs de pez cebra. Es importante destacar, que tal como se ha mencionado con anterioridad, el protocolo empleado pudo considerarse como óptimo para este tipo celular en términos de viabilidad, ausencia de fragmentación en el ADN y funcionalidad celular. Para este análisis molecular, se implementó por primera vez como técnica de evaluación de daño de una muestra criopreservada, un método cuantitativo basado en qPCR para conocer el número de lesiones sobre regiones concretas del genoma. Esta técnica, descrita inicialmente por Rothfuss y colaboradores (Rothfuss et al., 2010) para cuantificar el daño producido por la exposición al peróxido de hidrógeno en células humanas, se basa en la habilidad que tienen ciertas lesiones en el ADN para reducir y bloquear la progresión de la ADN polimerasa. Este bloqueo se traduce en un retraso en la amplificación del molde de ADN y un retraso en el Ct. Puesto que uno de los posibles efectos producidos por la criopreservación es la producción de ROS (de forma semejante a la producción de ROS que se produce tras la exposición al peróxido de hidrógeno) se decidió utilizar esta técnica para valorar los daños causados por la congelación/descongelación.

En el primer trabajo se analizaron dos regiones nucleares y dos regiones mitocondriales. La razón por la que se estudiaron ambos genomas por separado, fue la diferencia en el grado de compactación que presentan, que puede otorgarles una

distinta susceptibilidad al daño (Yakes and Van Houten, 1997). Salazar y colaboradores describieron diferentes porcentajes de daño en el ADN y capacidades de reparación entre el genoma mitocondrial y nuclear, usando un método de XL-PCR cuantitativo (Salazar and Van Houten, 1997). De acuerdo con estos experimentos previos, nuestros datos mostraron que el menor número de lesiones tras la criopreservación se encontró en el genoma nuclear.

En el segundo trabajo de este capítulo se cuantificó el número de lesiones inducidas por la criopreservación en genes concretos con especial relevancia en el tipo celular de estudio (PGCs) y además se analizaron las alteraciones producidas por la criopreservación sobre el patrón de metilación de promotores génicos y sobre transcritos clave. Nuestros resultados mostraron que dos de los genes estudiados (*pou5f1* y *sox3*) son menos susceptibles a sufrir daño tras el proceso de criopreservación. Por el contrario *vasa* y *sox2* presentaron un mayor número de lesiones tras la descongelación. Estas diferencias en la susceptibilidad a sufrir daño, pueden ser parcialmente atribuidas a las diferentes posiciones que ocupan los genes dentro de los diferentes territorios nucleares. Es sabido que las regiones cercanas a la envoltura nuclear pueden ser más susceptibles al daño (Bermejo et al., 2012).

Sin embargo, las alteraciones moleculares tras el proceso de criopreservación, no se limitan sólo al ADN, la reducción de algunos transcritos o incluso la eliminación de algunos de ellos como consecuencia del protocolo de criopreservación, ha sido descrito recientemente en espermatozoides humanos por algunos grupos (Garcia-Herrero et al., 2011). En nuestro estudio, tras la criopreservación, se produjo una disminución significativa en 4 de los 6 transcritos estudiados. Sin embargo, teniendo en cuenta que los GRs conteniendo las PGCs no fueron puestos en cultivo tras el proceso de congelación, nos cuestionamos si el tiempo que transcurre durante el protocolo de criopreservación es suficiente como para que ocurra una regulación transcripcional. Para ver qué estaba ocurriendo, analizamos la expresión de dos genes relacionados con el estrés térmico y osmótico (*hsp70* y *90*) (Guinez et al., 2004). Observamos que tras el proceso de criopreservación se produjo un aumento en la expresión de ambos genes, sugiriendo que era posible una regulación a nivel transcripcional. Para averiguar si estas alteraciones en el nivel de transcritos eran

debidas a la exposición de los crioprotectores más que al fenómeno de criopreservación/descongelación en sí mismo, se evaluó la expresión de los genes tras la exposición de los GR a los CPAs y antes de ser criopreservados. No se produjo ninguna disminución en la expresión de los genes relacionados con las PGCs y ningún aumento en la expresión de las *hsp*. Consecuentemente, se pudo concluir que la alteración en la abundancia de transcritos es principalmente debida al proceso de congelación y descongelación y no al efecto de la presencia de agentes crioprotectores en el medio.

De este modo, sabiendo que la regulación transcripcional es posible, y que la metilación de los residuos de citosina en el ADN es considerado uno de los mayores mecanismos epigenéticos que controlan la expresión de genes y el imprinting (Schaefer et al., 2007), decidimos estudiar el patrón de metilación de los promotores génicos, para confirmar si este fenómeno explicaba el descenso en todos los transcritos estudiados. Los estudios más recientes han mostrado una correlación negativa entre la fragmentación del ADN y la metilación de los promotores, ya que algunos componentes que se liberan durante el estrés oxidativo pueden actuar como sustrato de la metiltransferasa, e interferir en el proceso de metilación (Tunc and Tremellen, 2009; Ziech et al., 2011). Como nuestro protocolo de criopreservación de PGCs garantiza una ausencia de fragmentación en el ADN pudimos hacer un estudio de metilación evitando el citado efecto que pudiera enmascarar los resultados. Nuestros resultados mostraron diferentes niveles de metilación entre los distintos genes tras el proceso de criopreservación. Sólo en algunos de los genes (*vasa* y *cxcr4b*), la criopreservación produjo un aumento en la metilación que pudo ser correlacionada con la disminución de la expresión encontrada en estos genes. En este punto, se decidió analizar si una disminución en la abundancia de transcritos era posible sin que existiese una disminución de la transcripción, y de esta forma poder explicar los resultados obtenidos. Para ello, se utilizaron espermatozoides humanos como modelo de célula transcripcionalmente inactiva. En estas células nunca se ha descrito actividad transcripcional (Ostermeier et al., 2002) y es sabido que los ARNm presentes son remanentes de la espermatogénesis (Steger, 2001). En este modelo, cualquier disminución de los transcritos tras el proceso de criopreservación no podría ser

explicado por un mecanismo epigenético. Nuestros resultados mostraron que algunos transcritos humanos (relacionados con la síntesis de proteínas o utilizados como marcadores de éxito de embarazo y calidad seminal), disminuyeron tras la criopreservación. Este hecho nos permitió concluir que el efecto de la criopreservación en la alteración de la abundancia de transcritos no siempre puede ser explicado mediante un mecanismo de regulación transcripcional. Nuestra hipótesis baraja la posibilidad de que la criopreservación afecte la estabilidad de los ARNm haciéndolos más susceptibles a la degradación. Estudios recientes, han demostrado que la regulación de algunos transcritos específicos del genoma materno no sólo depende de una mecanismo de inhibición de la transcripción, sino que también existen ciertas proteínas (CUP) que se asocian a los ARNm y los mantienen en una forma deadenilada y reprimida (Igreja and Izaurrealde, 2011; Jeske et al., 2011; Steger, 2001; Zaessinger et al., 2006). Mecanismos similares pueden estar actuando en los transcritos paternos, aunque ninguno haya sido descrito hasta el momento. Es posible que la criopreservación afecte a la interacción ARNm-proteína, produciendo una desestabilización del ácido nucleico. De hecho, existen estudios que han demostrado que la criopreservación puede alterar la estructura de la nucleoproteína en espermatozoides (Flores et al., 2011). De manera similar, la criopreservación podría actuar afectando la estabilidad de los ARNm alterando la asociación ácido nucleico/proteína.

De los resultados obtenidos en los tres primeros trabajos de esta Tesis Doctoral (capítulos 1 y 2), se desprende que el proceso de criopreservación puede provocar alteraciones moleculares (lesiones en genes concretos, disminución de transcritos cruciales y cambios en el patrón de metilación de promotores que disminuyan la expresión génica) aun cuando el protocolo utilizado sea considerado óptimo para el tipo celular en términos de viabilidad, fragmentación del ADN y funcionalidad celular. Estas alteraciones deben de ser tenidas en cuenta a la hora de seleccionar un protocolo de criopreservación concreto y su evaluación permitiría discriminar entre distintos protocolos que en términos de viabilidad celular no tuvieran diferencias. La criopreservación es una técnica ampliamente usada en reproducción humana, y disponer de estas herramientas para la valoración específica de protocolos de

criopreservación, evitando así daños moleculares que puedan transmitirse a la progenie, tiene un valor añadido en este campo.

### **Generación *in vitro* de PGCs**

La posibilidad de generar PGCs *in vitro* tiene un gran impacto en el campo de la Biotecnología y la Acuicultura. En especies modelo como el pez cebra, se ha conseguido el cultivo de células madre embrionarias (Fan et al., 2004; Ma et al., 2001) e incluso se han realizado con éxito procesos de recombinación homóloga en esos cultivos (Fan et al., 2004; Fan et al., 2006). Por ello, la posibilidad de diferenciar *in vitro* dichas células a PGCs y trasplantarlas en el embrión receptor (garantizando la transmisión de la modificación genética realizada a la progenie), sería una herramienta de gran valor en la producción de transgénicos y de líneas *knock out*. En el caso de especies con interés en Acuicultura, o bien de especies en peligro de extinción, las PGCs ofrecen la alternativa perfecta para la creación de bancos de germoplasma, si no fuera por su escasa presencia en el embrión. Disponer de un método de cultivo *in vitro* que permitiese incrementar su número sería por tanto una herramienta de gran valor también en estas especies.

En mamíferos, se ha conseguido con éxito la diferenciación de las PGCs *in vitro* tanto en ratón (Hayashi et al., 2011; Shirazi et al., 2012) como en humano (Eguizabal et al., 2009). En ambos casos la diferenciación fue posible utilizando factores de la familia del BMP que están implicados en el mecanismo de especificación de las PGCs. En el caso del ratón, la contribución de las PGCs diferenciadas *in vitro* a la progenie quedó demostrada mediante experimentos de trasplante y posterior análisis de la progenie (Hayashi et al., 2011).

En cambio, no hay ningún estudio que demuestre la diferenciación de células embrionarias hacia PGCs en ninguna especie de teleósteo. La diferencia radica en el proceso de especificación de las PGCs: en mamíferos la determinación de las PGCs es un proceso inducible por factores de la familia del BMP, mientras que en peces, la determinación de las PGCs es un proceso heredado (Raz, 2003). El conocimiento sobre el origen heredado de la determinación de las PGCs (en el que el descubrimiento de los

marcadores moleculares, y la creación de individuos transgénicos fueron herramientas definitivas) ha hecho que se considere poco factible o incluso imposible la diferenciación de PGCs *in vitro*. No obstante, estudios realizados por nuestro grupo en cultivo de células embrionarias de pez cebra (Robles et al., 2011), demuestran que el comportamiento de las células embrionarias *in vitro* difiere significativamente respecto a lo observado *in vivo*. En el estudio realizado en esta Tesis Doctoral, hemos demostrado la posibilidad de inducir la diferenciación de PGCs *in vitro* partiendo de cultivos de células embrionarias. En este método la combinación de factores de crecimiento como el BMP4, EGF y RA han sido claves para el incremento de la generación de PGCs *in vitro*. El uso de estos tres factores junto con un medio utilizado previamente por Sakai y colaboradores (Sakai, 2002) en estudios de diferenciación de espermatogonias a espermatozoides (TCCM), fue suficiente para registrar un aumento significativo en el número de PGCs derivadas *in vitro* a partir de las células embrionarias.

Estas PGCs derivadas *in vitro* fueron caracterizadas mediante análisis de expresión de marcadores (qPCR), análisis de intensidad de fluorescencia y morfología (por análisis de imagen y citometría de flujo) y trasplante. Además, para comprobar que el aumento en el número de PGCs no fue debido a una proliferación de las células ya existentes, sino que se debía a un proceso real de diferenciación, se realizó un análisis de ciclo celular.

Para los estudios de expresión génica, se seleccionaron marcadores de las PGCs (*vasa*) y otros genes relevantes para su viabilidad y su capacidad de migración (*dnd* y *cxcr4b*). El tratamiento de diferenciación DFT4 aumentó significativamente la expresión de todos estos genes. Sin embargo, un incremento en la expresión génica no implica necesariamente un incremento en el número de PGCs diferenciadas, puesto que podría deberse a un aumento en la tasa de transcripción de alguna de las células o bien a una proliferación en las PGCs preexistentes, ya que existen estudios que han demostrado la proliferación de las PGCs *in vitro* (Fan et al., 2004). Por esta razón, se realizaron estudios de citometría de flujo y con ellos se constató un aumento en la población de PGCs paralelo a la disminución en la población de células somáticas. Para establecer el control de ambas poblaciones se utilizaron estudios previos en los que se

habían caracterizado dichas poblaciones por citometría de flujo (Goto-Kazeto et al., 2010). Los resultados de citometría revelaron, sorprendentemente, que el cultivo en TCCM de células embrionarias producía por sí mismo un incremento en la población de PGCs. Este medio, por tanto, era un elemento clave en el proceso, aunque la adición de los otros factores (RA, EGF, BMP4) en el TCCM tuvo un efecto sinérgico en el aumento del número de PGCs. Buscando confirmar que el aumento del número de PGCs *in vitro* no era debido a proliferación celular, se realizaron estudios de ciclo celular. En estos estudios se pudo constatar que el tratamiento que inducía el mayor aumento en la población de PGCs (DFT4) presentaba el menor índice de proliferación celular (menor número de células en G2/M) y por tanto el aumento en el número de PGCs registrado se debía inequívocamente a un aumento en la tasa de diferenciación y no a un aumento en la proliferación celular.

Para aportar más evidencias sobre nuestras observaciones, se realizó un análisis por intensidad de fluorescencia. Este análisis evidenció un claro aumento del número de pixeles fluorescentes tras el tratamiento de diferenciación, de acuerdo con nuestros resultados previos. El trasplante de las PGCs diferenciadas y la posterior colonización del GR en el embrión receptor, fueron logrados con éxito, constituyendo la evidencia final que confirma que las células han sido indudablemente diferenciadas hacia PGCs.

Por todo ello, aunque la inducción de la diferenciación a PGCs en peces ha sido considerada imposible hasta el momento, debido a la naturaleza hereditaria del plasma germinal, este estudio demuestra que esta diferenciación es posible *in vitro*. El hecho de que estas células en cultivo puedan responder a factores de diferenciación a los que son insensibles *in vivo* puede explicarse desde dos puntos de vista diferentes pero no excluyentes. Por un lado, las células *in vitro* podrían sufrir modificaciones epigenéticas que pudieran explicar un aumento en la expresión de *vasa* (por ejemplo una desmetilación de su promotor). De esta forma, células que en el embrión no expresarían *vasa* y sólo lograrían diferenciarse hacia PGC si heredasen el plasma germinal, *in vitro* podrían expresar autónomamente este gen (y otros relacionados) y diferenciarse hacia PGC. No obstante, la presencia transitoria de *vasa* en varias células embrionarias y su posterior desaparición, que hace que dichas células no lleguen a

diferenciarse hacia PGCs *in vivo* (Knaut et al., 2002), hace que la segunda hipótesis cobre una mayor verosimilitud. En esta segunda hipótesis planteamos que los cambios en la expresión génica que sufren las células embrionarias una vez son puestas en cultivo (Robles et al., 2011) podrían afectar a genes relacionados con la estabilización del transcripto *vasa*. La presencia de proteínas estabilizadoras de este y otros transcritos relevantes para la viabilidad de las PGCs *in vitro* que eviten su degradación, explicaría, por qué en cultivo las células no necesitan heredar el germoplama para diferenciarse a PGCs. Una de las proteínas más importantes de unión al ARN en las PGCs es la proteína DND-1. Su papel es tan crucial, que, tal como se ha realizado en esta Tesis, la generación de individuos estériles en pez cebra se logra con la inyección de un morfolino que evita la traducción de esta proteína. El DND-1 evita la degradación por micro-ARNs de los transcritos a los que se une (Kedde et al., 2007). Es posible que los cambios en la expresión génica *in vitro* generen una mayor presencia de esta proteína que logre la estabilización de transcritos claves para las PGCs que *in vivo* serían altamente inestables. De hecho, nuestros resultados de expresión génica confirman el aumento de los transcritos *dnd-1*, y este aumento es especialmente relevante en el tratamiento DFT4, el mejor tratamiento de diferenciación empleado en el presente estudio. Este último trabajo que constituye el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral, rompe con las ideas preconcebidas de la inducción hacia PGCs en peces, abriendo la posibilidad de realizar manipulaciones genéticas en las células embrionarias (aprovechando su mayor plasticidad a dichas manipulaciones), y posteriormente diferenciarlas hacia PGCs (para asegurar éxito en la contribución de estas células modificadas en la línea germinal tras el trasplante, garantizando así su transmisión a la progenie). Todas estas herramientas son cruciales para consolidar la importancia del pez cebra como modelo biológico en investigación.

## Consideraciones Finales

El desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha supuesto un gran avance en la biología reproductiva y biotecnología en peces, permitiendo la criopreservación y

diferenciación *in vitro* de PGCs de pez cebra, y logrando implementar nuevas herramientas moleculares para la valoración de los protocolos de criopreservación.

Con este trabajo se ha conseguido elaborar un protocolo de criopreservación para las PGCs de pez cebra que proporciona tasas de viabilidad celular semejante a las células sin criopreservar y que preserva la funcionalidad celular (emisión de pseudópodos) y la integridad del ADN. Además se ha logrado realizar un análisis exhaustivo de alteraciones moleculares tras la criopreservación, que ha permitido cuantificar por vez primera tras este proceso el número de lesiones en regiones y genes concretos. También se ha descrito por vez primera, un efecto directo de la criopreservación en la desestabilización de ARNm haciéndoles potencialmente más susceptibles a la degradación.

Por último, y como herramienta clave en el contexto de la investigación actual, se ha establecido un protocolo de diferenciación hacia PGCs *in vitro*, algo totalmente novedoso y que rompe con la idea preconcebida de la imposibilidad de diferenciar estas PGCs debido a la naturaleza hereditaria del origen del plasma germinal en peces. Esta herramienta permitiría la modificación de las células embrionarias en cultivo, su diferenciación hacia PGCs y posterior trasplante en el organismo receptor para la creación de quimeras de la línea germinal.

El desarrollo de todas estas técnicas supone un gran avance en las técnicas de manipulación y preservación de PGCs y en la creación de bancos de germoplasma en peces.

## **Bibliografía**

- Aitken, R.J., and De Iuliis, G.N. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. Biomed. Online* *14*, 727-733.
- Arakawa, T., Carpenter, J.F., Kita, Y.A., and Crowe, J.H. (1990). The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. *Cryobiology* *27*, 401-415.
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., and Meyers, S.A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.* *24*, 621-628.
- Beirao, J., Zilli, L., Vilella, S., Cabrita, E., Schiavone, R., and Herraez, M.P. (2012). Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids. *Biol. Reprod.* *86*, 59.
- Bermejo, R., Kumar, A., and Foiani, M. (2012). Preserving the genome by regulating chromatin association with the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* *22*, 465-473.
- Braat, A.K., Zandbergen, T., van de Water, S., Goos, H.J., and Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* *216*, 153-167.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., and Herraez, M.P. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* *50*, 144-153.
- Eguizabal, C., Shovlin, T.C., Durcova-Hills, G., Surani, A., and McLaren, A. (2009). Generation of primordial germ cells from pluripotent stem cells. *Differentiation* *78*, 116-123.

Fan, L., Alestrom, A., Alestrom, P., and Collodi, P. (2004). Development of cell cultures with competency for contributing to the zebrafish germ line. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *14*, 43-51.

Fan, L., Moon, J., Crodian, J., and Collodi, P. (2006). Homologous recombination in zebrafish ES cells. *Transgenic Res.* *15*, 21-30.

Fishman, M.C. (2001). Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science* *294*, 1290-1291.

Flores, E., Ramio-Lluch, L., Bucci, D., Fernandez-Novell, J.M., Pena, A., and Rodriguez-Gil, J.E. (2011). Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology* *76*, 1450-1464.

Garcia-Herrero, S., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Remohi, J., Pellicer, A., and Meseguer, M. (2011). Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod. Biomed. Online* *22*, 25-36.

Goto-Kazeto, R., Saito, T., Takagi, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2010). Isolation of teleost primordial germ cells using flow cytometry. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 1487-1492.

Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J.C., and Lefebvre, T. (2004). 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *319*, 21-26.

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* *146*, 519-532.

Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., Kagawa, N., Kuwayama, M., Nagano, M., Katagiri, S., and Takahashi, Y. (2010). Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction* *139*, 733-740.

Higaki, S., Mochizuki, K., Baba, H., Akashi, Y., Yamaha, E., Katagiri, S., and Takahashi, Y. (2009). Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jpn. J. Vet. Res.* *57*, 119-128.

Igreja, C., and Izaurrealde, E. (2011). CUP promotes deadenylation and inhibits decapping of mRNA targets. *Genes Dev.* *25*, 1955-1967.

Jeske, M., Moritz, B., Anders, A., and Wahle, E. (2011). Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels. *EMBO J.* *30*, 90-103.

Kawakami, Y., Goto-Kazeto, R., Saito, T., Fujimoto, T., Higaki, S., Takahashi, Y., Arai, K., and Yamaha, E. (2010). Generation of germ-line chimera zebrafish using primordial germ cells isolated from cultured blastomeres and cryopreserved embryoids. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 1493-1501.

Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., et al. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.

Knaut, H., Steinbeisser, H., Schwarz, H., and Nusslein-Volhard, C. (2002). An evolutionary conserved region in the vasa 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. *Curr. Biol.* *12*, 454-466.

Konantz, M., Balci, T.B., Hartwig, U.F., Dellaire, G., Andre, M.C., Berman, J.N., and Lengerke, C. (2012). Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1266*, 124-137.

Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., and Maisse, G. (2001). Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* *60*, 397-404.

Lee, R.F., and Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, 43-64.

Ma, C., Fan, L., Ganassin, R., Bols, N., and Collodi, P. (2001). Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2461-2466.

Mimeault, M., and Batra, S.K. (2013). Emergence of zebrafish models in oncology for validating novel anticancer drug targets and nanomaterials. *Drug Discov. Today* 18, 128-140.

Mugnano, J.A., Wang, T., Layne, J.R., Jr, DeVries, A.L., and Lee, R.E., Jr. (1995). Antifreeze glycoproteins promote intracellular freezing of rat cardiomyocytes at high subzero temperatures. *Am. J. Physiol.* 269, R474-9.

Nusslein-Volhard, C. (1994). Of flies and fishes. *Science* 266, 572-574.

Ostermeier, G.C., Dix, D.J., Miller, D., Khatri, P., and Krawetz, S.A. (2002). Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 360, 772-777.

Perez-Cerezales, S., Martinez-Paramo, S., Cabrita, E., Martinez-Pastor, F., de Paz, P., and Herraez, M.P. (2009). Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology* 71, 605-613.

Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* 4, 690-700.

Robles, V., Barbosa, V., Herraez, M.P., Martinez-Paramo, S., and Cancela, M.L. (2007). The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology* 68, 284-289.

Robles, V., Martí, M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Study of pluripotency markers in zebrafish embryos and transient embryonic stem cell cultures. *Zebrafish* 8, 57-63.

Rothfuss, O., Gasser, T., and Patenge, N. (2010). Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. *Nucleic Acids Res.* *38*, e24.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., and Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* *78*, 159-166.

Sakai, N. (2002). Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture. *Development* *129*, 3359-3365.

Salazar, J.J., and Van Houten, B. (1997). Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mutat. Res.* *385*, 139-149.

Schaefer, C.B., Ooi, S.K., Bestor, T.H., and Bourc'his, D. (2007). Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* *316*, 398-399.

Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1986). Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev. Biol.* *113*, 443-448.

Shah, S., Nagano, M., Yamashita, Y., and Hishinuma, M. (2010). Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4 degrees C. *Theriogenology* *73*, 560-567.

Shirazi, R., Zarnani, A.H., Soleimani, M., Abdolvahabi, M.A., Nayernia, K., and Ragerdi Kashani, I. (2012). BMP4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells. *Cell Biol. Int.* *36*, 1185-1193.

Shirazi, R., Zarnani, A.H., Soleimani, M., Abdolvahabi, M.A., Nayernia, K., and Ragerdi Kashani, I. (2012). BMP4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells. *Cell Biol. Int.* *36*, 1185-1193.

Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H.E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* *531*, 231-251.

Steger, K. (2001). Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat. Embryol. (Berl)* 203, 323-334.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293-296.

Tunc, O., and Tremellen, K. (2009). Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26, 537-544.

Varga, Z.M. Chapter 24 - Aquaculture and Husbandry at the Zebrafish International Resource Center. In *Methods in Cell Biology*, Academic Press) pp. 453-478.

Yakes, F.M., and Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 514-519.

Zaessinger, S., Busseau, I., and Simonelig, M. (2006). Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development* 133, 4573-4583.

Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2011). Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711, 167-173.

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., and Vilella, S. (2003). Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47, 227-235.

## **Conclusiones**

---

Las conclusiones derivadas de los trabajos que constituyen esta Tesis Doctoral son las siguientes:

- 1- La criopreservación de los rebordes genitales (GR) de pez cebra en pajuelas de 0,5 ml utilizando la solución crioprotectora DMSO 5M, EG 1M, PVP 4% proporciona una viabilidad y un grado de integridad del ADN semejantes a la de las PGCs sin congelar (control) y retiene la capacidad migratoria de las células; considerándose por tanto un protocolo eficaz.
- 2- La adición de AFP tipo I al medio de criopreservación no mejora la viabilidad tras la congelación a las concentraciones ensayadas (10 mg/mL y 20 mg/mL), siendo su efecto negativo en el caso de concentraciones elevadas (20 mg/mL).
- 3- La viabilidad celular tras la criopreservación no siempre presenta una correlación directa con la ausencia de fragmentación del ADN, haciendo necesario evaluar la integridad del ADN tras el proceso.
- 4- La técnica de qPCR permitió cuantificar por primera vez el número de lesiones producidas por la criopreservación en regiones y genes concretos. Demostrando la existencia de regiones (genoma mitocondrial) y genes (*vasa* y *sox 2*) con mayor susceptibilidad al daño genético.
- 5- El proceso de congelación-descongelación altera la presencia de trascritos clave de las PGCs, no teniendo la incubación sobre los crioprotectores efecto alguno sobre los transcritos. El descenso en alguno de estos transcritos (*vasa*) puede explicarse mediante regulación transcripcional al observar la hipermetilación de sus promotores.
- 6- La criopreservación altera la presencia de transcritos en células transcripcionalmente inactivas (espermatozoides humanos) haciendo previsible una posible desestabilización de la interacción ARN-proteína que favorezca la degradación de las moléculas de ARNm.

- 7- La diferenciación *in vitro* de células embrionarias de pez cebra hacia PGCs es posible utilizando el tratamiento DFT4 que utiliza el medio de cultivo *Testicular Cell Culture Medium* (TCCM) además de una combinación de factores: BMP4 (500 ng/ml), RA (5 mM) and EGF (50 ng/mL). Este hecho, sin precedente, sugiere que en peces la diferenciación de las PGCs *in vitro* sí es un mecanismo inductivo a diferencia de lo que sucede *in vivo*.
- 8- El aumento en la expresión de marcadores de PGCs en los cultivos de células embrionarias tras el tratamiento (DFT4) se debe a un aumento en las células que se diferencian y no a proliferación de PGCs preexistentes, tal como reflejan los estudios de citometría y ciclo celular.
- 9- Las PGCs diferenciadas *in vitro* presentan capacidad de colonización del GR tras ser trasplantadas en el embrión receptor, demostrando así su total funcionalidad.

## **Agradecimientos**

---

Han sido miles de horas de correteos, experimentos infinitos, ausencias de sueño y estreses de todo tipo persiguiendo “Amadeos” y logros varios. Sin embargo, cuando por fin miras hacia atrás, te das cuenta de que lo más importante y con lo que te quedas, no es con eso, ni siquiera con “Amadeo”. Indudablemente, los mejores momentos los aportan las personas que te acompañan en este duro camino.

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer su apoyo durante el desarrollo de esta Tesis por participar directa o indirectamente en ella, temo más que nada olvidarme de alguien:

En primer e indiscutible lugar, a la Dr Vanesa Robles, mi supervisora, amiga, mi mayor fuente de inspiración y apoyo. Recorrer este camino contigo de la mano ha sido lo mejor que me ha podido ocurrir. Gracias por tu confianza, esa confianza que para mí fue tan importante a lo largo de todos estos años y que nunca dejé de percibir. Gracias por toda la motivación y espíritu de sacrificio que transmites por los cuatro costados, trabajar a tu lado es un placer. Y sobre todo, gracias por enseñarme a: disfrutar de todo lo que hago, a no rendirme nunca y a sobreponerme cuando es necesario. No ha habido un solo día durante estos años, en el que haya dejado de sentir el enorme agradecimiento que ahora me embarga. Gracias por no dejarme caer nunca.

A mi *segunda supervisora en funciones aunque no en cargo*, y no por ello menos importante, la Dr Paz Herráez. Por ejercer de fuente de experiencia y por transmitirme esa calma que tan bien me vino en ciertas circunstancias. Gracias por proporcionarme esa confianza en mí misma que en determinados momentos pudo flaquear.

A mis niños: David y Fer, por acompañarme, apoyarme y ayudarme tanto en este camino. Vuestra llegada supuso encontrar a mis compañeros ideales de viaje. Veros “crecer” y sentir este orgullo que siento por vuestros logros, ha sido una experiencia única. Nunca nada supuso un problema afrontándolo juntos, y todas las alegrías se multiplicaban cuando chillábamos por los pasillos en busca unos de otros.

A mi segunda mamá; Mi Su, por no dejar que me quedara sin comer ni un día mientras tú estabas. Por levantar “ese dedín” a tiempo para lanzar uno de esos sabios consejos, dentro y fuera del laboratorio, por todas esas risas, lloros y *papeos*. Ese gen de madre hace que sólo tú sepas dar esos abrazos que pueden arreglar todo.

Al “Equipo Peces”; en especial a Cris, esa risa mueve montañas, por no hablar de la cara “póker”...A Silvia y mi Martita alevín. Siempre me acordaré de aquellas tardes en Biología Celular, un rato con vosotras parecía que arreglaba todos los cultivos, trasplantes fallidos y demás menesteres.

A la Dr Elsa Cabrita, que estando a cientos de km, siempre la noté muy cerca, nunca la distancia supuso un impedimento en sus inestimables consejos y ayuda.

A mis AMIGOS: Rubén, mi hermano y a mi siempre Nuria ¿Qué puedo decir en un par de líneas?, lo hemos afrontado TODO juntos. Sin vosotros nada hubiera sido posible. Esos ratos de “desestrese” me dieron la vida y esos malos ratos en vuestra compañía me calaron todavía más. Siempre supisteis como arreglar la peor de la crisis.

Mención especial a mi adorada Tuji; Carmen, pilar principal a lo largo de esta Tesis. Gracias por no escatimar jamás en esfuerzos, por ayudarme y devolverme la confianza en mi misma que a veces pude perder. Siempre te tuve ahí. Tu sonrisa y alegría supusieron para mí la mayor fuente de serenidad.

A mis compis de ruteos varios. A los míos, y a los que me han quedado en herencia, que ahora los siento míos como los que más; Sara, Cami, Elena, Borja, Maite, Elenina, Octavio, Sandra, Refu, Erica, Tejero, Marta, Merce, Edu...

A mis compis y ex compis del laboratorio, especialmente a Silvia (Sevilla) y Reixel, por esa disposición y entrega, dentro y fuera del laboratorio. También a María R, Claudia, Víctor, Irene, Diego, Berta, María, Natalia....

Al Dr Arsenio Fernández López, por esas prácticas, congresos, “papeos” y “cafeses” que tan buenas experiencias me aportaron. Gracias por proporcionarme esos consejos que tan bien me vinieron, sobre todo en momentos de crisis existencial.

A mi parte de la familia más “salerosa”, aunque la distancia que nos separa sea considerable, siempre os he sentido muy cerca.

A Avi, mi modelo a seguir y la persona a la que más admiro. Conocerte supuso encontrar el camino, mi camino. Gracias por no dejarme sola nunca, por poner orden y sensatez en esta cabeza desordenada y por hacerme percibir siempre ese apoyo incondicional. No lo has podido hacer mejor.

Y por último, a mis padres, y en este caso sí, los más importantes. Al final, este es el resultado de vuestro trabajo, todo el mérito es vuestro. Gracias por sentirme la persona más querida del mundo. En vuestro caso, no hay agradecimiento posible a la altura de la dedicación infinita que me habéis brindado.

## **ANEXO 1: Lista de Abreviaturas**

---

|         |   |
|---------|---|
| AFP     | Anti-Freeze Protein                             |
| BT      | Blastoderm Transplantation                      |
| bFGF    | Basic Fibroblast Growth Factor                  |
| Ct      | Cycle Treshold                                  |
| DFT     | Differentiation Treatment                       |
| DMSO    | Dimethyl sulfoxide                              |
| dpf     | Days post fertilization                         |
| EG      | Ethylene glycol                                 |
| EGF     | Epidermal Growth Factor                         |
| EGFP    | Enhanced Green Fluorescent Protein              |
| ESC     | Embryonic Stem Cells                            |
| GR      | Genital Ridge                                   |
| HMGCoAR | 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase |
| hpf     | Hours post fertilization                        |
| IGF-1   | Insulin-like growth factor 1                    |
| LIF     | Leukemia inhibitory factor                      |
| LRE     | Localized RNA expression                        |
| PGC     | Primordial Germ Cell                            |
| PI3K    | Phosphoinositide 3-kinase                       |
| PVP     | Polyvinylpyrrolidone                            |
| RA      | Retinoic Acid                                   |
| RFP     | Red Fluorescent Protein                         |
| ROS     | Reactive Oxygen Species                         |
| SCF     | Stem Cell Factor                                |
| SCSA    | Sperm Chromatin Structure Assay                 |
| SPT     | Single Primordial Germ Cell Transplantation     |
| TALENs  | Transcription Activator-Like Effector Nucleases |
| TUNEL   | Transferase-mediated dUDP Nick-end-Labeling     |

## **ANEXO 2: Lista de términos en inglés**

---

|                      |  |
|----------------------|--|
| <i>Cross linking</i> | Entrecruzamiento   |
| <i>Feeders</i>       | Células que se utilizan en co-cultivo como sustrato de otras                               |
| <i>Knock-out</i>     | Tecnología para reprimir de manera dirigida la expresión de un gen                         |
| <i>Knock-in</i>      | Tecnología para introducir de manera dirigida un gen                                       |
| <i>Knock-down</i>    | Tecnología para reducir la expresión de un gen o disminuir la traducción de su proteína    |
| <i>Reporter</i>      | Gen que se une a la secuencia reguladora de otro con fines de identificación y/o selección |
| <i>Time Lapse</i>    | Captura programada de imágenes para su posterior visualización secuencial                  |

## **ANEXO 3: Material Suplementario de los artículos**

---

**Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols**

**Theriogenology, 2012**

**Supplementary Table 1.** Primordial germ cell (PGC) survival rates (%) after embryo and genital ridge (GR) cryopreservation using different loading containers.

| Container                | CPAs solution | Sample                   | PGC survival rate (%) |
|--------------------------|---------------|--------------------------|-----------------------|
| Straw                    | CPAs          | Embryo                   | 92.3±13.9             |
|                          |               | GRs                      | 91.2±25.1             |
|                          | AFP10         | GRs                      | 89.3±19.8             |
|                          | AFP20         | GRs                      | 49.0±15.9*            |
| Cryovial                 | CPAs          | Embryo                   | 76.7±25.9             |
|                          |               | GRs                      | 72.1±21.7             |
| Microdrop                | CPAs          | GRs                      | 95.9±19.2             |
| <b>Microcapsule CPAs</b> |               | <b>Dissociated cells</b> | <b>25.3±3.82**</b>    |

Embryos or GRs per trial = 10, N = 3. AFP, antifreeze protein; CPA, cryoprotectant. \* Significant differences among different cryoprotectant solutions used in 0.5 straws. \*\* Significant differences among different cryopreservation protocols.

**Supplementary Table 2.** Percentage of DNA in tail in control and cryopreserved primordial germ cells (PGCs)

| Container        | Treatment    | Percentage of tail DNA (%DNAt) |
|------------------|--------------|--------------------------------|
| Unfrozen samples | Control      | 3.7±0.6 <sup>c</sup>           |
| 0.5 Straws       | CPAs         | 3.6±1.3 <sup>c</sup>           |
|                  | CPAs AFP 10  | 8.5±0.5 <sup>c</sup>           |
|                  | CPAs AFP 20  | 5.9±3.3 <sup>c</sup>           |
|                  | Without CPAs | 40.0±5.0 <sup>b</sup>          |
| Microcapsule     | CPAs         | 26.1±2.9 <sup>a</sup>          |

Samples were cryopreserved in 0.5 mL straws and microcapsule, using DMSO 5 mol/L, ethylene glicol (EG) 1 mol/L, and polyvinyl pyrrolidone (PVP) 4% (CPAs) with or without AFP at 10 mg/mL (AFP 10) or 20 mg/mL (AFP 20). Genital ridges (GRs) per trial = 20, N = 3. Letters represent significant differences among treatments.

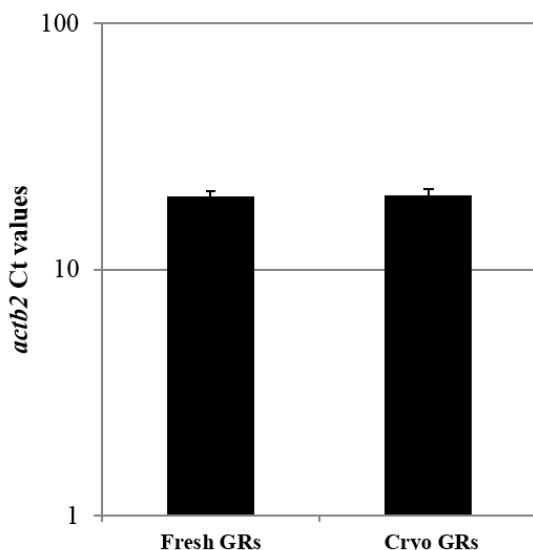
a-c Significant differences among different cryoprotectant solutions used in 0.5 straws. AFP, antifreeze protein; CPA, cryoprotectant.

**Supplementary time lapse of frozen/thawed Zebrafish primordial germ cells (PGCs) showing pseudopodial emission.** Primordial germ cells were cryopreserved with the 0.5 mL straw method. Primordial germ cells were recorded for 2 h using a Nikon (Tokyo, Japan) microscope and NIS-Element software.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11003566>

**Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges**

Plos One, 2013



**Figure S1.** *actb2* Ct values means in fresh and cryopreserved genital ridges (GRs) from 26 somite zebrafish embryos. Ct values mean  $\pm$  SE of three independent experiments with three replicates for each. Ct values remained unaffected by cryopreservation.

**Table S1.** Summary of gene abbreviations, gene complete names and gene functions in zebrafish primordial germ cells (PGCs) and in human sperm.

| Species   | Gene          | Complete name   | Function in zebrafish PGCs or human sperm   | Reference |
|-----------|---------------|---|---|-----------|
| Zebrafish | <i>dnd</i>    | dead end  | Specifically expressed in primordial germ cells (PGCs)<br>Required for PGC migration and survival<br>ATPase activity that is required for PGC formation | [27]      |
| Zebrafish | <i>vasa</i>   | vasa  | Involved in germ cell lineage development<br>Important functions in the development of PGCs   | [28]      |
| Zebrafish | <i>cxcr4b</i> | Chemokine (C-X-C motif), receptor 4b                        | PGC migration in zebrafish is directed by the chemokine SDF-1a that activates its receptor cxcr4b   | [29]      |
| Zebrafish | <i>pou5f1</i> | POU domain, class 5, transcription factor 1                 | Maintaining pluripotency of embryonic stem cells and inducing reprogramming of differentiated cells in zebrafish  | [30]      |
| Zebrafish | <i>sox2</i>   | SRY-box containing gene 2                                   | Plays an important role in neuronal differentiation   | [31]      |
| Zebrafish | <i>sox3</i>   | SRY-box containing gene 3                                   | Involved in early processes of zebrafish development.   | [32]      |
| Human     | <i>eIF2S1</i> | Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha | Important role in protein synthesis   | [6]       |
| Human     | <i>HOXB1</i>  | Homeobox B1   | Reported as marker of pregnancy success   | [6]       |
| Human     | <i>LHCGR</i>  | Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor             | Considered as human male quality marker   | [6]       |

**Table S2.** List of primers for DNA damage. Sequences start from 5' to 3'. Annealing temperature and amplicon size is specified for each pair of primers.

| Primer name         | Primer set                    | Annealing Tm (°C) | Amplicon size (bp) |
|---------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| <i>cxcr4b</i> LONG  | GCGTCCGGACTTATTGCGCCT         | 62                | 628                |
|                     | GACATTGGCCTCCTGCGGGT          |                   |                    |
| <i>cxcr4b</i> SHORT | CGAGCATGGTACCATCTGCGA         | 60                | 50                 |
|                     | GACATTGGCCTCCTGCGGGT          |                   |                    |
| <i>dnd</i> LONG     | GTCTCGACGCCGTGTCAT            | 62                | 678                |
|                     | AATCGTGACAAACGCAAACCA         |                   |                    |
| <i>dnd</i> SHORT    | GGATGTGCGAGGTCAACAGA          | 60                | 57                 |
|                     | CGCGTGATGGAAGTGGACTT          |                   |                    |
| <i>pou5fl</i> LONG  | ATTGGCCCATTCTGATTGATG         | 62                | 650                |
|                     | ACAAGCCGCCGTACAATAT           |                   |                    |
| <i>pou5fl</i> SHORT | CAGCAGACTGCAGACCCTATGA        | 60                | 57                 |
|                     | TCAAGCCGCCGGGCC               |                   |                    |
| <i>sox2</i> LONG    | ACGACGATTAACGGCACGAT          | 62                | 650                |
|                     | AAAAGCTGGAGAGTGCCCTCTGT       |                   |                    |
| <i>sox2</i> SHORT   | TGCACAACTGATGTTACGTCAA        | 60                | 81                 |
|                     | ATGTACCTTCAGTGAGAAACTCTTAAATC |                   |                    |
| <i>sox3</i> LONG    | AGTTCCGTGGCAGAGCAGAA          | 63                | 650                |
|                     | GTCCTGCATGAGGGAGTATGC         |                   |                    |
| <i>sox3</i> SHORT   | GGCGGGCAAAACAAACAGT           | 60                | 57                 |
|                     | GCATTCATAGGCCGCTTCAC          |                   |                    |
| <i>vasa</i> LONG    | TGCGCAAACCTGGTGGCGTCT         | 64                | 750                |
|                     | ATGGTGGCGGCTATCGCTC           |                   |                    |
| <i>vasa</i> SHORT   | TGGATGAAGCAGACAGAATGCT        | 60                | 79                 |
|                     | GAAATGCGCAAACCTGGTGG          |                   |                    |

**Table S3.** List of primers for gene expression and for bisulphite sequencing. Sequences start from 5' to 3'. Annealing temperature and the species are specified for each pair of primers.

| Primer name          | Primer set   | Annealing Tm (°C) | Species   | Use of primer        |
|----------------------|--|-------------------|-----------|----------------------|
| <i>HOXB1</i>         | GAAACACCCCTGCCCTTCAGA<br>ACCAGAGCCGCTGAAAGAGAA                 | 62                | Human     | Expression analysis  |
| <i>ACTB</i>          | TTCCTTCCCTGGCATGGAGT<br>TACAGGTCTTGCAGATGTC                    | 62                | Human     | Expression analysis  |
| <i>IHCGR</i>         | GCCCGTTTCATGTCAGCAA<br>CTGCCAGTCTATGGCATGGTT                   | 62                | Human     | Expression analysis  |
| <i>cscr4b</i>        | GGCGCIGGCATATTCCA<br>ACGCCCTAGGAAAGCATAAAGGA                   | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>dnd</i>           | GTCAACAGACTCGGCTCTCC<br>GCACAAGGTTGGATCAACCT                   | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>eIF2S1</i>        | AGCCCTAACAGAGCAGGTTGA<br>GCCITCIGTCTCTCCAGG                    | 62                | Human     | Expression analysis  |
| <i>hsp70</i>         | GGAAAGCCAAAAGITGCAGTGGAACA<br>GGAGTCGTTGAAATAGGCTGGAACTGTGATAA | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>hsp90</i>         | CTGGACAGCGCAGAACCTGAAGAT<br>CAGAGCCTCCATGAAAGCCTTGTCC          | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>pou5fl</i>        | GGTCGGAAGGCCAGGATT<br>TGAGCTGAGGGAATGTTTGC                     | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>sox2</i>          | ACCCGGAGGAAACCAA<br>CCCGGCAGGGTGTACTTG                         | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>sox3</i>          | GACGGGCGGCAGAACAC<br>CTGCCUGCGAGACCACAC                        | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>vasa</i>          | ATGGCATTCCCACATTTCA<br>GGCCGCCGTTTCCT                          | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>B-actin 2</i>     | CGAGCTGCTTCCCCATCCA<br>TCACCAACAGTAGCTGTCTTCTG                 | 60                | Zebrafish | Expression analysis  |
| <i>sox2</i>          | GTTAGATTGATATTGGAGTAGATTGATA<br>ACTACAACAAAAAAACAAATAAACTT     | 54                | Zebrafish | Methylation analysis |
| <i>sox2 nested</i>   | GGAGTAGATGATAATTGGATTAAAGTAA<br>ATAATAACCTCAATCAAAACTACCCCTA   | 54                | Zebrafish | Methylation analysis |
| <i>sox3</i>          | GTATIGTGTGGAGATTITGAAAGA<br>TCAATCAAAATTCCAATCACAC             | 54                | Zebrafish | Methylation analysis |
| <i>sox 3 nested</i>  | GTTGAGTTTTGAATTGGATTGA<br>TATACATTAAATTCCTAAACCATC             | 54                | Zebrafish | Methylation analysis |
| <i>pou5fl</i>        | TAATTGGGATAGTTAGGTTAGAAATTAG<br>CTTCTTATTTAAATCTCAACAAACCTT    | 56                | Zebrafish | Methylation analysis |
| <i>pou5fl nested</i> | GTTTGATTTAGATGGTATTTAATTGT<br>ATCTAATTAAACAAAACCCATTCA         | 56                | Zebrafish | Methylation analysis |
| <i>cscr4b</i>        | GTTTGTTGAATAAAATTGGG<br>AAAAATCATTACTAACTAAAAATC               | 56                | Zebrafish | Methylation analysis |
| <i>vasa</i>          | AATGGGAATTAGTGTATATTGATAGT<br>TTAAATTAAACCTCAATAACTAAATCA      | 56                | Zebrafish | Methylation analysis |

**Table S4.** Sequences, amplicon size and number of GpCs islands of the analyzed genes from Figure 4. Underlined CG corresponds with the analyzed CpG islands in the zebrafish genes

studied before and after cryopreservation (*cxcr4b* -240 bp-, *pou5f1* -255 bp-, *sox 3*-274 bp- and *vasa* -156 bp-).

| GENE          | SEQUENCE   | AMPLICON SIZE | NUMBER OF CpGs |
|---------------|--|---------------|----------------|
| <i>cxcr4b</i> | AAGAAGTCTACATTGGATG <b>CGAGCTGAAGCGTGCAGTATCACTTACAAGTATGTTGCTAAGCAGAGAGGT</b> CATTCTCAAGCATCTAAAGGACTGCCCTGGC <b>AAACGGTGGGATTCGAACCCACGGCCCCCGAAGAAACTGGAGCCTTAATCCAGCGCCTTAGACCCTCGGCCACGCAACCCACGGCCCCCGAAGAAACTGGAGCCTTAATCCAGCGCCTTAGACCCTCGGCCACGCA</b>     | 240           | 7              |
| <i>pou5f1</i> | TCTGATTTTAACAAGGCCATTCAAC <b>CGGAATCACCCCCCGCGACAGCCCAGACCTTCTTCATTTTCAAGCGGATTTAAAACGAACGATTTGCAAGGCGGCAGCTTTACGCAGCCCAAACACTGGTACCC<b>CGTTGCGGCCCCCGAGTTCACTGGGCAGGTTGCAGGAG<b>CGACGGCCGCCCTCAGCCCTCTATCGCGCAGACTAGAGAGC</b>AAATTAGATGCCATCTGAGGTC</b>AAAAAC</b> | 255           | 18             |
| <i>sox3</i>   | CATTTAGGATTCCTGAGCCATTCTCTCC <b>CGCTGCCCGCGAGACCCACACCATGAAAGCATAGGCCGCTTCACCCGGGCTGGT<b>CGTGGACTGCGGAATGGGGCTTTAACTCGGTTCCATCATGTTATACTTCTTAAAGTGGTGCCAAAGCACTCGAAAGAAAA<b>CGTTGAATTTCAAGAGTCTCACAAAAATGAAAGTCAGAGAGCTCAAAAC</b></b></b>                          | 274           | 14             |
| <i>vasa</i>   | TTTGATTTGAAACCTCATTGGTCTGAATCAATTATA <b>ACCGAGTCACAACTCTCCGGT</b> CATGTC <b>TAATCGAAATGAACTAGTGAACCGATCTCAAGGAGGACTTTAGCGTTAATAGTATT</b> TGTTGATTTAAATATCTCAAGCAAAAAGG   | 156           | 5              |

**In vitro generation of zebrafish PGC like cells****Sent for publication.**

**Supplementary Table 1 (S1). List of primers for gene expression.** Sequences start from 5' to 3'. Annealing temperature, accession number and amplicon size are specified for each pair of primers.

| Primer name      | Primer set  | Annealing Tm<br>(° C) | Accession<br>number | Amplicon size<br>(bp) |
|------------------|---|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>cxcr4b</i>    | F- GGCGCTGGCATATTCCA<br>R- ACGCCTAGGAAAGCATAAAGGA   | 60                    | AY057094            | 56                    |
|                  | F- GTCAACAGACTCGGCTCTCC<br>R- GCACAAGGTTTGGATCAACCT |                       |                     |                       |
| <i>dnd</i>       | F- ATGGCATTCCCATCATTTCAG<br>R- GGCGGCCGTTTTCCCT     | 60                    | NM_212795.1         | 206                   |
|                  | F- CGAGCTGTCTCCATCCA<br>R- TCACCAACGTAGCTGTCTTCTG   |                       |                     |                       |
| <i>vasa</i>      |   |                       | NM_131057           | 73                    |
| <i>β-actin 2</i> |   |                       | NM_181601           | 85                    |

**Supplementary Material 2 (S2).** *Bioimaging Software for PGC like cells detection by fluorescence script.*

```

Information:
%
% 0. To run this software you need to install the numerical computing
% environment Matlab http://www.mathworks.com
%
% 1. The software allows you to select the folder where the images to
% be analyzed (tif format)
%
% 2. The software automatically removes unnecessary elements of images
% (eg scales)
%
% 3. After the analysis, the software generates the following files: the
% processed image, topographic chart, and an Excel document with the
% frequencies of fluorescence
%
%%%%%%%%%%%%%%%
%
% Open the directory
directory = uigetdir();

% Images file type
type = '/*.tif';

% Directory and type
read_images = dir(strcat(directory,type));

% Processing the images one by one
for k = 1:length(read_images)

    % Read and process the image
    file = read_images(k).name;
    name=strcat(directory,'/');
    image = rgb2gray(im2double(imread(strcat(name,file))));

    % Displaying the image
    figure, imshow(image)

    % Convert to grayscale
    image(image==1)=0;

    % Removes unnecessary elements (eg scales)
    % Binary image indicating the pure black pixels
    imageBW=image==0;
    % Create BoundingBox
    boundingBox = regionprops(imageBW, 'BoundingBox');
    boundingBox = boundingBox(1).BoundingBox;
    % Set to black the BoundingBox
    image(round(boundingBox(2)):end,round(boundingBox(1)):end)=0;

    % Displaying the image
    figure, imshow(image);

    % Set the output names
    nameImageOutput = strcat(name,strtok(file,'.'),'.jpg');
    nameTopoChartOutput = strcat(name,strtok(file,'.'),'TopoChart.jpg');

    % Save the proceessed image
    imwrite(image, nameImageOutput)

    % Create the Topographic Chart
    mesh(image);
    % Set the axis
    axis([0 1500 0 1200 0 0.4]);
    % Load and set the ColorMap
    load('MyColormaps','mycmap');
    set(gcf,'Colormap',mycmap);

    % Save the Topographic Chart
    saveas(gcf, nameTopoChartOutput)

    % Processing the frequencies of fluorescence
    dataFrequencies = reshape(image, [],1);
    porcentaje = tabulate(dataFrequencies);

    % Create and save an Excel with the frequencies of fluorescence
    excel = strcat(name,strtok(file,'.'),'.xls');
    xlswrite(excel , porcentaje);

end

```