



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE C.C. BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Dpto. Biología Molecular

Área de Biología Celular

**Bases para la elaboración de bancos de
germoplasma de peces:
aplicación a la trucha leonesa**

**Basis for the establishment of germplasm resource banks in fish:
applications to the brown trout from the León province**

por

Sonia Martínez Páramo

**Memoria presentada como parte de los requerimientos para optar al título de
Doctora**

León, 15 de Septiembre de 2008

El desarrollo de la presente tesis doctoral ha sido financiado por una beca predoctoral concedida por la Diputación Provincial de León (Convocatoria 2005).



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

La Dra. D^a. M^a Paz Herráez Ortega como Directora de la Tesis Doctoral titulada **“BASES PARA LA ELABORACIÓN DE BANCOS DE GERMOPLASMA DE PECES: APLICACIÓN A LA TRUCHA LEONESA”** realizada por D^a. **Sonia Martínez Páramo** 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 12 de Septiembre de 2008

Fdo.: M^a Paz Herráez Ortega



Universidad de León

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de **Biología Molecular** en su reunión celebrada el día 15 de Septiembre de 2008 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "**BASES PARA LA ELABORACIÓN DE BANCOS DE GERMOPLASMA DE PECES: APLICACIÓN A LA TRUCHA LEONESA**", dirigida por la Dra. D^a. M^a Paz Herráez Ortega, elaborada por D^a. Sonia Martínez Páramo, y cuyo título en inglés es el siguiente "BASIS FOR THE ESTABLISHMENT OF GERMOPLASM RESOURCE BANKS IN FISH: APPLICATIONS TO THE BROWN TROUT FROM THE LEON PROVINCE".

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 15 de Septiembre de 2008.

El Secretario,

Fdo.: Jesús M. Aparicio

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Pedro Calvo Fernández

A mis padres

ÍNDICE

RESUMEN.....	15
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	23
----------------------------------	-----------

La trucha común en León.....	25
Bancos de germoplasma.....	28
Bases para la creación de un banco de recursos genéticos.....	31
Principios sobre la criopreservación de gametos y embriones.....	32
Teoría básica de la criopreservación.....	33
Crioprotectores.....	35
Criopreservación de semen de teleósteos.....	37
Criopreservación de embriones de teleósteos.....	45
Criopreservación de semen y embriones de trucha común.....	48
Bibliografía.....	51

OBJETIVOS.....	63
-----------------------	-----------

CRYOBANKING AS TOOL FOR CONSERVATION OF BIODIVERSITY: EFFECT OF BROWN TROUT SPERM CRYOPRESERVATION ON THE MALE GENETIC POTENTIAL.....	67
--	-----------

Abstract.....	71
1. Introduction.....	72
2. Materials and methods.....	74
2.1. <i>Collection of sperm and eggs</i>	74
2.2. <i>Sperm cryopreservation</i>	74
2.3. <i>Sperm viability</i>	75
2.4. <i>Comet assay (Single-cell gel electrophoresis procedure)</i>	76
2.4.1. <i>Preparation of samples</i>	76
2.4.2. <i>Cell lysis, DNA denaturalization and electrophoresis</i>	76
2.4.3. <i>Comet visualization and analysis</i>	77
2.5. <i>Fertilization</i>	77
2.6. <i>Microsatellite analysis</i>	78
2.7. <i>Statistical analysis</i>	78

3. Results.....	79
3.1. Sperm viability.....	79
3.2. Comet assay (<i>Single-cell gel electrophoresis procedure</i>).....	80
3.3. Fertilization.....	81
3.4. Microsatellite analysis.....	82
4. Discussion.....	85
Acknowledgments.....	88
References.....	88

INCORPORATION OF ANTIFREEZE PROTEINS INTO ZEBRAFISH EMBRYOS BY A NON-INVASIVE METHOD.....95

Abstract.....	99
1. Introduction.....	100
2. Material and methods.....	101
2.1. Animal care and obtaining embryos.....	102
2.2. Protein incorporation at different developmental stages.....	102
2.3. Determination of optimal incubation conditions.....	103
2.4. Effect of AFP incorporation and protein location.....	105
2.5. Statistical analysis.....	105
3. Results.....	106
3.1. Determination of optimal incubation conditions.....	106
3.2. Protein incorporation at different developmental stages.....	107
3.3. Effect of AFP incorporation and protein location.....	107
4. Discussion.....	111
Acknowledgments.....	114
References.....	114

CRYOPROTECTIVE EFFECTS OF ANTIFREEZE PROTEINS DELIVERED INTO ZEBRAFISH EMBRYOS.....119

Abstract.....	123
1. Introduction.....	124

2. Material and methods.....	126
2.1. <i>Animal care and obtaining embryos</i>	126
2.2. <i>Protein incorporation</i>	126
2.3. <i>Chilling sensitivity</i>	127
2.4. <i>Vitrification</i>	128
2.5. <i>Cell evaluation after thawing</i>	128
2.6. <i>Blastomere cryopreservation</i>	130
2.7. <i>Statistical analysis</i>	131
3. Results.....	131
3.1. <i>Chilling sensitivity</i>	131
3.2. <i>Vitrification</i>	132
3.3. <i>Blastomere cryopreservation</i>	134
4. Discussion.....	134
Acknowledgements.....	138
References.....	138
DISCUSIÓN GENERAL.....	143
Criopreservación de semen.....	146
Criopreservación de embriones y células embrionarias.....	149
Consideraciones finales.....	154
Bibliografía.....	156
CONCLUSIONES.....	161
AGRADECIMIENTOS.....	165
ANEXOS.....	169
Anexo I.....	171
Anexo II.....	173

RESUMEN

Durante las últimas décadas, las consecuencias de las catástrofes naturales unidas a los efectos negativos de la actividad humana se han visto reflejadas en el deterioro de los hábitats naturales así como en la reducción de la variabilidad de las especies que habitan en ellos. Los cursos fluviales son uno de los hábitats más susceptibles, debido principalmente a que desde los comienzos de la civilización, los ríos han sido el foco de asentamiento de las poblaciones humanas. En la provincia de León, la degradación del medio fluvial, la pesca exhaustiva y los brotes epidémicos han diezmando algunas poblaciones de peces, siendo la especie más emblemática y más amenazada la trucha común (*Salmo trutta* L.). Por ello, se han desarrollado durante años programas de cría en cautividad y repoblación, que han permitido contrarrestar en gran medida estos efectos. Sin embargo, la cría intensiva de trucha común presenta más dificultades que el cultivo de otras especies, debido en parte a que es muy susceptible de padecer enfermedades. La creación de stocks híbridos a partir de machos autóctonos y hembras de procedencia centroeuropea mejoró la productividad en cautividad. Sin embargo, este tipo de cruzamientos provoca introgresión génica de las poblaciones foráneas en el genoma de las poblaciones nativas, provocando la desaparición de caracteres seleccionados, favorables en un determinado hábitat y reduciendo la variabilidad génica de las poblaciones salvajes. La repoblación con stocks obtenidos a partir de las poblaciones nativas, requeriría crear un stock para cada población genéticamente diferenciada, lo que conlleva un gran coste y un riesgo de deriva génica a lo largo de las generaciones. En la cuenca del Duero, que es la que nos ocupa, existen diferentes poblaciones que muestran características diferenciales y que se encuentran perfectamente caracterizadas. En este contexto, la creación de un banco de germoplasma, donde almacenar gametos y embriones, sería enormemente útil en programas de conservación, ya que permitiría la preservación del material genético que define una población, su posterior empleo para la fecundación y finalmente la reintroducción de las distintas variedades en sus lugares de origen.

La criopreservación es el procedimiento más utilizado para preservar los gametos y embriones que constituyen un banco de recursos genéticos (GRB), y la puesta a punto de un GRB para cualquier especie requiere el dominio de esta técnica. Por ello nos proponemos comprobar si la criopreservación seminal garantiza la preservación de la variabilidad genética de las poblaciones de trucha amenazadas y analizar si el uso de

proteínas anticongelación mejora los resultados obtenidos en la congelación de embriones de peces.

Aunque la criopreservación de semen de peces se ha llevado a cabo en más de 200 especies, la mayor parte de ellas de agua dulce, los estudios realizados en trucha común son muy escasos. Por otra parte, datos recientes sugieren que la congelación del semen promueve fragmentación de la cromatina e indican que podría afectar al perfil genético de la descendencia. El protocolo utilizado en este trabajo, resultó de adaptar uno descrito por nuestro equipo para trucha arco iris, donde se utiliza una solución crioprotectora que contiene yema de huevo como estabilizador de membrana y DMSO como crioprotector principal. Para evaluar la calidad de la muestra antes y después de la criopreservación se realizaron estudios a nivel de estabilidad de la membrana plasmática, integridad del ADN y capacidad fecundante de los espermatozoides. Ni el porcentaje de células viables (entendiendo como viables aquellas células que mantuvieron la membrana plasmática intacta), ni el valor medio de fragmentación del ADN sufrió alteraciones significativas tras la criopreservación, aunque sí se redujo el porcentaje de células con menos del 5% de la cromatina fragmentada. Sin embargo, el porcentaje de huevos fecundados disminuyó de forma notable, debido probablemente a la suma de pequeños daños causados en las células a diferentes niveles durante el proceso. Aunque los daños a nivel del ADN no fueron significativos tras la descongelación, se produjo una disminución en el número de espermatozoides que conservaban su genoma en estado intacto, por lo que no asegura que no haya consecuencias en la descendencia. Además, la selección de los espermatozoides más resistentes durante el proceso de criopreservación, también podría conducir a una selección de determinados caracteres, provocando una variación en el patrón genético de la siguiente generación. Por ello, se realizó el análisis de 9 microsatélites en la descendencia, que demostró que los patrones genéticos de las progenies obtenidas a partir de semen fresco y congelado eran idénticos. Este hecho implica que la criopreservación de semen de trucha común es una herramienta válida para preservar su potencial genético, y así poder utilizar estas muestras en posteriores programas de repoblación.

En cuanto a la criopreservación de embriones y ovocitos de teleósteos, hasta el momento nunca se ha alcanzado con éxito este objetivo debido a su gran tamaño y su

particular estructura. Teniendo en cuenta este factor, así como el hecho de que los embriones de salmónidos tienen un tamaño particularmente grande y un desarrollo lento, y que existe un escasísimo conocimiento sobre sus características criobiológicas, parece más adecuado utilizar una especie modelo que ha sido bien estudiada, es fácil de mantener en laboratorio y presenta embriones con características, a priori, más favorables para la criopreservación. Por eso, en los estudios realizados en el presente trabajo se utilizó el pez cebra como modelo, con el fin de desarrollar mejoras en la congelación de embriones que puedan ser en un futuro aplicadas a la trucha común.

Los mayores éxitos alcanzados en criopreservación de embriones de teleósteos, se obtuvieron cuando embriones de la especie *Pleuronectes americanus* mostraron indicios de desarrollo tras la descongelación. Este hecho fue atribuido a que estos peces del Ártico expresan unas proteínas anticongelación (AFPs) que actúan como crioprotectores naturales. Por eso, se creyó oportuno incorporar estas AFPs a los protocolos convencionales de criopreservación, ya que la incorporación o expresión de estas proteínas podría incrementar la resistencia a la criopreservación en animales que no las producen naturalmente. En estudios previos, el empleo de la microinyección para introducir las AFPs en embriones de rodaballo y de dorada, demostró que el daño mecánico que se produce durante la manipulación resulta incompatible con la vitrificación. En el presente estudio se han incubado embriones de pez cebra en varios estadios embrionarios (2-8 células, 128 células y blástula avanzada) en un medio que contiene AFPs. El análisis de microscopía confocal demostró que existe una estrecha ventana temporal en el desarrollo embrionario (durante el estadio de 128 células), en la cual los blastómeros de la línea marginal, que darán lugar a la línea sincitial y a órganos derivados del aparato digestivo anterior (faringe, páncreas e hígado), captan esas proteínas del espacio perivitelino, manteniéndose localizadas en esos puntos, al menos hasta la eclosión. Este hecho resultó ser un gran avance teniendo en cuenta que la línea sincitial es considerada la barrera más impermeable de la estructura embrionaria y más susceptible de sufrir daños durante el proceso de vitrificación/descongelación. El efecto crioprotector de estas proteínas, quedó demostrado desde el momento en que los embriones de pez cebra incubados con AFPs, resistieron mucho mejor las bajas temperaturas que los embriones control, duplicando el porcentaje de eclosión tras 45 minutos a -10 °C. Tras la vitrificación también se observó el efecto beneficioso de las

AFPs, ya que disminuyó el porcentaje de embriones que colapsan durante la descongelación, debido probablemente a que la presencia de estas proteínas en la línea sincitial confiere mayor resistencia a esta envuelta, protegiendo el saco vitelino y el compartimento celular. Sin embargo, además de la morfología embrionaria se consideró necesario evaluar los daños producidos a nivel celular, ya que los embriones son incapaces de continuar el desarrollo. Con este fin, se desarrolló un protocolo de evaluación del compartimento celular para cada embrión independiente, con el fin de obtener datos del estado del compartimento embrionario propiamente dicho. Los resultados mostraron que, tras la criopreservación, sólo el 50% de las células se mantiene viable independientemente de la incubación con AFPs, considerándose que este porcentaje de células viables es incompatible con el desarrollo embrionario. Sin embargo, las células procedentes de embriones incubados con AFPs mostraron mejor funcionalidad celular, ya que son capaces de sobrevivir en cultivo durante más tiempo que las células de embriones control. Los avances producidos demuestran que las AFPs ejercen un efecto crioprotector, pero ha de conseguirse una distribución más amplia de las mismas a lo largo del embrión para obtener mejoras significativas en los resultados. Los progresos obtenidos hasta el momento no son suficientes como para emprender estudios específicos en trucha común.

Teniendo en cuenta las dificultades que plantea la criopreservación de embriones, se planteó la posibilidad que incorporar las AFPs a los protocolos tradicionales de congelación de blastómeros como posible solución a la preservación del material genético de ambos progenitores. Los resultados obtenidos en pez cebra, también mostraron una notable mejoría, ya que el porcentaje de blastómeros viables se duplica al añadir AFPs a la solución crioprotectora. Este hecho probablemente fue debido a que además de inhibir el crecimiento de los cristales de hielo durante la congelación/descongelación, las AFPs actúan como agentes estabilizadores de membrana reduciendo los daños producidos por las bajas temperaturas.

Atendiendo a que el propósito de la presente tesis doctoral es establecer unas bases para la creación de un banco de germoplasma para las poblaciones de trucha común de la provincia de León, de los resultados obtenidos se puede concluir que: el protocolo descrito para criopreservación de semen es un método apropiado para

preservar el potencial genético de los machos de esta especie, y por lo tanto es apto para congelar muestras destinadas a formar parte de un GRB. Las técnicas de androgénesis permitirían obtener una descendencia cuyo material genético fuese únicamente de origen paterno, evitando así la introgresión génica en aquellos casos en que no haya disponibilidad de ovocitos de hembras pertenecientes a la población que sea necesario repoblar. Incluso con tasas de fecundación bajas se obtendría un número de individuos en la primera generación suficiente para recuperar la población original, debido a la gran prolificidad de estas especies.

Por otra parte, y teniendo en cuenta que la criopreservación de embriones está aun lejos de ser alcanzada, la congelación de blastómeros parece una opción más realista para preservar el material genético de ambos progenitores. Los avances realizados en este trabajo mediante incorporación de AFPs al medio de congelación, podrían ser aplicados para la criopreservación de blastómeros de trucha común. Una vez estandarizado el protocolo, la recuperación de la población amenazada podría ser llevada a cabo mediante microinyección de blastómeros para creación de quimeras o transferencia nuclear a ovocitos enucleados. Sin embargo, para llevar a cabo con éxito este proceso aún es necesario un largo proceso de investigación.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La trucha común en León

Teniendo en cuenta el efecto negativo que la actividad humana está ejerciendo sobre determinados hábitats y las consecuencias que ello tiene sobre la biodiversidad, las iniciativas conservacionistas toman cada vez más fuerza, dirigiendo sus esfuerzos a decidir las mejores políticas para gestionar adecuadamente las áreas naturales, potenciar la creación de reservas y proponer nuevas estrategias para evitar el declive de las poblaciones silvestres. Uno de los hábitats más susceptibles son los cursos fluviales, que sufren intensas modificaciones en las áreas de mayor actividad humana. Según la IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), actualmente se consideran en peligro de extinción 1.571 especies de peces, casi todas de agua dulce. La mayoría de ellas corren peligro debido a la degradación de su hábitat (entre ellas algunos esturiones, anguilas o tiburones) y al menos 43 por sobrepesca. Otra causa de riesgo para algunas poblaciones es la introducción de especies exóticas, ahora más vigilada, pero que se ha permitido durante años y que ha tenido importantes consecuencias, especialmente entre las especies de aguas continentales. Muchas de las especies o variedades en peligro, especialmente estas últimas, tienen un gran valor económico para las áreas de donde son originarias y representan un recurso alimentario de primera necesidad. En el caso de la provincia de León y desde hace algunas décadas, existe una gran preocupación por la progresiva alteración del medio fluvial. Uno de los efectos más evidentes de la degradación en nuestros ríos es la desaparición de determinadas especies características de los mismos o la alarmante reducción de las poblaciones de peces, siendo la especie más emblemática y más amenazada la trucha común.

El acusado descenso en las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta* L.), debido al deterioro de la calidad ambiental, a la pesca exhaustiva y a los brotes epidémicos que han diezmando algunas poblaciones, ha llevado al diseño de programas de cría en cautividad y repoblación que se han desarrollado durante años. Sin embargo, la cría de trucha común salvaje presenta mayores dificultades que la de otras especies de trucha, como por ejemplo la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), ya que es muy susceptible de padecer enfermedades en cautividad. Por ello, se han desarrollado programas de repoblación utilizando truchas híbridas más resistentes que han sido obtenidas a partir de cruzamientos entre machos autóctonos y hembras foráneas,

principalmente de procedencia centro-europea (Corujo y cols., 2004). Sin embargo, este tipo de cruzamientos provoca introgresión génica de las poblaciones foráneas en el genoma de las poblaciones nativas, cuya principal consecuencia es la reducción de la variabilidad genética de las poblaciones salvajes, incluyendo la desaparición de algunos caracteres que pueden haber sido resultado de la selección natural por ser favorables en un determinado hábitat (Corujo y cols., 2004; Machordom y cols., 2000).

Para gestionar los recursos naturales de un modo seguro y eficiente, debe realizarse un análisis en profundidad de la variabilidad genética que existe dentro de las especies objeto de estudio. En los salmónidos, cada especie está dividida en subpoblaciones más o menos diferenciadas genéticamente, que son reconocidas por la existencia de diferencias morfológicas o ecológicas entre peces procedentes de distinto origen (Ryman, 1983). Ryman, en 1983, demostró que las poblaciones de trucha común están organizadas según una jerarquía, donde el nivel más alto viene determinado por la vertiente donde desembocan los ríos donde habitan. Por el contrario, Ostergaard y cols. (2003), estudiando las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) de islas del mar Báltico, comprobaron que la diferenciación entre poblaciones que produce la deriva génica debido al paso de generaciones (el factor temporal) es incluso superior a la producida por la localización de los animales en diferentes cursos fluviales (el factor espacial). En cualquier caso, y aunque las interacciones entre esos niveles aún no son bien conocidas, cada grupo está definido por unas características genéticas específicas (García-Marín y cols., 1999; Machordom y cols., 2000; Sanz y cols., 2000). En la Península Ibérica, existen al menos dos linajes diferenciados: uno en el cual están incluidas las especies pertenecientes a la vertiente Mediterránea (linaje IV) y otro compuesto por aquellas pertenecientes a la vertiente Cantábrica (linaje II) (Bernatchez, 2001; Cagigas y cols., 1999; García-Marín y Pla, 1996; García-Marín y cols., 1999; Machordom y cols., 2000).

Las variedades de trucha común objeto de nuestro estudio pertenecen a las cuencas del Duerna y del Esla, que a su vez pertenecen a la cuenca del río Duero, la cual es una de las más importantes de la vertiente Atlántica. Entre estas variedades existe una gran diferenciación genética que se mantiene tanto a nivel macro- como microgeográfico (Bouza y cols., 2001; Cagigas y cols., 2002; Corujo y cols., 2004; Estoup y cols., 1998; Sanz y cols., 2000). En la provincia de León, han sido llevados a cabo programas de

re población, sin tener en cuenta la variabilidad de las distintas poblaciones. Los peces utilizados en la repoblación, como se ha mencionado, fueron criados en piscifactorías a partir de progenitores de procedencia centro-europea, con características genéticas completamente diferentes a las de las truchas autóctonas, por lo que no fueron capaces de sobrevivir durante mucho tiempo en las condiciones ambientales de estos ríos (Blanco y cols., 1998; Corujo, 1999; García-Marín y cols., 1991; Martínez y cols., 1993; Moran y cols., 1991). Posteriormente, se crearon stocks híbridos a partir de cruces entre hembras de procedencia centro-europea y machos autóctonos, lo que supuso un mayor éxito en cuanto a la supervivencia de estos individuos. Sin embargo, como ya se explicó anteriormente, la introducción de especies foráneas provocó un grado de contaminación génica que en los peores casos ha implicado pérdida de caracteres genéticos típicos de estas poblaciones (Corujo y cols., 2004).

Para evitar el riesgo de introgresión génica, lo más apropiado sería repoblar los ríos con stocks obtenidos únicamente a partir de reproductores nativos. Sin embargo, para mantener la alta variabilidad existente en los ríos de la provincia de León, sería necesario disponer de un stock de reproductores para cada población genéticamente diferenciada. Además, cada stock debe estar constituido por un número de individuos suficiente como para evitar el llamado “efecto fundador”, que implica que, cuanto menor sea el tamaño de la población fundadora, más se incrementa la homocigosidad de la población, reduciendo la variabilidad genética y aumentando la probabilidad de que se expresen alelos recesivos deletéreos a lo largo de las generaciones. Debido al coste total que esto supondría, la repoblación con stocks de procedencia nativa no resulta muy realista. Por otra parte, el mantenimiento de la población en un cultivo intensivo también puede ser perjudicial para los fines de conservación, ya que según observaron Riabova y cols. (2006), en cultivos de esturión, se produce una pérdida de variabilidad genética a lo largo del tiempo que está relacionada con la densidad del cultivo, de forma que los cultivos intensivos reducen dicha variabilidad.

En este contexto, la congelación de semen, ovocitos y embriones permitiría crear un banco de recursos genéticos, entendido como banco de germoplasma, extraordinariamente útil en programas de conservación, en el cual sería posible preservar el material genético que define una población y la posterior reintroducción de las distintas variedades en sus lugares de origen.

Bancos de germoplasma

Una de las estrategias conservacionistas aplicadas actualmente es la creación de bancos de recursos genéticos (GRBs), que implica el almacenamiento de gametos y embriones cuyo fin principal es mantener *ex situ* el patrimonio genético de aquellas especies amenazadas y su posterior utilización para recuperar la población original cuando las condiciones ambientales sean favorables. Algunos defensores de la conservación de los ecosistemas, ven la modalidad de conservación *ex-situ* irrelevante desde el punto de vista de que los organismos conservados no sobreviven durante mucho tiempo en su hábitat natural. Sin embargo, aunque en la práctica las posibilidades de reintroducción son limitadas, ya que siempre dependerán de la restauración del hábitat, se han conseguido algunos éxitos que no habrían sido posibles sin la contribución de la conservación *ex-situ* (Stanley Price, 1989). El éxito en el desarrollo de programas de cría en cautividad, incluidas las aplicaciones de las tecnologías de reproducción y GRBs, dependerá de los avances en el conocimiento sobre la biología de la especie en cuestión. Por eso, en este contexto, debe considerarse esencial el conocimiento en profundidad de la biología reproductiva de las especies (Wildt y Wemmer, 1999). En este sentido, los GRBs combinan los aspectos prácticos de dos disciplinas amplias y complejas: la biología reproductiva y la criobiología.

Los comienzos de los GRBs se remontan a los años 50, cuando se desarrollaron los primeros experimentos de criopreservación de semen, lo cual supuso un gran avance en las técnicas de fecundación artificial utilizadas para la reproducción de animales de granja. Sin embargo, hasta 25 años después no comenzó a aplicarse esta técnica a la conservación de especies salvajes (Watson, 1978). La creación de bancos de esperma es una herramienta cada vez más apreciada, ya que, como veremos más adelante, reduce significativamente el número de animales vivos necesarios para mantener una población viable (Roldan y Garde, 2004) y por ello, su ritmo de creación para especies amenazadas, se ha incrementado de forma intensa en los últimos años. Estos bancos se están utilizando de forma sistemática en programas dirigidos a la conservación de ungulados, felinos o grandes mamíferos en diferentes partes del mundo (Watson y Holt, 2001).

En el caso de la conservación de peces, en las conclusiones de la Conferencia de Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo, celebrada en 1992, ya se propuso la creación de un banco internacional de recursos genéticos de peces, para preservar el genoma de las especies en peligro de extinción mediante la congelación de su esperma. Este banco se inició en Vancouver en 1994 bajo la dirección del Dr Harvey (Internacional Fisheries Gene Bank: www.worldfish.org/wft_experience.pdf). Por otra parte se están haciendo muchos esfuerzos para conservar las poblaciones de diferentes especies de esturión a partir de semen congelado (Grunina y cols., 2006) y son también numerosos los trabajos dedicados a la conservación de poblaciones o subespecies de salmónidos y ciprínidos utilizando como herramienta la congelación espermática para, posteriormente, fecundar ovocitos de especies próximas mediante procesos de androgénesis (David y Pandian, 2006).

La conservación de ovocitos presenta muchas más dificultades técnicas que la del esperma. Esto es debido a las características de estas células, que por su tamaño, su contenido en lípidos, la disposición de su material genético y de su citoesqueleto, sufren una gran cantidad de daños durante la criopreservación. No obstante, se ha logrado la fertilización de ovocitos congelados/descongelados en ratón, hamster, conejo, vaca y humano entre otras especies (Watson y Fuller, 2001). El avance en este campo va más ligado a la medicina reproductiva en humanos y al desarrollo de progenies clónicas u otras técnicas de manipulación genética, que a su aplicación directa en ganadería o conservación. En el caso de los peces y a pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, que han sido resumidos recientemente por Zhang y Lubzens (2008), no se ha obtenido ningún éxito, de forma que de momento no puede esperarse su utilización como reserva de material genético.

El caso de los embriones presenta una dificultad intermedia. En la década de los 70 se criopreservaron con éxito embriones de ratón (Whittingham y cols., 1972) y se publicó el primer caso de preñez con embriones congelados bovinos (Wilmut y Rowson, 1973). Hasta la fecha se han desarrollado tecnologías para la congelación de embriones de ganado vacuno, de oveja, caballo, gato, conejo, mandril, tití, ratón, rata, mono (Rall, 1992) y humano (Trounson y Mohr, 1983) y, más recientemente, en el año 2000, se obtuvieron los primeros cerdos nacidos de embriones congelados. Las tasas de embarazo y supervivencia hasta el parto obtenidas tras la transferencia de los embriones

descongelados a una hembra receptora, aún no son semejantes a las que se obtienen con embriones frescos, pero se espera que en un futuro no muy lejano el uso de embriones congelados se generalice en algunas especies. No obstante, de nuevo los peces ofrecen una peor respuesta a la conservación y, como se detallará más adelante, aun son necesarios muchos esfuerzos para hacer posible la supervivencia embrionaria tras la criopreservación. El desarrollo de métodos de congelación de embriones se considera de sumo interés, ya que proporciona un nuevo impulso a los bancos de germoplasma al permitir la conservación de todo el genoma, no sólo el procedente del espermatozoide (Whittingham y cols., 1972; Wilmut y Rowson, 1973), evitando la necesidad de desarrollar tecnologías de reproducción para recuperar la población original a partir sólo del esperma.

La posibilidad de establecer GRBs para la conservación de especies silvestres o agrícolas es una forma de contribuir al mantenimiento de su diversidad genética, cuya pérdida implica un grave problema que puede suponer la extinción de la población como consecuencia final. Un aspecto clave en la pérdida de diversidad genética es el tamaño de la población efectiva. Incluso en especies que, como tales, no pueden considerarse en peligro de extinción, la existencia de pequeñas poblaciones en determinadas localizaciones puede representar un peligro para la supervivencia de las mismas a largo plazo ya que se potencia la tendencia a la endogamia, provocando que la variabilidad se vaya perdiendo en cada generación (Frankham, 2001). La utilización de material criopreservado y almacenado en GRBs solventa en parte este problema, ya que los gametos congelados de determinados reproductores estarían disponibles para programas de cría, incluso durante tiempo superior al período de vida del donante. Teniendo en cuenta el amplio desarrollo de la tecnología aplicada a la reproducción, esos individuos podrían ser considerados como miembros reproductivos adicionales al grupo en generaciones posteriores, incrementando así el tamaño efectivo de la población (Holt, 2001).

Los GRBs pueden organizarse en función de dos objetivos bien distintos. Por una parte, objetivos taxonómicos, demográficos o de investigación, para los cuales los GRBs están constituidos principalmente por tejidos somáticos criopreservados, líneas celulares y muestras de ADN de diversas especies. Por otra parte, el GRB puede organizarse con

finés meramente reproductivos, conservando principalmente gametos y embriones, aunque los últimos experimentos de clonación en mamíferos a partir de líneas celulares adultas demuestran una nueva posibilidad de crear individuos a partir de líneas celulares criopreservadas, mediante transferencia nuclear en ovocitos.

Dentro de los GRBs con fines reproductivos podemos diferenciar tres tipos de bancos en función del objetivo que queramos conseguir. Así, pueden existir bancos para conservación animal, para preservación de especies agrícolas o para investigación médica y biotecnológica. Los objetivos de los GRBs para uso agrícola y biotecnológico son considerablemente más sencillos que los dirigidos hacia conservación de especies amenazadas, en cuyo caso es muy importante preservar líneas genéticas específicas sin introgresión de ninguna otra.

Teniendo en cuenta que el espacio físico así como la financiación para programas de GRB son limitados, cuando la población que se desea conservar es de gran tamaño, debe realizarse una selección de los gametos. Sólo en el caso de poblaciones muy pequeñas sería posible almacenar muestras de todos los individuos. Sin embargo, para fines de conservación, esta medida sería un objetivo ideal para el mantenimiento de la diversidad genética.

Bases para la creación de un banco de recursos genéticos

Como ya se indicó anteriormente, la creación de un GRB implica la aplicación de dos disciplinas: la biología reproductiva y la criobiología.

El conocimiento de la biología de la reproducción de cada una de las especies que formarán parte del GRB es imprescindible, tanto para la extracción de gametos como para la posterior utilización de los mismos. Este conocimiento en combinación con el desarrollo de nuevas técnicas de reproducción asistida ofrece sustanciales beneficios en programas de conservación de especies. En el caso de la trucha común, la obtención de gametos, fecundación artificial e incubación de embriones, se practican habitualmente en piscifactorías, obteniéndose buenos porcentajes de supervivencia a la eclosión (Sedgwick, 1995).

El método utilizado para preservar los gametos y embriones que constituyen un banco de germoplasma es la criopreservación. El procedimiento de criopreservación debe ser bien estudiado para cada especie y cada tipo celular, ya que presentan diferente reacción a la congelación. Sin embargo, el conocimiento de las bases del proceso es esencial para posteriormente aplicarlo a cada tipo celular en concreto.

Principios sobre la criopreservación de gametos y embriones

La criobiología es la disciplina que estudia los efectos de las bajas temperaturas en células y tejidos criopreservados, entendiendo la criopreservación como el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas con el fin de detener las funciones vitales de una célula u organismo, manteniéndolos en condiciones de “vida suspendida” durante tiempo indefinido. La posibilidad de una recuperación posterior del material criopreservado, manteniendo la viabilidad celular tras la descongelación, hace de la criobiología una herramienta esencial en el desarrollo de la tecnología reproductiva.

En los comienzos de la criobiología, la temperatura final a la que eran mantenidos los gametos venía determinada por el agente criogénico disponible en ese momento. Los primeros estudios donde se obtuvieron espermatozoides viables tras procesos de vitrificación y deshidratación se realizaron utilizando hielo seco (Polge y cols., 1949), que alcanza una temperatura de $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, el aumento de la disponibilidad de nitrógeno líquido a partir de finales de los 50, lo convirtió en el modo de almacenamiento más utilizado, alcanzando $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la fase líquida, y un rango de $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ en los vapores justo sobre la superficie del nitrógeno.

Teoría básica de la criopreservación

Durante los últimos 30 años el conocimiento de los procesos biológicos y biofísicos que tienen lugar cuando se produce el enfriamiento ha incrementado gradualmente.

Cuando una solución es enfriada por debajo de su punto de congelación, inicialmente es “superenfriada”, es decir, que permanece en estado líquido a una temperatura inferior a la temperatura real de congelación. Esta es una situación inestable, y a medida que la temperatura desciende incrementa la probabilidad de que ocurra el denominado proceso de nucleación donde comienzan a formarse cristales de hielo. En una solución, el agua pura es lo primero en congelarse, de modo que la solución se hace cada vez más concentrada a medida que el agua pura se congela, alcanzando valores de osmolaridad 20 veces superiores cuando la solución se encuentra a -40 °C. Por debajo de esa temperatura, la solución solidifica totalmente (Mazur, 1984).

Cuando la solución contiene una suspensión celular, tiene lugar el denominado “efecto solución”, es decir a medida que avanza el proceso de cristalización, se produce una salida de agua del interior celular debido al incremento de la osmolaridad del medio extracelular (Mazur, 1965). Si el enfriamiento es lo suficientemente lento, la célula se deshidrata totalmente antes de que se produzca la solidificación total del medio externo, evitando la formación de cristales de hielo en el interior celular. Si esto no ocurre, es muy probable que la célula muera en el proceso (Watson y Fuller, 2001).

La recuperación de células viables tras la criopreservación depende de muchas variables, pero si únicamente tenemos en cuenta la tasa de enfriamiento, la mayor supervivencia va asociada con la utilización de una rampa específica de enfriamiento, que depende de cada tipo celular. Durante un enfriamiento muy lento, las células estarán expuestas a unas condiciones hiperosmóticas extremas por un tiempo lo suficientemente largo como para experimentar daños. Por otra parte, si es demasiado rápido, las células no se deshidratan totalmente, permitiendo la formación de hielo intracelular que también produce daños irreparables.

La iniciación del crecimiento de los cristales de hielo es un punto muy importante a tener en cuenta, y difícilmente controlable, que tiene lugar tanto en el proceso de enfriamiento como durante la descongelación, momento en el cual se forma el hielo intracelular. La formación de hielo requiere una ordenación específica de las partículas en solución, de modo que los cristales tienden a crecer a partir de los centros de nucleación, que pueden ser otros materiales cristalinos, partículas sólidas o incluso las propias células de la suspensión (Rall, 1987).

En algunos casos especializados, la criopreservación se ha intentado en condiciones donde la formación de cristales de hielo sea muy limitada o inhibida por completo, produciendo la formación de un estado vítreo en el medio extracelular e intracelular a muy bajas temperaturas, formando una estructura estable, sin formación de hielo (Rall y Fahy, 1985). Este proceso es conocido como vitrificación, y requiere una combinación de aditivos específicos (crioprotectores) así como un intensivo control de proceso de congelación/descongelación (Kuleshova y cols., 1999). Su desarrollo comenzó en 1980 como alternativa de preservación, y como posible solución a las dificultades que supone la formación de hielo y la deshidratación celular. Este proceso implica la transformación de una solución acuosa en un sólido amorfo de aspecto vítreo donde no se forman cristales de hielo, debido a un drástico aumento en la viscosidad durante la congelación (Fahy y cols., 1984). Para que esto ocurra son necesarias altas concentraciones de crioprotectores (superiores a 6M), y velocidades de congelación relativamente rápidas (1000-2000 °C/min) (Watson y Fuller, 2001). Normalmente se utilizan combinaciones de varios de estos crioprotectores, ya que así se reduce la concentración final de cada uno de ellos disminuyendo su potencial toxicidad. Otra de las ventajas de este proceso, además de evitar la formación de cristales de hielo, es que la congelación se produce tan rápidamente que las células u órganos criopreservados apenas están expuestos al efecto solución, por lo que se reducen los daños producidos por la deshidratación (Watson y Fuller, 2001).

A lo largo del proceso de descongelación (normalmente también rápido), tampoco se forman cristales de hielo y la célula es devuelta a temperatura ambiente sin sufrir los daños que se producen en la congelación convencional. La adición de cada crioprotector provoca un grado de deshidratación previo a la congelación el cual puede ser más o menos prolongado dependiendo del tipo de crioprotector (Watson y Fuller, 2001). Estos métodos han sido puestos a punto con embriones (Rall y Fahy, 1985) y ovocitos (O'Neil y cols., 1998), donde resultan más beneficiosos que en semen, ya que las altas concentraciones de crioprotectores que se requieren resultan muy tóxicas para los espermatozoides.

Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias que reducen el daño celular producido por el proceso de congelación y descongelación. El mecanismo por el cual ejercen su efecto está relacionado con la reducción de la concentración de electrolitos en el medio extracelular (Karow, 1997), con la disminución de la formación de cristales de hielo y con la protección de la membrana y sus constituyentes (Parks, 1997) debido a sus propiedades coligativas (Fullerton y cols., 1994; Keener y cols., 1995). Cuando son añadidos, disminuye el punto de congelación de las células en solución, permitiendo que la temperatura sufra un mayor descenso antes de que el medio comience a congelarse. El proceso de congelación se ralentiza favoreciendo la deshidratación celular antes de que se produzca la congelación total del medio (Rall y cols., 1983).

Atendiendo a su capacidad de penetración en las células, estos compuestos pueden clasificarse en dos grupos: permeables y no permeables.

Los crioprotectores permeables suelen ser moléculas no electrolíticas, de bajo peso molecular y anfipáticas, capaces de atravesar las membranas celulares, ejerciendo su función interna y externamente (Anchordoguy y cols., 1991). Al penetrar en las células provocan la salida del agua intracelular, reduciendo la formación de cristales de hielo en el interior de la célula. Estas sustancias resultan tóxicas para las células, en mayor o menor medida dependiendo de la concentración, del tiempo de exposición, o de la temperatura, por lo que estos tres factores deben ser combinados de modo que el crioprotector sea efectivo causando el mínimo daño. El conocimiento de cada uno de los daños provocados por los crioprotectores es esencial para poder evitarlos, por ejemplo, llevando a cabo la adición o eliminación de los mismos en pasos sucesivos de exposición a crioprotectores en concentración creciente o decreciente según el caso.

Por otra parte, los crioprotectores interactúan con los grupos polares de los fosfolípidos de las membranas haciéndolas más plásticas, disminuyendo los efectos del estrés osmótico asociado a la deshidratación de las mismas durante la congelación, reemplazando el agua alrededor de la parte hidrofílica del fosfolípido. Este fenómeno hace que la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos disminuya, reduciendo la desorganización inherente a los cambios de fase y haciendo la membrana más estable (Anchordoguy y cols., 1991; Labbé y cols., 1995; Labbé y Maise, 1996).

El grado de protección que puede aportar un crioprotector depende en gran medida de sus características propias. Entre las sustancias que pueden actuar como crioprotectores permeables encontramos, glicerol, metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, dimetilformamida, dimetilacetamida y dimetil sulfóxido (DMSO).

Los crioprotectores no permeables son sustancias de elevado peso molecular, que actúan como estabilizadores de membrana o sobre las propiedades físico-químicas del medio de congelación, evitando la formación de cristales de hielo y el efecto de los solutos. La presencia de estas sustancias favorece un flujo de agua fuera de la célula inhibiendo el crecimiento de cristales en el interior, además de aumentar la viscosidad del medio extracelular manteniendo el hielo en forma de estructura amorfa evitando así el crecimiento de cristales que puedan dañar las membranas.

Dentro de este grupo de crioprotectores encontramos sustancias como la polivinilpirrolidona (PVP), los polivinil alcoholes (PVA), compuestos lipídicos como por ejemplo la yema de huevo, proteicos como la albúmina sérica bovina (BSA) y azúcares, principalmente sacarosa (Bergeron y Manjunath, 2006; Karow, 1997; Watson y Fuller, 2001).

Dentro del apartado de sustancias con capacidad crioprotectora, es importante destacar aquellas producidas por los propios organismos como mecanismo de adaptación al frío. Algunas especies de insectos, peces y plantas expresan unas proteínas anticongelación (AFPs) que actúan como crioprotectores naturales. Los primeros estudios acerca de estas proteínas en peces los realizaron DeVries y Wohlschlag (1969), cuando descubrieron que la sangre de peces que habitaban en aguas de la Antártida, no se congelaba incluso cuando las aguas alcanzaban temperaturas un grado por debajo de su punto de congelación. El motivo por el cual estos peces son capaces de sobrevivir bajo condiciones tan extremas sin congelarse se debe principalmente a dos características. Por una parte, comprobaron que el suero de estos peces contiene unas concentraciones de cloruro sódico, urea y proteínas que lo hacen isosmótico con respecto al agua de mar, y por lo tanto, debido al efecto coligativo de esas moléculas, el punto de congelación disminuye hasta $-0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DeVries, 1971). Por otra parte, encontraron en el suero una familia de glicoproteínas, las cuales, mediante adhesión a las paredes de los cristales de

hielo detienen su crecimiento hasta temperaturas inferiores a $-1,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (histéresis térmica) (Jia y Davies, 2002), temperatura a la cual se produce la congelación del agua de mar.

Teniendo en cuenta la capacidad protectora de resistencia al frío que las AFPs confieren naturalmente a aquellos animales que las producen, hace pensar en la posibilidad de utilizarlas en criopreservación de células, tejidos, órganos e incluso embriones. Además de su aplicación en criopreservación, las AFPs tienen muy diversas y ventajosas utilidades. En medicina se han utilizado para preservación en frío ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) de plaquetas o tejidos para transfusiones y trasplantes respectivamente (Macouzet y cols., 1999; Tablin y cols., 1996), y en criocirugía para destrucción de tumores malignos (Wang, 2000). En la industria alimenticia también se ha experimentado con AFPs debido a su capacidad para inhibir la cristalización y recristalización del hielo en los alimentos congelados a muy bajas concentraciones (0,003-0,0025 mM) (Crevel y cols., 2002; Li y cols., 1991). Además, los promotores génicos de las AFPs son utilizados para dirigir la expresión de otros genes, como por ejemplo la hormona de crecimiento, de modo que al insertar dicha construcción se logra un incremento de las tasas de crecimiento en salmónidos y otras especies de gran interés en acuicultura (Zbikowska, 2003).

Criopreservación de semen de teleósteos

Los espermatozoides de peces son células altamente diferenciadas, que presentan un patrón morfológico similar al de otras especies de vertebrados. En su estructura se pueden diferenciar tres partes: la cabeza, donde se encuentra el núcleo haploide, la parte intermedia que contiene una o varias mitocondrias y los centríolos y finalmente el flagelo, que debido a su extensión hace que la relación superficie/volumen de estas células sea muy grande. El citoplasma está limitado por una membrana especializada en algunas regiones, donde se localizan los mecanismos de reconocimiento y fusión al ovocito. Muchos orgánulos están ausentes, como por ejemplo el aparato de Golgi o los ribosomas, y otros están especializados ya que tienen una función especial en el proceso de fertilización y desarrollo temprano. En la mayoría de las especies de vertebrados, los espermatozoides poseen en la parte más apical de la cabeza el acrosoma. Este orgánulo contiene enzimas hidrolíticas cuya función es facilitar la entrada al interior del ovocito,

degradando las distintas paredes que lo rodean. En el caso de los teleósteos, salvo en los esturiones, los espermatozoides no tienen acrosoma ya que los ovocitos de peces están rodeados por una envuelta rígida, el corion, que los espermatozoides no pueden atravesar, por lo que presentan uno o más canales de entrada para los mismos denominados micropilos, siendo innecesaria la digestión de las envoltas. Los espermatozoides de peces, a diferencia de los de mamíferos, permanecen inmóviles en el plasma seminal. Su movilidad se activa tras la eyaculación al ser liberados en el agua, como consecuencia de distintos factores. En diferentes especies la activación puede ser producida por variaciones en la presión osmótica del medio, en el pH o en el contenido en distintos iones (Alavi y Cosson, 2006). Una vez activada, la movilidad es muy breve, variando según las especies desde unos segundos (salmónidos) hasta unos minutos (algunas horas en arenques). Por eso, es muy importante que durante la manipulación previa a la criopreservación no se produzca la activación de la movilidad, ya que las células agotarían todas sus reservas energéticas y no serían capaces de alcanzar el micrópilo en el momento de la fecundación.

Hasta el momento se ha criopreservado semen de más de 200 especies de teleósteos (Tiersch, 2000), la mayor parte de ellas de agua dulce, ya que son las más utilizadas en acuicultura. El diseño de los protocolos de criopreservación debe adaptarse para cada especie. Deben ser tenidas en cuenta las características específicas del semen (volumen seminal, composición del plasma, duración y mecanismo de activación de la movilidad y resistencia de las células al choque osmótico), para poder determinar cuáles son los parámetros más adecuados para optimizar la criopreservación (diluyente, crioprotector, velocidad de congelación/descongelación, envase, etc).

La composición del diluyente debe ser lo más similar posible al plasma seminal, y es imprescindible que mantenga una concentración y una osmolaridad que impidan la movilidad. Sobre todo se han utilizado soluciones salinas tamponadas, medios de cultivo y sencillas soluciones a base de azúcares o de cloruro sódico. La efectividad del diluyente dependerá de la especie, ya que cada una posee unas características típicas en su plasma seminal. Por ejemplo, en salmónidos se ha de mantener una concentración de K^+ elevada (20-60 mM) para evitar la activación de la motilidad, que ocurre por un descenso en este ión al contacto con el agua (Alavi y Cosson, 2006).

En cuanto al crioprotector, igual que ocurre con el diluyente, la efectividad puede variar en función de la especie en que se aplique. Normalmente se utilizan crioprotectores permeables, como por ejemplo DMSO y metanol (Horvath y cols., 2005; Lahnsteiner y cols., 1997) combinados con alguno no permeable que actúe como estabilizador de membrana, como por ejemplo yema de huevo, BSA o extracto de proteína de soja (Cabrita y cols., 2001a). Se ha demostrado que la presencia de estos compuestos estabilizadores de membrana incrementa el porcentaje de espermatozoides viables, móviles después de la congelación (Cabrita y cols., 2001a).

Una vez formulada la composición del diluyente y la combinación y concentración de los crioprotectores, hay que determinar en que proporción va a ser diluido el semen. La dilución más adecuada es aquella que reduce la concentración espermática para facilitar la incorporación del crioprotector en todas las células de la muestra, manteniendo una concentración de espermatozoides suficientes para llevar a cabo una fecundación efectiva. Las diluciones más utilizadas varían desde 1:1 en tilapia (Poleo y cols., 2005), 1:3 en salmónidos (Cabrita y cols., 2001a), 1:6 en dorada (Cabrita y cols., 2005a) o 1:9 en carpa (Horvath y cols., 2007).

Una vez realizada la mezcla del semen con la solución crioprotectora es necesario mantener un tiempo de equilibrado, suficiente para que el crioprotector penetre en las células. Para reducir la toxicidad de la solución, durante ese tiempo, la mezcla es mantenida a 4 °C, mientras se procede al envasado de la muestra.

Los envases más utilizados para la criopreservación de semen son pajuelas o criotubos de plástico. Actualmente es posible encontrar en el mercado gran variedad de estos envases, con diferente capacidad en función del volumen de muestra que queramos congelar (desde 0,25 a 5mL). La alta proporción superficie/volumen que presentan las pajuelas permite una buena transmisión de la temperatura, además de una perfecta identificación permanente de las muestras, lo cual debe ser tenido en cuenta cuando las muestras van a ser almacenadas por ejemplo en un banco de germoplasma. Después del llenado, las pajuelas se sellan con poliacrilamida, con calor, o con bolas de acero.

Una vez envasadas las muestras, se procede a la congelación, para lo cual hay que determinar cual es la velocidad de enfriamiento más adecuada para cada tipo de muestra. No está claro por qué las tasas de enfriamiento son más dañinas para los espermatozoides de unas u otras especies, aunque muchos autores, relacionan esta variabilidad con la

composición de los lípidos de sus membranas, sugiriendo que los cambios de fase de los lípidos pueden provocar la pérdida de integridad de la membrana (Watson, 1981; Watson y Morris, 1987). La utilización de congeladores programables permite establecer la rampa de congelación que creamos adecuada en cada caso. Sin embargo, lo más común en condiciones de campo es utilizar cajas de poliestireno donde se vierte nitrógeno líquido, y sobre cuya superficie se coloca una estructura flotante que mantiene las pajuelas a una altura determinada. El tiempo que se mantienen las pajuelas en los vapores de nitrógeno, así como la distancia a la que se encuentran de su superficie, describe una curva de enfriamiento que podrá ser modificada en función de la muestra, variando estos dos factores. En carpa, se suele congelar a una velocidad de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego se aumenta la velocidad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta que se alcanzan los $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y desde esa temperatura se almacenan en nitrógeno líquido. Las muestras de tilapia, se refrigeran desde los $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y desde esa temperatura hasta $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ se reduce la velocidad a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los salmónidos admiten una velocidad homogénea hasta $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, que suele estar comprendida entre -20 y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Finalmente, las pajuelas son introducidas en nitrógeno líquido donde serán almacenadas por tiempo indefinido.

Tan importante es establecer un control de la temperatura durante el enfriamiento como durante la descongelación. Cuando el envasado se ha realizado en pajuelas, la descongelación suele llevarse a cabo sumergiéndolas en un baño de agua termostatizado. La temperatura y tiempo necesarios han de establecerse previamente para conseguir la descongelación completa evitando el calentamiento de la muestra y varían en función del tamaño del envase.

Todos los estudios realizados con peces demuestran una gran variabilidad de resultados entre especies, poblaciones, individuos de la misma población e incluso entre muestras del mismo individuo recogidas en distintos tiempos. Por ello, es necesario realizar un análisis exhaustivo de la muestra, antes y después de la congelación, ya que, es imprescindible conocer el estado inicial del semen extraído para poder decidir qué protocolos de congelación permiten mantener mejor sus características. Por otra parte, teniendo en cuenta que es inevitable una pérdida de calidad tras la criopreservación, es muy importante realizar una evaluación previa, con el fin de seleccionar las muestras

aptas para la congelación. Esta evaluación debe ser rápida, ya que no puede transcurrir mucho tiempo desde la extracción hasta el procesamiento.

La calidad espermática se define como la capacidad para fecundar un ovocito y producir una descendencia viable. La determinación de la calidad de una muestra de semen puede ser evaluada mediante el estudio de las características del plasma seminal (pH, osmolaridad, concentración de iones), de la funcionalidad del espermatozoide (movilidad, integridad de la membrana plasmática, producción de ATP) y sobre todo de las interacciones entre espermatozoide y ovocito (Cabrita y cols., 2008).

Las pruebas realizadas para valorar la calidad de una muestra dependen de las circunstancias. Es decir, si la valoración debe realizarse en la piscifactoría o en condiciones de campo, las pruebas serán más rutinarias y sencillas que si se realizan en un laboratorio de análisis molecular.

Generalmente, el análisis más rápido y sencillo que da información “a priori” del estado de la muestra es el análisis de la movilidad. En condiciones de campo, con un microscopio sencillo es posible hacer una estimación subjetiva del movimiento de los espermatozoides, tras la activación de la muestra con un medio adecuado, atribuyendo una escala de 0 a 5, dependiendo del porcentaje de células con movimiento progresivo (Billard y cols., 1977). Una vez en el laboratorio, existe la posibilidad de evaluar la movilidad utilizando métodos informatizados, que permiten digitalizar y analizar cada imagen en tiempo real y que proporcionan gran cantidad de características del movimiento (Kime y cols., 2001). Algunos autores sugieren que existe una correlación entre movilidad y fertilidad (Lahnsteiner y cols., 2000), sin embargo, otros estudios demuestran que una buena movilidad inicial no garantiza los resultados finales (Cabrita y cols., 2005a).

Otro factor determinante en la capacidad fecundante del semen es la concentración espermática. Es un factor que se puede analizar fácilmente, por ejemplo utilizando un hemocitómetro, y que nos da una idea de en qué momento del ciclo reproductor se encuentra el animal. Recuentos bajos pueden reflejar que la muestra ha sido recogida al principio o al final del período reproductor y, por lo tanto el semen será de baja calidad (Nagahama, 1994). Además, el cálculo de la concentración espermática permite establecer las dosis necesarias para la fecundación, ya que es necesario mantener una proporción espermatozoide/ovocito.

Puede ocurrir que durante la extracción se produzca contaminación con heces u orina. En ese caso, la muestra tendrá unos valores de pH, osmolaridad y concentración, desviados con respecto a la media de la especie, indicando que no es apta para su utilización para fecundar en fresco o para ser criopreservada.

El estado de la membrana espermática es determinante en el análisis de la calidad seminal, ya que su integridad es imprescindible para la funcionalidad del espermatozoide. Los procesos que tienen lugar durante la congelación/descongelación, pueden provocar daños en la membrana. Entre estos procesos se encuentran la incorporación de crioprotectores (estrés químico), la exposición a soluciones hiperosmóticas (estrés osmótico) que provocan cambios volumétricos en la célula con el consiguiente daño en la membrana (estrés mecánico), la deshidratación inducida por la congelación así como la formación de cristales de hielo (daño mecánico), el cambio de fase de los fosfolípidos de membrana debido a los cambios de temperatura (estrés térmico) y finalmente el estrés oxidativo que provoca el propio metabolismo celular (Parks y Graham, 1992). Actualmente, lo más habitual es utilizar colorantes fluorescentes para determinar la integridad de la membrana. El modo de acción de estos reactivos se basa en la capacidad de penetrar en el interior celular, debido a las propiedades lipofílicas de algunos de ellos. Así es posible diferenciar las células que presentan daños en la membrana de las que la tienen intacta, ya que serán o no coloreadas en función de la funcionalidad de la membrana y de las características del marcador utilizado. Existen kits comerciales que combinan varios de estos colorantes, mostrando las células viables y no viables en distintos colores. La identificación y cuantificación puede realizarse utilizando microscopía de fluorescencia básica o citometría de flujo. Esta última, es capaz de detectar 10.000 células en pocos segundos, permitiendo analizar varias muestras en muy poco tiempo de un modo más fiable que la microscopía de fluorescencia (Ogier de Baulny y cols., 1999).

Durante el proceso de criopreservación se forman especies reactivas del oxígeno (ROS) que además de provocar daños en la membrana celular, debido a la oxidación de los ácidos grasos insaturados, provocan la fragmentación del ADN. Estos daños se ven reflejados en un descenso de la capacidad fecundante de la muestra, o aberraciones genéticas en la descendencia (Aitken y Baker, 2006; Mirzoyan y cols., 2006). Un modo de reducir los efectos provocados por los ROS es añadir antioxidantes a la solución de

criopreservación, como por ejemplo ácido cítrico, o estabilizadores de membrana, como la yema de huevo o la BSA (Bergeron y Manjunath, 2006; Cabrita y cols., 2001b). Las técnicas más utilizadas para evaluar el grado de fragmentación del ADN son el “ensayo cometa” (Comet assay) y la técnica del SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). El ensayo cometa consiste en someter las células espermáticas a una electroforesis alcalina, tras lisar las membranas y desnaturalizar el ADN. Durante la electroforesis, se produce una migración de los fragmentos de ADN, de modo que cuando las células son teñidas con bromuro de etidio, u otro colorante específico de ADN, forman una estructura similar a un cometa, donde el núcleo de la célula representa la cabeza, y los fragmentos de ADN la cola. El análisis mediante un software específico de las imágenes digitalizadas de cada célula permite obtener un dato numérico del daño a nivel de ADN que presenta una muestra (Cabrita y cols., 2005b; Dietrich y cols., 2005; Labbé y cols., 2001; Zilli y cols., 2003). En la técnica del SCSA, el semen es tratado con una solución ácida que desnaturaliza el ADN en aquellos puntos donde se ha producido rotura. Posteriormente, una tinción con naranja de acridina permite discernir entre el ADN que permanece en estado nativo y el desnaturalizado. Los resultados son analizados mediante citometría de flujo, obteniendo valores del porcentaje de células que presentan diferente estabilidad en el ADN (Evenson y cols., 1991).

Ninguno de los parámetros descritos hasta el momento es suficiente para realizar una predicción fiel de la calidad seminal, y menos aun de la calidad tras la descongelación. Sin embargo, la combinación de varios de estos métodos de evaluación ayuda a descartar las muestras no aptas.

Finalmente, si definimos calidad seminal como la capacidad de fecundar y obtener descendencia viable, es necesario realizar pruebas de fecundación para ver si el semen es viable tras la congelación. El procedimiento a seguir es característico de cada especie, pero lo que sí es común a todos los casos es que las células se vuelven muy frágiles y muchos espermatozoides, aun los móviles, no serán capaces de alcanzar los micropilos antes de sufrir la lisis. Por ello, es muy importante que la fecundación se produzca inmediatamente tras la descongelación. En muchos casos, para la activación se utilizan soluciones minerales especiales que prolongan el movimiento y minimizan el choque osmótico. Además, teniendo en cuenta que tras la congelación muchos

espermatozoides no serán viables, la proporción espermatozoide/ovocito debe ser mayor que la utilizada para fecundaciones con semen fresco.

Como ya se ha explicado anteriormente, la criopreservación reduce la capacidad fecundante del semen, y así lo demuestran trabajos como el de Cabrita y cols. (2001a), donde el porcentaje de huevos fecundados desciende de 89% con semen fresco a 65,4% con semen criopreservado, o el desarrollado por Labbé y Maise (2001), donde obtuvieron resultados similares, observando una reducción de 94,1% a 79,7% tras la criopreservación. Ambos trabajos fueron realizados en trucha arco iris. En trucha común, Sarvi y cols. (2006), también observaron una reducción de la fertilidad tras la criopreservación, aunque en esta especie, los porcentajes de huevos fecundados son inferiores a los obtenidos con trucha arco iris, tanto antes como después de la criopreservación (72,5% y 59,8% respectivamente).

En el caso que nos ocupa, y teniendo en cuenta que la preservación de semen de trucha común, va enfocada hacia la reconstrucción de poblaciones amenazadas, las bajas tasas de fecundación no suponen un problema, ya que cada hembra en una única puesta puede poner entre 1.000 y 2.000 huevos, dependiendo de su tamaño y de la época reproductora. Sin embargo, lo que sí supone un problema importante que debe ser tenido en cuenta es si la fecundación con semen criopreservado proporciona poblaciones semejantes a las obtenidas con semen fresco. Los diferentes trabajos publicados recientemente y que demuestran que la congelación seminal puede provocar fragmentación del DNA (Beirão y cols., 2008; Cabrita y cols., 2005b; Zilli y cols., 2003) pueden hacer sospechar que la criopreservación podría tener efectos sobre las frecuencias alélicas de la descendencia. Kopeika y cols. (2003), demostraron que la utilización de semen criopreservado ejerce un claro efecto sobre la descendencia, no sólo en cuanto a una reducción del porcentaje de supervivencia, sino que además, el proceso de congelación provoca una selección espermática que dará lugar a una población de embriones con un perfil genético muy homogéneo. Por eso sería interesante comprobar que el patrón genético de la descendencia obtenida con semen criopreservado no difiere del de la descendencia obtenida con semen fresco, ya que si no es así, estas muestras no deberían formar parte de un banco de germoplasma.

Criopreservación de embriones de teleósteos

La posibilidad de criopreservar embriones en lugar de espermatozoides u ovocitos presenta muchas ventajas, ya que permite preservar el material genético de ambos progenitores. Los beneficios de la criopreservación son muy numerosos teniendo en cuenta las posibles aplicaciones en acuicultura, programas de conservación de especies en peligro de extinción y creación de bancos de recursos genéticos de especies con valor biotecnológico o ecológico.

Desde el punto de vista de la acuicultura, la disponibilidad de embriones criopreservados facilitaría un suministro constante de animales, ya que en muchos casos, la producción se reduce al período reproductor de la especie. Además, el coste que suponen las instalaciones y el mantenimiento de reproductores se vería reducido, así como el impacto ambiental que supone la captura de animales para formación de nuevos stocks.

En cuanto a conservación, tanto de especies o poblaciones amenazadas, como de variedades o líneas con interés biotecnológico, la principal ventaja de la criopreservación de embriones es que permite preservar la diversidad genética. El mantenimiento en cautividad de los reproductores implica, como ya se ha citado, pérdida de variabilidad en cada generación (Ostergaard y cols., 2003), por lo que sería muy útil, poder descongelar y cultivar esos embriones que mantienen todas las características genéticas de la especie, población o variedad, para finalmente repoblar aquellos ambientes naturales donde sea necesario.

Sin embargo, y a pesar de todas las ventajas que supondría, la criopreservación de embriones de peces es un objetivo no alcanzado hasta el momento. Así como la criopreservación de semen ha sido lograda con éxito en muchas especies de teleósteos, la congelación de ovocitos y embriones sigue siendo un reto para los criobiólogos. Esto es debido principalmente a su estructura multicompartmentada, que dificulta el intercambio de agua y crioprotectores entre el embrión y el medio, necesarios para llevar a cabo con éxito el proceso (Robles y cols., 2008).

Dentro de las especies de teleósteos existe una gran variabilidad en cuanto al tamaño de los embriones, de modo que el diámetro puede variar entre 6-8 mm en salmónidos y 1 mm en pez cebra. Lo que es común en todos los casos es que al ser tan

grandes, al contrario que en los espermatozoides, la relación superficie volumen es muy pequeña, dificultando el flujo entre el interior y el exterior del embrión.

Su estructura consta de tres compartimentos bien diferenciados: el saco vitelino, el espacio perivitelino y el compartimento celular o embrión propiamente dicho. Cada compartimento está delimitado por unas envueltas que crean barreras de permeabilidad selectiva, y que muchos crioprotectores no son capaces de atravesar (Hagedorn y cols., 1997a; Zhang y Rawson, 1998). La envuelta que rodea más externamente el embrión es el corion, que es una estructura rígida, semipermeable y multilaminada que lo protege de daños mecánicos. Durante el desarrollo, se forma la línea sincitial, que es una estructura multinucleada, situada entre el vitelo y el compartimento celular a través de la cual se produce la captación de nutrientes. El vitelo está compuesto por lipoproteínas, de las cuales se nutre el embrión a través de este sincitio (vía endocitosis), hasta que puede ingerir alimento por vía oral. La línea sincitial es la principal barrera de permeabilidad de la estructura embrionaria (Hagedorn y cols., 1998). Por ello, muchos estudios de criopreservación centran sus objetivos en diseñar un protocolo que facilite el paso de los crioprotectores a través de esta estructura. Por ejemplo, hay estudios donde se demuestra que la expresión de aquaporinas en embriones de pez cebra incrementó la permeabilidad de la línea sincitial (Hagedorn y cols., 2002).

Tanto los datos de permeabilidad, como los de sensibilidad al frío indican que los estadios de desarrollo tempranos no son adecuados para realizar la congelación, siendo más apropiados los estadios más avanzados, en los que el embrión ya ha finalizado la gastrulación y muestra un desarrollo relativamente avanzado (Hagedorn y cols., 1997b; Zhang y Rawson, 1995).

La velocidad de congelación también es crucial en el proceso. Aunque los protocolos de congelación lenta han sido muy utilizados en los ensayos de criopreservación de embriones de peces, hay estudios que demuestran que este proceso no permite una correcta deshidratación de las células. Como consecuencia de ello se formarán cristales de hielo en el citoplasma que dañarán las membranas y orgánulos provocando la muerte celular (Acker y cols., 2001; Acker y McGann, 2001; Hagedorn y cols., 2004; Mazur, 1984). Por esta razón muchos autores consideran que la vitrificación es la mejor opción (Hagedorn y cols., 2004). Sin embargo, estudios realizados en embriones de rodaballo sometidos a protocolos de vitrificación determinaron que la

cantidad de crioprotector que puede incorporarse en los compartimentos embrionarios es muy inferior a la que se precisa en un proceso de vitrificación (Cabrita y cols., 2003a; Cabrita y cols., 2003b). Además, otros estudios de vitrificación en embriones de rodaballo y pez cebra mostraron que durante el proceso de descongelación se produce recristalización en el saco vitelino, que causa la destrucción mecánica del embrión (Liu y cols., 1998; Robles y cols., 2003).

Robles y cols. (2005), consiguieron el mayor éxito logrado hasta el momento en criopreservación de embriones de peces cuando vitrificaron embriones de la especie *Pseudopleuronectes americanus*, y observaron indicios de desarrollo tras la descongelación. Este hecho fue atribuido a la expresión de AFPs, que como ya se explicó anteriormente, actúan como crioprotectores naturales que se adhieren a los cristales de hielo impidiendo su crecimiento, durante los procesos de congelación y descongelación, lo que conlleva una reducción del daño celular (Fletcher y cols., 2001; Wang, 2000). Este hecho hace pensar que, la introducción o expresión de estas proteínas en otras especies podría incrementar su resistencia a la vitrificación o incluso hacer viable un mecanismo de congelación lenta.

Los primeros ensayos de incorporación de AFPs en peces, se realizaron mediante microinyección. El efecto beneficioso de estas proteínas se demuestra en trabajos como el de Robles y cols. (2007), en el cual, se produjo un incremento de la resistencia al frío en aquellos embriones en los cuales se microinyectaron AFPs. Sin embargo, los daños mecánicos producidos en los embriones durante el proceso, hacen que este método resulte incompatible con la vitrificación. Estudios realizados en rodaballo, mostraron que embriones microinyectados sometidos al protocolo de vitrificación/descongelación presentaron severas alteraciones, llegando en la mayoría de los casos a desintegrarse totalmente durante la descongelación (Robles y cols., 2006).

Por esta razón, aunque parece evidente el efecto positivo de las AFPs en los protocolos criopreservación de embriones de peces, es necesario buscar un método alternativo de introducción que resulte efectivo e inocuo al mismo tiempo.

Teniendo en cuenta que la gran cantidad de vitelo es uno de los principales inconvenientes para conseguir congelar con éxito embriones de gran tamaño como los de salmónidos, nuestro grupo ha ensayado una forma novedosa de abordar el tema. El proceso consistió en intentar congelar el compartimento celular aislado, es decir, el

embrión propiamente dicho, separado mediante disección del resto de las estructuras embrionarias y facilitando su desarrollo “in vitro” tras la descongelación. No se disponía de referencias que hubieran conseguido con éxito el cultivo in vitro de explantes embrionarios hasta el final del desarrollo, siendo el único trabajo realizado en este campo el realizado por el equipo de Langenberg y cols. (2003) en el cual se describen métodos para facilitar el cultivo in vitro durante ciertas horas, con el fin de permitir una mejor observación del desarrollo del sistema nervioso. Los ensayos, que iniciaron el desarrollo de la presente tesis doctoral, se realizaron con embriones de pez cebra, pero no fue posible optimizar el protocolo. Cuando los compartimentos celulares fueron extraídos en estadios anteriores a la formación de los somitos, algunas de las células mantenidas en cultivo se diferenciaron hacia tejido cardíaco presentando en algunos casos reflejos de contracción. Cuando la disección se realizó en estadio de 5-somitos, también se observaron movimientos reflejos de los embriones, pero en cualquier caso los explantes resultaron amorfos y no se mantuvieron en cultivo más de 3 días. Puesto que no era posible mantener embriones “in vitro” desprovistos del saco vitelino, se renunció a la posibilidad de congelar esos explantes, ya que no iban a poder desarrollarse normalmente tras la descongelación y se consideró de nuevo la congelación del embrión completo como única alternativa con ciertas posibilidades de éxito.

Criopreservación de semen y embriones de trucha común

Desde los comienzos de la criopreservación de semen, los salmónidos, y en concreto la trucha arco iris, ha sido una de las especies más estudiadas, y por tanto mejor conocidas actualmente (Babiak y cols., 2001; Cabrita y cols., 1998; Cabrita y cols., 2001a; Cabrita y cols., 2001c; Cabrita y cols., 2005b; Labbé y Maisse, 1996; Labbé y cols., 2001; Muller y cols., 2008). Sin embargo, los trabajos realizados en criopreservación de trucha común son muy escasos. Cabe esperar, que por la proximidad filogenética que existe entre las dos especies, sea relativamente sencillo adaptar los protocolos descritos en trucha arco iris a la criopreservación de semen de trucha común. Sin embargo, los espermatozoides de esta última especie son mucho menos resistentes a este tipo de tratamientos. Son más susceptibles a la toxicidad de los crioprotectores, por

lo que habrá que poner especial atención en la formulación de la solución crioprotectora y en los tiempos de equilibrado. Además, la movilidad tras la activación es muy breve. Mientras que los espermatozoides de trucha arco iris permanecen en movimiento durante aproximadamente 2 minutos, los de trucha común solamente se mueven durante 10 segundos, lo cual también dificulta los protocolos de fecundación *in vitro*. Otra de las dificultades que presenta la congelación de semen de trucha común, es el volumen de muestra que se puede obtener. Mientras que de un macho de trucha arco iris pueden extraerse varios mililitros de semen, en trucha común, en plena época reproductora, es habitual extraer en torno a un mililitro.

Teniendo todo esto en cuenta, el protocolo de criopreservación deberá ser cuidadosamente seleccionado para minimizar los daños, ya que el fin último es preservar el material genético. Los espermatozoides criopreservados serán utilizados en futuros programas de reproducción, bien para fecundar ovocitos de la misma especie si estuvieran disponibles o bien para originar nuevos individuos mediante técnicas de androgénesis. Esta técnica permite obtener embriones cuyo material genético es únicamente de origen paterno, debido a que el núcleo del ovocito utilizado en la fecundación ha sido inactivado. Así, y teniendo en cuenta la dificultad de criopreservar el material genético materno, se podría utilizar semen criopreservado de trucha común para realizar un proceso de androgénesis con ovocitos de trucha arco iris, obteniéndose individuos normales con el genoma diploide de *Salmo trutta*. De este modo, sería posible realizar repoblaciones de trucha común sin pérdida de los caracteres genéticos que caracterizan la población. Dentro de este campo, es destacable el trabajo de Babiak y cols. (2002), que realizaron experimentos de androgénesis con semen criopreservado de trucha arco iris, que se utilizó para fecundar ovocitos de esta misma especie, obteniendo un 42,5% de larvas eclosionadas, demostrando que es posible establecer un stock de peces viable a partir de un genoma criopreservado. Por otra parte, David y Pandian (2006), demostraron que es posible obtener individuos viables mediante androgénesis intergenérica. En este trabajo, huevos procedentes de hembras de la especie *Gymnocorymbus ternetzi* fueron fecundados con semen obtenido post-mortem de machos de la especie *Hemigrammus caudovittatus*, obteniendo un 46% de embriones fecundados. Estos resultados demuestran que la aplicación de técnicas de androgénesis en programas de creación de bancos genéticos cubre las necesidades de la industria acuícola,

preservando líneas o variedades de importante valor comercial, así como de la conservación de recursos naturales, preservando especies o poblaciones amenazadas o en peligro de extinción (David y Pandian, 2006).

En cuanto a la criopreservación de embriones, existen pocos estudios realizados con salmónidos, principalmente debido a su enorme tamaño, que dificulta los flujos de agua y crioprotectores, y a la gran cantidad de vitelo que contienen, que los hace especialmente sensibles (Billard y Zhang, 2001). La mayoría de los estudios se han realizado en pez cebra, ya que es un modelo muy utilizado en biología y muy fácil de mantener en el laboratorio. En el caso concreto de la trucha común, la disponibilidad de embriones se ve limitada a los dos meses que dura el periodo de reproducción (Diciembre y Enero), y que resulta demasiado breve para realizar un estudio exhaustivo de las cualidades de los embriones para la criopreservación. Por eso, sería más adecuado poner a punto los protocolos en una especie que permita un suministro constante de embriones, y aplicar los éxitos obtenidos durante su periodo reproductivo.

Bibliografía

- Acker JP, Elliott J, McGann LE. 2001. Intercellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores. *Biophysical journal*; 81(3): 1389-1397.
- Acker JP, McGann LE. 2001. Membrane damage occurs during the formation of intracellular ice. *Cryo Letters*; 22(4): 241-254.
- Aitken RJ, Baker MA. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 250: 66-69.
- Alavi SMH, Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*; 30: 1-14.
- Anchordoguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH, Crowe LM. 1991. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology*; 28: 467-473.
- Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H, Strzezek J, Demianowicz W. 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*; 56: 177-192.
- Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, Kuzminski H, Brzuzan P, Ciesielski S. 2002. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology*; 57: 1229-1249.
- Beirão J, Cabrita E, Soares F, Herraes MP, Dinis MT. 2008. Cellular damage in spermatozoa from wild-captured *Solea senegalensis* as detected by two different assays: comet analysis and Annexin V-Fluorescein staining. *Journal of Applied Ichthyology*; 24: 508-513.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*; 73: 1338-1344.
- Bernatchez L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*; 55: 351-379.

- Billard R, Dupont J, Barnabe G. 1977. Fall in motility and survival time at low temperature of sperm of *Dicentrarchus labrax* L. (Pisces, Teleostei) during the spawning season. *Aquaculture*; 11: 363-367.
- Billard R, Zhang T, 2001. Techniques of genetic resource banking in fish. In: *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future*. (Eds Watson PF, Holt WV), pp. 145-170. Taylor and Francys, London.
- Blanco G, Cagigas ME, Vazquez E, 1998. Genetic impact of introduced domesticated strain on Spanish native populations of brown trout (*Salmo trutta*). In: *Stocking and introduction of fish*. (Ed Cow I), pp. 371-379. Blackwell.
- Bouza C, Castro J, Sanchez L, Martinez P. 2001. Allozymic evidence of parapatric differentiation of brown trout (*Salmo trutta* L.) within an Atlantic river basin of the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*; 10: 1455-1469.
- Cabrita E, Alvarez R, Anel L, Rana KJ, Herraéz MP. 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*; 37: 245-253.
- Cabrita E, Anel L, Herraéz MP. 2001a. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*; 56: 623-635.
- Cabrita E, Martinez F, Alvarez M, Herraéz MP. 2001b. The use of flow cytometry to assess membrane stability in fresh and cryopreserved trout spermatozoa. *Cryo Letters*; 22: 263-272.
- Cabrita E, Robles V, Alvarez R, Herraéz MP. 2001c. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*; 201: 301-314.
- Cabrita E, Cherenguini O, Luna M, P P, Herráez MP. 2003a. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*; 221: 593-604.
- Cabrita E, Robles V, Cherenguini O, Paz P, Anel L, Herráez MP. 2003b. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology*; 60: 463-473.
- Cabrita E, Robles V, Cunado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herraéz MP. 2005a. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology*; 50: 273-284.

- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herraiz MP. 2005b. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*; 50: 144-153.
- Cabrita E, Robles V, Herraiz MP, 2008. Sperm quality assessment. In: Methods in reproductive aquaculture: marine and fresh water species. (Eds Cabrita E, Robles V, Herraiz MP), pp. 93-148. Taylor & Francis Group, London.
- Cagigas ME, Vazquez E, Blanco G, Sanchez JA. 1999. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. *Marine Biotechnology* (NY); 1: 286-296.
- Cagigas ME, Vázquez E, Blanco G, Sanchez JA. 2002. Phylogeographical lineages in brown trout (*Salmo trutta*) : investigating microgeographical differentiation between native populations from Northern Spain. *Freshwater Biology*; 47: 1879-1892.
- Corujo M, 1999. Nuevos datos de la estructura genética de las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta* L.) en la provincia de León; su integración en la descripción de la península Ibérica. Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo., Oviedo (Spain).
- Corujo M, Blanco G, Vazquez E, Sanchez JA. 2004. Genetic structure of northwestern Spanish brown trout (*Salmo trutta* L.) populations, differences between microsatellite and allozyme loci. *Hereditas*; 141: 258-271.
- Crevel RWR, Fedyk JK, Spurgeon MJ. 2002. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. *Food and Chemical Toxicology*; 40: 899-903.
- David CJ, Pandian TJ. 2006. Cadaveric sperm induces intergeneric androgenesis in the fish, *Hemigrammus caudovittatus*. *Theriogenology*; 65: 1048-1070.
- DeVries AL, Wohlschlag DE. 1969. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*; 163: 1073-1075.
- DeVries AL. 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. *Science*; 172: 1152-1155.
- Dietrich GJ, Szpyrka A, Wojtczak M, Dobosz S, Goryczko K, Zakowski L, Ciereszko A. 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*; 64: 1809-1822.

- Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornuet JM, Adriamanga M, Guyomard R. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*; 7: 339-353.
- Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. 1991. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Toxicology*; 5: 115-125.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*; 21: 407-426.
- Fletcher GL, Hew CL, Davies PL. 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annual Review of Physiology*; 63: 359-390.
- Frankham R, 2001. Conservation Genetics. *Encyclopedia of Genetics*. In: (Eds Brenner S, Miller JH), pp. 458-462. Academic Press, New York.
- Fullerton GD, Keener CR, Cameron IL. 1994. Correction for solute/solvent interaction extends accurate freezing point depression theory to high concentration range. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; 29: 217-235.
- García-Marín JL, Jorde PE, Ryman N, Utter F, Pla C. 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture*; 95: 235-249.
- García-Marín JL, Pla C. 1996. Origins and relationships of native populations of *Salmo trutta* (brown trout) in Spain. *Heredity*; 77: 313-323.
- García-Marín JL, Utter FM, Pla C. 1999. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*; 82: 46-56.
- Grunina AS, Recobrinsky AV, Tsvetkova LI, Barmintsev VA. 2006. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. *International Journal of Refrigeration. Issue with Special Emphasis on Cryobiology*; 29: 379-386.
- Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans FW, Wildt DE. 1997a. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. *Cryobiology*; 34: 335-347.

- Hagedorn M, Kleinhans FW, Wildt DE, Rall WF. 1997b. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology*; 34: 251-263.
- Hagedorn M, Kleinhans FW, Artemov D, Pilatus U. 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biology of Reproduction*; 59: 1240-1250.
- Hagedorn M, Lance SL, Fonseca DM, Kleinhans FW, Artemov D, Fleischer R, Hoque AT, Hamilton MB, Pukazhenthil BS. 2002. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. *Biology of Reproduction*; 67: 961-966.
- Hagedorn M, Peterson A, Mazur P, Kleinhans FW. 2004. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. *Cryobiology*; 49: 181-189.
- Holt WV, 2001. Genetic resource banking and maintaining biodiversity. In: *Cryobanking the genetic resource wildlife conservation for the future*. (Eds Watson PF, Holt WV), pp. 9-19. Taylor and Francis, London.
- Horvath A, Wayman WR, Urbanyi B, Ware KM, Dean JC, Tiersch TR. 2005. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture*; 247: 243-251.
- Horvath A, Miskolczi E, Mihalfy S, Osz K, Szabo K, Urbanyi B. 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*; 54: 251-257.
- Jia Z, Davies PL. 2002. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences*; 27: 101-106.
- Karow AM, 1997. Pharmacological interventions in vitro. In: *Reproductive tissue banking*. (Eds Karow AM, Critser JK), pp. 167-227. Academic Press, San Diego.
- Keener CR, Fullerton GD, Cameron IL, Xiong J. 1995. Solution nonideality related to solute molecular characteristics of amino acids. *Biophysical Journal*; 68: 291-302.
- Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality

- in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*; 130: 425-433.
- Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. 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.
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*; 38: 119-130.
- Labbé C, Maise G, Muller K, Zachowski A, Kaushik S, Loir M. 1995. Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout sperm plasma membrane. *Lipids*; 30: 23-33.
- Labbé C, Maise G. 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*; 145: 281-294.
- Labbé C, Maise G. 2001. Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. *Aquaculture*; 201: 287-299.
- Labbé C, Martoriati A, Devaux A, Maise G. 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*; 60: 397-404.
- Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*; 28: 471-479.
- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*; 54: 1477-1498.
- Langenberg T, Brand M, Cooper MS. 2003. Imaging brain development and organogenesis in zebrafish using immobilized embryonic explants. *Developmental Dynamics*; 228: 464-474.
- Li XM, Trinh KY, Hew CL. 1991. Expression and characterization of an active and thermally more stable recombinant antifreeze polypeptide from ocean pout, *Macrozoarces americanus*, in *Escherichia coli*: improved expression by the

- modification of the secondary structure of the mRNA. *Protein Engineering*; 4: 995-1002.
- Liu XH, Zhang T, Rawson DM. 1998. Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol. *Cryo Letters*; 19: 309-318.
- Machordom A, Suarez J, Almodovar A, Bautista JM. 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Molecular Ecology*; 9: 1324-1338.
- Macouzet M, Simpson BK, Lee BH. 1999. Cloning of fish enzymes and other fish protein genes. *Critical Reviews in Biotechnology*; 19: 179-196.
- Martinez P, Arias J, Castro J, Sanchez L. 1993. Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from Northwestern Spain. *Aquaculture*; 114: 203-216.
- Mazur P. 1965. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Federation Proceedings*; 24: S175-182.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*; 247: C125-142.
- Mirzoyan AV, Nebesikhina NA, Voynova NV, Chistyakov VA. 2006. Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). *International Journal of Refrigeration. Issue with Special Emphasis on Cryobiology*; 29: 374-378.
- Moran P, Pendas AM, Garcia-Vazquez E. 1991. Failure of stocking policy, of hatchery reared brown trout, *Salmo trutta* L., in Asturias, Spain, detected using LDH-5* as a genetic marker. *Journal of Fish Biology*; 39: 117-122.
- Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C. 2008. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology of Reproduction*; 78: 390-399.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*; 38: 217-229.
- Ogier de Baulny B, Labbe C, Maisse G. 1999. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*)

- testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*; 39: 177-184.
- O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW, DeVries AL. 1998. Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me₂SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature. *Cryobiology*; 37: 59-66.
- Ostergaard S, Hansen MM, Loeschcke V, Nielsen EE. 2003. Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment. *Molecular Ecology*; 12: 3123-3135.
- Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*; 38: 209-222.
- Parks JE, 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: *Reproductive tissue banking*. (Eds Karow AM, Critser JK), pp. 229-261. Academic Press, San Diego.
- Poleo GA, Greg Lutz C, Cheuk G, Tiersch TR. 2005. Fertilization by intracytoplasmic sperm injection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) eggs. *Aquaculture*; 250: 82-94.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*; 164: 666.
- Rall WF, Mazur P, McGrath JJ. 1983. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. *Biophysical Journal*; 41: 1-12.
- Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*; 313: 573-575.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*; 24: 387-402.
- Rall WF, 1992. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for the application to the conservation of salmonid fishes. In: *Genetic conservation of salmonid fishes*. (Ed Thorgaard Ca), Plenum Press, New York.
- Riabova GD, Klimonov VO, Afanas'ev KI, Vyshkvartsev DI, Moskaleichik FF, Rubtsova GA. 2006. Variation in morphometric and genetic characteristics of stellate sturgeon juveniles raised at different densities. *Genetika*; 42: 244-255.
- Robles V, Cabrita E, Real M, Álvarez R, Herráez MP. 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology*; 47: 30-39.

- Robles V, Cabrita E, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Herráez MP. 2005. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology*; 64: 1633-1664.
- Robles V, Cabrita E, Anel L, Herraéz MP. 2006. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution. *Aquaculture*; 261: 1299-1306.
- Robles V, Barbosa V, Herraéz MP, Martínez-Paramo S, Cancela ML. 2007. The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology*; 68: 284-289.
- Robles V, Cabrita E, Acker JP, Herraéz MP, 2008. Embryo cryopreservation: what we know until now. In: *Methods in reproductive aquaculture: marine and fresh water species*. (Eds Cabrita E, Robles V, Herraéz MP), pp. 265-294. Taylor & Francis Group, London.
- Roldan E, Garde J, 2004. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. In: *Los Retos Medioambientales del siglo XXI. La Conservación de la Biodiversidad en España*. (Ed Gomendio M), pp. 283-307. Fundación BBVA, Bilbao.
- Ryman N. 1983. Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: Differences between species. *Aquaculture*; 33: 1-21.
- Sanz N, Garcia-Marin JL, Pla C. 2000. Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*; 57: 2201-2210.
- Sarvi K, Niksirat H, Mojazi Amiri B, Mirtorabi SM, Rafiee GR, Bakhtiyari M. 2006. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture*; 256: 564-569.
- Sedgwick SD, 1995. *Trout farming handbook*. Oxford, England, 176 pp.
- Stanley Price MR, 1989. *Animal re-introductions, the Arabian Oryx in Oman*. Cambridge University Press, Cambridge, 291 pp.
- Tablin F, Oliver AE, Walker NJ, Crowe LM, Crowe JH. 1996. Membrane phase transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation. *Journal of Cellular Physiology*; 168: 305-313.

- Tiersch TR, 2000. Cryopreservation in Aquatic species . Advances in world aquaculture. Baton Rouge, Louisiana, USA, 439 pp.
- Trounson A, Mohr L. 1983. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*; 305: 707-709.
- Wang J-H. 2000. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology*; 41: 1-9.
- Watson PF, 1978. Artificial breeding of non-domestic animals. In: Watson PF (Ed.), Symposium of the zoological society of London. Academic Press, London.
- Watson PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*; 62: 483-492.
- Watson PF, Morris GJ. 1987. Cold shock injury in animal cells. *Symposia of the Society for Experimental Biology*; 41: 311-340.
- Watson PF, Fuller BJ, 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos. In: Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future. (Eds Watson PF, Holt WV), pp. 21-46. Taylor and Francis, London.
- Watson PF, Holt WV, 2001. Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future. Taylor and Francis, London.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*; 178: 411-414.
- Wildt DE, Wemmer C. 1999. Sex and wild life: the role of reproductive science in conservation. *Biodiversity and Conservation*; 8: 965-976.
- Wilmut I, Rowson LE. 1973. The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*; 33: 352-353.
- Zbikowska HM. 2003. Fish can be first--advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research*; 12: 379-389.
- Zhang T, Rawson DM. 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*; 32: 239-246.
- Zhang T, Rawson DM. 1998. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology*; 37: 13-21.

- Zhang T, Lubzens E, 2008. Cryopreservation of fish oocytes. In: Methods in reproductive aquaculture: marine and fresh water species. (Eds Cabrita E, Robles V, Herraéz MP), pp. 251-264. Taylor & Francis Group, London.
- 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.

OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis doctoral es progresar en los conocimientos básicos necesarios para el establecimiento de un banco de germoplasma representativo de las distintas poblaciones de trucha autóctonas de la provincia de León. Para ello se tratará de comprobar si la criopreservación de esperma es un método que garantiza la conservación del patrimonio genético de la trucha común (*Salmo trutta* L.) y desarrollar nuevos métodos que permitan mejorar los resultados obtenidos hasta el momento en criopreservación de embriones. Por ello, los principales objetivos de este estudio serán los siguientes:

1. Comprobar si los protocolos de criopreservación seminal diseñados por nuestro equipo para trucha arco iris permiten obtener esperma de buena calidad tras la descongelación cuando son aplicados a la trucha común.
2. Evaluar específicamente los daños producidos por la criopreservación a nivel de ADN, y determinar si el proceso de congelación/descongelación permite obtener una descendencia genéticamente idéntica a la obtenida con semen fresco.
3. Ensayar en especies modelo (pez cebra) nuevas fórmulas de crioprotección de embriones basadas en el empleo de proteínas anticongelación (AFPs) con el fin de evaluar futuras aplicaciones en embriones de trucha común. Para ello se pretende evaluar métodos no invasivos de incorporación de las proteínas y analizar el efecto crioprotector de las mismas durante la vitrificación.
4. Desarrollar nuevas técnicas de evaluación de embriones que permitan obtener un mayor conocimiento de los daños que se producen en el embrión tras la criopreservación, con el fin de ir solventando las barreras que hacen que hasta el momento, no se haya conseguido con éxito la criopreservación de embriones de teleósteos.

CAPÍTULO 1

**Cryobanking as tool for conservation of biodiversity:
effect of brown trout sperm cryopreservation
on the male genetic potential**

**S. Martínez-Páramo¹, S. Pérez-Cerezales¹, F. Gómez-Romano², G. Blanco²,
J.A. Sánchez², M.P. Herráez¹**

¹Department of Molecular Biology, Area of Cell Biology,
University of León, León, Spain

²Department of Functional Biology, Area of Genetics, IUBA.
University of Oviedo, Oviedo, Spain

Theriogenology

Aceptado para publicar el 11 de Septiembre de 2008

Abstract

Sperm cryobanking could be a good alternative to breeding in captivity in order to preserve genetic diversity. Sperm from two well-characterized brown trout populations originating from two river basins in the Northwest of Spain (Esla and Duerna), both threatened by extinction, was cryopreserved. In order to determine whether a sperm cryobank is the best option for preserving genetic profiles, cell viability, chromatin fragmentation, fertility and genetic variability of the offspring obtained with fresh and frozen sperm, were analyzed. Sperm viability was not reduced by freezing, ($87.0 \pm 3.32\%$ to $77.9 \pm 3.59\%$ and $77.6 \pm 6.53\%$ to $76.6 \pm 2.61\%$ in fresh and frozen sperm from Esla and Duerna, respectively). The percentage of fragmented DNA increased after freezing in spermatozoa from Esla males (from $4.7 \pm 0.23\%$ to $6.0 \pm 0.28\%$), but not those from Duerna males.

After freezing/thawing, the percentage of eyed embryos drops from $66.8 \pm 6.77\%$ to $16.1 \pm 3.46\%$ and from $50 \pm 8.97\%$ to $11.5 \pm 2.50\%$ in the Esla and Duerna basins, respectively. This reduction indicates than many spermatozoa have lost their ability to contribute to embryo development and this loss is not related to either spermatozoa viability or the DNA integrity. Genotypic determination by microsatellite analysis showed that frozen/thawed sperm provided offspring with a similar genetic profile to unfrozen milt, demonstrating the accuracy of the cryopreservation procedure. Taking into account the prolificacy of this species, even a low rate of success of fry after cryopreservation, could provide enough individuals to recover stable populations without altering the genetic profiles of the preserved strains. Therefore, cryopreservation is considered a safe, simple and cheap technology for gene banking in the analyzed brown trout populations.

1. Introduction

According to the World Conservation Union (IUCN) (www.iucnredlist.org), 2.514 species of teleosts are extinct in the wild or threatened to different extent. Many subspecies, varieties or geographically isolated subpopulations or stocks, which are often of particular interest as fishing resources, are also in danger of extinction. Brown trout (*Salmo trutta* L.) is considered an endemic species in the Iberian Peninsula inhabiting some rivers in the north of Spain. However, river pollution, uncontrolled fishing and other factors are endangering local populations, drastically reducing the number of individuals or even causing total extinction. This situation has prompted the development of restocking programmes involving the introduction of foreign as well as hatchery-reared strains.

A hierarchical populational genetic structure has been confirmed in brown trout [1], although the number of levels within this hierarchy and interactions among different lineages or groups has not been solved in detail [2-4]. A high level of genetic diversity has also been shown to exist among Spanish populations. In the Iberian Peninsula, at least two clearly distinguished lineages can be identified: populations from the Mediterranean drainage (lineage IV) and those from the Cantabric drainage (lineage II) [2,3,5-7]. This differentiation at a macrogeographic level also occurs at a microgeographic level [4,8-11]. The Duero river is one of the main Atlantic river basins. A strong intrabasin differentiation has been detected and previous surveys have proven the existence of genetic differences among natural populations. In the province of León, the Duero basin has been subjected to restocking programs, using the same hatchery stock for the whole province. However, these hatchery strains have been established with individuals from central Europe whose genetic characteristics are completely different from those of indigenous populations [12-15]. Later, the policy was to construct hybrid stocks (German stock/local populations) where Central European domestic females were crossed with wild males from the Duero basin. Females from the hybrid offspring were again crossed with wild males for several generations. These stocks are likely to be more successful at survival than pure exotic stocks but there is an obvious risk that this initiative will increase introgression rates, and thus genetic contamination of natural populations [11]. Finally, stocks with only indigenous breeders were created, removing

the risk of the introgression of Central Europe genes (Corujo, pers. comm.). To maintain the high level of genetic diversity existing in the Duero basin, a great number of total indigenous stocks should be created, one for each genetically differentiated population. Due to total cost and area needed, this solution is not realistic. Thus, the creation of a cryopreserved sperm bank could be an alternative option for preserving the indigenous genetic pool.

Sperm cryopreservation is a very valuable tool for the conservation of endangered species [16]. It is considered a secure method for the *ex situ* preservation of biodiversity, providing the opportunity to preserve representative samples and further reconstruct the original strain, population or variety, after the required environmental restoration. The development of reproductive technologies in fish allows population recovery from semen samples through crossbreeding programs or by the application of androgenesis procedures [17-19]. Cryobanking of sperm has considerable advantages over breeding in captivity in terms of costs, labour and security; since thousands of samples from different generations can be maintained in a minimum space, without the risk of loss caused by disease or genetic drift over time. Moreover, transportation and management of frozen samples is relatively simple, allowing greater flexibility in designing recovery programs.

Sperm cryopreservation has been widely investigated in fish by Billard and Zhang [20], Chao and Liao [21], Tiersch *et al.* [22] or Lahnsteiner *et al.* [23]. This process has been proven to affect cell structure and functionality, especially in salmonids [24-26]. A different degree of chromatin fragmentation has been reported after freezing/thawing in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), rainbow trout and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm [27-29] and clastogenic effects have also been demonstrated on sturgeon oocytes after fertilization with frozen/thawed sperm [30]. There is no data on the effects of cryopreservation on the DNA of brown trout sperm, although this fact should be carefully evaluated when freezing is carried out for gene banking purposes. The conservation of any population involves the conservation of its genetic profile [21], so it is necessary to check whether the genetic information that we are going to preserve will be representative of the current population when sperm is thawed. Few studies deal with fidelity in genetic transmission by cryopreserved germ cells of fishes, analyzing isoenzymatic variation in different loci [31,32].

The aim of this study is to evaluate the usefulness of the creation of a cryopreserved sperm bank as gene repository for two brown trout subpopulations originating from two rivers that form part of the Duero basin (Esla and Duerna). Evaluation of sperm quality and chromatin stability after freezing as well as analysis of the genetic variability of the offspring will provide interesting data about their suitability as an alternative source to fish farming in restocking programs.

2. Materials and methods

All chemicals were obtained from Sigma (Madrid, Spain), Merck (Barcelona, Spain) or Panreac (Barcelona, Spain). Media were not bought as such but prepared in our laboratory as referred to in the text.

2.1. Collection of sperm and eggs

Sperm and eggs were obtained from brown trout (*Salmo trutta* L.) provided by the Vegas del Condado fish farm (León, Spain). Trout used in the experimental design belong to two different genetically well-characterized populations, from the Esla and Duerna basins. Sample collection was carried out in January and February, during their natural reproductive period.

Sperm was collected from twelve males from each basin. Prior to milt extraction, males were anesthetized (0.2 g/l MS-222). Milt was obtained by abdominal massage and collected from the urogenital papilla with an insulin syringe without a needle, taking special care to avoid urine and faeces contamination.

Three females from each basin (Esla and Duerna) were anesthetized and eggs were obtained by stripping.

2.2. Sperm cryopreservation

The cryopreservation process was carried out immediately after extraction. Sperm was diluted at a ratio of 1:3 (v/v) in an extender kept at 4 °C composed by 7% DMSO

and 10% egg yolk in #6 Erdahl and Graham mineral solution (EG) (0.70 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.08 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.49 mM Na_2HPO_4 , 34.30 mM KCl, 99.95 mM NaCl, 0.52 mM citric acid, 55.51 mM glucose, 10 mL KOH solution 226.34 mM, 20 mL bicine solution 324.81 mM, and 323 mOsm/kg, pH 7.4) [33]. The equilibration time was 10 minutes. During this time, 500 μL of the mixture was loaded in 0.5 mL straws (IMV, France), which were sealed with polyacrylamide powder. The straws were frozen, in a Styrofoam box at 2 cm above the liquid nitrogen surface for 10 minutes, and then plunged into the liquid nitrogen. Samples were stored in a liquid Nitrogen container until use.

Finally, the straws were thawed in a water bath at 25 °C for 30 seconds.

2.3. Sperm viability

The percentage of viable cells was determined using double labelling with SYBR-14 and propidium iodide (PI) (Invitrogen, Spain). Fresh sperm was diluted in EG (1:3 v/v) to reach the same concentration as the cryopreserved sperm. Prior to the addition of fluorescent dyes, 1 μL of fresh (1:3 v/v in EG) or thawed sperm was diluted in 250 μL of EG. Subsequently, 2.5 μL of SYBR-14 working solution (50-fold dilution in distilled water of the stock solution -10-fold dilution in DMSO of the SYBR-14 commercial solution-) was added to the cell suspension. After 10 minutes of incubation at room temperature in the dark, 3 μL of working PI solution (0.5 mg/mL PBS 0.1M) was added to the cell suspension. The spermatozoa were incubated for 10 minutes under the same conditions and analyzed by epifluorescence microscopy (Nikon Eclipse E800 microscope) fitted with a 450–490 nm excitation filter and a 520 nm barrier filter, with a 40X objective. SYBR-14, a membrane-permeable nucleic acid stain, emits green fluorescence, whereas PI, a non-permeable probe, emits red fluorescence. Hence, cells emitting green fluorescence were considered viable cells, whereas red cells were considered to be non-viable. The percentage of viable cells was established on a count of one hundred cells for each male, for fresh or cryopreserved sperm.

2.4. Comet assay (Single-cell gel electrophoresis procedure)

The Comet assay allows DNA fragmentation to be detected. The Comet assay was performed following the protocol described by Cabrita *et al.* [29].

2.4.1. Preparation of samples

Aliquots of fresh and frozen/thawed sperm from each male were 40-fold diluted in EG solution or in H₂O₂ 500 mM in EG solution (positive control) and maintained in crushed ice for 20 minutes. After this time, they were diluted 10-fold in EG solution. Next, 10 µL of diluted sperm was embedded in 75 µL low melting point agarose (5 mg/mL in PBS). Immediately, the cell suspension was spread over a slide, and covered with a coverslip. The slides were previously coated with a thin layer of normal melting point agarose (5 mg/mL in PBS). The second layer of agarose containing the spermatozoa was left to solidify at 4 °C for 15 minutes and the coverslip was then removed. For each male, three slides per treatment (fresh and frozen/thawed sperm, with or without pre-treatment with H₂O₂) were subjected to the Comet assay.

2.4.2. Cell lysis, DNA denaturalization and electrophoresis

Slides containing the spermatozoa were immersed in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris-pH 10, 1% Triton X-100, 1% Lauril sarcosine; pH 12) for 1 hour at 4 °C. DNA denaturalization was then performed. After this, the slides were incubated in lysis solution containing DTT in a final concentration of 10 mM for 30 minutes at 4°C. The slides were then incubated for 90 minutes at room temperature in 10 mM Dithiothreitol (DTT) and 4 mM Litio diiodosalicilate lysis solution.

After DNA denaturalization, the slides were placed in an electrophoresis cube (Bio-Rad), and covered with electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM Na₂-EDTA, pH 12) in which they were maintained for 20 minutes at 4 °C. Electrophoresis was performed at 4 °C for 10 minutes at 25 V and 300 mA. Next, the slides were immersed in a neutralization solution (0.4 M Tris, pH 7.5) for 5 minutes. This procedure was repeated

three times. The slides were fixed by immersion in methanol for 3 minutes, left to dry in the air and stored at 4 °C until further analysis.

2.4.3. Comet visualization and analysis

Ethidium bromide solution (stock solution 5 µg/mL dH₂O stored at 4 °C in darkness) was used for comet visualization. Fifty microlitres of ethidium bromide working solution (0.5 µg/mL dH₂O) was pipetted onto the slide containing the sample covered with a coverslip. The samples were then observed under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E800) fitted with a 510–560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter, with a 40X objective. For each male and treatment, three slides were analysed. Images were acquired from the microscope with a digital camera (Nikon DXM1200F) taking 50 cells per male and treatment using the software Nikon ACT-1 (v. 2.62, Nikon). All the images were analysed with the Komet software imaging system (version 5, Kinetic Imaging, UK). Each spermatozoon image displays a comet like shape, containing undamaged DNA in the head and fragmented DNA in the tail.

Of all the parameters analyzed by Komet software, percentage of tail DNA (%DNA_t), was chosen to compare DNA damage in different treatments. This index is given by the formula: % DNA_t = 100 x (DNA_c – DNA_h) / DNA_c, where DNA_c and DNA_h are intensities of the pixels in the whole comet and in the head, respectively.

2.5. Fertilization

For fertilization assays, 12 males and 3 females from the same basin were crossbred. Eggs from one female were used for fecundations with sperm from four males (fresh and cryopreserved). Each crossbreeding was carried out in duplicate giving a total of 12 crossbreedings by duplicate from fresh and frozen sperm from each basin. Batches of 100 eggs were placed in a Petri dish and 500 µl of fresh (1:3 v/v in EG) or frozen/thawed sperm (one straw) was added. Spermatozoa motility was then activated with 10 mL of DIA solution (94.97 mM NaCl, 49.95 mM Glicine, 19.98 mM Tris). After 10 minutes, the eggs were washed with water and placed in an incubator with running

water at 4-8 °C, where they developed until eye stage. Dead embryos were removed once a week. Fertility was expressed as percentage of eyed embryos.

2.6. Microsatellite analysis

Breeders adipose fins and ten-week old larvae from each crossbreeding were fixed in 96° alcohol for further DNA extraction following the standard Chelex[®] 100 (Bio-Rad) resin protocol [34]. Twenty-four males and 6 females were characterized for 9 microsatellite loci: Str60INRA, SsoSL438, Ssa408Uos, Ssa410Uos, SSsp2213, SSsp2216, SsaD71, SsaD190 and OMM1064 following the protocol described by Lerceteau-Kohler and Weiss [35]. Offspring were analyzed only when the number of larvae obtained in the cross exceeded 16. Four crosses did not reach this number, so finally 20 crossbreedings were studied (Table 1). A total of 750 larvae were studied (350 from fertilization with frozen sperm and 400 from non-frozen). Amplification products were separated on an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems). Genotypes of each offspring were tested for conformity with expected Mendelian segregation of alleles.

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using the software package SPSS 15.0 for Windows. Results were expressed as means \pm SEM.

Comparison between percentage of sperm viability and fertilization rate in fresh or freeze/thawed sperm were performed using a Student's t-test for independent samples ($p < 0.05$).

The average of fragmented DNA (DNA_t) was compared using the Student's t-test ($p < 0.05$). Results were also expressed as the frequency of cells with different DNA_t percentage.

After genotypic determination, differences between the offspring from the same male/female crossbreeding with fresh or frozen sperm were compared using the χ^2 contingency test, applying the Yates' correction for small sample sizes [36]. As multiple

comparisons tests were made, sequential Bonferroni correction was applied to recalculate the significance level, following the method used by Rice [37].

3. Results

3.1. Sperm viability

The percentage of viable spermatozoa did not decrease after freezing/thawing. Statistical analysis did not detect significant differences between fresh and frozen samples, or between populations. Average of percentages of viable spermatozoa ranged from 87.0 ± 3.32 in fresh sperm from Esla males, to 76.6 ± 2.61 in thawed sperm from Duerna males (Fig. 1).

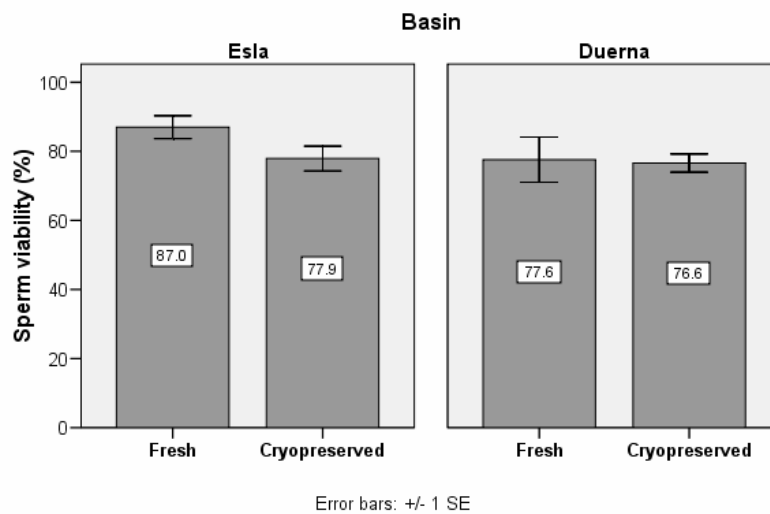


Fig. 1. Cell viability of fresh and frozen spermatozoa from males from the Esla and Duerna basins (n=12). Bars indicate S.E.M. There is no significant difference between treatments or between populations ($p < 0.05$).

3.2. Comet assay (Single-cell gel electrophoresis procedure)

Spermatozoa from brown trout showed low DNA fragmentation values, both before and after freezing, ranging from $4.7 \pm 0.22\%$ DNAt in fresh sperm from the Duerna males to $6.0 \pm 0.28\%$ DNAt in frozen sperm from the Esla males.

In fresh and frozen sperm from both basins, previous treatment with H_2O_2 promoted strain breaks in DNA, as was demonstrated by statistical analysis. Strain breaks in DNA were observed, except in cryopreserved samples from the Duerna basin (Fig. 2).

Student's t-test demonstrated that only in spermatozoa from Esla males DNA fragmentation increased after freezing ($4.7 \pm 0.23\%$ and $6.0 \pm 0.28\%$ in fresh and frozen spermatozoa respectively) whereas there were no significant differences in sperm obtained from the Duerna basin ($4.7 \pm 0.22\%$ and $5.3 \pm 0.24\%$ in fresh and frozen spermatozoa respectively) (Fig. 2).

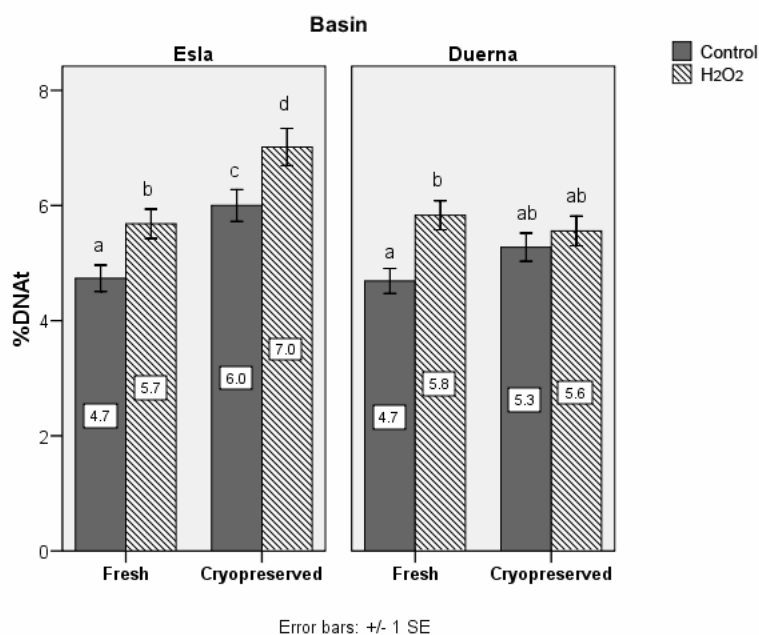


Fig. 2. Percentage of DNA fragmentation of fresh and frozen spermatozoa of males from the Esla and Duerna basins (n=12). Different letters show significant differences between treatments for each population (p<0.05).

Cell frequencies in relation to DNA damage (%DNAt) were represented in Fig. 3. The histogram showed similar distribution for both populations, before and after freezing. In all samples, the percentage of tail DNA was lower than 30% in all the analysed cells, with most of the events displaying less than 5% DNAt. Cryopreservation slightly reduced the percentage of spermatozoa with less than 1% DNAt in the Esla males, but did not affect the chromatin stability in cells from the Duerna males. Previous treatment with H₂O₂ promoted a decrease in the percentage of spermatozoa with the lowest degree of DNA damage, this being more noticeable in cryopreserved sperm from the Esla basin.

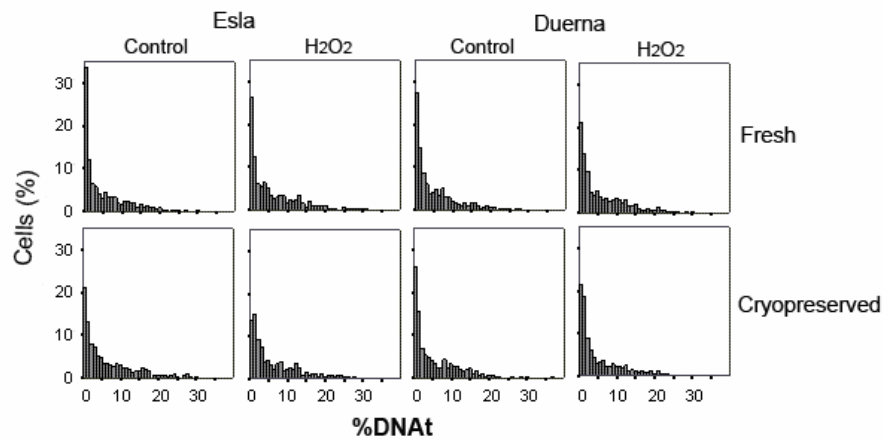


Fig. 3. Percentages of cells with different degree of %DNAt.

3.3. Fertilization

After seven weeks of development, the percentage of eyed embryos was similar in crossbreedings from Esla and Duerna populations (Fig. 4). Cryopreservation significantly reduced embryo development in both populations. The percentage of eyed embryos after freezing decreased to a quarter in comparison with the controls (from $66.8 \pm 6.77\%$ to $16.1 \pm 3.46\%$ and $50 \pm 8.97\%$ to $11.5 \pm 2.50\%$ in the Esla and Duerna basin, respectively).

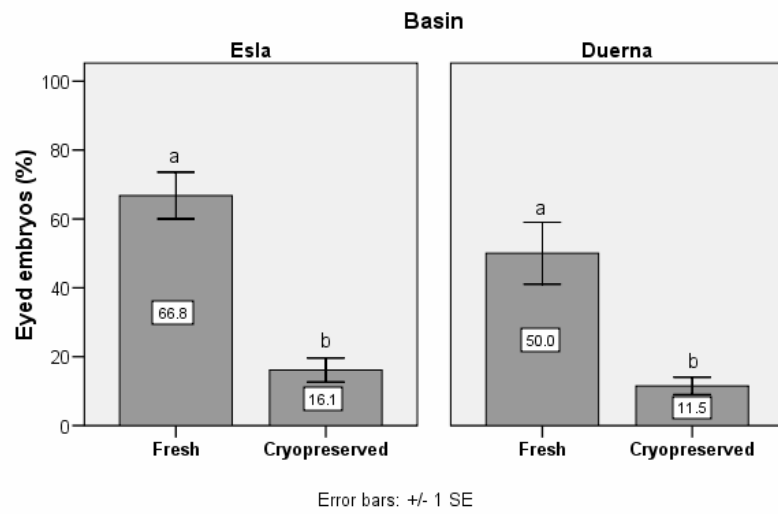


Fig. 4. Percentage of developing embryos. Bars indicate S.E.M (n=12). Different letters show significant differences between treatments as well as between populations ($p < 0.05$).

3.4. Microsatellite analysis

Genotypes of all breeders are shown in Table 1.

By knowing the genotypes from breeders and progenies, it is possible to deduce for each larva which allele came from each breeder. This is how the allelic contribution from the breeders to fresh and frozen offspring was calculated.

All offspring obtained from the same female were compared with each other to analyze differences in female genetic contribution. No significant differences were found in any of the comparisons made (data not shown).

Table 2 shows p-values of the comparisons between male allelic contribution to fresh and frozen offspring. In 39 out of 180 cases, males were homozygotes for a locus or their genotype matched with the female one. Comparisons could not be made because it was not possible to recognize which allele came from each breeder. In the 141 remaining cases there were significant differences in 4 of them at $p < 0.05$ and only in 1 at $p < 0.01$. However, after Bonferroni's correction, only in 1 case did the difference remain significant, representing 0.007% of the total comparisons.

Table 1. Crosses and breeders' genotypes for the 9 loci microsatellites. Breeders' code: E: Eslla population, D: Duerna population, numbers: number assigned to each breeder.

River	Crosses	Loci									
		♀ × ♂	SSsp2213	OMM1064	SsaD190	SsaD71	SsoSL438	SSsp2216	Str60INRA	Ssa410Uos	Ssa408Uos
ESLA	♀E1	♂E1	202/234	266/266	139/143	210/262	115/117	159/203	95/97	178/238	258/266
		♂E2	226/242	178/262	131/135	210/210	117/135	203/215	95/95	238/282	254/258
		♂E3	226/242	266/266	135/163	210/262	109/117	159/215	95/101	178/234	254/314
	♀E2	♂E3	226/242	178/266	131/139	210/210	117/135	203/215	95/101	178/238	258/278
		♂E4	226/230	262/262	139/147	210/246	107/107	203/211	95/95	178/242	270/282
		♂E5	178/214	178/262	139/163	206/246	107/107	179/203	95/95	234/238	262/270
	♀E3	♂E6	202/226	230/258	147/163	210/282	107/135	183/203	95/97	178/238	258/273
		♂E7	226/242	266/266	139/147	206/262	117/135	159/215	95/101	234/282	254/258
		♂E8	202/212	182/182	131/139	262/286	107/109	215/223	95/95	210/234	254/281
		♂E9	202/242	190/266	131/143	210/210	107/109	179/203	95/101	238/242	282/314
DUERNA	♀D1	♂E8	202/242	210/266	131/139	210/210	117/135	159/215	95/95	238/282	254/258
		♂E9	234/238	178/262	131/147	206/262	107/109	171/211	95/101	210/222	242/278
		♂E10	202/234	262/266	139/163	210/262	109/117	203/203	95/101	242/282	254/270
		♂E11	226/242	262/266	147/163	206/278	109/117	159/215	95/95	238/246	278/314
		♀D2	230/230	182/182	135/163	210/294	117/117	179/183	95/95	242/270	254/254
♀D2	♂D1	230/234	178/182	123/139	210/230	109/117	207/211	95/95	254/282	254/278	
	♂D2	222/234	178/182	135/155	135/155	117/117	183/207	95/95	230/270	250/250	
	♂D3	214/230	178/258	139/163	254/270	109/117	183/195	95/105	238/242	246/250	
	♂D4	230/234	182/270	135/163	270/294	117/117	179/207	95/95	242/242	250/250	
	♂D5	202/230	178/182	123/135	210/210	107/117	183/207	95/95	270/278	250/250	
	♂D6	202/230	178/182	135/139	230/254	117/117	207/211	95/95	270/270	250/278	
	♂D7	194/234	182/182	123/135	210/254	107/117	183/207	95/95	242/270	246/250	
♀D3	♂D7	214/234	178/262	139/163	210/258	107/117	167/179	91/95	218/222	250/254	
	♂D8	194/234	186/270	135/163	210/254	107/117	183/179	95/95	270/278	250/254	
	♂D9	202/230	178/182	135/139	230/270	107/109	179/211	95/95	250/270	250/278	
	♂D9	230/234	182/182	123/159	210/230	117/117	179/207	95/95	254/278	250/250	

Table 2. P-value from χ^2 contingency test using male's allelic contribution between fresh and frozen progenies. Breeders' code: E: Esla population, D: Duerna population, numbers: number assigned to each breeder.

Crosses	Loci												
	SSsp2213	OMM1064	SsaD190	SsaD71	SsoSL438	SSsp2216	Str60INRA	Ssa410Uos	Ssa408Uos				
♀E1 × ♂E1	0.9577	0.7422	0.9577	-	0.7513	0.6056	-	0.1766	0.4444				
♀E1 × ♂E2	0.0029**	-	0.6481	-	1	0.6547	0.5521	1	0.4825				
♀E1 × ♂E3	0.0110*	0.7051	0.2593	-	0.9577	0.8607	0.8668	-	0.7051				
♀E1 × ♂E4	0.5761	-	0.5761	0.5761	-	0.9297	-	0.6765	0.7978				
♀E2 × ♂E5	0.2850	0.8275	0.8275	0.2301	0.6481	0.9577	0.6481	1	1				
♀E2 × ♂E6	0.8275	-	0.6481	0.7876	0.4371	0.7051	1	0.2338	1				
♀E2 × ♂E7	0.2551	-	0.3687	1	1	0.8275	-	0.3484	0.6481				
♀E3 × ♂E8	0.6481	0.6481	0.8607	-	0.6547	1	-	1	1				
♀E3 × ♂E9	0.6481	1	0.5155	0.8754	-	1	-	0.6481	1				
♀E3 × ♂E10	0.8607	0.3687	0.6547	0.1709	0.0225*	-	-	0.4596	0.0225*				
♀E3 × ♂E11	1	0.8607	1	0.1709	0.6256	1	-	0.5058	0.6256				
♀D1 × ♂D1	1	1	1	0.7876	1	0.3687	-	1	1				
♀D1 × ♂D2	1	0.1797	0.6481	0.1191	-	0.8607	-	0.8908	-				
♀D1 × ♂D3	1	0.1709	1	0.6256	0.1709	1	1	0.3484	0.3687				
♀D1 × ♂D4	1	0.6481	-	0.1432	-	0.6481	-	-	-				
♀D2 × ♂D5	-	-	0.6761	0.6198	-	0.8965	-	-	0.7897				
♀D2 × ♂D6	0.3136	-	-	0.7352	-	-	-	0.6547	1				
♀D2 × ♂D7	0.8908	0.7352	0.3687	0.8275	-	1	0.0722	1	0.6481				
♀D3 × ♂D8	0.5460	0.8952	0.9621	0.6726	0.6395	0.7978	-	0.9297	0.7978				
♀D3 × ♂D9	0.8195	-	0.6873	0.5186	-	0.8465	-	0.4936	-				

(-) Comparison is not possible: the male is homozygote, or both breeders share the same genotype.

* Significant value without Bonferroni's correction.

** Significant value using Bonferroni's correction.

4. Discussion

Sperm cryopreservation has been successfully achieved in many fish species. Salmonids are one of the more studied groups and probably those in which more difficulties have been encountered. The special characteristics of their sperm (short duration of motility, low ATP production, high sensitivity to osmotic stress, high number of spermatozoa required to fertilize one egg) make them more sensitive to the cryopreservation process. Nevertheless, protocols have been developed for different species with different degrees of success. Effects of freezing/thawing on brown trout sperm have been described by Drokin *et al.* who reported alterations of the fine structure of plasma membrane [38], Labbe and Maisse who showed fertilization rates after thawing between 5 and 50% in comparison with fresh sperm [39] or Lahnsteiner *et al.* who achieved around 80% of fertility in comparison with a fresh sperm control [40].

Many authors have described damage caused by cryopreservation in fish spermatozoa affecting motility, cell metabolism, structure of plasma membrane, mitochondria, tail and chromatin, among others [24,28,41-43]. Plasma membrane is one of the structures most susceptible to damage due to its sensitivity to cold shock [44], to osmotic stress promoted by the processes [45], and the presence of reactive oxygen species (ROS) generated during freezing/thawing [46]. Membrane protection has been achieved through the use of membrane stabilizers and antioxidants during cryopreservation [25,47,48]. The analysis of cell viability performed with SYBR14/PI showed that the protocol of freezing/thawing used in this study with brown trout, did not provide significant differences in the percentage of viable cells before and after freezing, demonstrating good protection of the plasma membrane structure and permeability. Our extender contains 10% egg yolk as membrane stabilizer and citric acid as antioxidant. DMSO is a well-known hydroxyl-free radical producer and, as demonstrated by Mirzoyan *et al.*, working with sturgeon sperm, addition of antioxidants is specially recommended when this agent is used as cryoprotectant [30].

With regard to the integrity of DNA, spermatozoa from brown trout showed low values of DNA fragmentation both before and after cryopreservation in comparison with other fish species. ROS produced during cryopreservation can also affect DNA structure [30,49]. Nevertheless, our results showed that cryopreservation did not

increase mean values of %DNA_t in samples from the Duerna basin and only a slight rise was detected in the Esla population. This increase is considered slight enough to be explained by real differences in sperm DNA fragmentation as well as by other factors such as slight differences in electrophoresis run. In rainbow trout neomales (*Oncorhynchus mykiss*) percentage of tail DNA goes from 6.1% to 13.69% after freezing/thawing [50], gilthead sea bream (*Sparus aurata*) DNA showed a degree of fragmentation of 28.23% and 31.3% DNA_t in fresh and cryopreserved sperm respectively [29] and the increase detected after cryopreservation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm goes from 32.7% in fresh to 38.2% after thawing [27]. Chromatin structure varies between fish species [51] and sensitivity to damage promoted by cryopreservation could be affected by these structural differences, by the different plasma composition or by the specific metabolic rates, amongst others. Positive controls treated with H₂O₂ promoted strand breaks in DNA, both in fresh and frozen samples, as was also reported by Dietrich *et al.* [49].

Despite the mean values of %DNA_t being only slightly affected in brown trout after cryopreservation, the percentage of cells with less than 5% of fragmented DNA clearly decreased in Esla males. These samples also showed higher values of DNA_t after cryopreservation, demonstrating a higher susceptibility to damage than those from the Duerna males. This fact could have important implications for the ability of the frozen spermatozoa to fertilize the egg and to contribute to normal embryo development. According to Aitken and Baker, spermatozoa with a low level of oxidative damage could maintain their fertilization ability and, if the egg repair mechanisms are not sufficient, alterations in the embryo development may occur [46]. As has been quoted, fertilization of sturgeon eggs with cryopreserved sperm increased the rate of chromosomal aberrations in progeny [30].

In the present study, assessment of progeny development showed that the percentage of eyed embryos was reduced to a quarter when fertilization was carried out with cryopreserved sperm. Neither the spermatozoa viability nor the analysis of DNA integrity, explain this important decrease in the rate of development to eye stage. Other factors, such as a reduction in sperm motility, alterations in the ability of the spermatozoon to recognize the egg suggested by Cabrita [52], or modification in the distribution of plasma membrane proteins demonstrated in brown trout spermatozoa by

Drokin *et al.* [38], could affect fertilization ability. Labbe and Maisse also failed to detect in this species any correlation between fertilization rates of thawed sperm and motility, viability, plasma membrane lipid profile, ATP content or membrane resistance to osmotic shock [39]. Probably, the sum of all these factors is responsible for the decrease in the percentage of eyed embryos and only the more resistant cells are able to maintain their capacity to fertilize and contribute to embryo development after freezing.

The low values of fragmented chromatin could suggest that no changes the genetic profiles of progenies from fresh and frozen samples could be expected. Labbe *et al.*, working with rainbow trout, concluded that sperm cryopreservation did not impair offspring survival and quality [28]. Nevertheless, the selection of a specific population of resistant spermatozoa during the cryopreservation procedure could lead to a variation in the genetic profile of the obtained embryos, undesired from the point of view of the preservation of specific populations or strains.

The existence of this gametic selection was tested by comparing the genetic profile of fresh and frozen progenies obtained from the same cross. The results of the comparison (Table 2) showed that there were no significant differences in the genetic contribution by the male breeders to fresh and frozen progenies, thus cryopreservation does not affect the genetic information of the offspring. Therefore all evidence suggests that the genetic profile of the cryopreserved progeny is representative of the preserved population.

Our results clearly showed that sperm cryopreservation is an appropriate method to preserve the male genetic potential of brown trout in the highly genetically structured Duero basin, even if the fertilization ability of the spermatozoa is reduced during freezing/thawing. Frozen samples could be used to recover the original population with the development of specific protocols of interspecific androgenesis, similar to those developed for trout [17], sturgeon [18] or golden Buenos Aires tetra [19]. Taking into account the prolificacy of this species, even a rate of success as low as 1% of fry after freezing/thawing, could provide sufficient individuals to recover stable populations without altering the genetic profiles of the preserved strains.

Acknowledgments

This work was supported by the project LE007A06 from the Junta de Castilla y León and by a PhD grant of the Diputación Provincial de León

References

1. Ryman N. Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: Differences between species. *Aquaculture* 1983;33: 1-21.
2. García-Marín JL, Utter FM, Pla C. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity* 1999;82: 46-56.
3. Machordom A, Suarez J, Almodovar A, Bautista JM. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations. *Mol Ecol* 2000;9: 1324-1338.
4. Sanz N, Garcia-Marin JL, Pla C. Divergence of brown trout (*Salmo trutta*) within glacial refugia. *Can J Fish Aquat Sci* 2000;57: 2201-2210.
5. García-Marín JL, Pla C. Origins and relationships of native populations of *Salmo trutta* (brown trout) in Spain. *Heredity* 1996;77: 313-323.
6. Bernatchez L. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 2001;55: 351-379.
7. Cagigas ME, Vazquez E, Blanco G, Sanchez JA. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. *Marine Biotechnology (NY)* 1999;1: 286-296.
8. Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornuet JM, Adriamanga M, Guyomard R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol Ecol* 1998;7: 339-353.

9. Bouza C, Castro J, Sanchez L, Martinez P. Allozymic evidence of parapatric differentiation of brown trout (*Salmo trutta* L.) within an Atlantic river basin of the Iberian Peninsula. *Mol Ecol* 2001;10: 1455-1469.
10. Cagigas ME, Vázquez E, Blanco G, Sanchez JA. Phylogeographical lineages in brown trout (*Salmo trutta*) : investigating microgeographical differentiation between native populations from Northern Spain. *Freshw Biol* 2002;47: 1879-1892.
11. Corujo M, Blanco G, Vazquez E, Sanchez JA. Genetic structure of northwestern Spanish brown trout (*Salmo trutta* L.) populations, differences between microsatellite and allozyme loci. *Hereditas* 2004;141: 258-271.
12. García-Marín JL, Jorde PE, Ryman N, Utter F, Pla C. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture* 1991;95: 235-249.
13. Martinez P, Arias J, Castro J, Sanchez L. Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from Northwestern Spain. *Aquaculture* 1993;114: 203-216.
14. Moran P, Pendas AM, Garcia-Vazquez E. Failure of stocking policy, of hatchery reared brown trout, *Salmo trutta* L., in Asturias, Spain, detected using LDH-5* as a genetic marker. *J Fish Biol* 1991;39: 117-122.
15. Corujo M. Nuevos datos de la estructura genética de las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta* L.) en la provincia de León; su integración en la descripción de la península Ibérica. Oviedo (Spain): Área de Genética. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo., 1999.
16. Roldan E, Garde J. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. In: Gomendio M (Ed), *Los Retos Medioambientales del siglo XXI. La Conservación de la Biodiversidad en España*. Bilbao: Fundación BBVA, 2004, pp. 283-307.
17. Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, Kuzminski H, Brzuzan P, Ciesielski S. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology* 2002;57: 1229-1249.

18. Grunina AS, Recoubratsky AV, Tsvetkova LI, Barmintsev VA. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. *International Journal of Refrigeration Issue with Special Emphasis on Cryobiology* 2006;29: 379-386.
19. David CJ, Pandian TJ. Cadaveric sperm induces intergeneric androgenesis in the fish, *Hemigrammus caudovittatus*. *Theriogenology* 2006;65: 1048-1070.
20. Billard R, Zhang T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: Watson PF, Holt WV (Eds), *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future*. London: Taylor and Francys, 2001, pp. 145-170.
21. Chao N-H, Liao IC. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 2001;197: 161-189.
22. Tiersch TR, Yang H, Jenkins JA, Dong Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65: 493-508.
23. Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 2000;54: 1477-1498.
24. Cabrita E, Alvarez R, Anel L, Rana KJ, Herraes MP. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 1998;37: 245-253.
25. Cabrita E, Anel L, Herraes MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology* 2001;56: 623-635.
26. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T. Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *J Exp Zool* 1999;284: 454-465.
27. Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 2003;47: 227-235.
28. Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development* 2001;60: 397-404.
29. Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herraes MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005;50: 144-153.

30. Mirzoyan AV, Nebesikhina NA, Voynova NV, Chistyakov VA. Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). International Journal of Refrigeration Issue with Special Emphasis on Cryobiology 2006;29: 374-378.
31. Van Der Walt LD, Van Der Bank FH, Steyn GJ. The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for the conservation of genetic diversity in African catfish (*Clarias gariepinus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 1993;106: 313-318.
32. Otémé Z. Sensitivity to inbreeding and sperm cryopreservation in the catfish *Heterobranchus longifilis* Valenciennes 1840. 1997 Proceedings of the Symposium Genetic and Aquaculture in Africa, Abidjan, Paris (France), 1998;257-268.
33. Erdahl D, Graham E. Cryopreservation of spermatozoa of the brown, brook and rainbow trout. Cryo Lett 1980;1: 203-208.
34. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 1991;10: 506-513.
35. Lerceteau-Kohler E, Weiss S. Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. Aquaculture 2006;258: 641-645.
36. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman and Co, 1995.
37. Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. Evolution 1989;43: 223-225.
38. Drokin S, Stein H, Bartscherer H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta F. fario*). Cryobiology 1998;37: 263-270.
39. Labbe C, Maisse G. Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. Aquaculture 2001;201: 287-299.

40. Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquac Res* 1997;28: 471-479.
41. Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. *Cryobiology* 2003;46: 43-52.
42. Cabrita E, Robles V, Cunado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herraes MP. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* 2005;50: 273-284.
43. Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H, Strzezek J, Demianowicz W. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 2001;56: 177-192.
44. Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biol Reprod* 2008;78: 390-399.
45. Cabrita E, Alvarez R, Anel E, Herraes MP. The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Anim Reprod Sci* 1999;55: 279-287.
46. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250: 66-69.
47. Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006;73: 1338-1344.
48. Cabrita E, Martinez F, Alvarez M, Herraes MP. The use of flow cytometry to assess membrane stability in fresh and cryopreserved trout spermatozoa. *Cryo Lett* 2001;22: 263-272.
49. Dietrich GJ, Szyrka A, Wojtczak M, Dobosz S, Goryczko K, Zakowski L, Ciereszko A. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 2005;64: 1809-1822.

50. Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Herraiz MP. Chromatin fragmentation and oxidization during short- and long-term storage of sex reversed rainbow trout sperm. 8th international symposium on reproductive physiology of fish, Saint-Malo, France, 2007.
51. Saperas N, Ausio J, Lloris D, Chiva M. On the evolution of protamines in bony fish: alternatives to the "retroviral horizontal transmission" hypothesis. *J Mol Evol* 1994;39: 282-295.
52. Cabrita E Identificación de los daños producidos por la congelación seminal en la membrana plasmática de los espermatozoides de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y optimización de los protocolos de criopreservación. PhD Thesis, 2002. University of León, León (Spain).

CAPÍTULO 2

Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method

S. Martínez-Páramo¹, S. Pérez-Cerezales¹, V. Robles², L. Anel³, M.P. Herráez¹

¹Department of Molecular Biology, Area of Cell Biology,
University of León, León, Spain

²Center of Regenerative Biology in Barcelona, Barcelona, Spain

³Department of Pathology, University of León, León, Spain

Cryobiology

Aceptado para publicar el 20 de Marzo de 2008

Publicado: Volume 56, March 2008, Pages 216-222

Abstract

The cryopreservation of fish embryos is a challenge because of their structure, with multiple compartments and permeability barriers, and their high chilling sensitivity. Vitrification at advanced developmental stages is considered to be the more promising option. Nevertheless, all reported attempts have failed. Previous studies demonstrated a better ability for freezing in species that naturally express antifreeze proteins (AFPs). These proteins have been delivered into other fish embryos using time-consuming techniques like microinjection. In the present study, the introduction of FITC labelled AFPs was assayed in zebrafish embryos at early developmental stages (from 2-cell to high blastula stage), before the formation of the yolk syncytial layer, by an easy and non-invasive method and evaluated by fluorescence and confocal microscopy. Incubation with AFPs at 128-cell or high blastula stage provides incorporation of the protein in 50%-90% of embryos without affecting hatching. Incubation in media containing protein is a simple, harmless and effective method which makes it possible to treat several embryos at the same time. AFPs remain located in derivatives from marginal blastomeres: the yolk syncytial layer, the most cryosensitive and impermeable barrier, and different digestive organs. Our findings demonstrate that delivery of AFP type I and AFP type III into zebrafish embryos by incubation in media containing protein is a simple and harmless method that may improve cryoprotection of the cellular compartment.

1. Introduction

Fish embryo cryopreservation is a challenge for cryobiologists bearing in mind its possible applications in breeding and selection management in aquaculture, wildlife conservation programmes and the banking of particular species or strains with biotechnological or ecotoxicological value, as well as its importance as a basic cryobiological problem. Despite numerous efforts, no hatching rates or developmental ability have been reported after freezing embryos from marine or freshwater species, neither from warm nor temperate waters. The main handicaps for cryopreservation of embryos are: their large size, high lipid content, the nature of their structure with multiple compartments and barriers that render them very impermeable to cryoprotectants (CPAs) and water, and their high sensitivity to chilling [3].

Previous studies performed with winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), a sub-arctic species, have revealed some developmental ability in embryos subjected to a vitrification protocol [28]. This greater ability for freezing was attributed to the expression of antifreeze proteins (AFPs) in this species, reported as early as hatch [22; 23]. AFPs are natural CPAs able to adsorb ice crystals and prevent their further growth, avoiding the formation of crystals during freezing as well as recrystallization during thawing, and reducing cellular damage [11; 32; 35]. The introduction or expression of these proteins in other species may also improve their response to vitrification or even make it possible to use slow freezing protocols. Several studies have been conducted in mammals to determine whether AFPs could improve the viability of cryopreserved oocytes and embryos from different species, mainly by adding them to the external medium. The results of these studies are controversial; most authors have reported that these proteins have a positive effect on cryopreservation or hypothermic storage [1; 5; 7; 10; 18; 25; 30; 31], whereas others have reported no effect, controversial effects or even negative ones [6; 21].

Taking into account the low permeability reported for fish embryo membranes, several methods have been applied for delivering substances into them, microinjection being the method of choice for the introduction of cryoprotectants, proteins, RNA or DNA [2; 15; 16; 20; 26]. To incorporate AFPs, microinjection was assayed by our group using turbot and seabream embryos [26; 27]. Nevertheless, preliminary assays showed

that mechanical damage prompted by microinjection increased embryo breakdown during vitrification and thawing. Any manipulation causing additional injury to embryos should be avoided before freezing. Recent studies showed a non-invasive alternative method for introducing foreign material into developing zebrafish embryos using the application of femtosecond laser pulses [19]. In spite of their successful results, this technique requires a high level of expertise as well as very specific equipment, and their compatibility with further cryopreservation has not been analyzed. Like microinjection, the pore created by the laser could induce irreversible damage during the freeze/thawing process.

As demonstrated by Hagedorn [13], the yolk syncytial layer (YSL) surrounding the yolk, is the main permeability barrier, whereas the chorion is a semi-permeable barrier that allows the penetration of small-sized molecules [4]. Formation of YSL starts at early blastula (approx. 3 hours post fertilization -hpf-) (Zebrafish Book; http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html), but these early stages are reported to be inadequate for freezing [33]. However, because of their toxic effects, cryoprotectants cannot be introduced into the embryos a long time before freezing. AFPs from winter flounder are small molecules (7.8 kDa AFPI and 9.5 kDa AFPIII), which may be able to penetrate the zebrafish chorion. In contrast, AFPs have no toxic effects and could be introduced in early stages without expecting negative effects on embryo development and, subsequently, cryopreservation could proceed at later developmental stages. In this study, the incubation of embryos at early developmental stages in AFPs will be carried out and the penetration of these proteins will be analysed.

2. Material and methods

All chemicals were obtained from Sigma (Madrid, Spain). Media, except L-15, were not bought as such but prepared in our laboratory as referred to in the text.

2.1. Animal care and obtaining embryos

Zebrafish adults (*Danio rerio*) were maintained in 45-litre aquaria with recirculating water at 28 °C, under a 14h light / 10h dark cycle. The fish were fed twice daily with artemia and fish dry pellets (TetraMin®, Germany). Zebrafish were separated by sex in different aquaria before breeding. For spawning three females and two males were placed together in a mating tank during the late afternoon. This mating tank contained a glass tray covered with a plastic net and plastic aquarium plants. At the beginning of the light period the fish spawned and the eggs laid in the tray were protected from predation by the net. Two hours after spawning, the tray was removed and the eggs collected. Embryos were washed once with non-chlorinated water to eliminate food and organic residues, and twice with a methylene blue solution (2 mg/l H₂O) to eliminate possible parasites. Finally, the embryos were washed three times with embryo medium (EM) (Zebrafish Book; http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html), in which they were incubated at 28 °C until reaching the appropriate developmental stage.

2.2. Protein incorporation at different developmental stages

Incorporation of fluorescein isothiocyanate (FITC) labelled AFPI from winter flounder and AFPIII from ocean pout (A/F Protein Canada 2000 Inc., St John's, Canada) into the embryos was assayed at four developmental stages, 2-8 cell (0.75-1.25 hpf), 16-64 cell (1.50-2 hpf), 128-cell (2.25 hpf) and high blastula (HB) (3.3 hpf). Lyophilized proteins were diluted (2 mg/ml) in 0.1 M PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7.2) and stored at -20 °C until used. The penetration and location of the proteins in the embryo compartments was analyzed using fluorescence microscopy and confocal microscopy. All FITC-AFP solutions and embryos incubated with these proteins were always kept in darkness to avoid losses of FITC emission.

Embryos at each developmental stage were placed in 24-well flat-bottomed culture plates (Corning Inc, NY, USA) (20 embryos/well) after washing with methylene blue solution and EM. The medium was removed leaving the embryos in 500 µl of EM, then 25 µl pronase (25 mg/ml in PBS) was added, and the plates were shaken for 2 minutes. Finally, the embryos were washed with EM. The treatment promotes chorion

permeabilization but not chorion removal. The embryos were then incubated with 500 μ l of L-15 medium 6% fetal bovine serum (FBS) (Sigma, Madrid, Spain) and 10 μ l of a 2 mg/ml solution FITC-AFP-I or FITC-AFP-III in PBS per well, giving a final protein concentration of 40 μ g/ml. Incubation was performed at 28 °C for 4h after which the embryos were washed with EM to eliminate the excess of AFPs in order to avoid background fluorescence.

Protein penetration into the embryos was evaluated at 5-somites stage (11.7 hpf) using an inverted fluorescence microscope (Nikon eclipse TE2000-U) equipped with a specific objective (Nikon plan Fluor 10X/0.30) and a B filter (Nikon) and its location was analyzed with a confocal microscope RADIANCE 2000 (Bio-Rad).

2.3. Determination of optimal incubation conditions

Once the developmental stages allowing protein incorporation were established, a factorial experiment was carried out in triplicate with HB embryos, to analyze the effect of embryo number per well, the previous treatment of embryos with pronase to increase the chorion permeability and the incubation time with the proteins, as described in the flow chart (Fig. 1).

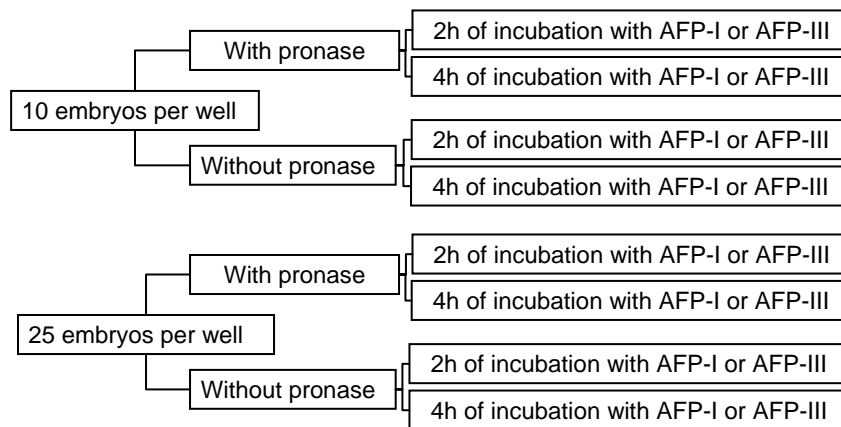


Fig. 1: Experimental development to determine incubation conditions

Protein penetration into the embryos was evaluated at 5-somites stage using an inverted fluorescence microscope. The chorion was removed with forceps to avoid the retention of labelled protein in the perivitelline space which makes microscopic evaluation difficult. Embryos were classified as negative, positive or strongly positive according to the fluorescence detected in the embryos (Fig. 2).

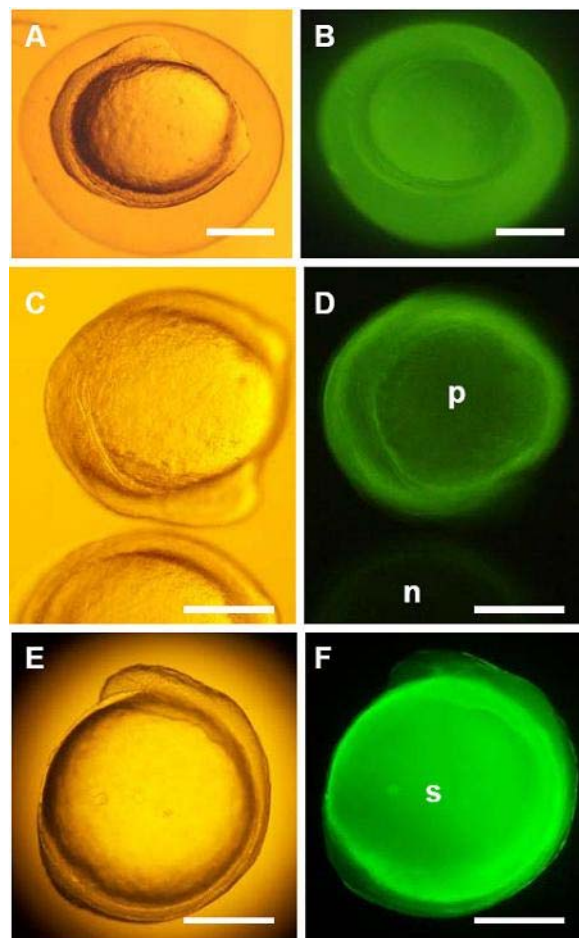


Fig. 2: Embryos at the 5-somites stage under bright field and fluorescence microscopy. First embryo (**A** and **B**) has chorion and shows widespread fluorescence. Dechorionized embryos (**C-F**) are classified as positive (**D-p**), negative (**D-n**) and strongly positive (**F-s**) according to the intensity of fluorescence in the yolk compartment. Scale bar: 250 μ m.

2.4. Effect of AFP incorporation and protein location

Once the incubation conditions were established, the effects of treatment on the hatching rate and protein location inside the embryos during development were analyzed. Embryos at the 128-cell and HB stages, 100 embryos per stage, were placed in a 24-well plate (25 embryos/well) and incubated with 500 μ l L-15 medium 6% FBS and 10 μ l FITC-AFPI or FITC-AFP3 solution (2mg/ml in PBS) at 28 °C for 4 hours. The experiment was performed in triplicate.

Embryos were washed with EM and incubated on it at 28 °C. At the 5-somites stage 25 embryos treated in 128-cell and 25 embryos treated at HB with AFPs, were fixed in paraformaldehyde 2% (w/v) in Sorensen buffer (16% (v/v) solution A: 9.066 g KH_2PO_4 / 1 H_2O ; 84% (v/v) solution B: 23.866 g Na_2HPO_4 / 1 H_2O), for 4 hours at 4 °C, and then washed three times with Sorensen buffer, for microscopic evaluation. Embryos that were not fixed (75 embryos per stage) were incubated in EM to calculate the hatching rate. Larvae were fixed in the paraformaldehyde solution as described above for microscopic analysis and were classified as negative, positive or strongly positive according to the emission of fluorescence.

The location of proteins was determined by analyzing the embryos and larvae with a confocal microscope RADIANCE 2000 (Bio-Rad). An image record for the different embryo optical section was undertaken for each sample.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using the computerized package generated by SPSS 15.0 software for Windows. Results were expressed as means \pm SEM.

For determination of the optimal incubation conditions in AFPs, initially a four-way ANOVA analysis was used to determine the existence of interaction between factors ($p < 0.05$). Next, comparison between means was carried out using a Student's t-test for independent variables, following a comparison of the standard deviation similarity using a Levene test ($p < 0.05$).

The effect of treatments on survival rate and the percentage of embryos that incorporated the proteins for each treatment were analyzed using a one-way ANOVA

analysis, after a previous testing of interaction between factors by a two-way ANOVA analysis ($p < 0.05$). Significant differences between control embryos, type of AFPs and developmental stage were detected by a multiple range test, the SNK test (Student–Newman–Keuls) ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Protein incorporation at different developmental stages

After incubation with FICT-AFPs, the proteins entered through the chorion and remained in the perivitelline space, and all the incubated embryos were fluorescent (Figs. 2A, 2B). Embryos incubated with the proteins at the two earliest stages (2-8 cell and 16-64 cell) did not show any fluorescence after chorion removal and washing. Analysis with confocal microscopy demonstrated that all the FITC-AFP remained on the chorion or on the chorion and also in the perivitelline space, without any sign of FITC-AFP inside the embryo (Fig. 3).

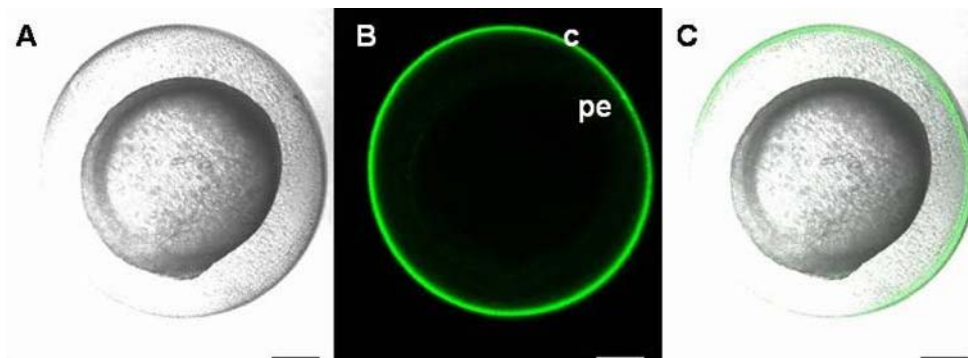


Fig. 3: Embryos at 5-somites stage. Confocal images (**A**: transmission, **B**: fluorescence and **C**: merge) show that protein is retained in the chorion (**c**). Also, traces of FITC-AFPI are located in the perivitelline space (**pe**). Scale bar: 250 μ m.

In contrast, most embryos incubated with the proteins at 128-cell or HB stage, displayed fluorescence of a different intensity in the yolk sac. Figure 2 shows the classification of the embryos as negative (Fig. 2D, n), positive (Fig. 2D, p) or strongly positive (Fig. 2F, s) according to the fluorescence detected in the yolk sac.

3.2. Determination of optimal incubation conditions

The 4 way ANOVA analysis performed to analyze the factors that could affect protein incorporation in HB embryos, revealed that the penetration of protein into the embryos was independent of the type of AFP (Fig. 4). A slight interaction was detected between the pronase treatment and the type of AFP: when embryos were treated with pronase, the penetration of AFPIII was significantly higher than that of APFI after two hours of incubation (90% and 33.33% positive embryos, respectively), but results after 4 hours of incubation were similar using both AFPs (73.32% and 53.08% positive embryos, respectively). The number of embryos per well, did not affect the percentage of embryos that incorporated the proteins. However, longer incubation times increased the percentage of strongly positive embryos (15.42% after 2h and 42.43% after 4h). This increase was shown with AFPI and AFPIII, and was independent of previous treatment with pronase.

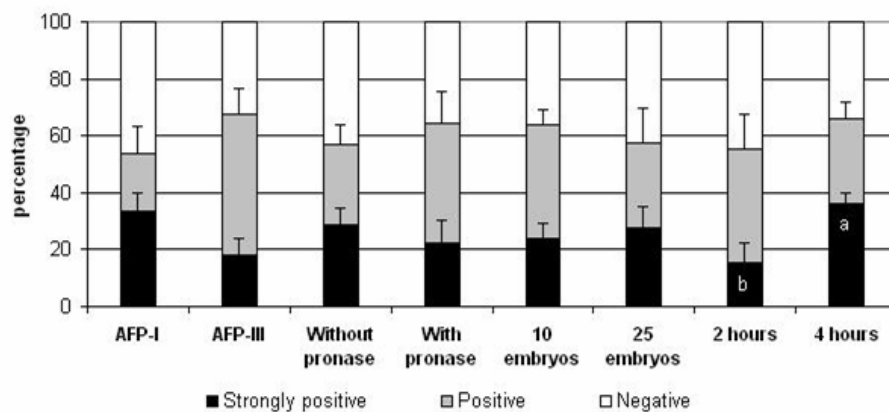


Fig. 4: Percentage of embryos that incorporated the protein. Bars indicate S.E.M. Letters show differences between strongly positive embryos for each period of incubation ($p < 0.05$).

3.3. Effect of AFP incorporation and protein location

The treatment for the incorporation of AFPs was not harmful to embryos, as shown by the percentage of embryos that survived at hatching (Fig. 5), the hatching rates of treated embryos being similar to that of their respective control. Nevertheless, survival

was lower when embryo handling took place at 128-cell (hatching rates ranging from 72% to 20%) than at HB stage (ranging from 100% to 56%).

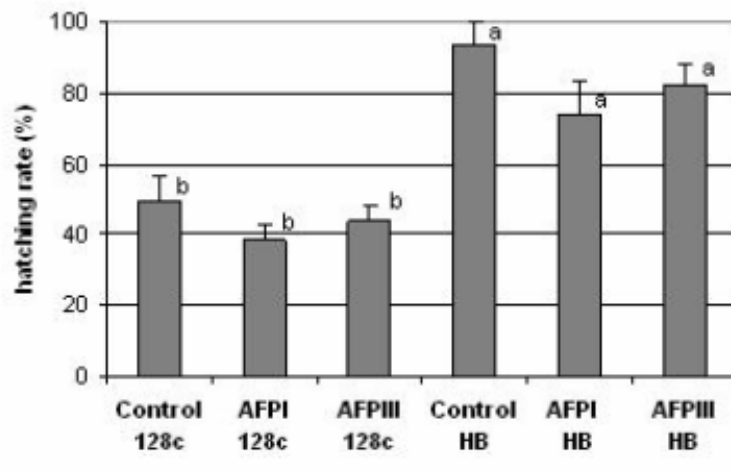


Fig. 5: The effect of treatment on hatching rate. Bars indicate S.E.M. Letters show differences between treatments and developmental stages ($p < 0.05$).

Most of the treated embryos incorporated the AFPs and significant differences were not observed for the penetration of AFPI or AFPIII into the embryos at HB or 128-cell stages. The percentage of embryos incorporating the protein (positive and strongly positive) ranged from 50% to 90% (Fig. 6). Incubation with AFPIII at 128-cell allows the incorporation of the protein in 90% of the embryos, 73% of them being strongly positive.

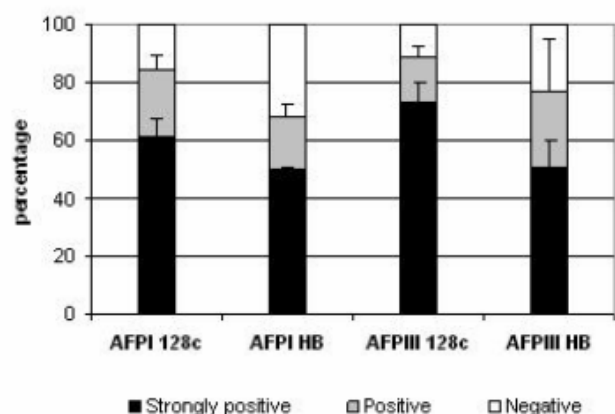


Fig. 6: Percentage of embryos that incorporated Type I or Type III protein for each developmental stage. Bars indicate S.E.M.

Confocal microscopy showed that proteins are not located inside the yolk sac in 5-somite embryos, but in the surrounding layer. The yolk syncytial layer appears to be strongly fluorescent in embryos that incorporated the labelled AFPs, regardless of the type of protein, when incubation take place at 128-cell or HB stages (Fig. 7). This demonstrated that proteins are mainly incorporated in the yolk syncytial layer, and not inside the yolk sac.

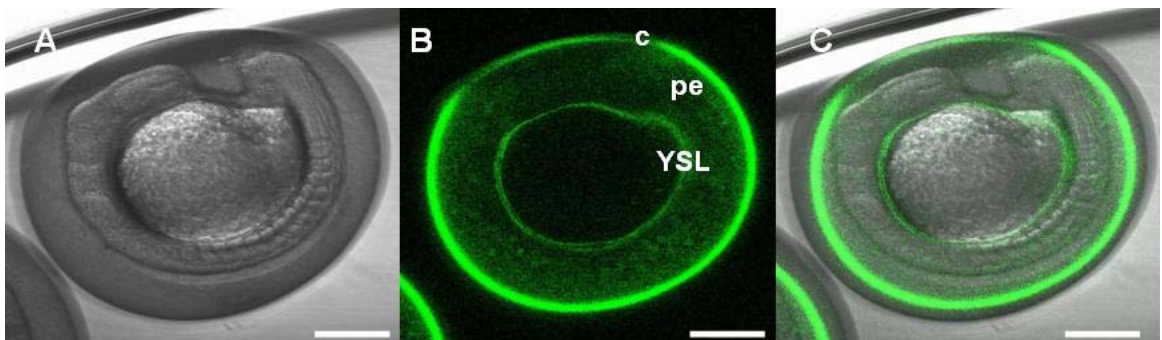


Fig. 7: Embryo during its segmentation period of development. Confocal images (A: transmission, B: fluorescence and C: merge) show the penetration of the protein into the perivitelline space (pe) and in the yolk syncytial layer (YSL). Also, part of the protein is retained in chorion (c). Scale bar: 250 μ m.

After hatching, larvae showed fluorescence emission, which confirmed that proteins incorporated at early stages were maintained in the embryos during development. In larvae the proteins were observed in different locations according to the stage of incubation with AFPs. When the embryos were incubated with the protein at HB stage, labelled proteins remains in the syncytial layer surrounding the yolk sac of the larvae (Fig. 8). However, when embryos incorporated the proteins at the 128-cell stage, fluorescence was also observed in some other structures. Proteins appear in different larvae located in organs such as pharynx, liver and/or pancreas, which derive from anterior endoderm (Fig. 9).

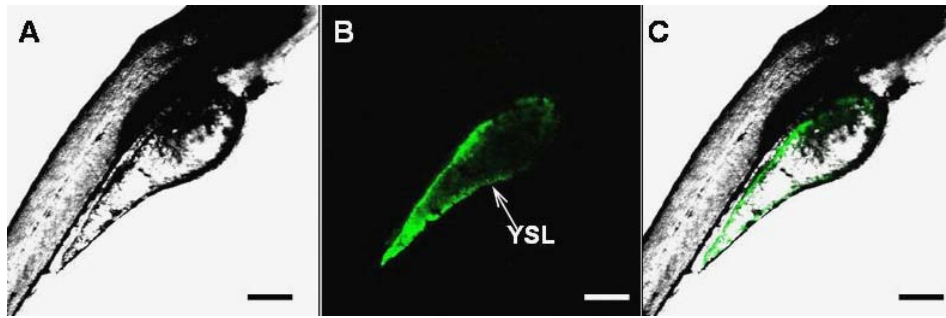


Fig. 8: Embryos incubated in FITC-AFPI at the HB stage and observed under confocal microscopy (A: transmission, B: fluorescence and C: merge) after hatching show penetration of labelled proteins into the yolk syncytial layer (YSL). Scale bar: 250 μ m.

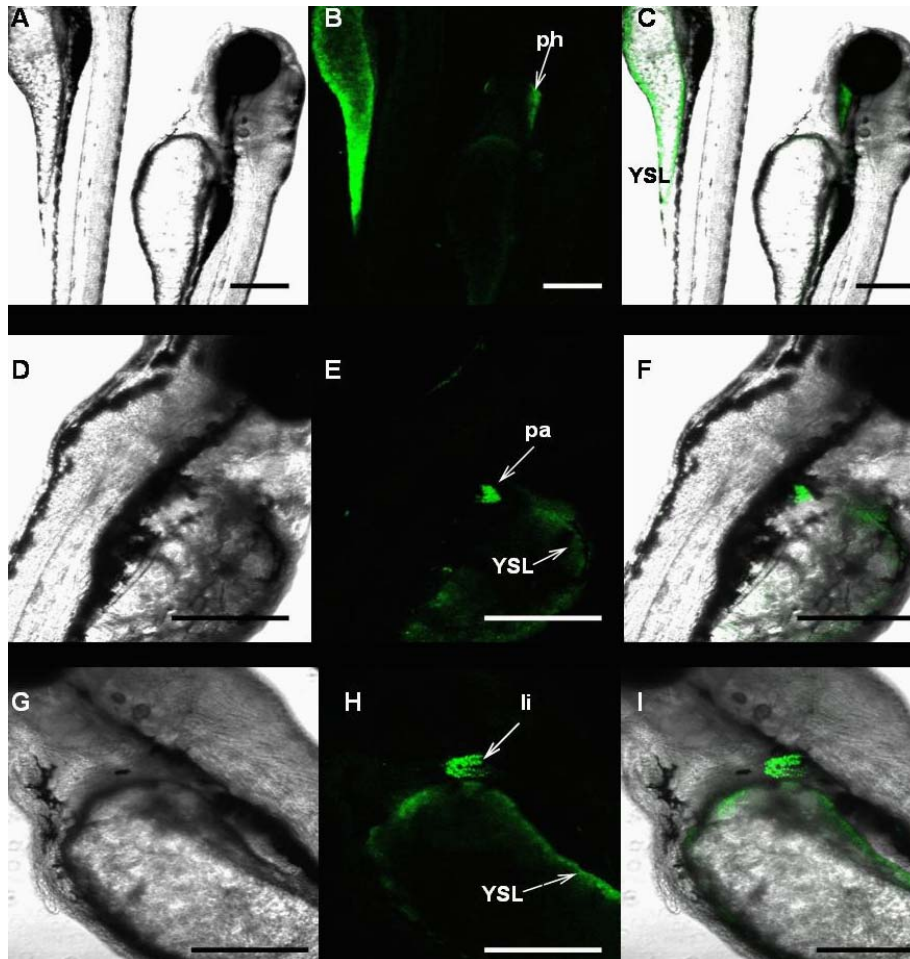


Fig. 9: Embryos incubated in FITC-AFPIII at the 128-cell stage and observed under confocal microscopy (A: transmission, B: fluorescence and C: merge) after hatching. Cells of the yolk syncytial layer (YSL; 10X) and cells that originated the pharynx (ph; 10X), the pancreas (pa; 20X) or the liver (li; 20X) incorporated the protein. Scale bar: 250 μ m.

4. Discussion

The zebrafish is widely used as a model in developmental biology and many of the studies on fish embryo freezing have been performed with this species. The permeability of embryo membranes to cryoprotectants and water has been analyzed using different methods, from volumetric approaches [12; 40] to HPLC [4], MR spectroscopy or MR microscopy [12] as well as impedance spectroscopy [41], demonstrating a low rate of exchange between the embryo and the external medium. The analysis of cryoprotectant penetration to the embryo compartments reveals that chorion, the most external embryo barrier, allows the movement of some cryoprotectants and water between the medium and the perivitelline space [4; 29], but indicates that the YSL is a very impermeable structure that avoids cryoprotectant penetration and dehydration of the yolk sac [13; 14]. Under such conditions, concentrations of CPAs in the yolk are too low to protect this structure and water content is very high, thus allowing the formation of ice crystals during freezing and recrystallization during thawing. These events cause structural damage in the YSL and, frequently, total embryo destruction [13; 29; 39].

Attempts to deliver cryoprotectants into the yolk sac by microinjection have been made by different researchers, with a good tolerance to several CPAs being shown, even at vitrifying concentrations [2; 27]. Nevertheless, this process allows the penetration of the substance in the embryo compartment in which it is microinjected, but does not allow its diffusion through other compartments or reduce injuries caused during vitrification in the YSL [16; 27].

Our results show that zebrafish chorion is permeable to AFPs, which penetrated to the perivitelline space in all the treated embryos. Pronase permeabilization increased AFPIII incorporation at short incubation times, but did not improve the penetration of AFPI. This could be due to the bigger size of AFPIII (9.5 kDa): pores created by pronase could facilitate the penetration of AFPIII in the perivitelline space. The smaller size of AFPI (7.8 kDa) enables free diffusion through the chorion without previous treatment with pronase. Nevertheless, four hours of incubation with the proteins allows the same percentage of positive embryos to be obtained without pronase treatment. So, this previous treatment could be avoided if longer periods of incubation are used.

Embryos at earlier stages (from 2- to 64-cell) were not permeable to the AFPs located in the perivitelline space. Nevertheless, at later developmental stages, these proteins were incorporated in some embryo structures in a high percentage of embryos and were stable inside them, remaining in the tissues until hatching. Simple incubation of embryos at specific developmental stages in the media containing AFPs, seems to be sufficient to allow protein incorporation in specific cells. Early zebrafish embryos are considered very sensitive to manipulation [12]. Nevertheless, our results demonstrated that reduction of hatching rate caused by handling at 128-cell stage is slight and compatible with further treatments, being this stage very convenient from the point of view of AFPs penetration. Early embryos have a simpler structure than those required for cryopreservation procedures (3-5 somites). The YSL, which prevents cryoprotectant incorporation into the embryos, is formed at the time of the 9-10th cleavage from a set of marginal blastomeres. Classic studies on the fate of blastomeres have revealed that tracers injected into these marginal cells at 64-, 128- and 256-cell stages (6-7 and 8th cleavage) produced a labelled YSL, but also many labelled cells within the blastoderm, which are present in clusters and strings around the circumference of the blastoderm [17]. When tracers were injected into the YSL after its formation, at the HB or early blastula stages, little or no dye passage to the blastoderm could be detected. These results indicate that marginal blastomeres, present at the 128-cell stage, originate the YSL and some other structures. Moreover, these studies show that, once YSL is formed and until early gastrulation, communication between the blastoderm and the yolk cell is progressively lost [17]. Detailed topological fate maps at the 128-cell stage are unavailable, as important cell mixing takes place during early epiboly. The marginal region experiences little mixing during the doming process [36], and according to Wallace and Pack [34] progenitors of the pharynx, oesophagus, liver and pancreas also reside at the blastoderm margin. These authors describe that the intestinal anlagen of zebrafish derives from an endodermal structure, and the pharynx, oesophagus, liver and pancreas arise from a common endoderm cluster rostral to this primitive endodermal tube. Differentiation of these progenitors into distinct cell lineages and the formation of the organ anlagen, take place later, between 24 and 52 hpf in zebrafish embryos [8; 9; 24; 38]. The pattern of AFPs distribution after hatching, in the embryos incubated at the 128-cell stage, indicates that marginal blastomeres are able to capture the protein from the

perivitelline space. The penetration of AFPs in these marginal cells allows the distribution of the proteins in specific locations: the YSL and the digestive organs derived from a common set of marginal cells. Nevertheless, incubation at HB only facilitates the incorporation into the YSL and no further communication with other embryo cells occurs.

Independently of the cells that incorporated the AFPs, the internalized proteins remain in them or their derivatives, without diffusing through other tissues. Incorporation at earlier stages, could promote a widespread distribution of the proteins, because all the blastomeres are interconnected by cytoplasmic bridges before the 5th division, allowing small molecules, such as AFPs, to travel from one cell to another [37]. If some of these blastomeres were able to capture the proteins from the perivitelline space, a wider distribution could be expected. Nevertheless, our results demonstrated that blastomeres of embryos at these earlier stages, were not able to incorporate the AFPs from the perivitelline space, suggesting that penetration of the protein is only possible after the formation of the marginal blastomeres layer.

The penetration of the protein is restricted to a narrow period during the embryo development (when marginal blastomeres are defined) and to the cellular compartment and no traces of fluorescence were observed inside the yolk. Similarly, AFPs microinjected into the turbot yolk sac at 72 hpf, were not incorporated in the embryo cells [27], demonstrating a very selective transport of molecules between yolk and cellular compartment.

The incorporation of AFPs in the YSL and other specific organs described in this work, would not be enough to avoid all damage caused by the cryopreservation process. Nevertheless, the presence of AFPs in the YSL represents an important achievement, bearing in mind that this envelope is impermeable to traditional CPAs and is considered a major focus of damage. So, new protocols of cryopreservation could be designed using a combination of AFPs and traditional CPAs, which could reduce damage in cryopreserved embryos.

In conclusion we can state that the delivery of AFPI and AFPIII into zebrafish embryos by incubation in media containing protein is a simple method, easy to perform. The next aim of our study will be to analyze the effect of AFPs in cryopreservation of fish embryos. This is the first report on the direct incorporation of AFPs in fish embryos.

Therefore, the method has to be optimized by evaluating different protein concentrations and developmental stages for incubation. Future studies on the use of appropriate protein carriers or the artificial expression of AFPs could also provide a widespread location of AFPs in the embryo, and could significantly increase the beneficial effects of AFPs for fish embryo freezing.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology, Project INIA/MCYT ACU02-002-C2 and by a PhD grant of the Diputación Provincial de León

References

- [1] A. Arav, G. Ramsbottom, A. Baguisi, B. Rubinsky, J.F. Roche, M.P. Boland, Vitrification of bovine and ovine embryos with the MDS technique and antifreeze proteins, *Cryobiology* 30 (1993) 621-622.
- [2] J. Beirao, V. Robles, M.P. Herraéz, C. Sarasquete, M.T. Dinis, E. Cabrita, Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture* 261 (2006) 897-903.
- [3] R. Billard, T. Zhang, Techniques of genetic resource banking in fish. in: P.F. Watson, and W.V. Holt, (Eds.), *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future*, Taylor and Francys, London, 2001, pp. 145-170.
- [4] E. Cabrita, V. Robles, O. Chereguini, P. de Paz, L. Anel, M.P. Herraéz, Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol, *Theriogenology* 60 (2003) 463-473.
- [5] L. Chen, W.Y. Huang, Y. Luoh, M. Wu, Cryopreservation of porcine oocytes before and after polar body formation by antifreeze protein type III, *Taiwan Livestock Res* 28 (1995) 169-179.

- [6] B.P. Ducker, C.P. Chen, P.L. Davies, V.K. Walker, Antifreeze protein does not confer cold tolerance to transgenic *Drosophila melanogaster*, *Cryobiology* 32 (1995) 521-527.
- [7] Y.B. Fei, L.P. Wei, S.Q. Gao, H.B. Zhu, Y.R. Luo, Z.X. Zhang, Additive of AFGPs in enhancing survival rate of frozen swine embryos, *Anim Reprod Heilongjiang* 3 (1995) 21-23.
- [8] H.A. Field, P.D.S. Dong, D. Beis, D.Y.R. Stainier, Formation of the digestive system in zebrafish. ii. pancreas morphogenesis*, *Developmental Biology* 261 (2003) 197-208.
- [9] H.A. Field, E.A. Ober, T. Roeser, D.Y.R. Stainier, Formation of the digestive system in zebrafish. I. liver morphogenesis, *Developmental Biology* 253 (2003) 279-290.
- [10] G.L. Fletcher, S.V. Goddard, Y. Wu, Antifreeze proteins and their genes: from basic research to business opportunity, *Chemtech* 29 (1999) 19-28.
- [11] G.L. Fletcher, C.L. Hew, P.L. Davies, Antifreeze proteins of teleost fishes, *Annual Review of Physiology* 63 (2001) 359-390.
- [12] M. Hagedorn, E. Hsu, F.W. Kleinhans, D.E. Wildt, New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation, *Cryobiology* 34 (1997) 335-347.
- [13] M. Hagedorn, F.W. Kleinhans, D. Artemov, U. Pilatus, Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo, *Biology of reproduction* 59 (1998) 1240-1250.
- [14] M. Hagedorn, F.W. Kleinhans, D.E. Wildt, W.F. Rall, Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*, *Cryobiology* 34 (1997) 251-263.
- [15] M. Hagedorn, S.L. Lance, D.M. Fonseca, F.W. Kleinhans, D. Artimov, R. Fleischer, A.T. Hoque, M.B. Hamilton, B.S. Pukazhenti, Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation, *Biology of reproduction* 67 (2002) 961-966.
- [16] M. Janik, F.W. Kleinhans, M. Hagedorn, Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*), *Cryobiology* 41 (2000) 25-34.

- [17] C.B. Kimmel, R.D. Law, Cell lineage of zebrafish blastomeres : III. Clonal analyses of the blastula and gastrula stages, *Developmental Biology* 108 (1985) 94-101.
- [18] C.A. Knight, J. Hallett, A.L. DeVries, Solute effects on ice recrystallization: An assessment technique, *Cryobiology* 25 (1988) 55-60.
- [19] V. Kohli, V. Robles, M.L. Cancela, J.P. Acker, A.J. Waskiewicz, A.Y. Elezzabi, An alternative method for delivering exogenous material into developing zebrafish embryos, *Biotechnology and Bioengineering* 98 (2007) 1230-1241.
- [20] E. Linney, N.L. Hardison, B.E. Lonze, S. Lyons, L. DiNapoli, Transgene expression in zebrafish: a comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches, *Developmental Biology* 213 (1999) 207-216.
- [21] J.A. Mugano, T. Wang, J.R. Layne, A.L. De Vries, R.E. Lee, Antifreeze glycoproteins promote lethal intracellular freezing of rat cardiomyocytes at high subzero temperatures, *Cryobiology* 32 (1995) 556-557.
- [22] H.M. Murray, C.L. Hew, G.L. Fletcher, Skin-type antifreeze protein expression in integumental cells of larval winter flounder, *Journal of Fish Biology* 60 (2002) 1391-1406.
- [23] H.M. Murray, C.L. Hew, G.L. Fletcher, Spatial expression patterns of skin-type antifreeze protein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) epidermis following metamorphosis, *J Morphol* 257 (2003) 78-86.
- [24] A.N.Y. Ng, T.A. de Jong-Curtain, D.J. Mawdsley, S.J. White, J. Shin, B. Appel, P.D.S. Dong, D.Y.R. Stainier, J.K. Heath, Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis, *Developmental Biology* 286 (2005) 114-135.
- [25] L. O'Neil, S.J. Paynter, B.J. Fuller, R.W. Shaw, A.L. DeVries, Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me₂SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature, *Cryobiology* 37 (1998) 59-66.
- [26] V. Robles, V. Barbosa, M.P. Herraez, S. Martinez-Paramo, M.L. Cancela, The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures, *Theriogenology* 68 (2007) 284-289.
- [27] V. Robles, E. Cabrita, L. Anel, M.P. Herraez, Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution, *Aquaculture* 261 (2006) 1299-1306.

- [28] V. Robles, E. Cabrita, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, M.P. Herraéz, Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species, *Theriogenology* 64 (2005) 1633-1646.
- [29] V. Robles, E. Cabrita, M. Real, R. Alvarez, M.P. Herraéz, Vitrification of turbot embryos: preliminary assays, *Cryobiology* 47 (2003) 30-39.
- [30] B. Rubinsky, A. Arav, A.L. De Vries, Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins, *Cryo Letters* 12 (1991) 93-106.
- [31] B. Rubinsky, A. Arav, A.L. Devries, The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes, *Cryobiology* 29 (1992) 69-79.
- [32] M.M. Tomczak, L. Vigh, J.D. Meyer, M.C. Manning, D.K. Hinch, J.H. Crowe, Lipid unsaturation determines the interaction of AFP type I with model membranes during thermotropic phase transitions, *Cryobiology* 45 (2002) 135-142.
- [33] J. Valdez, Delgado M., A. Miyamoto, T. Hara, K. Edashige, M. Kasai, Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages, *Theriogenology* 64 (2005) 112-122.
- [34] K.N. Wallace, M. Pack, Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish, *Developmental Biology* 255 (2003) 12-29.
- [35] J.-H. Wang, A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation, *Cryobiology* 41 (2000) 1-9.
- [36] E.T. Wilson, C.J. Cretokos, K.A. Helde, Cell mixing during early epiboly in the zebrafish embryo, *Dev Genet* 17 (1995) 6-15.
- [37] K. Woo, J. Shih, S.E. Fraser, Fate maps of the zebrafish embryo, *Current Opinion in Genetics & Development* 5 (1995) 439-443.
- [38] N.S. Yee, K. Lorent, M. Pack, Exocrine pancreas development in zebrafish, *Developmental Biology* 284 (2005) 84-101.
- [39] T. Zhang, D.M. Rawson, Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, *Cryobiology* 33 (1996) 1-13.
- [40] T. Zhang, D.M. Rawson, Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol, *Cryobiology* 37 (1998) 13-21.

- [41] T. Zhang, R.Y. Wang, Q.-Y. Bao, D.M. Rawson, Development of a new rapid measurement technique for fish embryo membrane permeability studies using impedance spectroscopy, *Theriogenology* 66 (2006) 982-988.

CAPÍTULO 3

Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos

S. Martínez-Páramo¹, V. Barbosa², S. Pérez-Cerezales¹, V. Robles³, M.P. Herráez¹

¹Department of Molecular Biology, Area of Cell Biology,
University of León, León, Spain

²CCMAR, Center for Marine Sciences, University of Algarve, Faro, Portugal

³Center of Regenerative Biology in Barcelona, Barcelona, Spain

Cryobiology

Aceptado para publicar el 12 de Septiembre de 2008

Abstract

Fish embryo cryopreservation, which is useful in aquaculture or biodiversity conservation, is still far from being achieved. Structural barriers reduce the entrance of cryoprotectants into embryo compartments. Previous studies demonstrated a better ability for freezing in Arctic species which naturally express antifreeze proteins (AFPs). In this study, AFPs were delivered in early zebrafish embryos by incubation in media containing protein. Their cryoprotective effects were then analyzed. Chilling sensitivity was evaluated at 4 °C and -10 °C. Survival rates significantly increased in embryos incorporating AFPI and kept at -10 °C. To analyze their effects on cryopreservation, 5-somite embryos were vitrified. Incorporation of AFPI reduced the percentage of embryos that collapsed at thawing (14.2% of AFPI-treated embryos and 48.9% of controls). Cellular damage caused by vitrification was assessed after thawing by cell dissociation and further analysis of cell survival in culture (SYBR-14/IP labeling). The percentage of viable cells at thawing ranged from 25% to 50%, considered incompatible with embryo development. Cells recovered from frozen control embryos did not survive in culture. However, the incorporation of AFPs allowed survival similar to that of cells recovered from unfrozen embryos. Blastomere cryopreservation trials incorporating AFPI in the extender also demonstrated a significant increase in viability after freezing. Our findings demonstrated that delivery of AFPs into zebrafish embryos by incubation in media containing protein at early stages is a simple and harmless method that increases cryoprotection of the cellular compartment. This beneficial effect is also noticed in blastomeres, encouraging their use in further protocols for embryo cryopreservation.

1. Introduction

Cryopreservation of fish embryos has yet to be achieved by cryobiologists. Their large size, high lipid content, multi-compartmental structure and high sensitivity to chilling make the cryopreservation of these embryos difficult. Several attempts have been made but no hatching rates have been reported after freezing. Cryopreservation is an interesting challenge to overcome taking into account its applications in the management of reproduction in aquaculture, wild life conservation programs and banking of species with biotechnological or ecological value [2].

Over the past few years, techniques for the cryopreservation of mammalian embryos have been developed successfully. Nevertheless, the large size of fish embryos and their envelopes that delimit different compartments, make them highly impervious to cryoprotectants (CPAs) and water [10]. This hinders the exchange between media and embryo compartments required for cryopreservation. Moreover, fish embryos are particularly sensitive to chilling, and several authors have reported embryo death at temperatures between -4 °C and -30 °C [11; 30; 33]. Taking into consideration these particular characteristics, as well as the high temperature of intracellular ice formation described by Hagedorn *et al.* in zebrafish, several authors consider that vitrification, rather than slow freezing, is the most promising option for cryopreservation [13]. This procedure is an ultra-fast freezing process that involves the use of high CPA concentrations, promoting the formation of a vitreous state when freezing occurs without ice crystal formation. Studies on CPA incorporation into turbot embryos subjected to vitrification protocols showed that it is very difficult to reach vitrifying concentrations of CPAs in the different embryo compartments [3; 4]. Previous studies on the vitrification of turbot and zebrafish embryos have also shown that ice recrystallization always takes place in the yolk sac during thawing [17; 25]. Under such conditions success remains a distant goal.

However, when *Pseudopleuronectes americanus* embryos were vitrified, evidence of development was observed after freezing [24]. This was attributed to the expression of antifreeze proteins (AFPs), which are natural cryoprotectants, present in this Arctic species, as well as in other fish, some species of insects and plants [6; 7]. AFPs adhere to ice crystals preventing their further growth during freezing and thawing, thus reducing

cellular damage [8; 29; 31]. These proteins have been added to the freezing media employed for cryopreserving mammalian oocytes and embryos, and most authors have reported a beneficial effect [1; 22]. The introduction or expression of these proteins in fish embryos may also improve their chilling resistance and response to vitrification.

Microinjection of the proteins could be an option, but the process alters the embryo envelopes, causing additional injuries and increasing embryo fragility. Previous studies performed by our group showed that delivery of AFPs into zebrafish embryos by incubation in media containing protein during the formation of the yolk syncytial layer is a simple method, easy to perform [19]. This method allows protein incorporation in specific cells without affecting embryo structure or hatching rate. In most of the embryos incubated in media containing AFPs, the yolk syncytial layer (YSL) captured the protein. Furthermore, when embryos were incubated at early stages (128-cell), AFPs were located in other structures than the syncytial layer. Proteins appear in organs which derive from anterior endoderm, such as pharynx, liver and/or pancreas. As demonstrated by Hagedorn, the yolk syncytial layer surrounding the yolk is the main permeability barrier [10]. Cryoprotectants enter the perivitelline space and, to a lesser extent, the cellular compartment but they do not cross the YSL, leaving it unprotected [10; 19]. Hagedorn and her colleagues reported significant damage in this structure during vitrification, even after the use of Me₂SO or propylene glycol as cryoprotectants [10]. Moreover, most of the reported morphological alterations in the embryo structure are related to the breakdown of the yolk cell. Taking this into account, the location of AFPs in the YSL is important as it may increase the protection of embryos during the freezing/thawing process.

In this study, the effect of these proteins on chilling sensitivity and freezing resistance will be analyzed. Bearing in mind that hatching has not been achieved, the most common way of evaluating the effects of any cryopreservation method is to measure the percentage of embryos with normal morphology after thawing [5; 24; 25; 34]. Success is still a long way off as cryoinjuries that occur in different compartments, which prevent normal embryo development, have not yet been characterized. This underlines the importance of checking other factors besides survival rate or embryo morphology, in order to gradually increase the knowledge that will help to find a global solution. Previous studies by our group, analyzing the activity of cytoplasmic enzymes in

vitrified turbot and zebrafish embryos, indicated the preservation of some cellular activity after thawing, despite the total loss of developmental ability [23]. In the present study, we will focus our interest on the cellular compartment. Therefore, cell viability and cell survival in culture in each individual frozen embryo will be evaluated as indicators of the cryoprotection conferred by AFPs. The effect of these proteins on isolated cells will also be analyzed as additives for zebrafish blastomere cryopreservation.

2. Material and methods

All chemicals, except the fluorescent probes, were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Media, except L-15 medium (Leibovitz) (Ref. L5520 Sigma-Aldrich, Spain), were not bought as such but prepared in our laboratory as referred to in the text.

2.1. Animal care and obtaining embryos

Zebrafish adults (*Danio rerio*) were maintained in 45-litre aquaria, separated by sex, under a 14h light/10h dark cycle. The fish were fed twice daily with artemia and fish dry pellets (TetraMin®, Germany). For spawning, three females and two males were placed together in a mating tank that contained a glass tray covered with a plastic net. The eggs, which lay in the tray, were collected two hours after the light period began.

The embryos were washed once with non-chlorinated water to eliminate food and organic residues and twice with a methylene blue solution (2 mg/l dH₂O) to eliminate possible parasites. They were then washed three times with embryo medium (EM) [32] and incubated at 28 °C in this medium until they reached the appropriate developmental stage.

2.2. Protein incorporation

Embryos at 128-cell (2.25 hours post-fertilization -hpf-) or high blastula stage (3.3 hpf), were placed in a 24-well flat-bottomed culture plate (10-20 embryos/well), and

incubated in medium containing AFPI or AFPIII (40 µg/ml) (A/F Protein Canada 2000 Inc., St John's, Canada) for 4 hours at 28 °C. Protein was diluted in L-15 for incubation of high blastula embryos, and in L-15 supplemented with 6% foetal bovine serum (FBS) for 128-cell embryos to avoid abnormal development. Embryos incubated in L-15 or L-15 6% FBS (high blastula or 128-cell embryos, respectively), were used as controls. Subsequently, embryos were washed with EM and incubated in it until the 5-somite stage was reached, in order to analyze chilling sensitivity at 4 °C and -10 °C, or to be vitrified.

2.3. Chilling sensitivity

Sensitivity at 4 °C was analyzed in 5-somites stage embryos placed in a 24-well plate containing 1.5 ml EM per well at this temperature. Temperature was recorded with a thermocouple (Cole-Parmer, Chicago, USA). Embryos that incorporated the protein at the high-blastula stage were maintained at 4 °C for 15, 30, 60, 90 or 120 minutes and those incubated with the protein at 128-cell stage were maintained at 4 °C for 60, 90, 120 and 180 minutes. After chilling, the embryos were transferred to another plate containing 1.5 ml EM per well at 28 °C and incubated under these conditions until hatching, when the hatching rate was determined.

Sensitivity at -10 °C was also analyzed at the 5-somite stage, in embryos previously incubated with the protein at 128-cell or high blastula stage, placing them in a cryostat chamber (MICROM HM 505N) on a plate with 1.5 ml of 2 M Me₂SO in Ringer [32] per well at this temperature for 10, 15, 30 or 45 minutes. The EM was replaced with Me₂SO to prevent the medium from freezing. After chilling, the embryos were washed with EM to eliminate cryoprotectant and incubated in EM at 28 °C until hatching, when the survival rate was determined.

At a minimum, experiments were conducted in triplicate with embryos from different batches. Each replicate was carried out with embryos from the same egg batch and included treatments with AFPs and the corresponding controls without AFPs. The number of embryos per well ranged from 10 to 20 depending on the batch size.

2.4. Vitrification

After incubation with AFPI or AFPIII under the above-described conditions, the embryos were incubated in EM at 28 °C until the 5-somite stage and then vitrified following the protocol described by Robles *et al.* in 2003, using a vitrifying solution containing 5 M Me₂SO + 2 M methanol + 1 M ethylene glycol + 10% sucrose [25]. During the last step of the protocol, the embryos were loaded into 0.5 ml straws (approx. 20 embryos/straw). Embryos untreated with AFPs were vitrified as controls. One thousand embryos from 21 different batches were vitrified. The number of vitrified embryos per treatment ranged from 110 to 300.

The straws were thawed in a water bath at 25 °C for 7 s. Immediately after thawing, they were cut and the embryos recovered in a Petri dish with EM and observed under a stereoscopic microscope (Leica GZ6). The total number of embryos was counted and the percentage of embryos with normal morphology determined by visual inspection under light microscopy. The embryos were considered to have normal morphology when they had a transparent yolk and no damage in the embryo compartment. The state of the chorion was not considered because zebrafish embryos can develop without chorion if incubated under suitable conditions.

2.5. Cell evaluation after thawing

To test cell viability after thawing, four hundred of the 1000 vitrified embryos with normal morphology after thawing were dissociated: 100 control embryos (frozen-control), 200 incorporating the AFPs at high blastula (100 from each protein type) and 100 incorporating the AFPs at 128-cell stage (50 from each protein type). Moreover, 50 embryos which were not subjected to any treatment (fresh-control) were dissociated to analyze cell viability in culture.

Immediately after embryo thawing, the chorion was mechanically removed and the embryo compartment dissected from the yolk sac using forceps and a steel surgical needle under a stereoscopic microscope. The cell compartment of each embryo was separately transferred with a Pasteur pipette to a well on a 24-well plate in a drop of EM and dissociated using a modification of the dissociated cell culture method described in

the Zebrafish book [32] and of the protocol described by Ober and Schulte-Merker in 1999 [21]. All procedures were carried out under sterile conditions, including materials and solutions. Briefly, 150 µl of a trypsin solution (0.25% (w/v) trypsin in PBS, 1 mM EDTA; pH 8) was added to the well. After 5 minutes, the trypsin reaction was stopped by adding 150 µl of a solution of 2 mM CaCl₂ 3% (v/v) FBS in distilled water. The plate was gently shaken for a few seconds and 150 µl of medium was removed using a micropipette. A total of 150 µl of Calcium free Ringer (116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 5 mM HEPES, pH 7.2; 388 mOsm/Kg) was then added to the well. Five minutes later 300 µl of the medium was removed and 500 µl of grown medium [32] was added. Cell suspensions were maintained in an incubator at 28 °C.

The percentage of viable cells was determined immediately after thawing in 84 embryos, at least 10 from each treatment, using double labeling with SYBR-14 / propidium iodide (PI) (Invitrogen, Madrid, Spain). After dissociation, 0.6 µl of SYBR-14 working solution (50-fold dilution in Milli Q H₂O of the SYBR-14 commercial solution) was added to 300 µl of cell suspension. The plate was protected from the light and incubated at 28 °C for 10 minutes in a cell incubator (Heto, Cell House 200). Subsequently, 5 µl of working PI solution (0.5 mg/ml PBS 0.1 M) was added to the same cell suspension. The cells were incubated for 10 minutes under the same conditions and analyzed by fluorescence microscopy. SYBR-14, a membrane-permeable nucleic acid stain, emits green fluorescence, whereas PI, a non-permeable probe, emits red fluorescence. Hence, cells emitting green fluorescence were considered viable, whereas red cells were considered to be non-viable. The percentage of viable cells was established for each analyzed embryo.

To evaluate cell survival in culture, cells from 300 dissociated embryos (at least 50 per treatment) were maintained separately in culture. The cell suspensions were incubated at 28 °C and aliquots of cells were labeled with SYBR-14 / IP, as previously described, after 1, 2, 4, and 6 hours.

2.6. Blastomere cryopreservation

To study the effect of AFPs on blastomere cryopreservation, 500 embryos from 4 batches were dissociated using the protocol described by Kopeika *et al.* in 2005 [14]. Embryos at the 50% epiboly stage (5.25 hpf) were placed in a Petri dish with EM and mechanically dechorionized as previously described for cell evaluation after thawing. Embryos were then placed in a 24-well plate (20 embryos/well), EM was removed and 1 ml of protease solution (2 mg/ml in PBS) added. After 20 minutes at room temperature (R.T.), blastomeres were separated from the yolk with gently pipette suction. The blastomere suspension was washed twice in 10 ml PBS (centrifuge at 800 x g for 10 min). The supernatant was discarded and the pellet resuspended in PBS (16.4×10^4 cells/ml) before applying treatments described in Table 1.

	SOLUTION	TREATMENT
Group 1	10µl cells + 1ml PBS 10% FBS solution	1 hour at R.T.
Group 2	10µl cells + 1ml PBS 10% FBS solution	Cryopreserved
Group 3	10µl cells + 1ml 2M Me ₂ SO in PBS 10% FBS solution	1 hour at R.T.
Group 4	10µl cells + 1ml 2M Me ₂ SO in PBS 10% FBS solution	Cryopreserved
Group 5	10µl cells + 1ml 10mg/ml AFPI in 2M Me ₂ SO in PBS 10% FBS solution	1 hour at R.T.
Group 6	10µl cells + 1ml 10mg/ml AFPI in 2M Me ₂ SO in PBS 10% FBS solution	Cryopreserved

Table 1: Experiment design for blastomere cryopreservation.

Ten microliters of cell suspension was added to 1 ml of the following solutions: 10% FBS in PBS; 2 M Me₂SO in PBS 10% FBS and 10 mg/ml of AFPI in 2 M Me₂SO in PBS 10% FBS and left for 30 minutes at R.T. Two groups were then formed: a control one where cells were kept in 24-well tissue culture plates for 1 h at R.T. and a cryopreserved one where cells were subjected to a cryopreservation protocol.

Cryopreservation was performed in eppendorf tubes and samples were frozen using the following cooling rates: 5 °C/min from 20 to 0 °C, 5 min at 0 °C, 1 °C/min from 0 to -40 °C by a programmable freezer before being plunged into liquid nitrogen. For thawing the eppendorf tubes were warmed in air to R.T. and blastomeres were washed twice with

PBS (centrifuge at 800 x g for 10 min). The pellets were resuspended in 20 µl of PBS and cell survival was examined using trypan blue solution (0.4% (v/v) in Ca⁺² and Mg⁺² free PBS) in a rate 1:1 (v/v) with cell suspension. Viable cell counts were carried out using a hemocytometer. Cryoprotectant toxicity and cell viability after cryopreservation were analyzed.

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using the computerized package generated by SPSS 15.0 software for Windows. All percentages were normalized through angular transformation ($\text{Arcsin}\sqrt{(\text{percentage}/100)}$) and results were expressed as means \pm SEM.

Results of chilling sensitivity experiments were analyzed using a Student's t-test. Hatching rates for experimental treatments were compared to the control without AFPs, for each time ($p < 0.05$).

A one-way ANOVA analysis was used to compare cell viability immediately after thawing and survival in culture. Significant differences between control embryos, type of AFPs and developmental stage were detected by a multiple range test, the SNK test (Student–Newman–Keuls) ($p < 0.05$). Cell survival in culture was also analyzed using a linear mixed model ($p < 0.05$) to detect differences in the evolution of each treatment. Effect of AFPs in blastomere cryopreservation was analyzed using a one-way ANOVA. Significant differences between percentages of viable cells after each treatment were detected by a multiple range test, the SNK test (Student–Newman–Keuls) ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Chilling sensitivity

Incubation at 4 °C for 180 minutes did not reduce the hatching rate in any treatment. Moreover, the incorporation of proteins into the embryos did not improve hatching rates at any developmental stage, as survival at hatching did not differ significantly from the controls (Fig. 1A), which was confirmed by the statistical analysis.

The hatching rate of embryos exposed to -10 °C decreased in time, especially in the control embryos, showing a decrease from 76% to 45% when incubated 45 minutes at this temperature (Fig. 1B). Embryos that incorporated the protein at the earlier stage also showed a decrease in hatching rate. In those embryos incorporating the proteins at the high blastula stage, the fall in the survival rate was less pronounced, resistance to cold shock being significantly higher after the incorporation of AFPI than in control embryos.

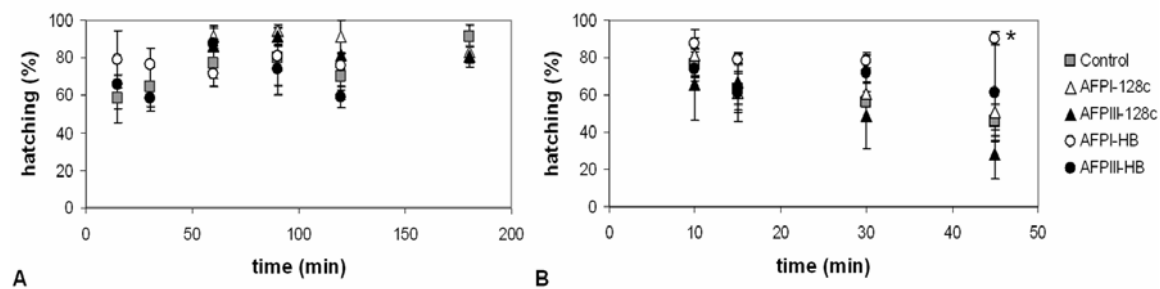


Fig. 1: Survival of embryos maintained at 4 °C (A) or -10 °C (B) at the 5-somite stage, after incorporation of AFPs. Controls were exposed directly to chilling without protein. Bars indicate S.E.M. Asterisk shows differences between control and AFP treatments after 45 minutes at -10 °C ($p < 0.05$).

3.2. Vitrification

Half of the vitrified control embryos showed morphological alterations after thawing affecting to the embryo compartment and/or the yolk sac and 51% showed normal morphology. The structural integrity of embryos that incorporated the protein at the high blastula stage did not show a significant improvement (67.6% and 74.5% of embryos with normal morphology for AFPI and AFPIII, respectively). The highest percentage of embryos with good morphology after thawing, significantly higher than in the controls, was obtained when AFPI was incorporated at the 128-cell stage (85.8%). Nevertheless, under the same conditions, AFPIII did not provide a significant effect (63.5%).

The analysis of cell viability immediately after thawing did not show differences between treatments, and morphologically normal thawed embryos that incorporated the proteins showed the same percentage of viable cells as the controls. After incubation of cell suspensions, cells from thawed AFP-treated embryos showed higher survival rates in culture than those from control embryos after freezing (Fig. 2). Moreover, some mitotic

events were observed in these culture plates, but not in the thawed control ones. During the first hour in culture, a decrease in the percentage of viable cells was noticed in all treatments except in those with AFPs incorporated at the 128-cell stage. From this moment, the viability rate of cells from embryos incubated with AFPs showed an increase. This phenomenon was not observed in cells from frozen control embryos after thawing. None of the cells obtained from thawed control embryos were viable after 6 hours and only 0.3% of them were viable after 4 hours in culture. In contrast, the percentage of viable cells from AFP-treated embryos ranged from 37.9% to 54.7% after 6 hours in culture, similar to that of cells from unfrozen embryos (61.8% in fresh-controls).

The linear mixed model ($p < 0.05$) showed significant differences between the frozen-control embryos and all the other treatments, regardless of the protein type. Comparison of means with one-way ANOVA ($p < 0.05$) demonstrated that cells from embryos that incorporated the protein at the high blastula stage showed better cell survival than those from control embryos in culture from 4 hours onwards. Cells from embryos that incorporated the proteins at the 128-cell stage showed noticeable differences to the controls in culture from 2 hours onwards.

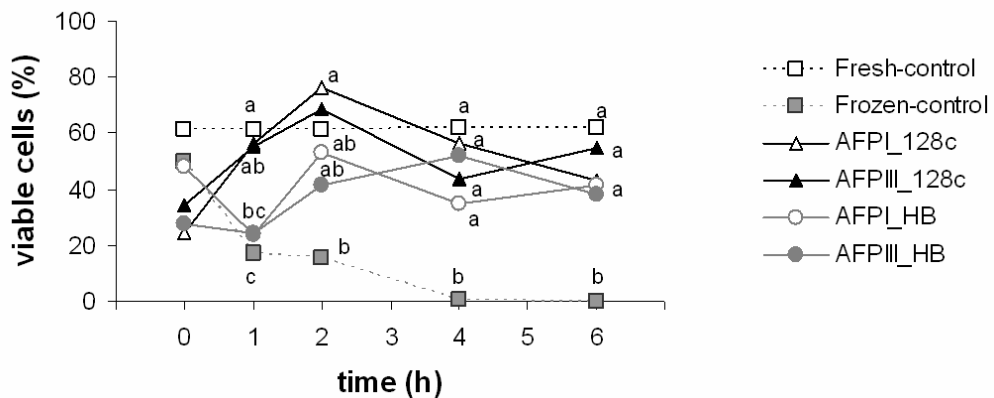


Fig. 2: Cell viability and survival in culture of cells from control embryos and from cryopreserved embryos treated with AFPs. S.E.M. bars are not represented to simplify the graphs. Letters show differences between treatments ($p < 0.05$).

3.3. Blastomere cryopreservation

Results demonstrated that the presence of AFPI in the cryoprotectant solution significantly improved cell survival after cryopreservation (54.3%, 29.9% and 0% in embryos frozen with AFPI + 2 M Me₂SO, 2 M Me₂SO and PBS 10% FBS, respectively) (Fig. 3). Moreover, the cryoprotectant solution containing AFPI was slightly less toxic than the solution with only Me₂SO, after equilibration for 1 hour at R.T.

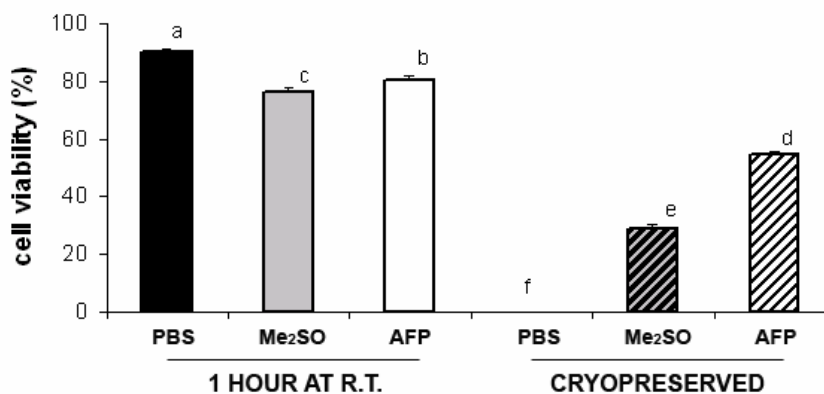


Fig. 3: Blastomere viability at thawing. The experimental groups are described in Table 1. Bars indicate S.E.M. Letters show differences between treatments ($p < 0.05$).

4. Discussion

Nowadays, zebrafish is used as a model species in biomedical research because it is small, easy to maintain and breeds in a laboratory and many experiments in fish embryo cryopreservation have been carried out using this species. Different techniques have been used to measure cryoprotectant concentrations inside embryo compartments and results obtained show that embryo envelopes represent a difficult barrier to overcome for water and cryoprotectants [3; 9; 34; 35; 36]. Specifically, the YSL has been described as the major impermeable barrier in the embryo [10]. The YSL blocks the entrance of cryoprotectants as well as the dehydration process in the yolk sack, thus bringing about the formation of crystal ice inside this structure. After the vitrification/thawing protocol considerable damage was caused to the YSL with total breakdown of embryos in some cases [25; 34]. Results obtained by our group showed that incubation in media containing

AFPs allows these proteins to enter the YSL [19], which could protect the envelope from the damage caused by freezing. When the embryos were incubated with protein at the 128-cell stage, organs such as the pharynx, liver or pancreas also contained the AFPs. The presence of these natural cryoprotectants could improve the chilling resistance of zebrafish embryos and also reduce the growth of ice crystals and their recrystallization.

Our results showed that the incorporation of AFPs by incubation in media containing protein under the tested conditions slightly reduced chilling sensitivity in zebrafish embryos. This reduction was only observed when embryos were subjected to -10 °C. Embryos at the 5-somite stage were very tolerant to 4 °C, and no losses of viability were observed after 180 minutes of incubation at this temperature. Hagedorn *et al.* reported good survival rates in 3-somite embryos exposed to 0 °C for 40 minutes [11] and Liu *et al.* observed that 60 minutes exposure to 0 °C did not affect the survival of 6-somite embryos [18]. Our results showed that a temperature of 4 °C is well tolerated even for longer periods. Cooling at -10 °C effectively reduces survival at hatching and only those embryos incorporating AFPI at high blastula showed a significant reduction in chilling sensitivity. In these experiments, non-labeled AFPs were used to avoid any potential toxicity of FITC (fluorescein isothiocyanate), the fluorescent molecule used for protein labeling, and the actual presence of the protein in the embryos was not monitored. According to the results of the preliminary experiments, it is estimated that between 10% and 30% of the embryos did not incorporate the protein [19]. This could reduce the sensitivity of the test, and mask the beneficial effects of AFPs. Moreover, the lipid content of the yolk sac is considered to be mainly responsible for chilling sensitivity and AFPs were not incorporated into this compartment.

The beneficial effects of AFPs were more evident after vitrification. Morphology after thawing is an index that does not indicate developmental ability. Nevertheless, given that cryopreservation causes a high rate of embryo breakage, it is frequently used as the parameter for checking the success of freezing processes [5; 17; 25; 34]. Improvement on the preservation of embryo integrity does not indicate embryo survival, but is useful for selecting less damaging protocols. The incorporation of AFPI at the 128-cell stage significantly increases this parameter to up to 85% of normal morphology. Structural damage in the YSL during freezing/thawing has been well documented in literature [10]. YSL protection provided by AFPs could confer more resistance to this

structure and reduce the probability of breakdown, preserving the yolk sac and the integrity of the cellular compartment.

It is reasonable to assume that embryo death after thawing must be caused by cell collapse. However, information on cell function after thawing is extremely scarce. The only available data were reported by our group [23]: the analysis of cytoplasmic enzyme activity in turbot and zebrafish embryos demonstrated that some cellular activity was preserved after thawing. These studies were undertaken using 200-300 pooled embryos per analysis, and the protocol did not allow selection of morphologically normal embryos before the evaluation of enzyme activity. The method used in the present study allowed the analysis of the percentage of viable cells in each individual embryo, after selecting those showing normal morphology. The percentage of viable cells ranged from 25% to 50% of the recovered cells after dissociation. This percentage seems to be too low to permit embryo survival and is not increased by the incorporation of AFPs. Nevertheless, treatment with the proteins clearly improved the survival ability of these viable cells recovered after thawing. It is well known that freezing can affect long-term cell survival. Cell damage at different levels (membrane, cytoskeleton, ATP production, cell signaling, etc) is well documented and induction of apoptosis after freezing/thawing has also been described in, among others, bone marrow cells [26] and oocytes [20]. Cells recovered from control embryos showed no ability to survive in culture, demonstrating damage incompatible with further development of the embryo. Although these embryos could have normal morphology and even a relatively high rate of viable cells after thawing, vitrification caused embryo death by total loss of cell function. Cell death in culture could be caused by damage at different levels and the probes used (SYBR14/PI) do not differentiate between necrosis and late apoptosis. Most cells seem to die by necrosis but the apoptotic process should not be discarded. The incorporation of AFP III and especially AFPI clearly improved long-term cell viability after thawing, survival rates being similar to those of cells from unfrozen embryos. Mortality percentages of cells from embryos treated with AFPs did not increase during the period analyzed and it was observed that some mitotic activity even increased the rate of viable cells in the culture plate during the first 2 hours. This increase in the percentage of viable cells, significant in some cases, could also be due to the lyses of those cells non viable after thawing, which are no longer detected from 2 hours onwards.

The present results showed that the cryoprotective effect of AFPs was especially noticeable at cellular level, because the percentage of viable cells from AFP treated embryos after freezing was higher than in those from frozen controls. However, this percentage continues to be insufficient to permit embryo development. Bearing in mind these results, it was interesting to test the effect of AFPs in blastomeres, an alternative to embryo cryopreservation allowing the preservation the diploid genome [27]. Results also showed a positive effect of AFPI after cryopreservation of blastomeres.

Fish AFPs, apart from reducing ice crystal growth during freezing and thawing, have been shown to stabilize cell membranes *in vitro* during hypothermic storage, probably by interacting with the plasma membrane [28]. Plasma membrane is one of the most sensitive structures and membrane stabilization is always considered a key aspect in cryoprotection [15; 27]. Hence, incorporation of these proteins in embryo cells or in isolated blastomeres, could be beneficial by both reducing mechanical damages promoted by ice crystals and increasing membrane resistance to functional damages caused during hypothermic storage.

Our findings clearly demonstrate that antifreeze proteins increase cryoprotection of the embryo cellular compartment. However, their presence in a limited set of cells reduces their global cryoprotective effect and does not improve embryo developmental ability. Most cells and organs remain unprotected by these natural agents and are only under the effect of the traditional cryoprotectants added during vitrification. Moreover, cryoprotection of the yolk sac has not been increased and the levels of other CPAs are too low to provide vitrifying conditions in this compartment [3; 25]. To facilitate yolk dehydration and cryoprotectant entrance, aquaporin-3, a water channel allowing movement of water, glycerol and other small uncharged molecules, was successfully expressed in zebrafish embryo membranes, without effects on survival or developmental ability [12; 16]. So far, no reports on their freezing ability have been published. Nevertheless, the combination of both aquaporin expression and incorporation of AFPs could improve embryo resistance to the vitrification process.

In conclusion we can state that the delivery of AFPI and AFPIII into zebrafish embryos by incubation in media containing protein is a simple method, easy to perform, which increases chilling resistance and significantly reduces damage caused by vitrification in the cellular compartment. Significant cryoprotection by AFPs has also

been demonstrated in the cryopreservation of fish blastomeres, supporting the hypothesis that these proteins, and particularly AFPI, are beneficial for the cryopreservation of zebrafish cells.

Future studies on the use of appropriate protein carriers or the artificial expression of AFPs providing the presence of the proteins in most of embryonic cells, could significantly increase the positive effects of AFPs for fish embryo freezing. Nevertheless, the solution for fish embryo cryopreservation will probably require the combination of two aspects, increased cryoprotection in the cellular compartment and improved permeabilization and dehydration of the yolk sac.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology, Project INIA/MCYT ACU02-002-C2, the Junta de Castilla y León (project Ref LE007A06) and by a PhD grant of the Diputación Provincial de León

References

- [1] A. Baguisi, A. Arav, T.F. Crosby, J.F. Roche, M.P. Boland, Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze proteins: Development in vitro and in vivo, *Theriogenology* 48 (1997) 1017-1024.
- [2] R. Billard, T. Zhang, Techniques of genetic resource banking in fish. in: P.F. Watson, and W.V. Holt, (Eds.), *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future*, Taylor and Francys, London, 2001, pp. 145-170.
- [3] E. Cabrita, V. Robles, O. Chereguini, P. de Paz, L. Anel, M.P. Herraiez, Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol, *Theriogenology* 60 (2003) 463-473.
- [4] E. Cabrita, V. Robles, O. Chereguini, J.C. Wallace, M.P. Herraiez, Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*), *Cryobiology* 47 (2003) 204-213.

- [5] E. Cabrita, V. Robles, J.C. Wallace, M.C. Sarasquete, M.P. Herraiez, Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture* 251 (2006) 245-255.
- [6] R.W.R. Crevel, J.K. Fedyk, M.J. Spurgeon, Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure, *Food and Chemical Toxicology* 40 (2002) 899-903.
- [7] P.L. Davies, B.D. Sykes, Antifreeze proteins, *Current Opinion in Structural Biology* 7 (1997) 828-834.
- [8] G.L. Fletcher, C.L. Hew, P.L. Davies, Antifreeze proteins of teleost fishes, *Annual Review of Physiology* 63 (2001) 359-390.
- [9] M. Hagedorn, E. Hsu, F.W. Kleinmans, D.E. Wildt, New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation, *Cryobiology* 34 (1997) 335-347.
- [10] M. Hagedorn, F.W. Kleinmans, D. Artemov, U. Pilatus, Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo, *Biology of reproduction* 59 (1998) 1240-1250.
- [11] M. Hagedorn, F.W. Kleinmans, D.E. Wildt, W.F. Rall, Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*, *Cryobiology* 34 (1997) 251-263.
- [12] M. Hagedorn, S.L. Lance, D.M. Fonseca, F.W. Kleinmans, D. Artemov, R. Fleischer, A.T. Hoque, M.B. Hamilton, B.S. Pukazhenti, Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation, *Biology of reproduction* 67 (2002) 961-966.
- [13] M. Hagedorn, A. Peterson, P. Mazur, F.W. Kleinmans, High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option, *Cryobiology* 49 (2004) 181-189.
- [14] J. Kopeika, T. Zhang, D.M. Rawson, G. Elgar, Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 570 (2005) 49-61.
- [15] S. Kusuda, T. Teranishi, N. Koide, Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method, *Cryobiology* 45 (2002) 60-67.

- [16] S.L. Lance, A.S. Peterson, M. Hagedorn, Developmental expression of aquaporin-3 in zebrafish embryos (*Danio rerio*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138 (2004) 251-258.
- [17] X.H. Liu, T. Zhang, D.M. Rawson, Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol, *Cryo Letters* 19 (1998) 309-318.
- [18] X.H. Liu, T. Zhang, D.M. Rawson, Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Theriogenology* 55 (2001) 1719-31.
- [19] S. Martínez-Páramo, S. Pérez-Cerezales, V. Robles, L. Anel, M.P. Herráez, Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method, *Cryobiology* 56 (2008) 216-222.
- [20] H. Men, R.L. Monson, J.J. Parrish, J.J. Rutledge, Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture, *Cryobiology* 47 (2003) 73-81.
- [21] E.A. Ober, S. Schulte-Merker, Signals from the yolk cell induce mesoderm, neuroectoderm, the trunk organizer, and the notochord in zebrafish, *Developmental Biology* 215 (1999) 167-181.
- [22] L. O'Neil, S.J. Paynter, B.J. Fuller, R.W. Shaw, A.L. DeVries, Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me2SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature, *Cryobiology* 37 (1998) 59-66.
- [23] V. Robles, E. Cabrita, P. de Paz, S. Cunado, L. Anel, M.P. Herraez, Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos, *Theriogenology* 61 (2004) 1367-1379.
- [24] V. Robles, E. Cabrita, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, M.P. Herraez, Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species, *Theriogenology* 64 (2005) 1633-1646.
- [25] V. Robles, E. Cabrita, M. Real, R. Alvarez, M.P. Herraez, Vitrification of turbot embryos: preliminary assays, *Cryobiology* 47 (2003) 30-39.
- [26] J. Schmidt-Mende, E. Hellstrom-Lindberg, B. Joseph, B. Zhivotovsky, Freezing induces artificial cleavage of apoptosis-related proteins in human bone marrow cells, *Journal of Immunological Methods* 245 (2000) 91-94.

- [27] C.A. Strussmann, H. Nakatsugawa, F. Takashima, M. Hasobe, T. Suzuki, R. Takai, Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival, *Cryobiology* 39 (1999) 252-261.
- [28] M.M. Tomczak, D.K. Hinch, S.D. Estrada, W.F. Wolkers, L.M. Crowe, R.E. Feeney, F. Tablin, J.H. Crowe, A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein, *Biophysical journal* 82 (2002) 874-881.
- [29] M.M. Tomczak, L. Vigh, J.D. Meyer, M.C. Manning, D.K. Hinch, J.H. Crowe, Lipid unsaturation determines the interaction of AFP type I with model membranes during thermotropic phase transitions, *Cryobiology* 45 (2002) 135-142.
- [30] J. Valdez, Delgado M., A. Miyamoto, T. Hara, K. Edashige, M. Kasai, Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages, *Theriogenology* 64 (2005) 112-122.
- [31] J.-H. Wang, A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation, *Cryobiology* 41 (2000) 1-9.
- [32] M. Westerfield, *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, Eugene, Oregon, 2000.
- [33] T. Zhang, D.M. Rawson, Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, *Cryobiology* 32 (1995) 239-246.
- [34] T. Zhang, D.M. Rawson, Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, *Cryobiology* 33 (1996) 1-13.
- [35] T. Zhang, D.M. Rawson, Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol, *Cryobiology* 37 (1998) 13-21.
- [36] T. Zhang, R.Y. Wang, Q.-Y. Bao, D.M. Rawson, Development of a new rapid measurement technique for fish embryo membrane permeability studies using impedance spectroscopy, *Theriogenology* 66 (2006) 982-988.

DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos años, los conservacionistas han insistido en la importancia de mantener bajo condiciones seguras aquellas especies animales que forman parte de poblaciones amenazadas, protegiéndolas de los cambios ambientales provocados por la actividad humana. Sin embargo, los procedimientos utilizados habitualmente, como por ejemplo el mantenimiento en ambientes controlados, zoológicos o reservas naturales, no las protege de catástrofes naturales o epidemias. Por ello, los últimos avances en genética y tecnología de la reproducción proporcionan una nueva forma de protección para estas especies amenazadas: el almacenamiento a largo plazo de sus gametos en bancos de germoplasma (GRBs).

De acuerdo con Watson y Holt (2001), previamente a la creación de un banco de recursos genéticos con fines de conservación deben tenerse en cuenta ciertas consideraciones: el propósito de dicho banco, su tamaño, localización, medidas de seguridad, propiedad legal, etc. No obstante, en el caso de los peces, y en el caso concreto de la conservación de poblaciones de trucha con características genéticas bien definidas, una vez consideradas las evidentes ventajas que representaría la creación de uno de estos bancos para fortalecer los programas de conservación, es necesario abordar problemas relacionados con la propia técnica de conservación de los recursos genéticos. Los gametos y/o embriones que van a formar parte de un banco de germoplasma deben ser criopreservados siguiendo un protocolo cuidadosamente descrito. Este protocolo será viable siempre y cuando sea posible obtener una descendencia totalmente normal a partir de las muestras criopreservadas, en la cual se conserve el patrimonio genético de la población a lo largo de las sucesivas generaciones. En algunas especies, la selección de machos cuyos espermatozoides presentan mayor viabilidad tras la criopreservación pueden mejorar los resultados globales, sin embargo, esto es lo que no se desea cuando se crea un GRB, ya que se trata de mantener un amplio rango de representantes genéticos de la población, no seleccionados (Watson y Fuller, 2001).

Los trabajos realizados en el ámbito de la presente tesis doctoral representan una contribución al desarrollo de las técnicas que permitan elaborar GRBs de peces, y cubren algunos de los aspectos aun no abordados por otros investigadores: la constatación de que la conservación seminal preserva fielmente la diversidad genética propia de la población y el desarrollo de nuevos métodos de crioprotección que mejoren los resultados obtenidos en la criopreservación de embriones.

Criopreservación de semen

Como ya se ha explicado anteriormente, las muestras que son criopreservadas con el fin de constituir un banco de germoplasma, deben tener un nivel de calidad mínimo para ser utilizadas posteriormente en programas de conservación. Muchos estudios realizados en semen de teleósteos han puesto de manifiesto que los salmónidos son uno de los grupos más susceptibles al daño durante la criopreservación (Cabrita y cols., 2001b; Ogier de Baulny y cols., 1997). Hay estudios que demuestran que la membrana es la estructura más sensible al daño, debido a que es la más expuesta a todo tipo de estrés: térmico, osmótico e incluso a la acción de las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas durante el proceso (Cabrita y cols., 1998; Labbé y cols., 2001; Mirzoyan y cols., 2006). Sin embargo, el grado de susceptibilidad es muy variable, en muchos casos debido a la adaptación al medio natural de la especie o a las características propias de sus membranas. Ya en 1981, Watson demostró que la composición lipídica de la membrana plasmática puede determinar que sea más o menos susceptible a sufrir daños durante la criopreservación (Watson, 1981; Watson y Morris, 1987). Un ejemplo de adaptación al medio son las especies de agua salada, cuyos espermatozoides resisten mucho mejor el choque osmótico que las de agua dulce debido a que la fecundación ocurre en un medio hiperosmótico al que han tenido que adaptarse (Drokin y cols., 1998).

En el caso particular de la trucha común, los análisis presentados en el presente estudio, demostraron que el porcentaje de células viables se mantiene estable tras la criopreservación, con valores en torno al 80%, entendiendo como viables aquellas que poseen la membrana celular intacta en el momento de la descongelación. Este hecho puede deberse principalmente a la composición del medio de criopreservación utilizado, que contiene yema de huevo como estabilizador de membrana y ácido cítrico como antioxidante. Varios investigadores han demostrado que la yema de huevo añadida a la solución de criopreservación, funciona muy bien como estabilizador de membrana (Bergeron y Manjunath, 2006; Cabrita y cols., 2001a), debido sobre todo a que su presencia en el medio minimiza la eliminación de colesterol de la membrana, como demostraron Bergeron y Manjunath (2006). Estos investigadores descubrieron la existencia de una familia de proteínas de unión a lípidos en el plasma seminal de toro, que inducen la eliminación de colesterol y fosfolípidos de la membrana celular. El

colesterol es un factor importante en la fluidez y permeabilidad de la membrana. Muller y cols. (2008), trabajaron con espermatozoides de trucha arco iris, y demostraron que cuanto mayor es la cantidad de colesterol, menos fluida es la membrana y más resistente al choque hiposmótico, lo que reduce los daños provocados durante el proceso de congelación/descongelación. Cuando se añade yema de huevo, las proteínas de unión a lípidos interaccionan con las lipoproteínas de baja densidad que contiene el aditivo, minimizando la eliminación de colesterol de la membrana y ejerciendo un efecto positivo en la criopreservación.

Los ROS generados durante el proceso también tienen un efecto negativo sobre la membrana, ya que provocan la peroxidación de los lípidos que la componen modificando su estructura y permeabilidad (Mirzoyan y cols., 2006). El DMSO es un productor natural de grupos hidroxilo, por lo que cuando se trabaja con este crioprotector, es conveniente añadir antioxidantes en el medio de congelación para neutralizar sus efectos.

Sin embargo, el efecto de los ROS no sólo se observa en la estabilidad de la membrana, sino que los daños más importantes se producen a nivel de la estructura del ADN. Los efectos del estrés oxidativo en el ADN pueden tener importantes consecuencias en el desarrollo de la descendencia, ya que pueden ir desde oxidación de las bases nitrogenadas a rotura de las cadenas de ADN (Slupphaug y cols., 2003). Cuando una muestra es criopreservada con fines reproductivos, hay que minimizar al máximo la presencia de ROS, para evitar daños en el material genético. Mirzoyan y cols. (2006) observaron que, en esturión, los embriones desarrollados a partir de huevos fecundados con semen congelado utilizando DMSO como crioprotector, mostraban un porcentaje de aberraciones cromosómicas doble del que presentan los obtenidos a partir de semen fresco. Además observaron que la adición de ácido ascórbico a la solución crioprotectora, incrementaba la movilidad y capacidad fecundante del semen y reducía el número de aberraciones cromosómicas hasta los niveles observados con el semen fresco. Este estudio sugería que el efecto oxidativo del DMSO provoca alteraciones en la cromatina espermática durante la congelación, que pueden ser suprimidos por la adición de antioxidantes.

Los espermatozoides de trucha común no presentaron incremento medio en la fragmentación del ADN tras la congelación, mostrando unos niveles muy bajos, antes y después de la criopreservación, si se comparan con los datos obtenidos para otras

especies de peces (Cabrita y cols., 2005). Este hecho implica que el protocolo utilizado se ajusta razonablemente bien a las necesidades de la especie, pero no asegura que no haya consecuencias en la descendencia, ya que, como demostraron Aitken y Baker (2006), espermatozoides con bajo nivel de daño oxidativo pueden mantener su capacidad fecundante pero, si los mecanismos de reparación del huevo no son suficientes, puede haber alteraciones en el desarrollo embrionario de la progenie. En nuestros experimentos observamos que, aunque el porcentaje medio de fragmentación del ADN no se incrementa significativamente durante la congelación, el porcentaje de células con una fragmentación inferior al 5% sí sufre una reducción. Esto nos indica que existe una disminución en el número de espermatozoides que conservan su genoma en estado óptimo.

Los bajos valores de fragmentación del ADN registrados hacen pensar que la descendencia obtenida a partir de semen criopreservado presente un patrón genético similar a la procedente de semen fresco. Sin embargo, como hemos observado, la capacidad fecundante del semen se ha reducido muy significativamente tras la descongelación debido, probablemente, a la suma de pequeños daños causados en las células a diferentes niveles. El proceso de criopreservación puede provocar la selección de una población de espermatozoides especialmente resistentes, que determinen un perfil genético diferente, lo cual debe ser evitado cuando la criopreservación se dirige hacia la conservación de una población en concreto. Analizando el desarrollo de embriones de locha, una especie de agua dulce, obtenidos a partir de semen fresco y congelado Kopeika y cols. (2003) observaron diferencias en la supervivencia de los mismos en diferentes estadios embrionarios: tras la gastrulación se observaba una mayor mortalidad de los embriones de semen congelado, aunque la supervivencia a la eclosión no era tan diferente. Su explicación a estas diferencias es que la criopreservación puede causar cambios en la diversidad genética de la población de espermatozoides congelados. Según estos autores, la presión selectiva ejercida por la criopreservación podría resultar en una población espermática más uniforme, conduciendo a una mayor homogeneidad en el perfil genético de los embriones obtenidos. Esta hipótesis ha quedado descartada en nuestro caso, ya que el análisis genético de la descendencia demostró que el protocolo utilizado para la criopreservación de semen de trucha común no provocó pérdida de alelos en la progenie, que mostraba un patrón genético idéntico en ambos casos. Estudios

posteriores de estos mismos autores demostraron de nuevo que la congelación seminal reduce la supervivencia embrionaria de la locha y que los agentes que afectan a la reparación del ADN pueden revertir o incrementar este efecto negativo (Kopeika y cols., 2004). Su hipótesis es que la criopreservación induce inestabilidad del ADN espermático, que puede ser posteriormente reparado por los mecanismos de reparación del ovocito. Nuestros resultados confirman que, de existir daños en el ADN no detectados por el ensayo cometa, que sean responsables de la reducción en las tasas de eclosión, no suponen en ningún caso una forma de selección gamética.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el protocolo utilizado resultaría válido para preservar semen de trucha común con fines reproductivos y de conservación de las poblaciones de interés, ya que queda demostrado que es posible mantener el potencial genético de los machos tras la criopreservación. Las muestras congeladas podrían ser utilizadas para fecundar ovocitos de la misma población en época reproductiva, o para desarrollar técnicas de androgénesis interespecíficas. En este caso el procedimiento más adecuado consistiría en la utilización de semen congelado para la fecundación de ovocitos inactivados de trucha arco iris, lo que permitiría obtener una descendencia de trucha común en cualquier época del año, debido a la disponibilidad de huevos procedentes de la acuicultura. En cualquier caso, aunque las tasas de fecundación tras utilizar este procedimiento fueran muy bajas y los individuos obtenidos en la primera generación fueran escasos, la población original podría ser recuperada debido a la gran prolificidad de estas especies.

Criopreservación de embriones y células embrionarias

Mientras que la preservación del material genético paterno, mediante congelación de semen, se ha puesto a punto en infinidad de especies y se utiliza rutinariamente en granjas y piscifactorías, y, como se ha comprobado, permite preservar fielmente el perfil genético de nuestras poblaciones concretas de trucha común, la preservación del genoma de origen materno no se ha desarrollado con igual éxito.

Los estudios realizados hasta el momento en criopreservación de ovocitos de pez cebra han determinado que la alta sensibilidad al frío, así como la impermeabilidad de

sus membranas, añadido al problema que supone para el intercambio de fluidos la pequeña relación superficie/volumen, hace casi imposible desarrollar un protocolo efectivo para su preservación (Isayeva y cols., 2004; Zhang y cols., 2005). Estos inconvenientes se extienden también a la criopreservación de embriones, con la dificultad añadida que supone su estructura multicompartimentada que divide el embrión en varios compartimentos con distinta densidad y volumen, y que hacen aún más difícil el intercambio de agua y crioprotectores.

Muchas han sido las técnicas utilizadas para analizar la permeabilidad de las membranas. Zhang y Rawson (1998), realizaron los primeros estudios teniendo en cuenta los cambios volumétricos que observaban en los embriones. Posteriormente, el desarrollo de nuevas tecnologías como el HPLC (Cabrita y cols., 2003), la resonancia magnética nuclear (Hagedorn y cols., 1997) o la espectroscopia de impedancia (Zhang y cols., 2006) permitieron hacer un estudio más exhaustivo. En todos los casos se concluye que, a través del corion es posible el intercambio de agua y crioprotectores entre el medio externo y el espacio perivitelino, pero la impermeabilidad de la línea sincitial impide la entrada de crioprotectores al saco vitelino así como la salida de agua al exterior. Como consecuencia, el embrión no se deshidrata totalmente, facilitando la formación de cristales de hielo en el interior del saco vitelino, causando daños irreparables durante el proceso de vitrificación/descongelación (Robles y cols., 2003).

Estos resultados demuestran que, las directrices seguidas para llevar a cabo con éxito la criopreservación de embriones de teleósteos, deben ir dirigidas hacia la protección del compartimento embrionario y del saco vitelino en igual medida.

El método más utilizado para superar la barrera de impermeabilidad que supone la línea sincitial, ha sido la microinyección. Muchos autores han conseguido con éxito incorporar crioprotectores en el saco vitelino mediante esta técnica, trabajando con embriones de pez cebra (Janik y cols., 2000; Kopeika y cols., 2006), rodaballo (Robles y cols., 2006) o dorada (Beirão y cols., 2006; Robles y cols., 2007). Sin embargo, el daño mecánico provocado por la microinyección no resulta compatible con la posterior vitrificación, ya que el poro creado por la aguja es un punto crítico a partir del cual se puede desencadenar la desintegración total del embrión durante la descongelación. Estudios recientes mostraron una alternativa no invasiva para introducir material exógeno (ADN, proteínas, plásmidos...) en embriones de pez cebra mediante la

aplicación de un láser que emite pulsos a intervalos de fentosegundos (Kohli y cols., 2007). Sin embargo, y a pesar del éxito obtenido en los resultados, esta técnica puede no ser compatible con la vitrificación, ya que al igual que la microinyección, el poro creado por el láser puede inducir daños irreversibles durante el proceso.

Cualquier manipulación que pueda provocar daños en el embrión antes de la vitrificación, debe ser evitada. Los estudios que hemos realizado han permitido desarrollar un protocolo no invasivo mediante el cual, embriones de pez cebra incubados en un medio que contenía AFPs eran capaces de incorporar estas proteínas en determinados órganos internos. Existe una pequeña ventana temporal en el desarrollo de los embriones de pez cebra, en la cual los blastómeros de la línea marginal, que darán lugar a la línea sincitial y a órganos derivados del aparato digestivo anterior (faringe, páncreas e hígado), captan esas proteínas del espacio perivitelino. La presencia de estas proteínas en la línea sincitial puede suponer un gran avance en la criopreservación de embriones de teleósteos, ya que la estructura más impermeable y más susceptible de sufrir daños estaría protegida (Hagedorn y cols., 1998). Muchos embriones sometidos a vitrificación sufren la rotura del saco vitelino durante el proceso de descongelación, debido a la recristalización del hielo en su interior. La protección de la envuelta que rodea a esta estructura puede incrementar la resistencia de la misma y reducir también este daño mecánico.

Una vez incorporadas las AFPs, el siguiente paso fue evaluar su capacidad crioprotectora. Hasta el momento todos los estudios realizados en este campo han evaluado la supervivencia embrionaria o el porcentaje de embriones que presentan una morfología normal tras la descongelación, sin realizar valoraciones del estado de cada uno de los compartimentos o de la extensión de los daños celulares producidos (Cabrita y cols., 2006; Robles y cols., 2003; Robles y cols., 2005; Zhang y Rawson, 1996). Consideramos que cuando el éxito del protocolo parece tan distante, la evaluación global de la supervivencia o del número de embriones con aspecto aparentemente normal, no aporta datos que puedan indicar con suficiente precisión cuales con los factores a corregir. Por ello el abordaje de este experimento aporta una nueva forma de evaluación de los protocolos de vitrificación y proporciona información interesante, que permite evaluar los pequeños avances que se van produciendo en el diseño de un protocolo de conservación válido. Los resultados obtenidos mostraron que, los embriones que fueron

incubados en un medio que contenía AFPs durante la ventana temporal en la que existen células que captan las proteínas del medio, resisten mejor las bajas temperaturas, duplicando el porcentaje de embriones control eclosionados tras 45 minutos a -10 °C. Robles y cols. (2007), observaron este mismo efecto en embriones de dorada microinyectados con AFPs, consiguiendo porcentajes de eclosión próximos al 100% tras ser incubados a 0 °C durante 1 hora.

Tras la criopreservación también se observó el efecto beneficioso de las AFPs, ya que disminuyó significativamente el porcentaje de embriones que colapsan durante la descongelación. Este hecho fue atribuido a que las AFPs presentes en la línea sincitial confieren mayor resistencia a esta estructura, incrementando la protección del saco vitelino y del compartimento celular, reduciendo la probabilidad de rotura.

Sin embargo, aunque las AFPs mejoran la estructura morfológica, existen daños a nivel celular que impiden que continúe el desarrollo embrionario. Por ello, es necesario realizar un análisis para evaluar qué cantidad de células permanecen viables en el embrión y así determinar la efectividad del proceso. Robles y cols. (2004), analizando homogeneizados de 200-300 embriones de pez cebra y rodaballo observaron que existe actividad enzimática de ciertas enzimas citoplásmicas tras la criopreservación, lo que demuestra que aunque no haya desarrollo embrionario, algunas células aún se mantienen viables. La utilización de homogeneizados de un gran número de embriones no permitía evaluar si la actividad enzimática preservada era mayor en aquellos que presentan buen aspecto tras la descongelación y, de esta forma conocer el alcance del daño celular en estos embriones que no han sufrido el colapso total. En nuestro trabajo conseguimos analizar el porcentaje de células viables en cada uno de los embriones descongelados, observando que el porcentaje de células viables tras la criopreservación no superó el 50%. La incubación de los embriones en presencia de AFPs no incrementó este valor que resulta incompatible con el desarrollo embrionario. Sin embargo, cuando analizamos la supervivencia de estas células a más largo plazo, observamos que las procedentes de embriones incubados con AFPs son capaces de sobrevivir en cultivo durante más tiempo, lo que indica una mejor funcionalidad celular.

Nuestros resultados representan un avance significativo en el campo de la congelación de embriones. Hay que considerar que la introducción de las AFPs no ha alcanzado más que algunas estructuras muy concretas del embrión y que no se ha

utilizado la presencia de AFPs en el medio de vitrificación. Por ello parece posible que si se consiguiera la expresión de estas proteínas en otros tipos celulares, los resultados podrían optimizarse. No obstante, las mejoras observadas en pez cebra no parecen suficientes como para ensayar el mismo planteamiento con embriones de trucha. La gran diferencia de tamaño entre los embriones de ambas especies es suficiente como para prever que aunque se produjera una entrada similar de AFPs, no se conseguiría supervivencia tras la vitrificación. Probablemente, el éxito de la técnica requiera combinar la introducción de estas proteínas, con la expresión artificial de las mismas en otras células y la adopción de algún método adicional para proteger el contenido del saco vitelino. Este último objetivo podría abordarse combinando los tratamientos con AFPs con la expresión de aquaporinas, tal y como han descrito Hagedorn y cols. (2002). Estos ensayos, habrán de hacerse en cualquier caso en una especie modelo como el pez cebra, antes de poder ser transferidos a la trucha común.

Teniendo en cuenta la dificultad que supone la criopreservación de embriones y las posibles aplicaciones de las AFPs, se plantea la criopreservación de blastómeros como alternativa para preservar el material genético de ambos progenitores. La criopreservación de blastómeros se ha desarrollado con éxito en diversas especies de teleósteos. Leveroni Calvi y Maise (1998), elaboraron un protocolo para trucha arco iris, que posteriormente aplicaron en carpa (Leveroni Calvi y Maise, 1999), obteniendo en ambos casos un porcentaje de blastómeros viables superior al 90%. En salmón, los resultados obtenidos por Kusuda y cols. (2002), demostraron que también en esta especie es posible la criopreservación de blastómeros, obteniendo valores de viabilidad tras la descongelación superiores al 60%.

En nuestro estudio hemos comprobado que la incorporación de AFPs a los protocolos convencionales de congelación de blastómeros, también mejora notablemente los resultados obtenidos en pez cebra, observándose que el porcentaje de blastómeros viables se duplica al añadir AFPs a la solución crioprotectora. Este efecto puede ser debido a que, estas proteínas, además de reducir el crecimiento de los cristales de hielo durante la congelación y la descongelación, actúan como agentes estabilizadores de membrana, haciéndola más resistente a los daños funcionales causados durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Tomczak y cols., 2002).

Una vez optimizados los protocolos de criopreservación de blastómeros, sería posible regenerar genotipos completos a partir de los genomas criopreservados, combinando adecuadamente estos métodos con las últimas técnicas de manipulación de embriones. En trucha arco iris, Nilsson y Cloud (1992), desarrollaron un protocolo de formación de quimeras a partir de embriones en los cuales fueron microinyectados blastómeros aislados. Posteriormente, Lin y cols. (1992), mostraron evidencias de integración del genoma de las células del donante en la línea germinal del hospedador, de modo que es posible transferir el patrón genético del donante a la descendencia. Unos años más tarde, Wakamatsu y cols. (2001), demostraron que es posible obtener individuos fértiles y diploides mediante transplante nuclear de blastómeros en ovocitos enucleados de medaka, manteniéndose los caracteres genéticos de los donantes al menos durante la primera y segunda generación.

La aplicación de estas tecnologías supone un gran avance, no sólo en la preservación de la diversidad de las especies de peces, sino que también pueden tener utilidad en la mejora de las técnicas de acuicultura.

Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que el protocolo descrito para criopreservar semen de trucha común es un método apropiado para preservar el potencial genético de los machos de esta especie, y que por lo tanto podría ser utilizado para congelar muestras destinadas a formar parte de un GRB.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, la criopreservación de blastómeros es una alternativa válida para preservar el genoma diploide en peces, al menos hasta que sean desarrollados métodos que hagan posible la criopreservación de embriones, ya que los avances conseguidos en este último campo, aunque significativos, no permiten esperar éxitos en un futuro próximo. La incorporación de AFPs durante el periodo del desarrollo embrionario en el cual se forman los blastómeros marginales responsables del desarrollo del digestivo anterior, así como su adición a la solución de criopreservación aporta beneficios que deben ser tenidos en

cuenta a la hora de diseñar un protocolo de congelación, tanto para blastómeros como para embriones completos.

La recuperación de la población original de trucha común amenazada, será posible a partir de esas muestras criopreservadas, tanto espermatozoides como blastómeros, aplicando las nuevas tecnologías desarrolladas en biología de la reproducción. La reconstrucción de la población a partir de espermatozoides, se podrá llevar a cabo utilizando técnicas convencionales de fecundación u otras más complejas como la androgénesis, dependiendo de las necesidades del momento. Cuando el material de partida sean blastómeros, se requerirán técnicas más complicadas como microinyección de blastómeros para creación de quimeras o transferencia nuclear a ovocitos enucleados, con la ventaja de que será preservado el material genético de ambos progenitores.

Bibliografía

- Aitken RJ, Baker MA. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 250: 66-69.
- Beirão J, Robles V, Herraéz MP, Sarasquete C, Dinis MT, Cabrita E. 2006. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture*; 261: 897-903.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*; 73: 1338-1344.
- Cabrita E, Alvarez R, Anel L, Rana KJ, Herraéz MP. 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*; 37: 245-253.
- Cabrita E, Anel L, Herraéz MP. 2001a. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*; 56: 623-635.
- Cabrita E, Martinez F, Alvarez M, Herraéz MP. 2001b. The use of flow cytometry to assess membrane stability in fresh and cryopreserved trout spermatozoa. *Cryo Letters*; 22: 263-272.
- Cabrita E, Robles V, Chereguini O, de Paz P, Anel L, Herraéz MP. 2003. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology*; 60: 463-473.
- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herraéz MP. 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*; 50: 144-153.
- Cabrita E, Robles V, Wallace JC, Sarasquete MC, Herraéz MP. 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture*; 251: 245-255.
- Drokin S, Stein H, Bartscherer H. 1998. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta F. fario*). *Cryobiology*; 37: 263-270.
- Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans FW, Wildt DE. 1997. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. *Cryobiology*; 34: 335-347.

- Hagedorn M, Kleinhans FW, Artemov D, Pilatus U. 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biology of Reproduction*; 59: 1240-1250.
- Hagedorn M, Lance SL, Fonseca DM, Kleinhans FW, Artimov D, Fleischer R, Hoque AT, Hamilton MB, Pukazhenthil BS. 2002. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. *Biology of Reproduction*; 67: 961-966.
- Isayeva A, Zhang T, Rawson DM. 2004. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*; 49: 114-122.
- Janik M, Kleinhans FW, Hagedorn M. 2000. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology*; 41: 25-34.
- Kohli V, Robles V, Cancela ML, Acker JP, Waskiewicz AJ, Elezzabi AY. 2007. An alternative method for delivering exogenous material into developing zebrafish embryos. *Biotechnology and Bioengineering*; 98: 1230-1241.
- Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. 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.
- Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. 2004. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*; 61: 1661-1673.
- Kopeika J, Zhang T, Rawson D. 2006. Zebrafish embryos (*Danio rerio*) using microinjection. *Cryo Letters*; 27: 319-328.
- Kusuda S, Teranishi T, Koide N. 2002. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology*; 45: 60-67.
- Labbé C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*; 60: 397-404.
- Leveroni Calvi S, Maisse G. 1998. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on postthaw survival rate. *Cryobiology*; 36: 255-262.

- Leveroni Calvi S, Maisse G. 1999. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomeres. *Aquatic Living Resources*; 12: 71-74.
- Lin S, Long W, Chen J, Hopkins N. 1992. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 89: 4519-4523.
- Mirzoyan AV, Nebesikhina NA, Voynova NV, Chistyakov VA. 2006. Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). *International Journal of Refrigeration. Issue with Special Emphasis on Cryobiology*; 29: 374-378.
- Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C. 2008. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology of Reproduction*; 78: 390-399.
- Nilsson EE, Cloud JG. 1992. Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 89: 9425-9428.
- Ogier de Baulny B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maisse G. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*; 34: 141-149.
- Robles V, Cabrita E, Real M, Alvarez R, Herraes MP. 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology*; 47: 30-39.
- Robles V, Cabrita E, de Paz P, Cunado S, Anel L, Herraes MP. 2004. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Theriogenology*; 61: 1367-1379.
- Robles V, Cabrita E, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Herraes MP. 2005. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology*; 64: 1633-1646.

- Robles V, Cabrita E, Anel L, Herraéz MP. 2006. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution. *Aquaculture*; 261: 1299-1306.
- Robles V, Barbosa V, Herraéz MP, Martínez-Paramo S, Cancela ML. 2007. The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology*; 68: 284-289.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; 531: 231-251.
- Tomczak MM, Hinch DK, Estrada SD, Wolkers WF, Crowe LM, Feeney RE, Tablin F, Crowe JH. 2002. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophysical Journal*; 82: 874-881.
- Wakamatsu Y, Ju B, Pristiyazhnyuk I, Niwa K, Ladygina T, Kinoshita M, Araki K, Ozato K. 2001. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 98: 1071-1076.
- Watson PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*; 62: 483-492.
- Watson PF, Morris GJ. 1987. Cold shock injury in animal cells. *Symposia of the Society for Experimental Biology*; 41: 311-340.
- Watson PF, Fuller BJ, 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos. In: *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future*. (Eds Watson PF, Holt WV), pp. 21-46. Taylor and Francys, London.
- Watson PF, Holt WV, 2001. *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future*. Taylor and Francys, London.
- Zhang T, Rawson DM. 1996. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*; 33: 1-13.
- Zhang T, Rawson DM. 1998. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology*; 37: 13-21.

Zhang T, Isayeva A, Adams SL, Rawson DM. 2005. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*; 50: 285-293.

Zhang T, Wang RY, Bao Q-Y, Rawson DM. 2006. Development of a new rapid measurement technique for fish embryo membrane permeability studies using impedance spectroscopy. *Theriogenology*; 66: 982-988.

CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de los trabajos que constituyen esta tesis doctoral son las siguientes:

1. La congelación de semen de trucha común de las poblaciones características de las cuencas del Esla y el Duerna, utilizando como diluyente la solución #6 Erdahl y Graham con 10% de yema de huevo y 7% de DMSO en proporción 1:3 (semen:diluyente), envasado en pajuelas de 0.5 ml y mantenido 10 minutos a 2 cm sobre la superficie de nitrógeno líquido, no redujo el porcentaje de espermatozoides viables, ni incrementó el valor medio de fragmentación de su ADN, aunque el porcentaje de células con menos de un 5% de la cromatina fragmentada resultó menor tras la congelación/descongelación.
2. La criopreservación seminal disminuyó significativamente el porcentaje de huevos fecundados, poniendo en evidencia otros daños funcionales que afectan a su capacidad fecundante o al desarrollo temprano de los embriones.
3. Las alteraciones espermáticas provocadas por la criopreservación no constituyen una forma de selección gamética puesto que las descendencias obtenidas a partir de semen fresco y congelado, mostraron el mismo patrón genotípico en ambos casos en las dos poblaciones estudiadas. Por ello la congelación espermática se considera un método apropiado para preservar el potencial genético de los machos de trucha común, ya que permitió mantener la variabilidad en la descendencia y proporcionó tasas de fecundación suficientes para garantizar la recuperación de la población original debido a la gran prolificidad de esta especie.
4. La incubación de embriones de pez cebra en un medio que contiene AFPs entre el estadio de 128 células y el de blástula avanzada, resultó ser un método efectivo, sencillo e inocuo para introducir estas proteínas en las células derivadas de los blastómeros marginales: los órganos derivados del digestivo anterior, así como en el interior de la línea sincitial, considerada como la barrera más impermeable de la estructura embrionaria.
5. La incorporación de AFPs en esas estructuras incrementó la resistencia al frío de los embriones de pez cebra, así como la protección del compartimento embrionario durante la vitrificación/descongelación, reduciendo el porcentaje de embriones que colapsan durante el proceso y mejorando la supervivencia en cultivo de las células

embrionarias. La disociación de las células embrionarias y el estudio de su supervivencia en cultivo indicó que a pesar de las mejoras conseguidas, el porcentaje de células viables a largo plazo en embriones descongelados es insuficiente para permitir su desarrollo tras la descongelación. Estos resultados desaconsejan el inicio de experiencias en embriones de salmónidos en tanto no se consigan resultados más favorables.

6. La incorporación de AFPs a los protocolos convencionales de congelación de blastómeros, mejoró notablemente los resultados obtenidos en pez cebra, abriendo nuevas direcciones para preservar el material genético de ambos progenitores hasta que sea desarrollada con éxito la criopreservación de embriones.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer su apoyo durante el desarrollo de este proyecto:

En primer lugar, a la Dra. Paz Herráez por la confianza depositada en mí desde el primer momento, y su apoyo a la hora de sacar adelante este trabajo.

A los doctores, compañeros y amigos Dra. Vanesa Robles, Dra. Elsa Cabrita y Dr. Felipe Martínez-Pastor, por todo lo que me han enseñado durante estos años.

A mis compañeros, Sera y Zê, por su colaboración en el trabajo experimental, y por saber poner ese punto de calma cuando los nervios aprietan.

A mis compañeros becarios, y no becarios del Área de Biología Celular: Seve, Sheyla, Bea, Hugo, Camino, Leticia, Alberto, Deli, Marta y María. Gracias por vuestra colaboración y por hacerme pasar tan buenos ratos. Al grupo de criobiología, por su apoyo y total disposición.

A mis amigos y colegas biólogos, que aunque no han estado aquí directamente durante el desarrollo de mi tesis, me han hecho disfrutar muchísimo del camino hasta llegar aquí. Y a mis amigos de Valladolid y León, que aunque muchas veces no entienden muy bien que hago aquí en la Universidad tantos años, me hacen sentir especial.

Al personal de la piscifactoría de Vegas del Condado, por su disponibilidad y ayuda en el manejo de las truchas.

A Deme por estar siempre ahí, en los buenos y en los malos momentos; y a su familia, por hacerme sentir parte de ella.

Y por último pero no menos importante a mi familia; a mis hermanos, mis sobrinos, y por supuesto a mis padres, porque gracias a su apoyo incondicional y sus consejos he conseguido llegar hasta aquí.

ANEXOS

View Letter

Close

Date: 11 Sep 2008
To: "Sonia Martinez-Paramo" smarpa@unileon.es
From: therio.europe@unimi.it
Subject: Your Submission THERIO-D-08-00345R1
Ms. Ref. No.: THERIO-D-08-00345R1
Title: Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential
Theriogenology

Dear Ms Martinez-Paramo,

I am pleased to confirm that your manuscript, "Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential, has been accepted for publication in *Theriogenology*.

The files have been forwarded to the publisher and you will be contacted in due course regarding galley proofs.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Fulvio Gandolfi, DVM, PhD
Co-Editor-in-Chief
Theriogenology

View Letter

Close

Date: Sep 12, 2008
To: "Paz Herraéz" paz.herraéz@unileon.es
From: "Cryobiology" biol29@york.ac.uk
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: CRYO-D-08-00010

Title: CRYOPROTECTIVE EFFECTS OF ANTIFREEZE PROTEINS DELIVERED INTO ZEBRAFISH EMBRYOS

Cryobiology

Dear Dr Paz Herraéz,

I confirm that your manuscript is now accepted for publication in Cryobiology and has been sent to Elsevier. Can I please stress the importance of dealing promptly with any enquiries that may come to you from the publisher, particularly that you deal with proofs promptly and within the time limits specified.

Any delay at that stage means either that the issue will have to go ahead without your paper or that all the papers in that issue will be held up awaiting the final set of proofs. Neither of these is desirable and your cooperation in this matter will be much appreciated.

Thank you for submitting your paper to Cryobiology

With kind regards,

David E. Pegg
Editorial Office
Cryobiology

