

MI PROYECTO DE TESIS

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

Sonia Martínez Páramo

Área de Biología Celular. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 24071. León.

smarpa@unileon.es

Según la IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), actualmente hay 1.275 especies de peces en peligro de extinción o amenazadas a distintos niveles. En concreto, en la provincia de León, la especie más amenazada es la trucha común (*Salmo trutta* L.), siendo las pertenecientes a las cuencas fluviales del Esla y del Duerna las poblaciones objeto de nuestro estudio. Para paliar el efecto de la degradación ambiental, se han desarrollado programas de repoblación con *stocks* híbridos obtenidos de cruzamientos entre machos autóctonos y hembras de procedencia centroeuropea, obteniendo individuos muy resistentes a las enfermedades en cautividad, pero que a su vez resultaron muy vulnerables en el medio natural, debido probablemente a que se produjo un fenómeno de introgresión génica que hizo desaparecer caracteres seleccionados, favorables en un determinado hábitat y reduciendo la variabilidad génica de las poblaciones salvajes (Corujo et al., 2004). En la actualidad se realizan repoblaciones con individuos criados en cautividad a partir de individuos fundadores de las poblaciones originales, con el consiguiente riesgo de deriva génica que se produce a lo largo de las generaciones (Ostergaard et al., 2003).

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. El objetivo de mi tesis fue 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 previos obtenidos en congelación de embriones de peces.

Para la criopreservación seminal se utilizó una solución crioprotectora que contiene yema de huevo como estabilizador de membrana y DMSO como

crioprotector principal. Se realizó un estudio de la calidad de la muestra antes y después de la criopreservación a nivel de estabilidad de la membrana plasmática (doble tinción SYBR-14/ioduro de propidio), integridad del ADN (ensayo cometa) y capacidad fecundante de los espermatozoides. Los resultados mostraron que el porcentaje de células que no presentaron alteraciones en la membrana, así como el valor medio de fragmentación del ADN no incrementaron tras la criopreservación. Sin embargo, la tasa de fecundación disminuyó de forma notable, debido probablemente a la suma de pequeños daños causados en las células a diferentes niveles durante el proceso. Aunque el valor medio de fragmentación del ADN no incrementó de forma significativa tras la descongelación, sí se produjo una reducción en el número de espermatozoides que mantuvieron un grado de fragmentación inferior al 10%, así como el de aquellos que conservaron su capacidad fecundante, por lo que se consideró que durante el proceso de congelación/descongelación podría ocurrir una selección de los espermatozoides más resistentes. Esta selección podría dar lugar a una descendencia cuyo patrón genético no fuese exactamente idéntico al obtenido con semen fresco y al de los parentales. El análisis de microsatélites descartó esta hipótesis, ya que los perfiles genéticos de las progenies obtenidas a partir de semen fresco y congelado eran idénticos (Martínez-Páramo et al., 2009a), confirmando de esta forma que a pesar de la disminución de las tasas de fecundación, la congelación seminal es una herramienta adecuada para conservar fielmente el germoplasma de trucha común.

En cuanto a la criopreservación de embriones y ovocitos, nunca se ha alcanzado con éxito en teleósteos, debido principalmente a su gran tamaño y complejidad estructural. Los mayores éxitos descritos hasta el momento fueron los obtenidos por nuestro equipo en criopreservación de embriones de *Pseudopleuronectes americanus*, y que fueron atribuidos a la presencia de unas proteínas anticongelación (AFPs) que esta especie del Ártico expresa naturalmente (Robles et al., 2005). Teniendo esto en cuenta, se planteó la posibilidad de diseñar un protocolo que permitiera incorporar estas AFPs en embriones de otras especies, con el fin de incrementar su resistencia a la criopreservación. Debido a que los embriones de salmónidos tienen un tamaño particularmente grande y un desarrollo lento, y a que existe un escasísimo conocimiento sobre sus características criobiológicas, se utilizaron embriones de una especie modelo, el pez cebra, para poner a punto estas técnicas y desarrollar mejoras que puedan ser aplicadas a la trucha común. Los resultados obtenidos mostraron que los embriones de pez cebra, en un estadio concreto de desarrollo (128 células), son capaces de incorporar las AFPs presentes en el medio de incubación, a través de los blastómeros marginales que darán lugar a los derivados del digestivo anterior y a la línea sincitial que rodea el vitelo, que es

considerada la estructura más susceptible de sufrir daños durante la criopreservación. Se observó además que las AFPs incorporadas en estadios tempranos permanecen durante el desarrollo al menos hasta la eclosión, localizándose en la línea sincitial y en otros órganos derivados del digestivo anterior como la faringe, el hígado y el páncreas (**Figuras 1 A y B**). La presencia de estas proteínas en el embrión incrementó su resistencia a bajas temperaturas (-10°C), disminuyó el porcentaje de embriones que colapsan durante la descongelación, y favoreció la protección del compartimento celular, prolongando la supervivencia *in vitro* de las células embrionarias (Martínez-Páramo et al., 2008). Los avances obtenidos demostraron que las AFPs ejercen un efecto crioprotector, pero que sigue siendo insuficiente para conseguir con éxito el desarrollo embrionario tras la descongelación. Por ello, teniendo en cuenta la dificultad que supone la criopreservación de embriones de pez cebra, se consideró innecesario realizar experiencias paralelas con embriones de trucha. Como alternativa se evaluó la incorporación de AFPs a los protocolos de congelación de blastómeros, que permite la preservación del material genético de ambos progenitores. La incorporación de estas proteínas proporcionó resultados muy satisfactorios ya que tras la descongelación se duplicó el porcentaje de blastómeros viables (Martínez-Páramo et al., 2009b).

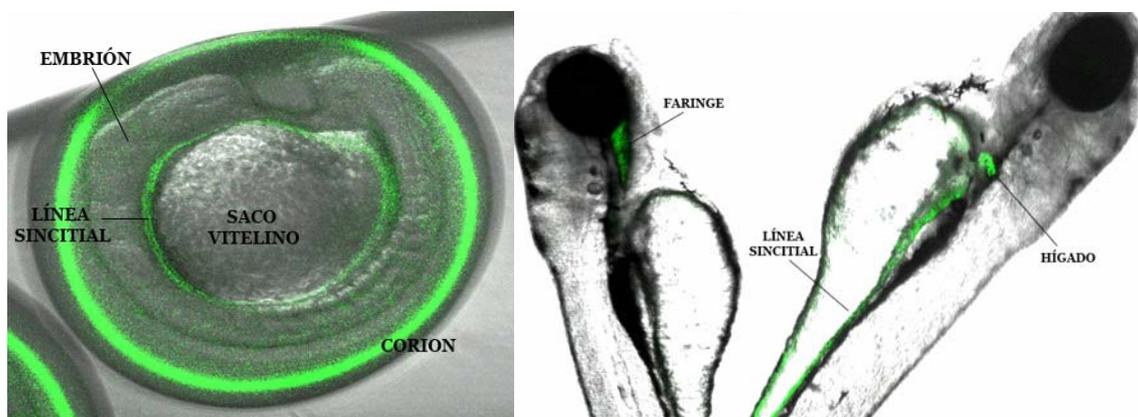


Figura 1: A) Embrión de pez cebra durante el estadio de esbozo caudal. La imagen de microscopía confocal (objetivo 10X) muestra la localización de las AFPs (marcadas con FITC), en el interior de la línea sincitial así como en el espacio perivitelino entre el corion y el compartimento embrionario. **B)** Larvas de pez cebra inmediatamente tras la eclosión. La imagen de microscopía confocal (objetivo 10X) muestra la localización de las AFPs (marcadas con FITC), en el interior de la línea sincitial, la faringe y el hígado.

Con el trabajo realizado podemos concluir que la criopreservación seminal es un método apropiado para preservar el potencial genético de los

machos de trucha común, y por lo tanto es apto para congelar muestras destinadas a formar parte de un banco de recursos genéticos, que posteriormente podrán ser utilizadas para recuperar la población amenazada mediante la realización de cruces sucesivos, o la aplicación de técnicas de androgénesis. Por otra parte, la opción más realista para preservar el material genético de ambos progenitores parece ser la congelación de blastómeros, que posteriormente podrían ser utilizados en programas de repoblación, mediante creación de quimeras o transferencia nuclear a ovocitos enucleados, para lo cual aún es necesario un largo proceso de investigación. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral fueron publicados en *Cryobiology* y *Theriogenology*, revistas internacionales reconocidas en el área de la criobiología y la reproducción animal.

Bibliografía (incluye las publicaciones surgidas del proyecto de tesis)

- 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.
- Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Robles V, Anel L, Herráez MP. (2008) Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method. *Cryobiology*. 56: 216-222.
- Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez JA, Herráez MP. (2009a) Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*. 71: 594-604.
- Martínez-Páramo S, Barbosa V, Pérez-Cerezales S, Robles V, Herráez MP. (2009b) Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*. 58: 128-133.
- 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.
- 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: 1633-1646.

Dirigida por:

Dra. Paz Herráez Ortega (Área de Biología Celular, Departamento de Biología Molecular).

Otros miembros del equipo de investigación:

Dra. Elsa Cabrita (ICMAN, CSIC. Cádiz)

Dra. Vanesa Robles (Área de Biología Celular, Universidad de León)
Dr. Luis Anel Rodríguez (Área de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de León)
Dr. Paulino de Paz (Área de Biología Celular, Universidad de León)
D. Serafín Pérez Cerezas (Área de Biología Celular, Universidad de León)
D. Jose Beirão (Área de Biología Celular, Universidad de León)

Galería de fotos



En la fotografía aparece el grupo de investigación de la Dra. Paz Herráez Ortega (en el centro) junto a la autora de este trabajo de tesis y D. Serafín Pérez Cerezas, miembro del grupo de investigación.