



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

MASTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Contribución al establecimiento de un modelo de estudio de imprinting y reprogramación basado en el cultivo de células haploides y transferencia nuclear en pez cebra

Tesis de Master
Valencia, Julio 2011

María del Carmen Santos Merino

Director:
Fernando García Ximénez

Resumen

La existencia del mecanismo de imprinting en pez cebra puede ser útil para estudiar el papel que cumple este mismo fenómeno en mamíferos. Para intentar averiguar cómo tiene lugar el imprinting en pez cebra, se han construido larvas haploides ginogenotas y androgenotas. Las larvas haploides ginogenotas se produjeron por fertilización de ovocitos con espermatozoides radiados con luz UV, y las larvas haploides androgenotas por fertilización de ovocitos radiados con luz UV con espermatozoides sin radiar. La radiación UV no es eficaz en la inactivación del material genético materno, de ahí que se obtuviera un mayor porcentaje de larvas haploides ginogenotas que androgenotas. Se observó una mayor tasa de desarrollo hasta larva de 24 horas en androgenotas, que indicaría de un lado que la radiación UV del oocito solo afecta a la cromatina nuclear pero no a la organización ooplasmática y, de otro, que el material genético paterno es más importante en las primeras etapas del desarrollo embrionario que el genoma materno o bien que la activación mediante el espermatozoide radiado previamente no es totalmente eficiente. Las larvas haploides sobrevivieron, en algunos casos, hasta 11-16 días. Este hecho es de gran relevancia, ya que hasta ahora solo se habían observado supervivencias máximas de hasta 5 días. El uso de los cultivos celulares derivados de tales larvas en experimentos de trasplante nuclear de células somáticas, permitirá evaluar mejor la capacidad del ovocito para reprogramar el núcleo de células somáticas haploides procedentes de larvas ya totalmente diferenciadas.

Abstract

The existence of the imprinting mechanism in zebrafish can be useful for studying the role of this phenomenon in mammals. To try to investigate how imprinting occurs in zebrafish, we have been constructed androgenetic and ginogenetic haploid larvae. Ginogenetic haploid larvae were produced by fertilizing eggs with sperm irradiated by ultraviolet light, and the androgenetic haploid larvae by fertilization eggs irradiated by ultraviolet light by sperm without irradiate. Ultraviolet radiation is not effective in the inactivation of the maternal genetic material, hence to obtain a higher percentage of ginogenetic haploid larvae than androgenetic. There was a higher rate of development to larvae of 24 hours in androgenetic, indicating in one hand that the ultraviolet radiation of the oocyte only affects the nuclear chromatin organization but not affects the ooplasmatic one and, in the other hand, that the paternal genetic material is more important in the early stages of embryonic development than the maternal genome or that the activation by previously irradiated sperm is not totally efficient. Haploid larvae survived, in some cases, up to 11-16 days. This is very important because until our studies it hadn't been observed survival up to 5 days. The use of cell cultures derived from these larvae in somatic cell nuclear transplantation will allow us to evaluate better the ability of the oocyte to reprogram the nucleus of somatic cells from haploid larvae fully differentiated.

Índice

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características biológicas del pez cebra	1
1.1.1. Características generales	1
1.1.2. Ciclo biológico	2
1.1.3. Freza y fecundación	3
1.1.4. Activación oocitaria	3
1.1.5. Desarrollo embrionario	4
1.2. El pez cebra como modelo animal	8
1.2.1. Antecedentes	8
1.2.2. Principales ámbitos de aplicación del pez cebra	9
1.2.2.1. Biomedicina	10
1.2.2.2. Cáncer	11
1.2.2.3. Medicina regenerativa	11
1.2.2.4. Desarrollo de nuevos productos químicos para biomedicina	12
1.2.2.5. Toxicología	12
1.3. Una aplicación científica muy especial: obtención de haploides	12
1.3.1. Utilización de haploides	12
1.3.2. Tipos de organismos haploides (ginogenotas y androgenotas)	13
1.3.3. Técnicas de obtención de organismos haploides	14
1.4. Imprinting gamético	17
1.4.1. Origen y definición	17
1.4.2. Estudios pioneros de imprinting	18
1.4.3. Establecimiento del imprinting gamético en mamíferos (ratón)	19
1.4.4. Estudio de imprinting en pez cebra	21
1.5. Transplante nuclear en pez cebra	21
II. OBJETIVOS	25

III. MATERIAL Y MÉTODOS	26
3. 1. Cuidado y mantenimiento de las colonias de peces cebra	26
3. 2. Obtención de gametos no activados	26
3.2.1. Obtención de ovocitos	27
3.2.2. Obtención de semen	29
3.3. Radiación de gametos	31
3.3.1. Radiación de semen (Obtención de ginogenotas)	31
3.3.2. Radiación de ovocitos (Obtención de androgenotas)	31
3.3. Fecundación <i>in vitro</i>	32
3.4. Cultivo de larvas haploides	32
3.5. Diseño experimental	34
3.6. Análisis estadístico	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
V. CONCLUSIONES	43
VI. BIBLIOGRAFÍA	44

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Dimorfismo sexual en pez cebra	1
Figura 2. Localización de la glándula de eclosión en larvas de 24 horas	2
Figura 3. Imagen de la región micropilar de un ovocito no fertilizado	3
Figura 4. Fotografías de las cinco primeras divisiones en huevos de pez cebra	5
Figura 5. Embrión de pez en estadio MBT	6
Figura 6. Embrión de pez al final del estadio de gastrulación	7
Figura 7. Larva haploide	17
Figura 8. Mantenimiento de las colonias de peces cebra adultos	26
Figura 9. Obtención de ovocitos	28
Figura 10. Obtención de semen	30
Figura 11. Equipos necesarios para la radiación de gametos	31
Figura 12. Métodos de cultivo de larvas haploides	33
Figura 13. Embrión en estadio MBT	34

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Tasas de fecundación, de desarrollo de embriones a larvas y porcentaje de larvas haploides	36
Tabla 2. Capacidad de rotura del corion de las larvas haploides	38
Tabla 3. Supervivencia de las larvas haploides	39
Tabla 4. Porcentaje de larvas que sobreviven a los 5 y 10 días post-fertilización	41
Tabla 5. Tasas de fijación y proliferación de los cultivos de larvas	42

Índice de gráficas

	Pág.
Gráfica 1. Evolución de la supervivencia de las larvas a lo largo del tiempo	40

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Características biológicas del pez cebra

1.1.1. Características generales

El pez cebra, perteneciente al género *Brachydanio* (Fam. *Cyprinidae*), es un pez tropical de agua dulce originario del sudeste asiático (India, Pakistán, Bhután, Bangladesh, Nepal y Birmania) (Menon, 1999; Westerfield, 2000; Bhat, 2003). En general, los peces cebra prefieren las aguas en calma o con bajo movimiento, ligeramente alcalinas (pH \approx 8.0) y con alta transparencia (\sim > 35 cm) (McClure, 2006; Spence, 2006).

Esta especie es de pequeño tamaño, variando entre 4 y 6 cm su longitud y entre 2 y 3 gramos su peso. Presentan un color de fondo dorado o plateado, con cinco bandas longitudinales que comienzan detrás del opérculo y llegan hasta el extremo de la aleta caudal, dándole un aspecto cebrado que le otorga su nombre común. La aleta anal también está rayada pero no la dorsal. La vida media de estos animales es de 2 a 3 años (Moody, 1999).

Presentan dimorfismo sexual (Figura 1), siendo la hembra más robusta que el macho, con el vientre más voluminoso (en edad fértil) y de color plateado. El macho es más estilizado y su vientre presenta una tonalidad más amarillenta. Cuando la hembra está cargada de huevos se hace más evidente el dimorfismo sexual.



Figura 1. Dimorfismo sexual en pez cebra. En la parte superior de la imagen se observa al macho y en la inferior a la hembra.

1.1.2. Ciclo biológico

El pez cebra es de reproducción ovípara, presentando un rápido desarrollo embrionario. Alrededor de 24 horas después de la fecundación, los órganos más importantes están ya formados en la larva y durante el tercer día se produce la eclosión. La eclosión se debe a la acción de una enzima (ZHE1) que es expresada en las células de las glándulas de eclosión localizadas en el vitelo de embriones de 24 horas (Sano *et al.*, 2008). Esta enzima es una metaloproteasa que cataliza la digestión del corion (Okada *et al.*, 2009) (Figura 2). Las larvas no requieren alimento hasta después del quinto día de vida, ya que durante este tiempo se nutren del vitelo. Tras la reabsorción del vitelo, aproximadamente 2 días después de la eclosión, las larvas comienzan ya a ingerir alimento.



Figura 2. Localización de la glándula de eclosión en larvas de 24 horas (Thisse *et al.*, 2001).

Alcanzan la madurez sexual a los 3-4 meses aunque la producción máxima de huevos se da a los 7-18 meses de edad. El ciclo sexual de la hembra está sujeto a un ritmo circadiano. La freza se produce una hora después del amanecer, natural o artificial, y los huevos son fertilizados externamente en los siguientes 10-15 minutos. Tras manifestar comportamiento sexual, la probabilidad de puesta por pareja individual es del 50 %. Las hembras pueden ovular y frezar entre 50 y 100 oocitos por semana. La reproducción está influenciada por las condiciones ambientales y el estado del animal (Moody, 1999).

1.1.3. Freza y fecundación

En el proceso de fertilización, el espermatozoide solo puede atravesar el corion y fusionarse con el oocito a través del micropilo (Wolenski y Hart, 1987), que en el caso del pez cebra es difícil de visualizar (Poleo *et al.*, 2001). La región del micropilo consta de 7-10 ranuras y crestas que desembocan directamente en una especie de vestíbulo central, único lugar por el que el espermatozoide puede entrar en contacto con el oocito subyacente (Figura 3). Tras la penetración del espermatozoide, el micropilo se sella y se produce una aglutinación espermática a lo largo de las ranuras.

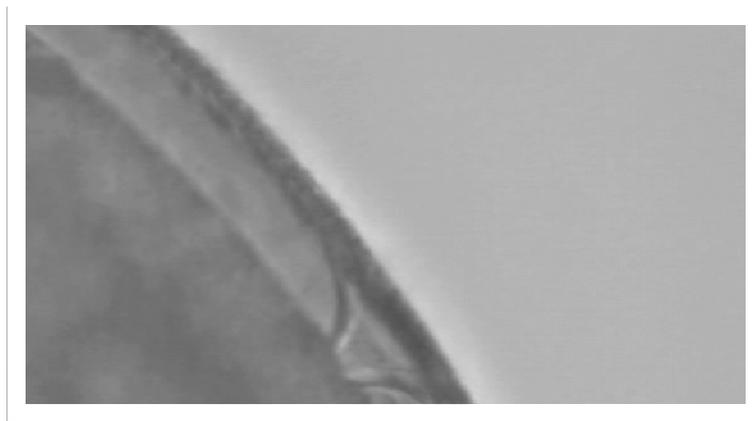


Figura 3. Imagen de la región micropilar de un ovocito no fertilizado.

Cuando la hembra freza los oocitos, el vitelo y el citoplasma se hallan mezclados, estando el huevo cubierto por el corion transparente. Al entrar en contacto con el agua, el oocito se activa (Hart y Fluck, 1995; Sakai *et al.*, 1997) y se produce una segregación, de forma que se diferencian el polo animal y el vegetativo (Lee *et al.*, 1999). Existe una asociación entre el punto de entrada del esperma y el lugar de formación del polo animal (Amanze e Iyengar, 1990). En este punto se encuentra la placa metafásica.

1.1.4. Activación oocitaria

En el pez cebra, como en la gran mayoría de especies animales, el proceso de activación oocitaria se inicia por el aumento transitorio de calcio libre intracitoplasmático provocado por el contacto con el agua y que se completa con la

penetración espermática. Se genera así una única oleada de calcio que atraviesa el oocito a una velocidad de $9 \mu\text{m/s}$. La onda se inicia en el polo animal, en la región del micropilo y se propaga a través del vitelo hasta llegar al extremo opuesto, en el polo vegetal (Lee *et al.*, 1999). Como ya se ha dicho, la exposición al agua dulce supone el inicio de la activación del ovocito, pero ésta resulta incompleta en ausencia de espermatozoide, por lo que no se sigue con la primera división de segmentación (Sakai *et al.*, 1997), no dando lugar a desarrollo partenogenético alguno.

1.1.5. Desarrollo embrionario

Kimmel *et al.* (1995) han establecido la secuencia de estadios del desarrollo embrionario característico de los peces teleósteos:

1) El **estadio de cigoto** comienza con la fertilización, que desencadena los primeros movimientos citoplásmicos responsables de la división asimétrica del citoplasma, con la expulsión del segundo corpúsculo polar y las primeras divisiones de segmentación, que afectan solo a la región del polo animal. Las seis primeras divisiones (Figura 4) son incompletas y totalmente pautadas, alternando divisiones perpendiculares y paralelas al eje longitudinal, que se producen a intervalos de 15 minutos (**estadio de división**). Como consecuencia de ello, la forma del blastocisto es elipsoidal y su eje mayor determinará la orientación del eje longitudinal del embrión.

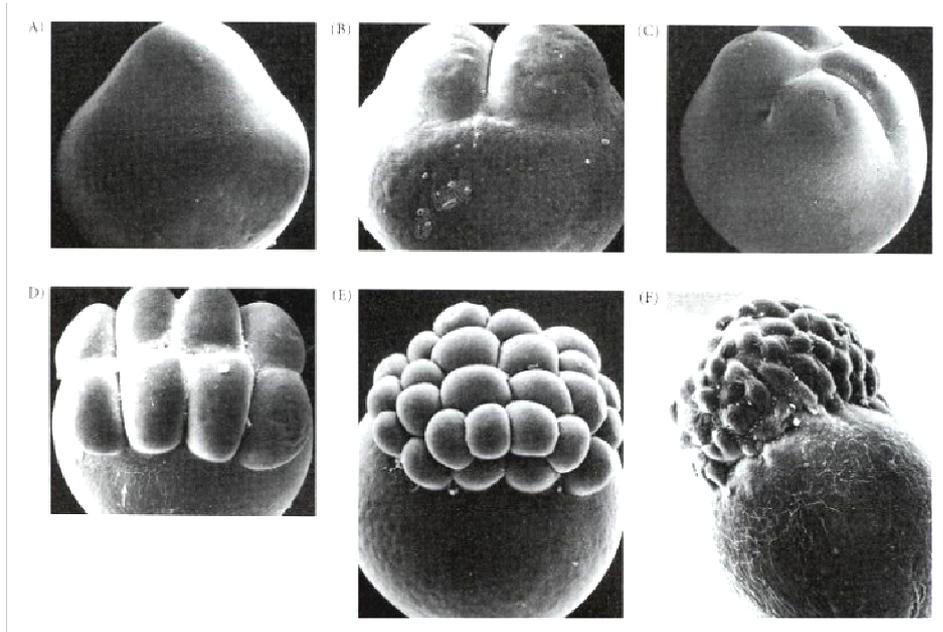


Figura 4. Fotografías de las cinco primeras divisiones en huevos de pez cebra. (A) Estadio de una célula. (B) Estadio de 2 células. (C) Estadio de 4 células. (D) Estadio de 8 células. (E) Estadio de 32 células. (F) Estadio de 64 células (Beams y Kessel, 1976).

2) Cuando el embrión está compuesto por 64 células se inicia el **estadio de blástula**. Durante este periodo el embrión entra en la transición a media blástula (MBT: Mid Blastula Transition), se originan las tres linajes celulares (capa de yema sincitial (YSL), capa envolvente (EVL) y capa profunda (DL); Figura 5) y comienza la epibolia.

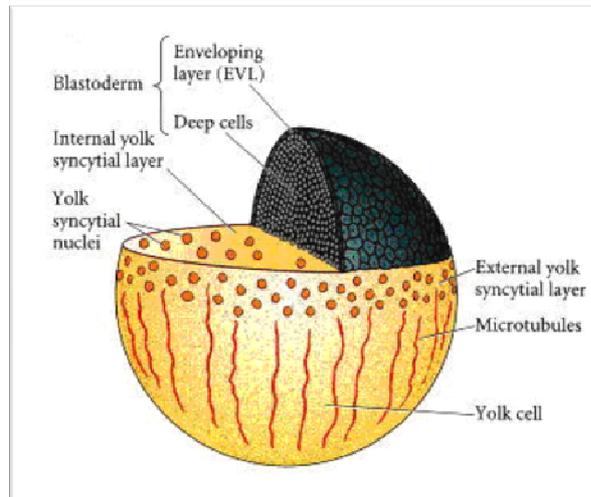


Figura 5. Embrión de pez en estadio MBT. Obsérvense los tres linajes celulares: EVL, YSL y DL (Gilbert, 2000).

En la etapa de blástula temprana, el polo animal sigue teniendo aspecto elipsoidal, las células continúan dividiéndose pero de forma metasincrónica, es decir, no totalmente síncronas pero sí agrupadas en oleadas de divisiones correspondientes a cada ciclo de división, y perdiendo así su disposición regular. El alargamiento del ciclo celular marca el comienzo de la MBT (Kane y Kimmel, 1993) que tiene lugar hacia la décima división celular y que se corresponde con el estado de 512 células (Newport y Kirshner, 1982a, 1982b).

Una vez ha comenzado la MBT, las células de la capa profunda del polo animal empiezan a adquirir movilidad durante su larga interfase y además se activa la transcripción en ellas. Estas dos características son esenciales para el proceso posterior de gastrulación (Kane y Kimmel, 1993).

La YSL se forma en el noveno o décimo ciclo celular, cuando las células del polo vegetal del blastodermo se asocian con las células de la base del vitelo, produciéndose un anillo de núcleos justo debajo del blastodermo. Una parte de la YSL se extenderá hacia la zona inferior del polo animal formando la capa sincicial interna (I-YSL: internal syncytial layer) que desempeñará una función nutritiva. El resto de la YSL forma la capa sincicial externa (E-YSL: external syncytial layer), que constituye el motor de la epibolia (Trinkaus, 1984).

3) El **estadio de gástrula** se caracteriza por la formación de las capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y por la determinación del mapa de territorios presuntivos, estadio que coincide con el 50 % de la epibolia. Las células de la capa profunda se mueven hacia el exterior para intercalarse con las células más superficiales (Warga y Kimmel, 1990). Posteriormente, estas células migran hacia la superficie del huevo para envolverlo por completo. Durante la migración, uno de los lados del blastodermo se vuelve notablemente más grueso que el otro (Figura 6).

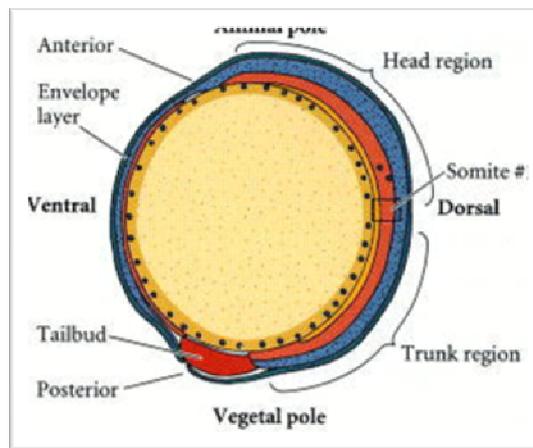


Figura 6. Embrión de pez al final del estadio de gastrulación. Obsérvese el engrosamiento del blastodermo en la parte inferior del embrión (Gilbert, 2000).

4) Seguidamente, comienza el **estadio de segmentación** que se caracteriza por la formación de pares de somites a intervalos de tiempo regulares. Esta etapa finaliza alrededor de las 24 horas de desarrollo y a partir de aquí comienza el **estadio de paraangula**, en el que tiene lugar la organogénesis. Durante el tercer día, los embriones eclosionan, pero la larva aún no está completamente desarrollada. El sistema digestivo es el último en formarse y hasta el cuarto o quinto día postfertilización se nutren exclusivamente de las reservas de vitelo.

1.2. El pez cebra como modelo animal

1.2.1. Antecedentes

Ya en los años treinta, Jane Oppenheimer (1936) y otros propusieron el pez cebra como un sistema muy adecuado en embriología experimental. Posteriormente, en los años setenta, George Streisinger y sus colaboradores comenzaron a explotar a esta especie, debido a su corto intervalo generacional y elevada fecundidad, para convertirla en un modelo genético excelente para el estudio del desarrollo de los vertebrados y de su comportamiento. Es exactamente la combinación de estos dos hechos, su valor en embriología experimental y, al mismo tiempo, en estudios genéticos, lo que ha sido determinante para que en la última década el pez cebra se haya convertido en el sistema animal de elección para cientos de investigaciones en todo el mundo y en uno de los vertebrados mejor conocidos en términos de desarrollo.

Los investigadores de instituciones académicas y las compañías farmacéuticas ven al pez cebra como una nueva y poderosa herramienta en la investigación y en el desarrollo de nuevos fármacos, al permitir acelerar el análisis de los procesos biológicos implicados.

De hecho, el pez cebra posee muchas características que lo convierten en un modelo de gran utilidad: Los adultos son relativamente pequeños (sólo 3.4 cm de largo), baratos, con un alojamiento fácil y se pueden mantener en grandes cantidades. El pez cebra puede mantenerse fácilmente bajo condiciones controladas de laboratorio, cada pareja suele producir varias decenas de huevos por apareamiento. La fecundación y posterior desarrollo embrionario, son externos y se producen sincrónamente en grandes grupos. Los embriones son relativamente grandes y transparentes, lo que permite que su desarrollo pueda ser observado fácilmente a través del corion transparente. Se desarrollan rápidamente: en un día, un embrión ya presenta todos los tejidos principales, e incluso los esbozos de muchos órganos, tales como el corazón (que presenta latido, con la consiguiente circulación sanguínea), el sistema nervioso, los ojos y los opérculos, todo lo cual puede observarse fácilmente con un simple microscopio de disección. Cinco días después de la fecundación (DPF), la larva del pez cebra ha formado la mayoría de los órganos internos como el hígado,

páncreas y una red vascular compleja. En comparación con los vertebrados superiores, los órganos en el pez cebra son un modo de versión minimalista, utilizando muchas menos células para completar una función equivalente en el organismo.

Otra de las ventajas cruciales del pez cebra reside en su utilidad para la identificación de genes por mutaciones inducidas. De hecho, presenta un número de características únicas que facilitan el análisis genético, la consanguinidad y la conservación de stocks. Comparado con otros vertebrados, el intervalo generacional de 3-7 meses no es particularmente corto, sin embargo el elevado número de crías facilita mucho los análisis genéticos.

Teniendo en cuenta todos estos atributos, los experimentos en pez cebra son significativamente más fáciles, más rápidos y más baratos que en ratón, que es actualmente uno de los modelos de vertebrados principal en el desarrollo de nuevos fármacos. Por último señalar que, pese a la distancia evolutiva, los ensayos en pez cebra permiten la mejor comprensión de muchas patologías humanas y sus tratamientos.

Entre las desventajas del modelo de pez cebra destacan: la falta de anticuerpos contra las proteínas de superficie, la dificultad (que no imposibilidad) del establecimiento de ciertos cultivos celulares (células madre embrionarias pluripotentes, células neuronales, células tumorales, células hematopoyéticas, células del sistema inmune, etc) y la falta de tecnología *knockout* convencional (Meeker y Trede, 2008).

1.2.2. Principales ámbitos científicos de aplicación del pez cebra

Debido a los problemas físicos y éticos derivados de la realización de experimentos en seres humanos, la investigación utiliza fundamentalmente modelos animales para estudiar los procesos biológicos conservados entre los seres humanos y los vertebrados inferiores. Los modelos de vertebrados superiores más comúnmente utilizados son rata y ratón. Estos animales ofrecen muchas ventajas con respecto a otros animales de experimentación. Entre éstas destacan su pequeño tamaño (facilita su cuidado), su corto intervalo generacional, su similitud fisiológica y molecular con los humanos, su genoma ya secuenciado, la posibilidad de manipulación y análisis

genético y su larga historia de uso en investigación científica. Aunque estos modelos tienen ventajas significativas, en ocasiones son caros de mantener, difíciles de manipular embrionariamente, además, pueden presentar limitaciones para estudios genéticos a gran escala. Así, y con sus especiales características, el pez cebra, *Danio rerio*, se ha convertido en los últimos años en un modelo de vertebrados popular en las diferentes áreas de investigación como la biología del desarrollo, genética, farmacología y toxicología (Aleström *et al.*, 2006; Beis y Stainier, 2006; Ingham, 2009).

1.2.2.1. Biomedicina

En la investigación biomédica, los modelos animales sirven para el estudio fundamental de sistemas biológicos y de enfermedades que no pueden ser estudiados directamente en seres humanos (Wall y Shani, 2008). El pez cebra nos ayuda a comprender que factores están relacionados con la salud humana, ya que nos proporciona una herramienta efectiva basada en ensayos con células y organismos enteros (Brittijn *et al.*, 2009). En este contexto, el pez cebra ha sido utilizado en investigaciones relacionadas con:

- a) Los procesos inflamatorios y de cicatrización (Martin y Feng, 2009).
- b) Los procesos infectivos, principalmente por su excelente accesibilidad óptica en los estadios embrionario y larvario, cuando el sistema inmune innato es ya efectivo (van der Sar *et al.*, 2004; Levraud *et al.*, 2009) e incluso, en el pez cebra adulto para analizar múltiples enfermedades (Phelps *et al.*, 2009), o las interacciones entre las células del huésped y las bacterias (Brugman *et al.*, 2009).
- c) La comprensión de enfermedades neurodegenerativas (Panula *et al.*, 2006; Senut *et al.*, 2009).
- d) El desarrollo esquelético y del cartílago (Chen *et al.*, 2009; Witten y Huysseune, 2009).
- e) Angiogénesis, vascularización (Montero-Balaguer *et al.*, 2009; cardiovascularización Santoro *et al.*, 2009).
- f) La función del sueño y los mecanismos de regulación del sueño (Zhdanova, 2006).

- g) Los mecanismos de envejecimiento, para desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas para un envejecimiento saludable (Gerhard, 2003; Kishi *et al.*, 2009).
- h) La comprensión de los desordenes de estrés y de los trastornos de ansiedad en los seres humanos (Egan *et al.*, 2009).

Para comprender como se desarrollan muchas de estas enfermedades, se están desarrollando líneas (estirpes) de mutantes (Talbot y Hopkins, 2000), y poniendo a puntos técnicas tales como genes *knockdown* con el uso de morfolidos (Nasevicius y Ekker, 2000), o más recientemente con el uso de nucleasas de “dedos de zinc” generadas por ingeniería genética (Meng *et al.*, 2008).

1.2.2.2. Cáncer

El pez cebra como modelo animal para estudio *in vivo* del cáncer permite seguir a tiempo real la invasión de embriones, la circulación de células tumorales en los vasos sanguíneos, la migración y la formación de micrometástasis. Es por ello, que se ha utilizado para el análisis rápido de la invasión y el comportamiento metastásico de tumores humanos (Marques *et al.*, 2009), leucemias (Payne y Look, 2009) y, para desarrollar estrategias que inhiban el desarrollo de tumores (por ejemplo: controlando la angiogénesis tumoral, Harfouche *et al.*, 2009).

1.2.2.3. Medicina regenerativa

La medicina regenerativa es otro área de investigación de gran interés. En este sentido, es importante comprender como se establecen las células madre, sus propiedades de auto-renovación, y su reclutamiento para producir nuevas células (Hultman *et al.*, 2009). Dentro de esta área el pez cebra constituye un buen modelo para el estudio de la regeneración de muchos órganos (Moss *et al.*, 2009). Destacan los estudios sobre la enfermedad de atrofia muscular espinal (Boon *et al.*, 2009), y los estudios sobre los mecanismos de regeneración de ciertos órganos, como el hígado (Kan *et al.*, 2009), las células beta pancreáticas en peces cebra adultos (Moss *et al.*,

2009), la retina (Fadool y Dowling, 2008; Battista *et al.*, 2009) y las células ciliadas del oído interno (Liang y Burgess, 2009).

1.2.2.4. Desarrollo de nuevos productos químicos para biomedicina

Vinculado a la biomedicina, se encuentra el estudio y el desarrollo de productos químicos con aplicaciones biomédicas, como son la administración de fármacos a células seleccionadas y la bioimagen (Nelson *et al.*, 2009). El objetivo de estos estudios es mejorar la eficacia y tolerancia de la terapia contra el cáncer y el desarrollo de nuevas metalodrogas antitumorales (Klein *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

1.2.2.5. Toxicología

El pez cebra se utiliza en estudios de toxicología desde 1950 (Carvan *et al.*, 2007). Entre sus aplicaciones en este campo destacan el análisis de los efectos de residuos tóxicos y contaminantes en el medio ambiente y la creación de bioindicadores que emiten una señal cuando detectan un compuesto tóxico (Aleström *et al.*, 2006). Los embriones de pez cebra también suponen una alternativa fiable en los estudios de toxicidad, cuyo objetivo es predecir los efectos de ciertos compuestos químicos en los mamíferos (por ejemplo: distinguir compuestos teratógenos de no teratógenos, Selderslaghs *et al.*, 2009) y permitir la detección rápida de compuestos neurotóxicos (Fan *et al.*, 2010).

1.3. Una aplicación científica muy especial: obtención de haploides

1.3.1. Utilización de haploides

Los organismos haploides son aquellos que contienen tan solo una copia de cada cromosoma (un solo juego de cromosomas).

Una de las razones que han favorecido el crecimiento del pez cebra como modelo vertebrado en sistemas genéticos es la habilidad para generar embriones haploides. La herencia uniparental ayuda a superar un problema importante en el

análisis genético diploide, incluyendo la búsqueda de mutaciones (Mullins y Nüsslein-Volhard, 1993) y el mapeo genético (Postlethwait *et al.*, 1994), donde los rasgos son a menudo enmascarados o confundidos por la contribución del segundo parental. Sin embargo, la limitación principal de las larvas haploides es la muerte durante el desarrollo debido a las anormalidades que presentan (Henion *et al.*, 1996; Streisinger *et al.*, 1981; Streisinger *et al.*, 1986; Walker y Streisinger, 1986). En algunos casos, la obtención de partenogenotas diploidizados ayuda a superar algunas de tales limitaciones (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

Los embriones uniparentales, como los partenotas o androgenotas, han sido utilizados para el estudio de los procesos de impronta así como el papel que juega el genoma paterno durante el desarrollo temprano (Latham *et al.*, 2000; Latham *et al.*, 2002). Los haploides ginogenotas han sido usados en mapeo genético (Postlethwait *et al.*, 1994) y en la búsqueda de mutantes por morfología (Mullins y Nüsslein-Volhard, 1993) o por PCR (Fritz *et al.*, 1996). Sin embargo, la producción de ginogenotas no es siempre factible. La producción rutinaria de haploides androgenotas podría ser utilizada para la búsqueda e identificación de machos portadores de mutaciones recesivas.

1.3.2. Tipos de organismos haploides (ginogenotas y androgenotas)

Hay dos tipos de herencia uniparental: la ginogénesis, en la que el embrión hereda todos los cromosomas sólo de la madre, y la androgénesis, en la que el embrión hereda todos los cromosomas sólo del padre. Describiendo mejor los conceptos anteriores, la **ginogénesis** es un mecanismo reproductivo que puede darse de forma natural y artificial, por medio del cual la información genética contenida en el óvulo es activada para el desarrollo de un nuevo individuo por medio de un espermatozoide que no contribuye con su información genética al desarrollo del organismo (Purdom, 1969; Nagy, 1987; Carter *et al.*, 1991), mientras que la **androgénesis** es el mecanismo mediante el cual se desarrolla un embrión a partir del material genético del espermatozoide y en donde el óvulo solo contribuye citoplasmáticamente al futuro individuo (Purdom, 1969; Nagy, 1987; Carter *et al.*, 1991).

En pez cebra, los individuos generados por estos mecanismos son haploides (aunque pueden ser diploidizados) y dicha condición supone que no sobrevivan más allá del desarrollo embrionario o larvario temprano (Mair *et al.*, 1986; Mair, 1993).

1.3.3. Técnicas de obtención de organismos haploides

Como se ha descrito en el apartado anterior, para la generación de individuos ginogenotas y androgenotas es indispensable la inactivación del material genético de los espermatozoides y ovocitos, respectivamente. Este proceso puede llevarse a cabo artificialmente mediante la aplicación de radiaciones y/o tratamientos químicos (Purdom, 1983; Chourrout, 1984).

En vertebrados, la reproducción ginogenética espontánea se produce en ciertas especies de reptiles, anfibios y peces teleósteos. La androgénesis espontánea, sin embargo, nunca ha sido observada. Los reptiles partenogenotas se reproducen por partenogénesis verdadera, es decir, sin fertilización (telitoquia). Todas las especies de anfibios y peces teleósteos partenogenotas, en cambio, requieren el estímulo de un espermatozoide para iniciar la embriogénesis. Los ejemplos bien estudiados de especies de peces ginogenotas naturales incluyen *Poecilia Formosa* (Schartl *et al.*, 1995), y *Carassius auratus gibelio* (Cherfas, 1981; Yamashita *et al.*, 1993). Estas especies producen ovocitos diploides (a veces triploides) que se activan por cualquier esperma homólogo o esperma de una especie estrechamente relacionada. El mecanismo por el cual los ovocitos se diploidizan varía, aunque la forma más común consiste en la duplicación del genoma, seguida de la división de células normales en la que las cromátidas hermanas se aparean preferentemente. No hay recombinación y se evita la segregación.

Desafortunadamente, en muchos vertebrados utilizados como sistemas modelo en genética la descendencia uniparental no puede ser producida. En los ratones, por ejemplo, (McGrath y Solter, 1984b) y tal vez en todos los mamíferos (Haig y Trivers, 1995), la impronta de origen paterno-específico (la expresión exclusiva de alelos paternos de algunos genes y alelos maternos de los demás, en tejidos específicos) impide la producción de individuos viables uniparentales. Sin embargo, en el pez cebra

la impronta de los genes esenciales para el desarrollo no impide la producción de androgenotas (animales cuyo genoma proviene sólo del progenitor masculino) (Corley-Smith *et al.*, 1996) o ginogenotas (animales cuyo genoma es solamente de origen materno) (Streisinger *et al.*, 1981), siempre y cuando se diploidicen.

El tipo de radiación que se usa actualmente para producir tanto embriones haploides ginogenotas como androgenotas es la luz ultravioleta (UV) (Jenneckens *et al.*, 1999). La acción de este agente ocasiona la desnaturalización del ADN mediante la formación de puentes de timina (dímeros de timina). Este tipo de radiación es de fácil manejo y su uso representa un riesgo ínfimo en comparación con las radiaciones ionizantes (rayos gamma y X).

Para producir embriones haploides ginogenotas viables, se inactivan los espermatozoides por irradiación con luz UV y con ellos se fertilizan los huevos. El esperma irradiado con luz UV no es capaz de contribuir con su material genético al desarrollo del embrión, pero sí de desencadenar la activación oocitaria y el desarrollo embrionario. Para obtener embriones haploides androgenotas viables, lo que debe irradiarse son los huevos previo a su fecundación, para inactivar el genoma materno (Ihssen *et al.*, 1990). En anfibios, los haploides androgenotas también pueden producirse usando radiación láser, enucleación manual (Ellinger *et al.*, 1990) o un tratamiento que afecta a los microtúbulos (presión hidrostática, D₂O; Briedis y Elinson, 1982), o bien radiación UV de onda corta (Gurdon, 1960; Gillespie y Armstrong, 1981).

La radiación UV penetra débilmente en el núcleo de los espermatozoides y los ovocitos, por eso se requiere que el esperma se diluya en un medio que no active los espermatozoides pero que reduzca la concentración espermática, mientras los ovocitos se mantienen en un medio no activante, para ser irradiados (Purdom, 1983; Chourrout, 1984; Jenneckens *et al.*, 1999).

En el caso de la inactivación genética de los ovocitos, la radiación UV puede provocar la destrucción de otros componentes citoplasmáticos como el ADNm (Gillespie y Armstrong, 1980, 1981, en Lozano *et al.*, 1987), y el ARNm (Thorgaard, 1983).

Como se ha mencionado antes, también pueden utilizarse para producir peces ginogenotas sustancias químicas que interactúan con el ADN del esperma. Los que han sido utilizados en investigaciones en moluscos, peces y anfibios con resultados

satisfactorios incluyen el azul de toluidina (Briggs, 1952; Uwa, 1965 en Thorgaard, 1983), etilenurea (Jones *et al.*, 1975 en Thoorgaard, 1983) y dimetil-sulfóxido (DMSO) (Tsoi, 1969, Mantelman, 1980 en Thorgaard, 1983).

Dado que estos tratamientos no son efectivos al 100 %, es necesario testar el nivel de haploidía en los individuos generados. Para su identificación pueden ser empleados dos tipos de procedimientos, los directos y los indirectos, o bien la combinación de ambos.

Dentro de los métodos directos se encuentra el empleo de semen heterólogo (Sugama *et al.*, 1990; Váradi *et al.*, 1999, Gomelsky *et al.*, 2000), patrones de coloración (Taniguchi *et al.*, 1986; Masaoka *et al.*, 1995), morfología (Colombo *et al.*, 1995; Linhart *et al.*, 1995), proporción de sexos (Kakimoto *et al.*, 1994; Fujioka *et al.*, 1998), número de nucleolos (Kucharczyk *et al.*, 1999), citometría de flujo (Gomelsky *et al.*, 2000), electroforesis de isoenzimas (Taniguchi *et al.*, 1986; Sugama *et al.*, 1990; Sumantadinata *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1996) y de ADN (Carter *et al.*, 1991; Jenneckens *et al.*, 1999; Galbusera *et al.*, 2000). Y como método directo el recuento del número de cromosomas para evaluar el nivel de ploidia (Chourrout, 1984; Linhart *et al.*, 1995; Colombo *et al.*, 1995; Váradi *et al.*, 1999).

Los embriones de pez cebra haploides presentan ligeras anomalías morfológicas y su desarrollo se detiene aproximadamente cuatro días después de la fertilización (3 a 5 días). Los embriones presentan lo que se conoce como “síndrome haploide” que se caracteriza por una disminución del tamaño corporal de los embriones y de los melanocitos y por la presencia de “orejas” duplicadas (Figura 7). Los androgenotas haploides son indistinguibles en apariencia de los ginogenotas haploides, lo que sugiere que las anomalías no son debidas al origen parental, pero pueden depender de la dosis génica.

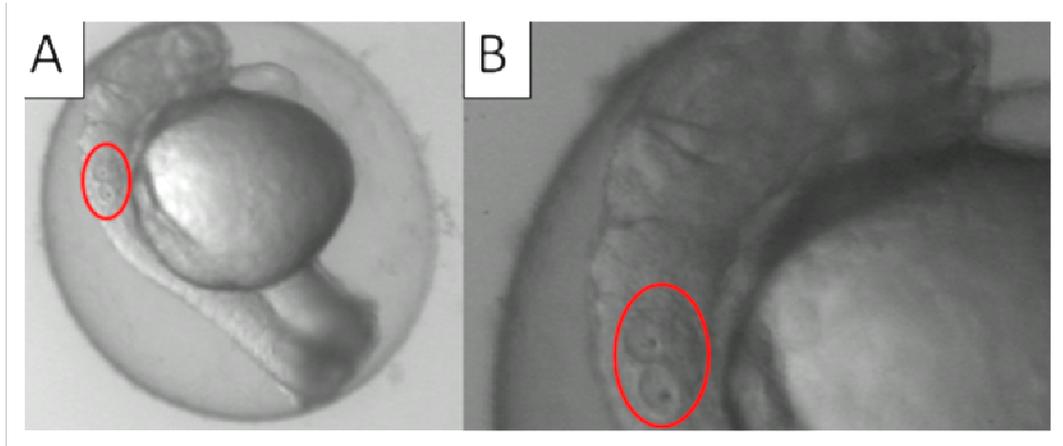


Figura 7. Larvas haploides. (A) Larva de pez cebra que presenta el llamado “síndrome haploide”. Obsérvese el menor tamaño corporal y la presencia de orejas duplicadas (señaladas en la imagen con un círculo de color rojo). (B) Detalle de las orejas duplicadas.

1.4. Imprinting gamético

1.4.1. Origen y definición

El imprinting gamético es un fenómeno que supone modificaciones específicas en la línea germinal que producen diferencias de expresión del material genético dependiendo de su procedencia, materna o paterna (Reik y Walter, 2001a).

Este fenómeno está presente en varios *fila* y ha sido especialmente estudiado en mamíferos, particularmente en ratón. Debe señalarse que la impronta gamética guarda relación con el establecimiento o progresión de una larga, y aún creciente, lista de enfermedades humanas. El imprinting gamético está implicado en la patogenia de varios síndromes, entre los cuales cabe destacar el síndrome de Prader-Willi (Nicholls *et al.*, 1989), el síndrome de Angelman (Knoll *et al.*, 1989) y el síndrome de Beckwith-Wiedeman (Henry *et al.*, 1991).

El imprinting defectivo o la pérdida del mismo, seguido por la expresión de loci imprintados, puede causar la formación de tumores en humanos. Así, se ha detectado la activación aberrante de genes imprintados se ha detectado en tejidos afectados de pacientes con cáncer (Ogawa *et al.*, 1993; Rainier *et al.*, 1993). Hasta ahora se han

identificado en humanos seis loci imprintados que están implicados en carcinogénesis (Falls *et al.*, 1999; Jirtle, 1999).

1.4.2. Estudios pioneros de imprinting

En 1984, varios grupos de investigadores llevaron a cabo una serie de experimentos (McGrath y Solter, 1983; Barton *et al.*, 1984; McGrath y Solter, 1984a; Surani *et al.*, 1984), entre los que destacan los de McGrath y Solter (1983, 1984a), quienes, aplicando la técnica de trasplante de pronúcleos a embriones unicelulares de ratón, evidenciaron que el crecimiento y desarrollo normal de un embrión de mamífero requería la presencia indefectible del genoma de la madre y del padre al mismo tiempo. Observaron que cuando se eliminaba uno de los pronúcleos cigóticos, paterno o materno, y éste era reemplazado por otro del mismo origen que el pronúcleo no eliminado para restablecer el diploidismo de la especie, se obtenían, respectivamente, cigotos ginogénicos (dos pronúcleos maternos) o androgénicos (dos pronúcleos paternos) inviables. En ratón, los androgenotas tienen un pobre desarrollo de tejido embrionario pero un buen desarrollo de membranas extraembrionarias y trofoblasto (Barton *et al.*, 1984), mientras que los ginogenotas tienen un desarrollo del embrión relativamente normal, mientras que los tejidos embrionarios no están bien desarrollados (Surani y Barton, 1983; Surani *et al.*, 1984; Barton *et al.*, 1985). El genoma paterno, por tanto, parece ser más importante para la proliferación de tejidos extraembrionarios y el genoma materno para el desarrollo embrionario postimplantación, al menos en ratón. Todo lo anterior, permitió establecer que los cigotos androgénicos y ginogénicos de los mamíferos no eran funcionalmente equivalentes (no contribuían por igual a la información de los embriones).

Un año más tarde, Cattanaach y Kirk (1985) obtuvieron crías de ratón con disomías uniparentales (condición por la que ambos cromosomas de un par derivan del mismo parental). En estos animales, independientemente del origen materno o paterno de la duplicación cromosómica, presentaban fenotipos anómalos y opuestos: por ejemplo, cuando ambos cromosomas provenían de la madre, las crías eran de tamaño más pequeño, y cuando procedían del padre, más grandes. También observaron que la duplicación de algunos dominios cromosómicos es a menudo letal

para los embriones. En este caso, a diferencia de lo observado por McGrath y Solter, los efectos no podían atribuirse a ningún componente extracromosómico (manipulación mecánica, factores citoplásmicos), sino que podía deberse a que los genes esenciales de estas regiones estaban imprintados

Los experimentos anteriores, más otros complementarios, como los que evidenciaban la inactivación preferencial del cromosoma X paterno en las membranas extraembrionarias de los mamíferos placentados y en los marsupiales (Johnson, 1974; Takagi y Sasaki, 1975), aportaron pruebas irrefutables de que algunos genes se expresaban de forma diferente en los cromosomas paternos y maternos de los mamíferos. Para explicar sus resultados, McGrath y Solter (1984a) aventuraron la hipótesis de que el genoma materno o paterno es acondicionado o modificado durante la gametogénesis y que ese «acondicionamiento» es totalmente reversible. Hoy día, el «acondicionamiento» de McGrath y Solter se conoce con el nombre de imprinting gamético.

1.4.3. Establecimiento del imprinting gamético en mamíferos (ratón)

Cuando el ovocito en mamíferos es fecundado por el esperma, éste recibe el material genético paterno. Los alelos paternos, similares a los alelos maternos, son objeto de modificaciones epigenéticas durante la gametogénesis que causan que un subconjunto de genes sean expresados sólo en uno u otro de los dos cromosomas parentales en el embrión. Este mecanismo regulatorio es denominado impronta gamética (McGrath y Solter, 1984a; Barton *et al.*, 1984).

La manipulación de embriones de ratón *in vitro* para producir embriones diploides con el genoma materno o paterno únicamente, proporciona, como ya se ha señalado la más clara evidencia del fenómeno del imprinting gamético. Inicialmente, la producción de embriones partenogenotas, en un número de especies de vertebrados, indica que podría darse un desarrollo normal solo con el genoma materno. Sin embargo, la demostración de que los partenogenotas mamíferos no son viables sugiere que esto no es cierto para todas las especies (Kaufman *et al.*, 1977). Las hipótesis que se postulaban para un fallo en el desarrollo completo son: la homocigosidad de alelos letales recesivos, la ausencia de contribución extragenética

por parte del espermatozoido fertilizador o la no equivalencia de los genomas parentales (Graham, 1974).

Para distinguir cual de estas alternativas era cierta se usó el trasplante nuclear para la creación de embriones con diferentes contribuciones parentales (ginogenotas y androgenotas). Ni los partenogenotas ni los embriones diploides biparentales ginogenéticos y androgenéticos se desarrollaron completamente (McGrath y Solter 1984c, Surani *et al.*, 1984). Tanto los embriones androgenéticos como los ginogenéticos pueden desarrollarse hasta la etapa de blastocisto, pero mueren poco después de la implantación. El hecho de que estos embriones se obtuvieran de ratones consanguíneos descarta la posibilidad de que la mortalidad se debiera a la homocigosidad de mutaciones recesivas. La demostración de que los embriones ginogenéticos se desarrollaron hasta el mismo estado que los partenogenotas sugirió que la contribución citoplásmica del espermatozoido no era el origen del error en el desarrollo (Surani y Barton, 1983). Los experimentos de trasplante nuclear con pronúcleos derivados de ratones T^{hp} (una mutación con efecto materno en el cromosoma 17 (Johnson, 1974)) también confirmó que el efecto fenotípico tenía origen nuclear y no citoplasmático.

El mecanismo molecular de la impronta se asocia a una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas del genoma, la metilación del ADN, que ocurre predominantemente en los dinucleótidos simétricos CpG (Reik *et al.*, 2001b). Se desconocen todavía en detalle los mecanismos reguladores y se ignora si la metilación es primaria o secundaria. Lo que si se sabe es que la metilación del ADN está asociada a una estructura cromatínica más compactada que inhibe la transcripción génica. La prueba definitiva para confirmar que un gen está sometido a impronta es la demostración de que su expresión es monoalélica en al menos algún tejido.

El fenómeno de la impronta gamética tiene un ciclo vital característico: ocurre en la línea germinal, durante la gametogénesis, y se modifica en fases embrionarias precoces (Reik *et al.*, 2001b).

La teoría más aceptada para explicar la aparición de la impronta en la evolución es la de la lucha o conflicto de sexos (Teoría de Haig) (Moore y Haig, 1991). La impronta es fundamental en mamíferos habiendo evolucionado en los últimos 125 millones de años, así como en algunas plantas, pero no parece existir en otros muchos

animales. La teoría actualmente establecida propone que la impronta se habría desarrollado como un mecanismo para solventar una lucha de poderes a nivel de expresión entre los genes paternos (promotores del crecimiento) y los genes maternos (represores de crecimiento) (Haig, 1993). Sin embargo, el conflicto genético sobre la cantidad de recursos maternos que obtiene la descendencia es perfectamente compatible con que los dos genomas cooperen para producir una descendencia viable, ya que ambos conjuntos de genes tienen un interés común y es que las crías sobrevivan (Moore y Haig, 1991).

1.4.4. Estudios de imprinting en pez cebra

El hecho de que los peces ginogenéticos sean viables se ha tomado como evidencia de la ausencia de la impronta diferencial parental: la metilación epigenética masculina y femenina de ciertos genes durante la gametogénesis (Corley-Smith *et al.*, 1996).

Sin embargo, Martin y McGowan (1995) en su estudio con peces cebra, demostraron la existencia de la impronta gamética al igual que en mamíferos. En este estudio, se observó que la metilación de un locus en la línea germinal femenina se ve disminuida, mientras que en la línea germinal masculina se ve aumentada, equivalente a lo que ocurre en el imprinting de mamíferos. La similitud de este proceso entre mamíferos y pez cebra apoya la conservación del imprinting a lo largo de la evolución. Así, la existencia del mecanismo en pez cebra puede ser útil para llegar a comprender el papel de la impronta en los mamíferos.

1.5. Transplante nuclear en pez cebra

El transplante nuclear (TN) es el método experimental más poderoso actualmente para el estudio de las interacciones entre núcleo y citoplasma en el proceso de desarrollo, la diferenciación y la herencia. El TN es una técnica eficaz que permite investigar cuáles son los cambios funcionales que tienen lugar en el genoma durante la diferenciación. Su aplicación ha sido altamente extendida para generar animales modificados genéticamente, e incluso, para clonarlos.

La idea de usar el TN se planteó ya en 1886 por Rauber (Rauber, 1886), que describe un experimento en el que se intercambi6 el n6cleo de una c6lula de sapo por el n6cleo de un huevo de rana y viceversa. En 1952, Briggs y King (Briggs y King, 1952) realizaron con 6xito el trasplante de n6cleos de bl6stula en huevos enucleados de la rana (*Rana pipiens*), ya que obtuvieron larvas nadadoras. En 1958 (Gurdon *et al.*, 1958), obtuvieron el primer adulto vertebrado por TN (clonaci6n) usando *Xenopus laevis*. Posteriormente, se obtuvieron adultos f6rtils mediante el trasplante de n6cleos de c6lulas del epitelio intestinal de renacuajo a huevos enucleados, lo que genera clones de animales adultos a partir de n6cleos de c6lulas som6ticas. En 1997, se clon6 la oveja Dolly mediante el TN de una c6lula derivada de la gl6ndula mamaria de otra oveja (Wilmut *et al.*, 1997).

Otro de los factores importantes, que explica las bajas eficiencias del TN, es la desincronizaci6n del ciclo celular entre el n6cleo de la c6lula donante del n6cleo y el citoplasma del oocito receptor. La sincronizaci6n del ciclo celular puede el ratio de formaci6n del blastocisto. Se ha conseguido elevados porcentajes de desarrollo de embriones clonados cuando los n6cleos de las c6lulas donantes se encuentran en las primeras fases del ciclo celular (G0 o G1). Se pueden lograr una alta efectividad en el TN si se evita que las c6lulas est6n en fase S. Para evitar un pobre desarrollo de los embriones es necesario mantener un nivel correcto de polid6a en ellos.

Las c6lulas utilizadas frecuentemente como donantes de n6cleos en TN en peces tele6steos suelen ser blast6meros (Wakamatsu *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2002). Adem6s de estas c6lulas embrionarias, tambi6n se ha utilizado c6lulas som6ticas procedentes de cultivos de larvas (Lee *et al.*, 2002) o adultas (Ju *et al.*, 2003; Kaftanovskaya *et al.*, 2007). El trasplante se ha realizado utilizando tambi6n c6lulas procedentes de cultivos primarios (Lee *et al.*, 2002), as6 como de subcultivos (Lee *et al.*, 2002). Este es un aspecto importante teniendo en cuenta que las anomal6as cromos6micas aparecen a menudo en cultivos prolongados (Kaftanovska *et al.*, 2007).

La t6cnica de TN en peces fue establecida por investigadores chinos en los a6os sesenta (Tung *et al.*, 1963), con la producci6n exitosa de peces mediante trasplante nuclear de c6lulas de bl6stula media (MBT) en ovocitos enucleados de *Carassius auratus* y *Rhodeus sinensis*. Los embriones as6 obtenidos, se desarrollaron en ciertos casos incluso en peces adultos, dando lugar a descendencia viable (Tung *et al.*, 1973;

Yan *et al.*, 1984; Yan *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1986; Qi *et al.*, 1997). Los resultados de estos experimentos confirmaron que los núcleos procedentes de células totalmente diferenciadas, obtenidas de peces adultos, pueden desdiferenciarse hasta un nivel en el que recuperan la totipotencia (Chen *et al.*, 1986).

La investigación del TN nuclear en pez cebra comenzó a finales de los años noventa, cuando Lee *et al.* (2002) obtuvieron los primeros embriones de pez cebra generados por TN usando fibroblastos embrionarios de cultivos prolongados. La tecnología del TN en pez cebra fue puesta a punto por Hu *et al.* en 2002. Recientemente, Luo *et al.* (2011) han publicado un artículo en el que se describen las fases críticas para conseguir una transferencia nuclear de células somáticas efectiva en pez cebra. Según estos autores, los estadios de cúpula y de escudo serían las etapas críticas en las que el desarrollo de los embriones obtenidos por TN se bloquea con mayor frecuencia, y que podrían explicar las bajas eficiencias de esta técnica. Además estos autores en 2009 (Luo *et al.*, 2009) descubrieron que la expresión de los genes *mycb* y *klf4* estaba alterada en células de hígado procedentes de embriones obtenidos por TN. Esto es similar a la reprogramación de células diferenciadas a un estado pluripotente *in vitro* (Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Las células diferenciadas pueden ser reprogramadas a un estado embrionario, mediante TN a ovocitos o por fusión con células madre embrionarias (ES). Takahashi y Yamanaka (2006) demostraron la inducción de células madre pluripotentes a partir de fibroblastos de ratón de embriones o de adultos con la introducción de cuatro factores: *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*. Es por esto por lo que estos autores creen que el balance entre la expresión de estos dos genes (*mycb* y *klf4*) podría ser importante en los procesos de reprogramación de embriones de pez cebra obtenidos por TN (Luo *et al.*, 2011).

Uno de los principales obstáculos de los experimentos de transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) en pez cebra es la escasez de conocimientos acerca de la reprogramación nuclear somática en los huevos reconstituidos. La eficiencia de la TNCS puede variar considerablemente en función de la fuente y los tipos de células somáticas donantes, ya que pueden tener diferentes capacidades para ser reprogramados por el ooplasma. Por tanto, sería interesante identificar los factores

que regulan el potencial de las células somáticas donantes que favorecen su reprogramación.

Hongtuo y Chingjiang (2001) para estudiar el TN en peces, fusionaron células de blástula y gástrula con oocitos inactivados por luz UV mediante electrofusión. Obtuvieron un bajo porcentaje de efectividad, en gran medida debido a que los ovocitos son mucho más grandes que la célula donante del núcleo.

En el TN en pez cebra la localización del punto de eyección del núcleo (el polo animal) requiere la activación previa del ovocito porque el micropilo no es fácil de detectar (Poleo *et al.* 2001). Recientemente, en nuestro laboratorio han publicado un artículo en el que se describe la capacidad de realizar TN usando ovocitos no activados sin la necesidad de decorionarlos o localizar el micropilo (Pérez-Camps *et al.*, 2010).

Los factores implicados en el éxito del TN son muy complejos. En mamíferos y peces, se ha observado que la mayoría de los embriones clonados no completan su desarrollo, y algunos de los animales clonados que sobreviven presentan anomalías. La causa principal puede ser la reprogramación epigenética defectuosa o incompleta del núcleo donante, que afecta a la expresión de los genes necesarios para las fases de desarrollo de los embriones clonados. Esto es debido a los distintos tipos de células donantes del núcleo utilizadas en TN presentan diferentes capacidades para ser reprogramadas por el ooplasma. Por tanto, sería interesante identificar los factores que regulan el potencial de las células donantes para ser reprogramadas, por ejemplo, analizando el perfil de expresión génica.

II. OBJETIVOS

Como parte del estudio del fenómeno de imprinting y reprogramación en pez cebra basado en células haploides y transplante nuclear, se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

1. Evaluar las eficacias de las diferentes etapas del proceso de obtención de células haploides (donantes en TN) en función de la estirpe (*wild* vs. *gold*) y del tipo (androgenota vs. ginogenota) así como de la técnica de cultivo (estándar vs. larva entera):
 - Tasa de fecundación.
 - Tasas de desarrollo hasta etapas clave.
 - Tasa de contaminación.
 - Tasa de fijación al sustrato de los cultivos.
 - Tasa de colonización del sustrato.
2. Evaluar la capacidad de supervivencia de las larvas más allá de las 24 horas y de su liberación del corion.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cuidado y mantenimiento de las colonias de peces cebra

Se usaron estirpes *wild* (silvestre) y *gold* (albina) de peces cebra, *Danio rerio*. Estas dos poblaciones se mantuvieron separadas en las proporciones adecuadas (3:2 hembras/macho), bajo condiciones estándar (Westerfield, 2007). La alimentación fue a base de granulado comercial para peces tropicales y suplementada con yema de huevo descongelada y carne de camarón, como alternativa al alimento vivo (daphnia o nauplios de artemia), los cuales son habitualmente recomendados para la producción de huevos (Westerfield 2003, Simão *et al.*, 2007). La distribución del alimento fue automática y los acuarios utilizados fueron de 25 litros, con filtrado del agua. El ciclo celular estaba regulado por 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.



Figura 8. Mantenimiento de las colonias de peces cebra adultos.

3.2. Obtención de gametos no activados

En el momento en el que se producía el amanecer artificial, se seleccionaron aquellos acuarios donde los peces mostraban comportamiento reproductivo. Inmediatamente se separaban los machos y las hembras para evitar la reproducción natural.

3.2.1. Obtención de ovocitos

Solo se extrajeron oocitos de aquellas hembras que manifestaban claramente comportamiento reproductivo y se evaluó posteriormente la calidad (coloración, forma, tamaño, opacidad, etc.) de los óvulos obtenidos (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002). Para ello, las hembras se anestesiaban en una solución de aceite de clavo (100 μ L en 1L de agua deionada y descalcificada: agua de sistema; Westerfield, 2007) y los oocitos se obtuvieron por extrusión de la cavidad ovárica. Debía tenerse especial cuidado que los huevos no entraran en contacto con agua dulce, puesto que se activarían de forma inmediata. A continuación, los huevos se depositaban en Hank's (Hanks' buffered salt solution; Sigma-Aldrich H8264) con 1.5% (v/v) de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,1 g de NaCl/100 cc de medio Hank's (medio para ovocitos; pH 7,4; osmolaridad 310 – 320 mOsm) a 8 °C de temperatura hasta su uso (1 hora y 30 minutos como máximo).



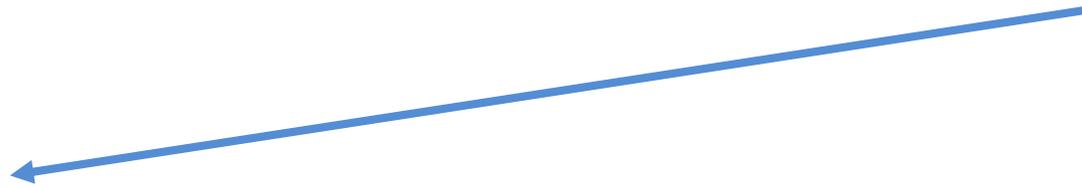
Evaluación del comportamiento reproductivo de las hembras.



Selección de hembras con comportamiento reproductivo.



Anestesia en aceite de clavo.



Obtención de ovocitos por extrusión de la cavidad ovárica.



Colocación de los ovocitos en Hank's y evaluación de su calidad.

Figura 9. Obtención de ovocitos.

3.2.2. Obtención de semen

Los machos que manifestaban comportamiento reproductivo se anestesiaban según se ha descrito anteriormente. Luego, se presionaba suavemente la cavidad abdominal mientras se recogía el semen del poro genital en microcapilares (1 x 90 mm, Narishige Scientific Instrument Lab.) individuales de vidrio. Se disolvió el semen de 2-3 machos diferentes (0,5-2 μ l/macho) en 100 μ l de medio para ovocitos, que permite mantener el semen en estado no activado.



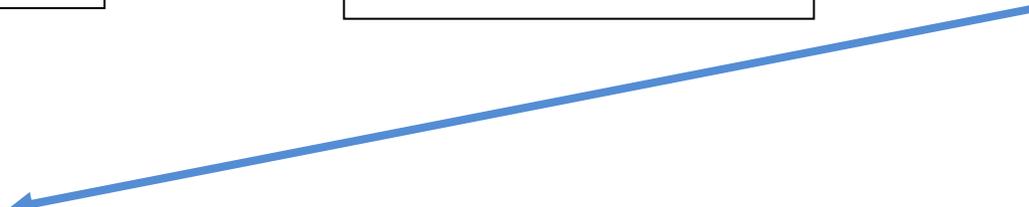
Evaluación del comportamiento reproductivo de los machos.



Selección de machos con comportamiento reproductivo.



Anestesia en aceite de clavo.



Recogida del semen en microcapilares por presión de la cavidad abdominal.



Mantenimiento del semen en hielo hasta su uso.



Dilución del semen de los diferentes machos en Hank's.

Figura 10. Obtención de semen.

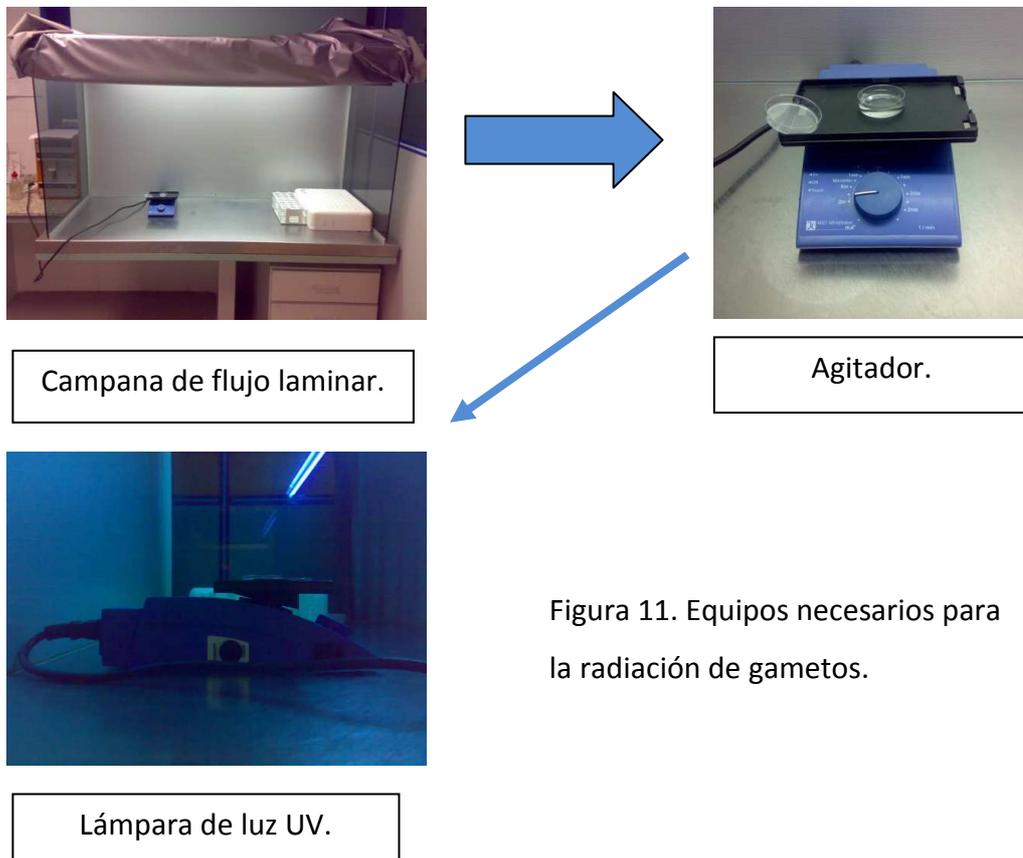
3.3. Radiación de gametos

3.3.1. Radiación de semen (Obtención de ginogenotas)

Se radiaron muestras de semen diluidas en 100 μl de solución balanceada de Hanks's (Cardona-Costa *et al.*, 2009) usando una lámpara germicida UV (General Electric, 30W). La radiación se llevó a cabo a 62 cm del foco, aplicando una dosis de radiación de $0,529 \text{ mW/cm}^2$, medida con un USB 400 (Espectrómetro de fibra óptica en miniatura; Ocean Optics Inc. First In Photonics, USA). Se utilizó un vórtex (MS1; IKA-Works Inc., Wilmington, CA, USA) a 200 rpm con el objeto de homogeneizar el área de radiación durante la exposición a la luz UV (Francisco-Simão *et al.*, 2010) (Figura 9). El tiempo de radiación fue de 1 minuto.

3.3.2. Radiación de ovocitos (Obtención de androgenotas)

Los ovocitos recolectados fueron radiados con luz UV siguiendo el mismo procedimiento que para el semen, pero sin agitación y durante 12 minutos.



3.3. Fecundación *in vitro*

En el pez cebrá, los ovocitos pierden rápidamente su capacidad postovulatoria de ser fertilizados (90 minutos). Además, el tiempo entre la activación completa de los ovocitos y la fecundación *in vitro* es extremadamente corto (segundos) en pez cebrá (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002). Antes de cada ensayo de fecundación, se evaluó la motilidad del esperma por revisión visual a 200x aumentos después de añadir agua de sistema. Solo se usaron las muestras que mostraban una óptima motilidad (80-100 %).

La fecundación *in vitro* de ovocitos no radiados con espermatozoides radiados y viceversa se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Westerfield (2007). Los ovocitos no activados se mezclaron con el semen en placas Petri de 35 mm y ambos gametos se activaron por adición de 1 ml de agua de sistema. Tras 2-3 minutos, la placa se rellenó con agua de sistema para permitir un buen desarrollo de los embriones. El cultivo se llevó a cabo a 28,5 °C.

Transcurridas 24 horas, las larvas que presentaban el llamado “síndrome haploide” fueron seleccionadas para cultivo *in vitro* o para el análisis del grado de supervivencia, en función del número obtenido (para el primer caso son necesarias un gran número, al menos unas 15).

3.4. Cultivo de larvas haploides

Transcurridas 24 horas, si el número de larvas haploides era mayor de 20 estas se seleccionaron para el cultivo *in vitro*. Estas larvas haploides fueron decorionadas mecánicamente, desinfectadas con 0,2 % v/v lejía/agua de sistema y lavadas en solución salina tamponante Hank's. Las larvas ginogenotas y androgenotas fueron cultivadas por separado en medio Leibovitz suplementado con 20 % de BFS y 0,036 g/100 ml de glutamina (L15-FBS) en placas Petri de 9 cm a 28,5 °C (Westerfield, 2007). Se utilizaron dos métodos de cultivo: cultivo estándar y cultivo de larvas enteras (Figura 10). En el primer método de cultivo las larvas además de ser decorionadas, también se les elimina el vitelo y son disgregadas en la placa de cultivo para su fijación. En el segundo caso, las larvas son decorionadas únicamente y se colocan en la placa de cultivo para que se fijen solas.

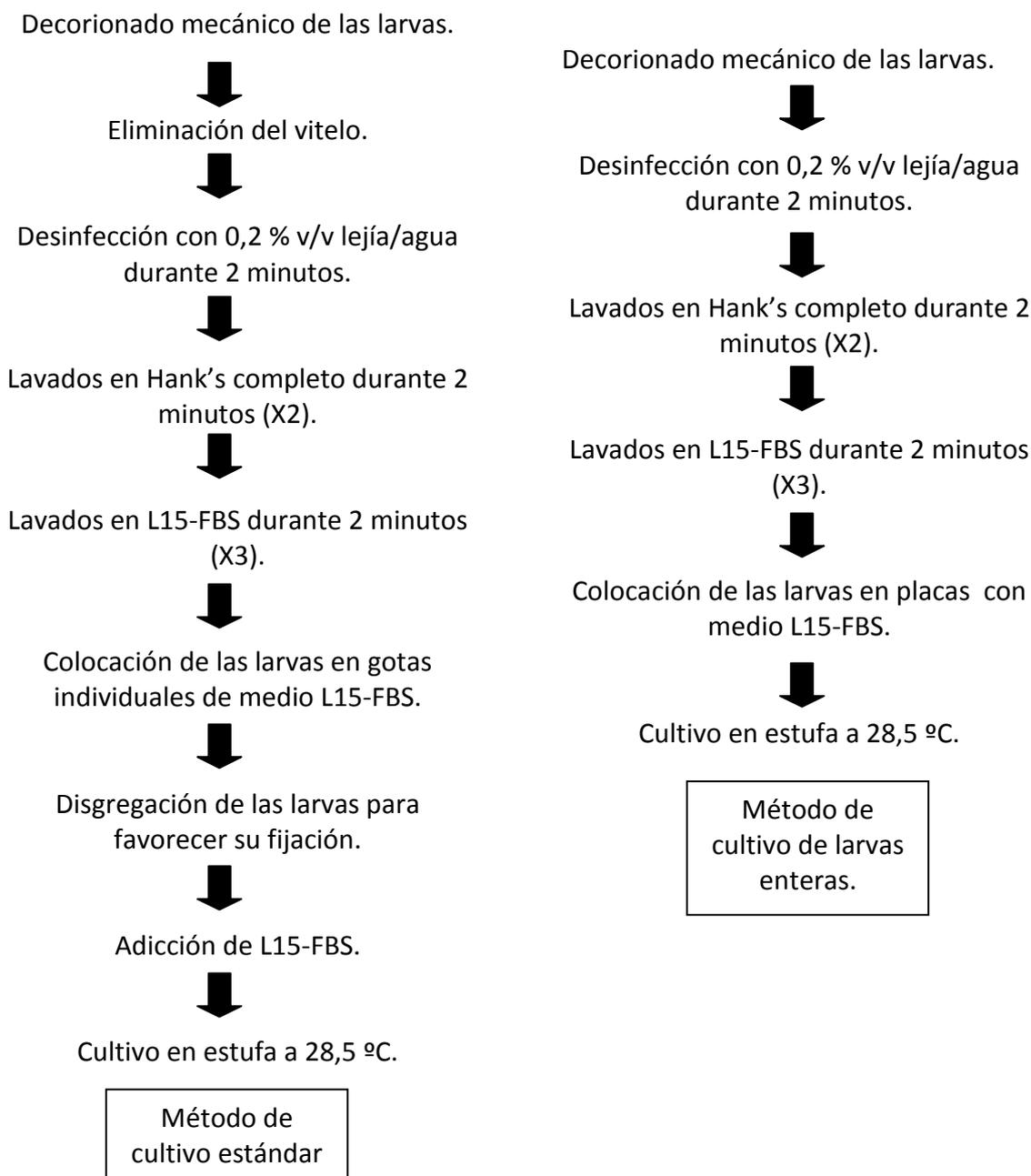


Figura 12. Métodos de cultivo de larvas haploides.

3.5. Diseño experimental

El presente trabajo persigue varios objetivos cuya consecución ha exigido la ejecución de diferentes experimentos:

- Experimento 1. Fertilización *in vitro* de gametos (espermatozoides u ovocitos) tras ser radiados con luz UV.

Este experimento nos permite evaluar si la capacidad de fertilización de los gametos tras ser radiados se mantiene y si esta capacidad es independiente de la cepa de pez cebra utilizada (*gold* y *wild*). Para ello se comparó el porcentaje de embriones que sobreviven a 3 horas posfertilización (estadio MBT; Figura 13). Se diferenciaron cuatro grupos experimentales en función de la cepa utilizada y el tipo de gameto radiado: *gold* ginogenotas, *wild* ginogenotas, *gold* androgenotas y *wild* androgenotas.

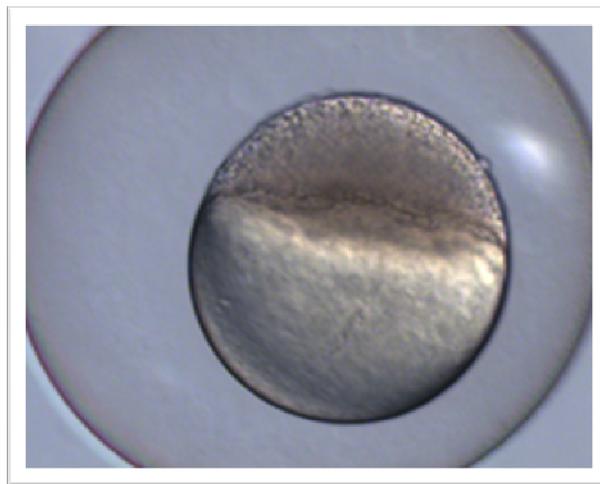


Figura 13. Embrión en estadio MBT.

En este experimento también se evaluó la influencia de la radiación UV en la capacidad de los gametos para llevar a cabo la fertilización y su eficacia en la producción de larvas haploides. Para ello, se valoró el porcentaje de embriones que dieron lugar a larvas y el porcentaje de larvas que presentaban el llamado “síndrome haploide” a 1 día posfertilización, respectivamente.

- Experimento 2. Aislamiento de las larvas haploides ginogenotas y androgenotas y evaluación de la supervivencia.

Se observó el estado del corion y el latido del corazón de las larvas haploides cada 24 horas, hasta la muerte de las mismas. Al igual que en el experimento 1, se diferenciaron cuatro grupos experimentales en función de la cepa utilizada y el tipo de gameto radiado: *gold* ginogenotas, *wild* ginogenotas, *gold* androgenotas y *wild* androgenotas.

- Experimento 3. Optimización de los métodos de cultivo de larvas y su mantenimiento a largo plazo.

Se valoró la capacidad de crecimiento y proliferación en cultivo de las células procedentes de larvas haploides, así como el potencial que presentan para los cultivos prolongados. Para ello, se establecieron 6 grupos experimentales en función de la estirpe, de la dotación cromosómica y del tipo de cultivo llevado a cabo: *wild* (control DP cultivo estándar; HP cultivo estándar; HP cultivo larvas enteras), *gold* (control DP cultivo estándar; HP cultivo estándar; HP cultivo larvas enteras).

3.6. Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos en los que se compararon porcentajes fueron analizados estadísticamente mediante un test Chi-cuadrado. Cuando el análisis presentaba un solo grado de libertad se aplicó la corrección de Yates para la continuidad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación con la capacidad de fertilización *in vitro* de los gametos tras ser radiados con luz UV, los resultados del experimento 1 se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Tasas de fecundación, de desarrollo de embriones a larvas. Porcentaje de larvas haploides (24 horas) obtenidas respecto al total de embriones MBT (Transición a media blástula) y respecto al total de larvas desarrolladas en los diferentes grupos experimentales (*wild* androgenotas, *wild* ginogenotas, *gold* androgenotas y *gold* ginogenotas).

	<i>wild</i>		<i>gold</i>	
	Androgenotas	Ginogenotas	Androgenotas	Ginogenotas
Tasa de fecundación	475/1144 ^a (41,52 %)	873/1632 ^b (53,49 %)	304/676 ^a (53,85 %)	794/1867 ^a (42,53 %)
Tasa de desarrollo de embriones a larvas	403/527 ^a (76,47 %)	272/636 ^c (42,77 %)	234/312 ^a (75 %)	425/783 ^b (54,28 %)
% larvas HP respecto total embriones MBT	65/527 ^c (12,33 %)	148/636 ^b (23,27 %)	24/312 ^d (7,69 %)	232/783 ^a (29,63 %)
% larvas HP respecto el total larvas desarrolladas	65/403 ^b (16,12 %)	148/272 ^a (54,41 %)	24/234 ^c (10,26 %)	232/425 ^a (54,58 %)

Entre columnas, datos con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

El tipo de gameto radiado y la estirpe no afectan a la tasa de fecundación, evaluada en estadio MBT, ya que aunque uno de los grupos difiere significativamente del resto, las tasas son muy similares (entorno al 40-50 %). Esto indicaría que la radiación UV no afecta de manera diferencial la capacidad fecundante de los ovocitos o de los espermatozoides. Además, dado que la valoración de la fecundación se realiza en estadio MBT (3 horas tras la fertilización) este resultado también indicaría la ausencia de efectos diferenciados de los factores estirpe y gameto radiado sobre la supervivencia hasta dicho estadio.

En cuanto a las tasas de desarrollo hasta larva de 24 horas, se observó una mayor tasa de desarrollo de embriones a larvas en androgenotas que en ginogenotas, independientemente de la estirpe, que indicaría de un lado que la radiación UV del oocito solo afecta a la cromatina nuclear pero no a la organización ooplasmática dadas las elevadas tasas de desarrollo que presentan los androgenotas y, de otro, que el material genético paterno es más importante en las primeras etapas del desarrollo embrionario que el genoma materno o bien que la activación mediante el espermatozoide radiado previamente no es totalmente eficiente. Debe tenerse en cuenta que las primeras etapas del desarrollo embrionario, hasta la transición MZT, es gobernada por el ARNm del ovocito y hemos visto que hasta MBT no se detectan diferencias relevantes. Sin embargo, quizás la información aportada por el espermatozoide si sea crítica en estadios postgastrulación. Ungar *et al.* (1998) en sus experimentos de producción de androgenotas haploides en pez cebra observaron que el 30 % de los embriones moría dentro de las primeras 24 horas. En nuestro caso, el porcentaje de muerte para los androgenotas haploides es algo menor, entre el 24-25 % (supervivencia entorno al 75-76 %).

Por su parte, Corley-Smith *et al.* (1996) también produjeron androgenotas haploides en pez cebra con rayos X y observaron que el 10,20 % (5/49) de larvas eran haploides. En nuestro caso, el porcentaje de larvas haploides obtenido es más alto en la estirpe *wild* (12,33 %) que en la *gold* (7,69 %), siendo estos valores muy similares a los obtenidos por Corley-Smith *et al.* (1996) con radiación por rayos X.

En cuanto al porcentaje de larvas HP (haploides) obtenidas, ya sea respecto al total de embriones MBT como al total de larvas desarrolladas, se observa una clara diferencia entre androgenotas y ginogenotas, a favor de estas últimas, independientemente de la especie. Esto puede deberse a que la inactivación del material genético materno sea más difícil que la inactivación del genoma paterno mediante la radiación UV. De hecho la dosis establecida en nuestro laboratorio (Simão *et al.*, 2010; Simão *et al.*, 2011) es diferente (y más elevada) para ovocito que para espermatozoide. Debe tenerse en cuenta que la radiación de ovocitos, en función de la dosis aplicada, puede provocar la destrucción de otros componentes citoplasmáticos como el ADNm (Gillespie y Armstrong, 1980, 1981, en Lozano *et al.*, 1987), y el ARNm (Thorgaard, 1983), requeridos para obtener larvas viables.

En relación al experimento 2 y la evaluación de la capacidad para liberarse del corion por las larvas haploides, los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Capacidad de rotura del corion de las larvas de los cuatro grupos experimentales (*wild* androgenotas, *wild* ginogenotas, *gold* androgenotas y *gold* ginogenotas).

	<i>wild</i>		<i>gold</i>	
	Androgenotas	Ginogenotas	Androgenotas	Ginogenotas
Larvas totales	21	18	19	48
Liberadas (sin corion)	18/21 ^b (85,71 %)	8/18 ^a (44,44 %)	12/19 ^{ab} (63,16 %)	40/48 ^{ab} (83,33 %)

Entre columnas, datos con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

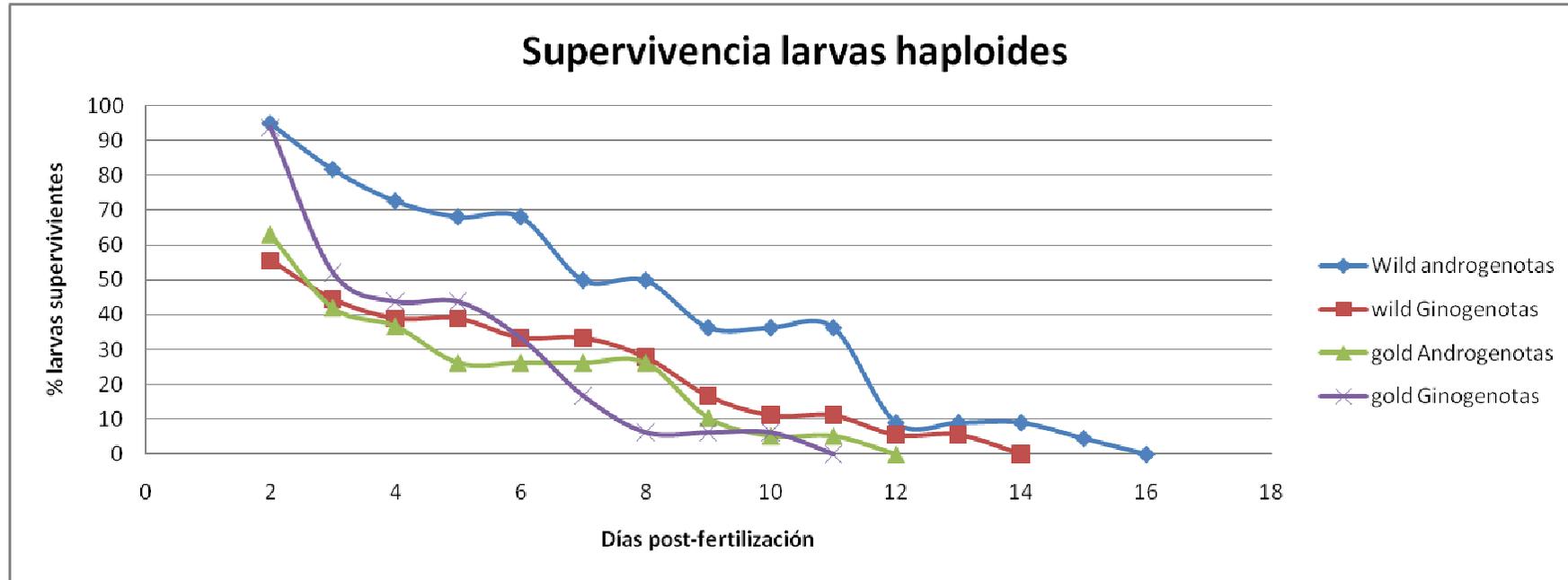
A la vista de la tabla y aunque existan diferencias significativas, no cabe proponer hipótesis alguna dada su incongruencia, lo único que cabe señalar es que, en conjunto, el 73,58 % de las larvas (78/106) no presentaban daños en su maquinaria enzimática que les impidiera la rotura del corion. Dong *et al.* (2007) realizaron estudios de radiación de embriones de pez cebra con luz UV y observaron que esta radiación disminuía la capacidad de eclosión de las larvas debido a los daños en la maquinaria enzimática necesaria para la rotura del corion causados por la radiación UV.

En relación al experimento 2 y la evaluación de la supervivencia de las larvas haploides, los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Supervivencia de las larvas de los cuatro grupos experimentales (*wild* androgenotas, *wild* ginogenotas, *gold* androgenotas y *gold* ginogenotas) en función del número de días postfertilización (d.p.f.).

	2 d.p.f.	3 d.p.f.	4 d.p.f.	5 d.p.f.	6 d.p.f.	7 d.p.f.	8 d.p.f.	9 d.p.f.	10 d.p.f.	11 d.p.f.	12 d.p.f.	13 d.p.f.	14 d.p.f.	15 d.p.f.	16 d.p.f.
<i>wild</i> Androgenotas	19/22 (95 %)	18/22 (81,82 %)	16/22 (72,73 %)	15/22 (68,18 %)	15/22 (68,18 %)	11/22 (50 %)	11/22 (50 %)	8/22 (36,36 %)	8/22 (36,36 %)	8/22 (36,36 %)	2/22 (9,09 %)	2/22 (9,09 %)	2/22 (9,09 %)	1/22 (4,55 %)	0/22 (0%)
<i>wild</i> Ginogenotas	10/18 (55,55 %)	8/18 (44,44 %)	7/18 (38,88 %)	7/18 (38,88 %)	6/18 (33,33 %)	6/18 (33,33 %)	5/18 (27,78 %)	3/18 (16,67 %)	2/18 (11,11 %)	2/18 (11,11 %)	1/18 (5,56 %)	1/18 (5,56 %)	0/18 (0 %)		
<i>gold</i> Androgenotas	12/19 (63,16 %)	8/19 (42,11 %)	7/19 (36,84 %)	5/19 (26,32 %)	5/19 (26,32 %)	5/19 (26,32 %)	5/19 (26,32 %)	2/19 (10,53 %)	1/19 (5,26 %)	1/19 (5,26 %)	0/19 (0%)				
<i>gold</i> Ginogenotas	45/48 (93,75 %)	25/48 (52,08 %)	21/48 (43,75 %)	21/48 (43,75 %)	16/48 (33,33 %)	8/48 (16,67 %)	3/48 (6,25 %)	3/48 (6,25 %)	3/48 (6,25 %)	0/48 (0 %)					

Para ver mejor la evolución de la supervivencia de las larvas haploides de los cuatro grupos experimentales, se han representado los datos en la gráfica 1.



Gráfica 1. Evolución de la supervivencia de las larvas de los cuatro grupos experimentales a lo largo del tiempo.

La supervivencia de las larvas haploides, ya sean androgenotas o ginogenotas, supera en este trabajo a las obtenidas por otros autores han que obtienen habitualmente supervivencias larvarias de hasta cinco días (Ungar *et al*, 1998; Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002). En nuestro caso, las larvas de la estirpe *wild* sobreviven más que las de la estirpe *gold*, lo que puede deberse a que la estirpe *wild* es la que está presente en la naturaleza, por lo que presenta menos mutaciones que influyan en el desarrollo larvario que en la *gold*. De esta gráfica también cabe concluir que las larvas haploides no son capaces de alcanzar el estadio adulto, hecho que ya habían observado varios autores (Mair *et al.*, 1986; Mair, 1993).

Tabla 4. Porcentaje de larvas que sobreviven a los 5 y 10 días post-fertilización en los diferentes grupos experimentales (*wild* androgenotas, *wild* ginogenotas, *gold* androgenotas y *gold* ginogenotas).

	<i>wild</i>		<i>gold</i>	
	Androgenotas	Ginogenotas	Androgenotas	Ginogenotas
Larvas que sobreviven a 5 d.p.f.	15/22 ^a (68,18 %)	7/18 ^{ab} (38,88 %)	5/19 ^b (26,32 %)	21/48 ^{ab} (43,75 %)
Larvas que sobreviven a 10 d.p.f.	8/22 ^a (36,36 %)	2/18 ^{ab} (11,11 %)	1/19 ^{ab} (5,26 %)	3/48 ^b (6,25 %)

Entre columnas, datos con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Ungar *et al.* (1998) obtuvieron embriones de pez cebra haploides androgenotas, los cuales detuvieron su desarrollo aproximadamente cuatro días después de la fertilización (3 a 5 días). En nuestro caso, hemos visto que los embriones son capaces de sobrevivir más allá de 5 días, incluso 10, aunque no son capaces de completar su desarrollo hasta el estadio adulto. Se obtuvieron porcentajes de supervivencia más elevados tanto a 5 como a 10 días postfertilización en la estirpe *wild* que en la *gold*. Este hecho es de gran relevancia a la hora de utilizar los cultivos celulares derivados de tales larvas en experimentos de trasplante nuclear de células somáticas, ya que con ello se podrá evaluar mejor la capacidad del ovocito para reprogramar el núcleo de células somáticas haploides procedentes de larvas que han sobrevivido un máximo de 11-16 días, y por tanto casi totalmente diferenciados, pudiendo depender además de su condición androgenota o ginogenota. Efectivamente, el ovocito receptor (no enucleado) es capaz de reprogramar la célula somática haploide, se obtendrán larvas que habrán recuperado su condición diploide y que serán capaces de alcanzar estadios adultos e incluso estadios adultos e, incluso, ser fértiles.

Tabla 5. Tasas de fijación y proliferación de los cultivos de larvas en función del grupo experimental: *wild* (control DP cultivo estándar; HP cultivo estándar; HP cultivo larvas enteras) y *gold* (control DP cultivo estándar; HP cultivo estándar; HP cultivo larvas enteras). Ambas tasas están calculadas respecto al número de placas de cultivo, no respecto al número de larvas puestas en cada placa de cultivo.

		Tasa de fijación	Tasa de colonización
<i>Wild</i>	DP estándar	2/2 (100 %)	2/2 (100 %)
	HP estándar	8/8 (100 %)	5/8 (62,5 %)
	HP enteras	2/2 (100%)	1/2 (50 %)
<i>Gold</i>	DP estándar	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)
	HP estándar	2/5 (40 %)	2/5 (40 %)
	HP enteras	3/3 (100 %)	2/3 (66,67 %)

Por lo que se refiere a la tasa de fijación al sustrato de las larvas puestas en cultivos, es de resaltar que en todos los grupos experimentales se obtiene un alto porcentaje de fijación, exceptuando el grupo *gold* HP estándar. Debe resaltarse que esta etapa experimental se vio profundamente afectada por las elevadas tasas de contaminación ambiental por hongos (también presente en similares formas en laboratorios de Singapore M. Pérez-Camps: comunicación personal). En nuestro caso se achaca tal grado de elevada contaminación a la elevada pluviometría en nuestro entorno y en este año. En cualquier caso, la reducción final en los efectivos impidió la realización de análisis estadísticos. En cuanto, a la tasa de colonización del sustrato (proliferación) los resultados son más variables, siendo el cultivo estándar de larvas HP en el que menor porcentaje de colonización se observa, tanto en la estirpe *gold* como en la *wild*. Una explicación plausible para ello sería que las células procedentes de larvas haploides pueden presentar requerimientos de cultivo diferentes a los diploides, debido posiblemente a la existencia de imprinting genómico (Tsalavouta *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010).

V. CONCLUSIONES

1. El tipo de gameto radiado (oocito o espermatozoide) y la estirpe (*wild* o *gold*) no afectan a la tasa de fecundación ni a la supervivencia hasta estadio MBT.
2. El mayor porcentaje de larvas haploides se obtuvo cuando se radiaron los espermatozoides, lo que sugiere que la inactivación por radiación UV del material genético materno sea menos eficaz que la del genoma paterno.
3. Pese a lo descrito por otros autores, se han observado supervivencias de las larvas haploides más allá de 5 días, incluso 10, aunque no sean capaces de completar su desarrollo hasta el estadio adulto. Este hecho es de gran relevancia cuando se pretenda evaluar la capacidad del ovocito de reprogramar el núcleo de células somáticas haploides procedentes de larvas de 24 horas y hasta 11-16 días, con sus células mucho más diferenciadas, dependiendo de la estirpe y el tipo de gameto radiado (androgenotas y ginogenotas).
4. Uno de los principales problemas que se presenta en el establecimiento de cultivos celulares haploides, y que es muy difícil de controlar, es la aparición de múltiples contaminaciones, particularmente por hongos, lo que requerirá la adición de un antifúngico específico.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Aleström P, Holter JL, Nourizadeh-Lillabadi R. (2006). Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol* 24(1): 15-21.

Altschmied J, Volff JN, Winkler C, Gutbrod H, Korting C, Pagany M, Scharl M. (2000). Primary structure and expression of the Xiphophorus DNA-(cytosine-5)-methyltransferase *xdnmt-1*. *Gene* 249: 75–82.

Amanze D, Iyengar A. (1990). The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. *Development* 109(2): 495-500.

Barton SC, Surani MA, Norris ML. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311: 374–376.

Barton SC, Adams CA, Norris ML, Surani MA. (1985). Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophectoderm tissues in reconstituted blastocysts in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 90: 267-285.

Battista AG, Ricatti MJ, Pafundo DE, Gautier MA, Faillace MP. (2009). Extracellular ADP regulates lesion-induced in vivo cell proliferation and death in the zebrafish retina. *J Neurochem* 111(2): 600-613.

Beam H, Kessel R. (1976). Cytokinesis: A Comparative Study of Cytoplasmic Divisions in Animal Cells. *American Scientist* 54: 279-290.

Beis D, Stainier, DY. (2006). In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends in Cell Biology* 16(2): 105-112.

Bhat A. (2003). Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. *Environ Biol Fishes* 68: 25–38.

Boon KL, Xiao S, McWhorter ML, Donn T, Wolf-Saxon E, Bohnsack MT, Moens CB, Beattie CE. (2009). Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Hum Mol Genet* 18(19): 3615-3625.

Briggs R, King TJ. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 38: 455–463.

Brittijn SA, Duivesteijf SJ, Belmamoune M, Bertens LF, Bitter W, de Bruijn JD, Champagne DL, Cuppen E, Flik G, Vandenbrouck-Grauls CM, Janssen RA, de Jong IM, de Kloet ER, Kros A, Meijer AH, Metz JR, van der Sar AM, Schaaf MJ, Schulte-Merker S, Spaik HP, Tak PP, Verbeek FJ, Vervoordeldonk MJ, Vonk FJ, Witte F, Yuan H, Richardson MK. (2009). Zebrafish development and regeneration: new tools for biomedical research. *Int J Dev Biol* 53(5-6): 653-658.

Brugman S, Liu KY, Lindenbergh-Kortleve D, Samsom JN, Furuta GT, Renshaw SA, Willemsen R, Nieuwenhuis EE. (2009). Oxazolone-induced enterocolitis in zebrafish depends on the composition of the intestinal microbiota. *Gastroenterology* 137(5): 1757-1767.

Briedis A, Elinson RP. (1982). Suppression of male pronuclear movement in frog eggs by hydrostatic pressure and deuterium oxide yields androgenetic haploids. *J Exp Zool* 222: 45-57.

Cardona-Costa J, Pérez-Camps M, García-Ximénez F, Espinós FJ. (2009). Effect of gametes aging on their activation and fertilizability in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 6(1): 93-95.

Carter RE, Mair GC, Skibinaki DOF, Parkin DT, Beardmore JA. (1991). The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture* 95: 41-52.

Carvan MJ, Gallagher EP, Gosoir A, Hahn Me, Larsson DG. (2007). Fish models in toxicology. *Zebrafish* 4(1): 9-20.

Cattanach BM, Kirk M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 315: 496-498.

Chen HX, Yi YL, Chen MR, Yang X. (1986). Studies on the developmental potentiality of cultured cell nuclei of fish. *Acta Hydrobiologica Sinica* 10(1): 1.

Chen YH, Lin YT, Lee GH. (2009). Novel and unexpected functions of zebrafish CCAAT box binding transcription factor (NF-Y) B subunit during cartilages development. *Bone* 44(5): 777-784.

Cherfas NB. (1981). Gynogenesis in fishes. In: Kirpičnikov, V.S. (Ed.), *Genetic Basis of Fish Selection*. Springer verlag, Berlin, pp. 255-273.

Chourrout D. (1984). Pressure-Induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in Rainbow Trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36: 111-126.

Colombo L, Barbaro A, Libertini A, Benedetti P, Francescon A, Lombardo I. (1995). Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Journal of Applied Ichthyology* 11: 118-125.

Corley-Smith GE, Lim CJ, Brandhorst BP. (1996). Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* 142: 1265-1276.

Dong Q, Svoboda K, Tiersch TR, Monroe WT. (2007). Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: evidence for a competent photorepair system. *J Photochem Photobiol B* 88(2-3): 137-146.

Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kauleff AV. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205(1): 38-44.

Ellinger MS, King DR, McKinnell RG. (1975). Androgenetic haploid development produced by ruby laser irradiation of anuran ova. *Radiat Res* 62: 117–1122.

Fadool JM, Dowling JE. (2008). Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Prog Retin Eye Res* 27(1): 89-110.

Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. (1999). Genomic Imprinting: Implications for Human Disease. *Am J Pathol* 154: 635–647.

Fan CY, Cowden J, Simmons SO; Padilla S, Ramabhadran R. (2010). Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicol Teratol* 2(1): 91-98.

Francisco-Simão M, Cardona-Costa J, Perez Camps M, García-Ximénez F. (2010). Ultraviolet radiation dose to be applied in recipient zebrafish embryos for germ-line chimaerism is strain dependent. *Reprod Domest Anim.* 45(6): 1098-1103.

Fritz A, Rozowski M, Walker C, Westerfield M. (1996). Identification of selected gamma-ray induced deficiencies in zebrafish using multiplex polymerase chain reaction. *Genetics* 144: 1735–1745.

Fujioka Y. (1998), Survival, growth and sex ratios of gynogenetic diploid honmoroko. *Journal of Fish Biology* 52: 430–442.

Galbusera, P. (2000). Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation. *Aquaculture* 185(1-2): 25-42.

Gerhard GS. (2003). Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp Gerontol* 38(11-12): 1333-1341.

Gilbert SF. (2000). *Developmental Biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.

Gillespie LL, Armstrong JB. (1981). Suppression of first cleavage in the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) by heat shock or hydrostatic pressure. *J Exp Zool* 218: 441–445.

Gomelsky B, Mims SD, Onders RJ, Shelton WL, Dabrowski K, Garcia-Abiado MA. (2000). Induced Gynogenesis in Black Crappie. *North American Journal of Aquaculture* 62 (1): 33 – 41.

Graham CF. (1974). The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in brological research. *Biol Rev* 49: 399-422.

Grush J, Noakes DLG, Moccia RD. (2004). The Efficacy of Clove Oil as an Anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish* 1(1): 46-53.

Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. (1958). Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182: 64–65.

Gurdon JB. (1960). The effects of UV irradiation on the uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. *Q J Microscop Sci* 101: 299–311.

Haig D. (1993). Genetic conflicts in human pregnancy. *Q Rev Biol* 68(4): 495-532.

Haig D, Trivers R. (1995). The evolution of parental imprinting: a review of hypotheses. In *Genomic imprinting* (ed. R. Ohlsson, K. Hall & M. Ritzen), pp. 17-28. Cambridge University Press.

Harfouche R, Basu S, Soni S, Hentschel DM, Mashelkar RA, Sengupta S. (2009). Nanoparticle-mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signaling inhibits angiogenesis. *Angiogenesis* 12(4): 325-338.

Hart NH, Fluck RA. (1995). Cytoskeleton in teleost eggs and early embryos: Contributions to cytoarchitecture and motile events. *Curr. Top. Dev. Biol.* 31: 343-381.

Henion PD, Raible DW, Beattie CE, Stoesser KL, Weston JA, Eisen JS. (1996). Screen for mutations affecting development of zebrafish neural crest. *Dev Genet* 18: 11-17.

Henry I, Bonaiti-Pellié C, Chehense V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, Junien C. (1991). Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* 351(6328): 665-667.

Hongtuo F, Chingjiang W. (2001). Nuclear transfer in loach (*Paramisgurnus dabryanus* Sauvage) by cell-to-cell electrofusion. *Aquacult Res* 32: 267-275.

Hu W, Wang Y, Chen S, Zhu Z. (2002). Nuclear transplantation in different strains of zebrafish. *Chinese Science Bulletin* 47 (15): 1277-1280.

Hultman KA, Budi EH, Teasley DC, Gottlieb AY, Parichy DM, Johnson SL. (2009). Defects in ErbB-dependent establishment of adult melanocyte stem cells reveal independent origins for embryonic and regeneration melanocytes. *PLoS Genet* 5(7): e1000544.

Ihssen PE, McKay LR, McMillan I, Phillips RB. (1990). Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries application. *Trans Am Fish Soc* 119: 698–717.

Ingham PW. (2009). The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet* 15(18): 107-112.

Jenneckens I, Müller-Belecke A, Hörstgen-Scwark G, Meyers JN. (1999). Proof of the successful development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) clones by DNA fingerprinting. *Aquaculture* 173: 377–388.

Jiang X, Yu Y, Yang HW, Agar NY, Frado L, Johnson MD. (2010). The imprinted gene PEG3 inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth. *J Biol Chem* 285(11): 8472-80.

Jirtle RL. (1999). Genomic Imprinting and Cancer. *Exp Cell Res* 248: 18–24.

Johnson DR. (1974). Hairpin-tail: a case of post-reductional gene action in the mouse egg. *Genetics* 76: 795-805.

Ju B, Pristyazhnyuk I, Ladygina T, Kinoshita M, Ozato K, Wakamatsu Y. (2003). Development and gene expression of nuclear transplants generated by transplantation of cultured cell nuclei into non-enucleated eggs in the medaka *Oryzias latipes*. *Develop Growth Differ* 45: 167-174.

Kaftanovskaya E, Motosugi N, Kinoshita M, Ozato K, Wakamatsu Y. (2007). Ploidy mosaicism in well-developed nuclear transplants produced by transfer of adult somatic cell nuclei to nonenucleated eggs of medaka (*Oryzias latipes*). *Develop Growth Differ* 49: 691–698.

Kakimoto Y, Aida S, Arai K, Suzuki R. (1994). Induction of gynogenetic diploids in ocellated buffer *Takifugu rubripes* by cold and heat treatments. *Appl Biol Sci* 33: 103-112.

Kan NG, Junghans D, Izpisua Belmonte JC. (2009). Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *FASEB J* 23(10): 3516-3525.

Kane DA, Kimmel CB. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119: 447-456.

Kaufman MH, Barton SC, Surani MAH. (1977). Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature* 265: 53-55.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203(3): 253-310.

Kishi S, Slack BE, Uchiyama J, Zhdanova IV. (2009). Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates—a mini-review. *Gerontology* 55(4): 430-441.

Klein LC, K Yeung P, Berman JN. (2009). Cladribine inhibits a diltiazem-induced increase in red blood cell purine nucleotide concentrations in a zebrafish model. *Biomarkers* 14(8): 554-559.

Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM Jr, Lalande M, Latt SA. (1989). Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32(2): 285-290.

Kurcharczyk D, Woznicki P, Luczynski MJ, Klinger M, Luczynski M. (1999). Ploidy level determination in genetically manipulated northern pike based on the number of active nucleoli per cell. *North American Journal of Aquaculture* 61: 38-42.

Latham KE, Patel B, Bautista FD, Hawes SM. (2000). Effects of X chromosome number and parental origin on X-linked gene expression in preimplantation mouse embryos, *Biol Reprod* 63: 64–73.

Latham KE, Akutsu H, Patel B, Yanagimachi R. (2002). Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos, *Biol Reprod* 67: 386–392.

Lee KW, Webb SE, Miller AL. (1999). A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. *Dev Biol* 214(1): 168-180.

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

Levraud JP, Disson O, Kissa K, Bonne I, Cossart P, Herbomel P, Lecuit M. (2009). Real-time observation of listeria monocytogenes-phagocyte interactions in living zebrafish larvae. *Infect Immun* 77(9): 3651-3660.

Liang J, Burgess SM. (2009). Gross and fine dissection of inner ear sensory epithelia in adult zebrafish (*Danio rerio*). *J Vis Exp.* (27)Pii:1221.doi: 10.3791/1211.

Linhart O, Kvensnicka P, Flajshans M, Kaal A, Ráb P, Palecek J, Slechta V, Hamacková J, Prokes M. (1995). Genetics studies with tench, *Tinca tinca* L.: Induced meiotic gynogenesis and sex reversal. *Aquaculture* 132: 239-251.

Liu Q, Goudie CA, Simco BA, Davis KB, Morizot DC. (1996). Isozyme expression and genecentromere distances in diploid and triploid hybrid catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 125: 56-65.

Lozano R, Rejon CR, Ruiz M. Rejon. (1987). Manipulación cromosómica en organismos acuáticos. *In: Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Eds.). Genética en Acuicultura.* Mundi-Prensa libros, Madrid, España. 215-246 p.

Luo D, Hu W, Chen S, Xiao Y, Sun Y, Zhu Z. (2009). Identification of differentially expressed genes between cloned and zygote-developing zebrafish (*Danio rerio*)

embryos at the dome stage using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* 80: 674-684.

Luo DJ, Hu W, Chen SP, Zhu ZY. (2011). Critical Developmental Stages for the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer in Zebrafish. *Int J Biol Sci* 7: 476-486.

Mair CC, Scott AG, Beardmore JA, Skibinski DOF. (1986). A technique for induction of diploid gynogenesis in *Oreochromis niloticus* by suppression of first mitotic division. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol II. Berlin. P. 289-299.*

Mair GC. (1993). Chromosome-set manipulation in tilapia, techniques, problems and prospects. *Aquaculture* 111: 227-244.

Marques IJ, Weiss FU, Vlecken DH, Nitsche C, Bakkers J, Lagendijk AK, Partecke LI, Heidecke CD, Lerch MM, Bagowski CP. (2009). Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer*. 9: 128.

Martin P, Feng Y. (2009). Inflammation: Wound healing in zebrafish. *Nature* 459(7249): 921-923.

Martin C, McGowan R. (1995). Parent-of-origin specific effects on the methylation of a transgene in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Genetics* 17 (3): 233-239.

Masaoka T, Arai K, Suzuki R. (1995). Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiated eggs by suppression of the first cleavage. *Fisheries Science* 61: 716-717.

McClure MM, McIntyre PB, McCune AR. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol* 69: 553-570.

McGrath J, Solter D. (1983). Nuclear transplantation in the Mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220: 1300-1302.

McGrath J, Solter D. (1984a). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37: 179-183.

McGrath J, Solter D. (1984b). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226: 1317-1319.

McGrath J, Solter D. (1984c). Maternal *Thp* lethality in the mouse is nuclear, not cytoplasmic, defect. *Nature* 308: 550-551.

Meeker ND, Trede NS. (2008). Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol* 32(7): 745-757.

Meng X, Noyes MB, Zhu L, Nathan D, Lawson ND, Wolfe SA. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26(6): 695–701.

Menon AGK. (1999). Check list — fresh water fishes of India. *Rec. Zool. Surv. India. Misc. Publ., Occas. Pap.* 175 (366): 234–259.

Montero-Balaguer M, Swirsding K, Orsenigo F, Cotelli, F, Mione M, Dejana E. (2009). Stable vascular connections and remodeling require full expression of VEcadherin in zebrafish embryos. *PLoS One* 4(6): e5772.

Moody S. (1999). Introduction to the Zebrafish. En, W. Driever, *Cell Lineage and Fate Determination* (pp. 371-382). George Washington University, Washington, D.C., U.S.A.: Academic Press.

Moore T, Haig D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 7: 45-49.

Moss JB, Koustubhan P, Greenman M, Parsons MJ, Walter I, Moss LG. (2009). Regeneration of the pancreas in adult zebrafish. *Diabetes* 58(8): 1844-1851.

Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. (1993). Mutational Androgenetic haploid zebrafish approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* 3: 648–654.

Mylonas CC, Cardinaletty G, Sigelaki I, Polzonetti-Magni A. (2005). Comparative Efficacy of Clove Oil and 2-phenoxyethanol as Anesthetics in the Aquaculture of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) at Different Temperatures. *Aquaculture* 246: 467-481.

Nagy A. (1987). Genetic manipulations performed on warm water fish. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol II. Berlin. P.* 163-275.

Nascevicus A, Ekker SC. (2000). Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat Genet* 26(2): 216-220.

Nelson SM, MahmoudT, Beaux M 2nd, Shapiro P, Mcllory DN, Stenkamp DL. (2010). Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos. *Nanomedicine* 6(1): 93-102.

Newport J, Kirschner M. (1982a). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30: 675-686.

Newport, J., Kirschner, M. (1982b). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30: 687-696.

Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M. (1989). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 342(6247): 281-285.

Nüsslein-Volhard C, Dahm R. (2002). *Zebrafish: A practical approach*. (Oxford University Press, Oxford, England) pp. 332.

Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. (1993). Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 362: 749-751.

Okada A, Nagata K, Sano K, Yasumasu S, Kubota K, Ohtsuka J, Iuchi I, Tanokura M. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of ZHE1, a hatching enzyme from the zebrafish *Danio rerio*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 65(10): 1018-1020.

Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V, Tiittula A, Moshnyakov M, Podlasz P. (2006). Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* 3(2): 235-247.

Payne E, Look T. (2009). Zebrafish modeling of leukaemias. *Br J Haematol* 146(3): 247-256.

Phelps HA, Runft DL, Neely MN. (2009). Adult zebrafish model of streptococcal infection. *Curr Protoc Microbiol*. Chapter 9: Unit 9D.1.

Pérez-Camps M, Cardona-Costa J, Francisco-Simao M, García-Ximénez F. (2010). Definition of three somatic adult cell nuclear transplant methods in zebrafish (*Danio rerio*): before, during and after egg activation by sperm fertilization. *Zygote* 18(1): 33-39.

Poleo GA, Denniston RS, Reggio RC, Godke RA, Tiersch TR. (2001). Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction* 65: 961-966.

Postlethwait JH, Johnson SL, Midson CN, Tablot WS, Gates M, Ballinger EW, Africa D, Andrews R, Carl T, Eisen JS, Horne S, Kimmel CB, Hutchinson M, Johnson M, Rodriguez A. (1994). A genetic linkage map for the zebrafish. *Science* 264: 699-703.

Purdom CE. (1969). Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. *Heredity* 24(3): 431-444.

Purdom CE. (1983). Genetics engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture* 33: 287-300.

- Qi FY, Xu GZ. (1997). Genetic character and individual growth of the trans-nucleus fish of the bighead and the blunt-snout bream. *Acta Zool Sinica* 43(2): 211.
- Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. (1993). Relaxation of Imprinted Genes in Human Cancer. *Nature* 362: 747–749.
- Rauber A. (1886). Personaltheil und Germinaltheil des Individuum. *Zool Anz* 9: 166–171.
- Reik W, Walter J. (2001a). Genomic imprinting, parental influence on the genome. *Nature Rev Genet* 2: 21-32.
- Reik W, Dean W, Walter J. (2001b). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093.
- Sakai N, Burgess S, Hopkins N. (1997). Delayed in vitro fertilization of zebrafish eggs in Hank's saline containing bovine serum albumin. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6(2): 84-87.
- Sano K, Inohaya K, Kawaguchi M, Yoshizaki N, Iuchi I, Yasumasu S. (2008). Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS J.* 275(23): 5934-5946.
- Santoro MM, Pesce G, Stainier DY. (2009). Characterization of vascular mural cells during zebrafish development. *Mech Dev* 126(8-9): 638-649.
- Schartl M, Wilde B, Schlupp I, Parzefall J. (1995). Evolutionary origin of a parthenoform, the amazon molly *Poecilia formosa*, on the basis of a molecular genealogy. *Evolution* 49: 827–835.
- Selderslaghs IW, Van Rompay AR, De Coen W, Witters HE. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod Toxicol* 28(3): 308-320.
- Senut MC, Azher S, Margolis FL, Patel K, Mousa A, Majid A. (2009). Distribution of carnosine-like peptides in the nervous system of developing and adult zebrafish (*Danio rerio*) and embryonic effects of chronic carnosine exposure. *Cell Tissue Res* 337(1): 45-61.
- Simão MF, Pérez-Camps M, García-Ximénez F. (2007). Short Communication. Zebrafish Embryo Development Can Be Reversibly Arrested at the MBT Stage by Exposure to a Water Temperature of 16°C. *Span J Agric Res* 5(2): 181-185.
- Simão MF, Cardona-Costa J, Perez Camps M, García-Ximénez F. (2010). Ultraviolet Radiation Dose to be Applied in Recipient Zebrafish Embryos for Germ-line Chimaerism is Strain Dependent. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 1098–1103.

Simão MF, Cardona-Costa J, Pérez-Camps M, García-Ximénez F. (2011). Ultraviolet radiation and handling medium osmolarity affect chimaerism success in zebrafish. *Zygote* 19: 67-70.

Spence R, Runa KF, Reichard M, Huq KA, Wahab MA, Ahmed ZF, Smith C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *J Fish Biol* 69: 1435–1448.

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

Streisinger G, Singer F, Walker C, Knauber D, Dower N. (1986). Segregation analysis and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics* 112: 311-319.

Sugama K, Taniguchi N, Seki S, Nabeshima H, Hasegawa Y. (1990). Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1427-1433.

Sumantadinata K, Taniguchi N. (1991). Gene-centromere recombination rate in *Pgm* and *Est-2* loci of gynogenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.) obtained by retaining of the second polar body. *Indon J Trop Agric* 3: 38-41.

Surani MAH, Barton SC. (1983). Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222: 1034-1036.

Surani MAH, Barton SC, Norris ML. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548-550.

Takagi N, Sasaki M. (1975). Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 256: 640-642.

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

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.

Talbot WS, Hopkins N. (2000). Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. *Genes Dev* 14(7): 755-762.

Taniguchi N, Kijama A, Tamura T, Takegami K, Yamasaki I. (1986). Color, growth and maturation in ploidymanipulated Fancy carpa. *Aquaculture* 57: 321-328.

Thisse B, Pflumio S, Fürthauer M, Loppin B, Heyer V, Degraeve A, Woehl R, Lux A, Steffan T, Charbonnier XQ, Thisse C. (2001) Expression of the zebrafish genome during embryogenesis (NIH R01 RR15402). ZFIN Direct Data Submission.

Thorgaard GH. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Fish Physiology, vol. IX, part B. (W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds). pp. 405-434. Academic press, New York. 477 pages.

Trinkaus JP. (1984). Mechanism of *Fundulus* Epiboly—A Current View. Amer Zool 24(3): 673-688.

Tsalavouta M, Astudillo O, Byrnes L, Nolan CM. (2009). Regulation of expression of zebrafish (*Danio rerio*) insulin-like growth factor 2 receptor: implications for evolution at the IGF2R locus. Evol Dev 11(5): 546-558.

Tung TC, Wu SC, Tung YYF, Yan SY, Tu M, Lu TY. (1963). Nuclear transplantation in fish. Science Bulletin, Academia Sinica (in Chinese) 7: 60–61.

Tung TC, Ye YF, Lu DY, *et al.* (1973). Transplantation of nuclei between two subfamilies of teleosts. Acta Zool Sin 19(3): 201.

Ungar AR, Helde KA, Moon RT. (1998). Production of androgenetic haploids in zebrafish with ultraviolet light. Mol Mar Biol Biotechnol 7(4): 320-326.

van der Sar AM, Appelmelk BJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Bitter W. (2004). A star with stripes: zebrafish as an infection model. Trends in Microbiology 12(10): 451-457.

Váradi L, Benkó I, Varga J, Horváth L. (1999). Induction of diploid gynogenesis using interspecific sperm and production of tetraploids in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822). Aquaculture 173: 401-411.

Wakamatsu Y, Ju B, Pristyazhnyuk 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*). Proc Natl Acad Sci USA 98: 1071-1076.

Wall RJ, Shani M. (2008). Are animal models as good as we think? Theriogenology 69: 2-9.

Walker C, Streisinger G. (1983). Induction of mutations by gamma-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos. Genetics 103: 125-136.

Wang YH, Cheng CC, Lee WJ, Chiou ML, Pai CW, Wen CC, Chen WL, Chen YH. (2009). A novel phenotype-based approach for systematically screening antiproliferation metallodrugs. Chem Biol Interact 182(1): 84-91.

Warga RM and Kimmel CB. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. Development 108: 569-580.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385: 810–813.

Witten PE, Huysseune A. (2009). A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 84(2): 315-346

Westerfield M. (2000). *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. 4th Ed. (University of Oregon Press, Eugene, OR, USA) pp. 385.

Westerfield M. (2007). *The Zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 5th Ed. (University of Oregon Press, Eugene, OR, USA) pp. 385.

Wolenski JS, Hart NH. (1987), Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg. *Journal of Experimental Zoology*, 243: 259–273.

Yamashita M, Jiang J, Onozato H, Nakanishi T, Nagahama Y. (1993). A tripolar spindle formed at meiosis-I assures the retention of the original ploidy in the gynogenetic triploid crucian carp (ginbuna), *Carassius auratus langsdorfii*. *Development Growth and Differentiation* 35: 631–636.

Yan SY, Lu DY, Du M, Li GS, Lin LT, Jin GQ, Wang H, Yang YQ, Xia DQ, Liu AZ, *et al.* (1984). Nuclear transplantation in teleosts. Hybrid fish from the nucleus of crucian and the cytoplasm of carp. *Science in China* 27(10): 1029-1034.

Yan SY, Lu D, Du M. *et al.* (1985). Nuclear transplantation in teleosts, IVA. Nuclear transplantation between different subfamilies- hybrid fish from the nucleus of grass carp (*Ctenopharyngoden idellas*) and the cytoplasm of blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Chinese J. Biotechnology* 1(4): 15.

Zhdanova IV. (2006). Sleep in zebrafish. *Zebrafish* 3(2): 215-226.