



First attempts to cryopreserve red abalone (*Haliotis rufescens*) oocytes

Primeros intentos por criopreservar ovocitos del abulón rojo (*Haliotis rufescens*)

Ramírez Torrez, A.¹, Paniagua Chávez, C.¹, Portillo López, A.^{2*}.

¹Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Carretera Tijuana-Ensenada No. 3918 zona playitas, C.P. 22860. Ensenada, Baja California; México.

²Universidad Autónoma de Baja California, Km 103 carretera Tijuana-Ensenada, C.P. 22860. Ensenada, Baja California; México.

ABSTRACT

Overall, few advances in the cryopreservation of complex cells such as oocytes, embryo or tissue have been registered and in less quantity have been reported for aquatic species. Abalone has high economic interest worldwide and the conservation of abalone germplasm may help to enhance its culture and develop repopulation programs. In this work, we reported the cytotoxic effect of two concentration of trehalose (0.2 and 0.4 M) on red abalone oocytes incubated for 10, 15 and 20 min. Also, we reported the cryopreservation of red abalone oocytes using a 3-steps cryopreservation protocol and 5 thawing protocols. Significant differences on cytotoxic effect were found ($p < 0.01$). However, none of the cryoprotectant was optimum to cryopreserve red abalone oocyte. In conclusion, it is necessary to find an appropriate method to dehydrate or make the cryoprotectant penetrate on the abalone oocyte before proceeding to cryopreservation.

KEY WORDS

Oocytes, abalone, cytotoxic effect, cryopreservation.

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: June 13th 2014.

Accepted/Aceptado: September 4th 2014.

*Corresponding Author:

Portillo López A., Universidad Autónoma de Baja California, Km. 103, Carretera Tijuana-Ensenada, C.P. 22860 Ensenada, Baja California; México. Phone: +52(646) 174 4560. E-mail: portillo@uabc.edu.mx

RESUMEN

En general, el avance en la criopreservación de células complejas tales como óvulos, embriones o tejidos ha sido poco y mucho menor en aquellos estudios relacionados con la criopreservación de ovocitos de especies acuáticas. Los abulones son de gran interés económico en todo el mundo. La conservación de germoplasma de esta especie puede ayudar a mejorar su cultivo y a desarrollar programas de repoblamiento. En este trabajo se reporta el efecto citotóxico de Trehalosa en ovocitos de abulón en dos concentraciones de 0.2 y 0.4 M, incubados 10, 15 y 20 min. Además, se reporta la criopreservación utilizando un método lento en 3 pasos y 5 protocolos de descongelación. Se encontraron diferencias significativas en el efecto citotóxico ($p < 0.01$). Sin embargo, ninguno de los crioprotectores fue óptimo para la criopreservación de los ovocitos de abulón. Por lo tanto, se concluye que para poder llegar a criopreservar los ovocitos de abulón rojo es necesario encontrar un método para poder deshidratar a las células o hacer que los crioprotectores penetren en ellas.

PALABRAS CLAVE

Ovocitos, abulón, efecto citotóxico, criopreservación.

Introduction

In the last decades, aquaculture has become the primary productive sector with higher growth rate for the feeding sector. Nowadays, aquaculture is responsible of near half of the total of consumed fish feeding and this growth is expected to increase as much as human population (FAO 2014). Despite this fact, domestication, improvement of most of cultivated aquatic organisms and conservation of the genetic aquatic resources is far from what agriculture and stockbreeding are today, therefore it is imperative to establish programs for the optimization and conservation of this resource (Bilio, 2007).

Conservation measures *ex situ* and *ex situ-vivos* provide a backup against the loss of genetic resources due to the detriment of the habitat or problems related with eventualities. In general, *ex situ* collections play an important and active role in the strategic programs of reproduction. In the case of aquatic organisms, cryopreservation of the sperm of wide variety of teleost has proven to be a functional procedure for aquatic organisms. However, the development of this technology for a variety of aquatic species is small compared with the development in agriculture and stockbreeding, even though many aquatic organisms have served as models for an infinite number of molecular, environmental and physiological studies. It might be due to the fact that many protocols have to be design for each species and more specifically for each tissue, which makes *ex situ* conservation a great challenge for aquatic species.

In general, the advance of cryopreservation of complex cells such as oocytes, embryo or tissue is very little. The first attempts of cryopreservation of oocytes were made with mice in the 70's (Watson and Fuller, 2001) and nowadays great efforts have been made for the cryopreservation of human oocyte, where significant advances have been accomplished (Fabbri *et al.*, 2001; Bianchi *et al.*, 2005; Borini *et al.*, 2006). Hence, if there has been little success in the cryopreservation of oocyte in mammals, less advances have been obtained with aquatic species (Hanquet-Dufour *et al.*, 2006). Among the few studies related with cryopreservation of oocytes of aquatic species we found those made with the oocytes of zebrafish, *Danio rerio* (Zhang *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009), sea urchin, *Evechinus chloroticus* (Adams *et al.*, 2003), starfish

Introducción

En las últimas décadas, la acuicultura se ha convertido en el sector productivo primario con mayor tasa de crecimiento para el sector alimentario. Hoy en día, la acuicultura es responsable de cerca de la mitad del total del alimento pesquero consumido y se espera que éste incremente tanto como el crecimiento de la población humana (FAO 2014). A pesar de este hecho, la domesticación, el mejoramiento de la mayoría de los organismos acuáticos cultivados y la conservación de los recursos genéticos acuáticos están muy lejos de lo que hoy se tiene en la agricultura y ganadería, por lo que es imperante el establecimiento de programas para la optimización y conservación de este recurso (Bilio, 2007).

Las medidas de conservación *ex situ* y *ex situ-vivos* proveen un respaldo en contra de la pérdida de los recursos genéticos debido al deterioro del hábitat o a problemas relacionados con eventualidades. En general, las colecciones *ex situ* juegan un papel importante y activo en los programas estratégicos de reproducción. En el caso de los organismos acuáticos, la criopreservación de espermatozoides de una amplia variedad de teleosteos ha demostrado que es un procedimiento funcional para los organismos acuáticos. Sin embargo, el desarrollo de esta tecnología para una variedad de especies acuáticas es pequeña comparada con el desarrollo que se tiene en la agricultura y la ganadería a pesar de que muchos organismos acuáticos han servido también de modelos para una infinidad de estudios moleculares, ambientales y fisiológicos. Esto es debido a que muchos de los protocolos se tienen que diseñar para cada especie y específicamente para cada tejido, lo cual hace que la conservación *ex situ* para las especies acuáticas sea un reto.

En general, los avances de la criopreservación de células complejas tales como óvulos, embriones o tejidos han sido pocos. Los primeros intentos de criopreservación de óvulos se realizaron con el ratón en la década de los 70's (Watson y Fuller, 2001) y en la actualidad se han destinado grandes esfuerzos por la criopreservación de óvulos de humanos, en donde ya se han logrado avances significativos (Fabbri *et al.*, 2001; Bianchi *et al.*, 2005; Borini *et al.*, 2006). Por lo tanto, si en mamíferos se ha tenido poco éxito en la criopreservación de óvulos, menos avances se han obtenido con especies acuáticas (Hanquet-Dufour *et al.*, 2006). Entre los pocos estudios relacionados con la criopreservación de ovocitos de especies acuáticas se encuentran aquellos realizados con los ovocitos del pez cebra, *Danio rerio* (Zhang *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009), el erizo de mar, *Evechinus chloroticus* (Adams *et al.*, 2003), estrella de mar (Hamaratoğlu *et al.*, 2005) y mejillón,

(Hamaratoğlu et al., 2005) and mussel, *Perna canaliculus* (Adams et al., 2009). All of them with consistently low levels of success. The only successful case registered so far is the cryopreservation of oocytes of Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Tervit et al., 2005). These authors accomplished to produce 51 % of larvae for settlement from cryopreserved oocytes. In all mentioned cases, it is general that evaluation of success of cryopreservation is associated to variables such as structural integrity and cell viability. Many times, thawed oocytes seem viable but they cannot either be fertilized or produce normal embryos.

An aquaculture species of great importance in the world, especially for Mexico, is red abalone, *Haliotis rufescens*. Abalones are of the great economic interest all around the world since they are considered to be a gastronomic delight. The cost of abalone meat is very high due to its own biology, since its lifecycle is relatively long, it reaches a commercial size until 4 or 5 years of life. Mexico holds the fourth position worldwide in production, and Baja California is one of the states with major development in aquaculture, with an annual production of 29.6 tons of meat (Searcy-Bernal et al., 2010). Currently, wild capture fishery of abalone is restricted due to its high exploitation, being the wild stocks in risk of extinction; hence, there is a great interest to cryopreserve gametic cells. In 2005, cryopreservation of sperm of red abalone was reported (Salinas-Flores et al., 2005). However, up to date, there are no reports found on cryopreservation of oocytes or embryos of this important species. Despite the fact that in aquatic species very little success has been obtained by cryopreserving oocytes or embryos, it is imperative to begin research in this topic in order to evaluate cryodamage and determine optimum protocols of cryopreservation. Therefore, the objective of this paper is to report the results of the first attempts to cryopreserve oocytes of red abalone *Haliotis rufescens*.

Materials and Methods

Obtaining of organisms and gametes

Abalones were obtained from the Company Abalones Cultivados S. de R. L. de C. V. in the common land Eréndira, Baja California (31° 20", 116° 29") and were transported within plastic bags with oxygen in coolers to the Department of Aquaculture of the CICESE

Perna canaliculus (Adams et al., 2009). Todos ellos con resultados poco exitosos. El único caso exitoso registrado hasta el momento es la criopreservación de ovocitos del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Tervit et al., 2005). Estos autores lograron producir 51 % de larvas para el asentamiento a partir de ovocitos criopreservados. En todos los casos mencionados generalmente la evaluación del éxito de la criopreservación se asocia a variables tales como la integridad estructural y viabilidad general de la célula. En muchas ocasiones los ovocitos descongelados parecen viables pero no pueden ser fertilizados o producen embriones anormales.

Una especie acuícola de gran importancia en el mundo y especialmente en México es el abulón rojo, *Haliotis rufescens*. Los abulones son de gran interés económico en todo el mundo porque se consideran una delicia gastronómica. El costo de la carne de abulón es muy alto por su misma biología, ya que su ciclo de vida es relativamente largo, alcanza la talla comercial hasta los 4 a 5 años de vida. México ocupa la cuarta posición mundial en producción, siendo Baja California uno de los estados con mayor desarrollo en acuicultura, con una producción anual de 29.6 toneladas de carne (Searcy-Bernal et al., 2010). Actualmente la captura silvestre de abulón se encuentra restringida por su alta explotación estando las poblaciones naturales en riesgo de extinción es por ello que actualmente existe un gran interés por criopreservar las células gaméticas. En 2005 se reportó la criopreservación del espermatozoide del abulón rojo (Salinas-Flores et al., 2005). Sin embargo, hasta la fecha, no se encuentran reportes sobre la criopreservación de ovocitos o embriones de esta importante especie. A pesar de que en especies acuáticas se ha tenido poco éxito criopreservando ovocitos o embriones, es imperante empezar a realizar investigación en este tópico para empezar a evaluar el criodamage y poder determinar protocolos óptimos de criopreservación. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es reportar los resultados de los primeros intentos para criopreservar los ovocitos del abulón rojo *Haliotis rufescens*.

Materiales y Métodos

Obtención de organismos y gametos

Los abulones se obtuvieron de la compañía Abalones Cultivados S. de R. L. de C. V. en el ejido Eréndira, Baja California (31° 20", 116° 29") y se transportaron dentro de bolsas plásticas con oxígeno en hieleras enfriadas al Departamento de Acuicultura del CICESE para la inducción al desove. Los organismos se mantuvieron en un sistema de recirculación con un volumen de 250 L en agua de mar

for the induction to spawning. Organisms were kept in a recirculation system with a volume of 250 L of natural sea water with salinity of $\sim 35 \pm 2$ ‰ and a temperature of $\sim 15 \pm 1$ °C.

In the laboratory, mature males were identified by the yellowish color of their gonad and females by their green olive color (Fallu, 1991). Once the mature organisms were identified, three females and three males were chosen to induce them to liberation of gametes in accordance with the methodology described by Salinas-Flores *et al.*, (2005). Abalones were placed in a plastic container with 3 L of filtered sea water (FSW). Liberation of gametes was induced by adding 2 M TRIS (Sigma Co. St. Louis Missouri) and incubating organisms for 15 min. Then, 0.66 mL per liter of hydrogen peroxide at 30 % were added (Clarkson Laboratory and Supplies, Chula Vista California USA) and gametes started to be released after approximately 2 to 3 hours of adding the hydrogen peroxide. Immediately, once the liberation of gametes started, organisms were rinsed with FSW and placed in individual containers that had ~ 50 mL of FSW for them to finish the liberation of gametes. Once the liberation of gametes finished, they were collected in tubes of 50 mL and kept in a refrigerator to ~ 5 °C until their utilization.

Cryopreservation of oocytes of red abalone

Oocytes were placed on a sieve of 70- μ m mesh screen and rinsed again with FSW and back to collect in sea water for their count. Oocytes were adjusted at a 2×10^6 cell/mL before being used in the different treatments.

Experiment 1: Cytotoxic effect of cryoprotectants. Trehalose (Sigma Co. St. Louis Missouri) was selected as non-penetrating cryoprotectant at two concentrations: 0.2 y 0.4 M. The addition of cryoprotectants was made in ten steps until 1:1 dilution was obtained. Once the oocytes were suspended in the different concentrations of the cryoprotectant, they were incubated by 10, 15 or 20 min. The cytotoxic effect of cryoprotectants in oocytes was evaluated at the ending of the different timings of incubation by means of fluorescein diacetate (FDA) staining at a final concentration of 6×10^{-6} M. Stock solution of FDA contained 1 mg of FDA per mL of acetone (Boender, 1984). Oocytes were stained by 10 min at 18 °C in the dark. Once stained, they were observed in an epifluorescence microscope (Nikon® Eclipse80i® Nikon Inc., Garden City, New York) equipped with a mercury lamp and an excitation filter at

natural con una salinidad de $\sim 35 \pm 2$ ‰ y una temperatura de $\sim 15 \pm 1$ °C.

En el laboratorio, se identificaron a los machos maduros por el color amarillento de su gónada y a las hembras por el color verde olivo (Fallu, 1991). Una vez identificados los organismos maduros se escogieron tres hembras y tres machos para inducirlos a la liberación de gametos de acuerdo a la metodología descrita por Salinas-Flores *et al.*, (2005). Los abulones fueron colocados en un contenedor de plástico con 3 L de agua de mar filtrada (AMF). La liberación de gametos se indujo agregando 2 M de TRIS (Sigma Co. St. Louis Missouri) e incubando a los organismos por 15 min. Después se agregó 0.66 mL por litro de peróxido de hidrógeno al 30 % (Clarkson Laboratory and Supplies, Chula Vista California USA) y los gametos empezaron a ser liberados después de aproximadamente 2 a 3 horas de haber agregado el peróxido de hidrógeno. Inmediatamente, al empezar la liberación de gametos, los organismos fueron enjuagados con AMF y colocados en recipientes individuales que contenían ~ 50 mL de AMF para que terminaran de liberar los gametos. Una vez terminada la liberación de gametos, éstos fueron recolectados en tubos de 50 mL y mantenidos en un refrigerador a ~ 5 °C hasta su utilización.

Criopreservación de ovocitos de abulón rojo

Los ovocitos fueron colocados en un tamiz de 70 μ m de luz de malla y enjuagados nuevamente con AMF y vueltos a recolectar en agua de mar para su conteo. Los ovocitos fueron ajustados a 2×10^6 células/mL antes de ser utilizados en los diferentes tratamientos.

Experimento 1: Efecto citotóxico de los crioprotectores. Se seleccionó trehalosa (Sigma Co. St. Louis Missouri) como crioprotector no penetrante a dos concentraciones: 0.2 y 0.4 M. La adición del crioprotector se realizó en diez pasos hasta obtener una dilución 1:1. Una vez que los ovocitos fueron suspendidos en las diferentes concentraciones del crioprotector, éstos se incubaron por 10, 15 ó 20 min. El efecto citotóxico de los crioprotectores en los ovocitos fue evaluado al terminar los diferentes tiempos de incubación mediante la tinción de diacetato de fluoresceína (FDA, por sus siglas en inglés) a una concentración final del 6×10^{-6} M. La solución madre de FDA contenía 1 mg de FDA por mL de acetona (Boender, 1984). Los ovocitos fueron teñidos por 10 min a 18 °C en oscuridad. Una vez teñidos los ovocitos, se observaron en un microscopio de epi-fluorescencia (Nikon® Eclipse80i® Nikon Inc., Garden City, New York) equipado con una lámpara de mercurio y un filtro de excitación a los 450 nm para la fluorescencia verde. Las imágenes de los ovocitos fueron capturadas con

450 nm for green fluorescence. Images of oocytes were captures with a digital camera (Evolution® VF, Media Cybernetics) mounted in the microscope and assisted by the analysis package of images Image Pro® Plus V 5.1 (Media Cybernetics®) for Windows®. The capture of images was made at 200 ms (milliseconds) in all cases and the intensity of the fluorescence and changes in the size of the oocyte were used as parameters to determine viability of them. Counts of 50 cells per triplicate per organism were made. Treatments that kept fluorescence were considered as treatments that did not have any cytotoxic effect to oocytes. Oocytes kept in FSW in the same conditions as the experiment were used as control.

Experiment 2: Freezing of oocytes of red abalone. According to the results of cytotoxicity, the best cryoprotectant was chosen in order to freeze samples of oocytes. Oocytes were suspended in trehalose 0.4 M and incubated for 20 min according to the procedure described in the experiment 1, before being freezed in Pasteur pipettes of 0.5 mL. Final concentration of oocytes was of ~500,000 cells per pipette. Cryopreservation was made in a programmable freezer (PLANER plc®Kryo 560-16, UK) according to the methodology described by Borini *et al.*, (2006), modified in the starting temperature and nucleation method. Starting freezing temperature was of 15 °C and in the first step temperature was lowed at a rate of 2 °C/min until it reached -8 °C. In this temperature, automatic nucleation was induced during 10 min. In the second step, temperature diminished at a rate of 0.3 °C/min until it reached the -30 °C. The final step was made at a congelation rate of 50 °C/min until it reached -150 °C. Finally, samples were placed in liquid nitrogen tanks until their posterior thawing. Five methods of thawing were used in order to determine the optimum procedure. The first consisted in keeping samples during 30 s at room temperature and then placed them in a water bath at 30 °C for 40 s. (Borini *et al.*, 2006). In the second method pipettes were submerged at 30 °C for 40 s. In the third, pipettes were submerged at 50 °C for 13 s; in the fourth at 60 °C for 10 s and in the fifth, at 70 °C for 13 and 9 s. After thawing, cells were observed in the microscope to determine the cryodamage caused by freezing, which consisted in observing physical changes of the cell such as disruption of the plasmatic membrane, shrinking or stretch of the cell.

Data analysis. A two way analysis of variance was performed in to determine the effect of concentrations of

una cámara digital (Evolution® VF, Media Cybernetics) montada en el microscopio y asistida por la paquetería de análisis de imágenes, Image Pro® Plus V 5.1 (Media Cybernetics®) para Windows®. La captura de las imágenes se realizó a 200 ms (milisegundos) en todos los casos y la intensidad de la fluorescencia y los cambios en el tamaño del ovocito fueron utilizados como parámetros para determinar la viabilidad de los mismos. Se realizaron conteos de 50 células por triplicado por organismo. Los tratamientos que mantuvieron la fluorescencia, fueron considerados como los tratamientos que no ejercieron un efecto citotóxico a los ovocitos. Los ovocitos mantenidos en AMF en las mismas condiciones que el experimento fueron utilizados como control.

Experimento 2: Congelación de ovocitos de abulón rojo. De acuerdo a los resultados de citotoxicidad, se escogió el mejor crioprotector para congelar las muestras de ovocitos. Los ovocitos fueron suspendidos en trehalosa 0.4 M e incubados por 20 min de acuerdo al procedimiento descrito en experimento 1, antes de ser aspirados en pipetas Pasteur de 0.5 mL. La concentración final de ovocitos fue de ~500,000 células por pipeta. La criopreservación se realizó en un congelador programable (PLANER plc®Kryo 560-16, UK) de acuerdo a la metodología descrita por Borini *et al.*, (2006), modificada en la temperatura de inicio y el método de nucleación. La temperatura de criopreservación inicial fue de 15 °C y en el primer paso la temperatura se bajó a una tasa de 2 °C/min hasta alcanzar -8 °C. En esta temperatura se indujo la nucleación automática durante 10 min. En el segundo paso la temperatura se disminuyó a una tasa de 0.3°C/min hasta alcanzar los -30 °C. El último paso se realizó con una tasa de congelación de 50 °C/min hasta llegar a los -150 °C. Finalmente, las muestras se colocaron en tanques de nitrógeno líquido hasta su posterior descongelación. Cinco métodos de descongelación fueron utilizados para determinar el procedimiento óptimo. El primero consistió en mantener a las muestras durante 30 s a temperatura ambiente y luego colocarlas en un baño de agua a 30 °C por 40 s (Borini *et al.*, 2006). En el segundo método las pipetas se sumergieron en un baño de agua a 30 °C por 40 s. En el tercero las pipetas se sumergieron a 50 °C por 13 s; en el cuarto a 60 °C por 10 s y en el quinto a 70 °C durante 13 y 9 s. Después de la descongelación, las células se observaron al microscopio para determinar el criodaño causado por la congelación, el cual consistía en observar cambios físicos de la célula tales como disrupción de la membrana plasmática, encogimiento o alargamiento de la célula.

Análisis de los datos. Se realizó un análisis de varianza de dos vías para determinar el efecto de las concentraciones de la trehalosa (0.2 y 0.4 M) y los tiempos de incubación (10, 15 y 20

the trehalose (0.2 and 0.4 M) and the timings of incubation (10, 15 and 20 min). For the cryopreservation, a one way analysis of variance was performed to determine the effect of thawing rate in the viability of oocytes. A test of Tukey was used *a posteriori* to identify differences in among groups. A $p < 0.05$ was chosen as significance level. Tests were performed with the statistical software SAS for Windows (SAS Institute, Cary, North Carolina). Before the analysis, all percent data were arcsine square-root transformed.

Results and Discussion

Significant differences were found between cryoprotectant concentrations and incubation times ($p < 0.01$). In control samples, $99 \pm 1\%$ of the oocytes was kept viable during the course of the assays. The best treatments were for oocytes incubated in 0.2 M Trehalose for 20 min. ($96 \pm 1\%$ de viabilidad) and for oocytes incubated in 0.4 M Trehalose for 10 min. ($98 \pm 1\%$ de viabilidad). Nevertheless, there were not significant differences in the incubation time with 0.4 M trehalose (Figure 1). In cryopreservation there were no significant differences found in any of the treatments, ($p > 0.05$). In all the thawing treatments cells were found damaged (Figure 2).

Para la criopreservación se realizó un análisis de una vía para determinar el efecto de la tasa de descongelación en la viabilidad de los ovocitos. Una prueba *a posteriori* de Tukey fue utilizada para identificar diferencias entre grupos. Una $p < 0.05$ fue escogida como nivel de significancia. Las pruebas fueron realizadas con el paquete estadístico de SAS para Windows o (SAS Institute, Cary, North Carolina). Antes del análisis todos los datos porcentuales fueron transformados con la fórmula de arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción.

Resultados y Discusión

Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones del crioprotector y los tiempos de incubación ($p < 0.01$). En muestras control el $99 \pm 1\%$ de los ovocitos se mantuvo viable en el transcurso de los ensayos. Los mejores tratamientos fueron para los ovocitos incubados por 20 min. en 0.2 M de trehalosa ($96 \pm 1\%$ de viabilidad) y para los ovocitos incubados por 10 min en 0.4 M de trehalosa ($98 \pm 1\%$ de viabilidad). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el tiempo de incubación con 0.4 M Trehalosa (Figura 1). En la criopreservación no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$). En todos los tratamientos de descongelación las células se encontraron dañadas (Figura 2).

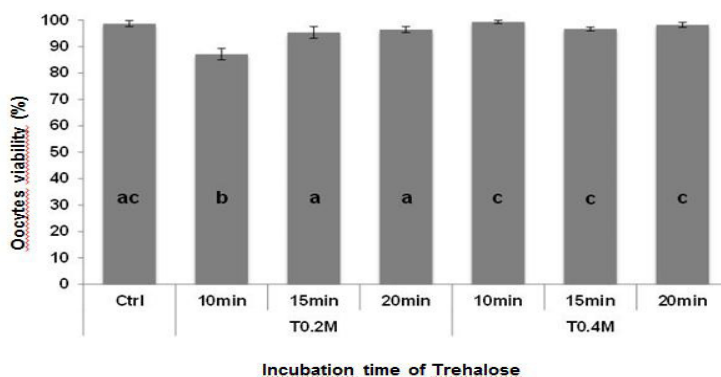


Figure 1. Percentage of viability of red abalone oocytes *Haliotis rufescens*, after being incubated for 10, 15 or 20 min in Trehalose 0.2 and 0.4 M. T, trehalose; Ctrl, control. Letters in each bar indicate significant differences between the treatments.

Figura 1. Porcentaje de viabilidad de ovocitos del abulón rojo, *Haliotis rufescens*, después de haber sido incubados por 10, 15 o 20 min en Trehalosa 0.2 y 0.4 M. T, trehalosa; Ctrl, control. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos.

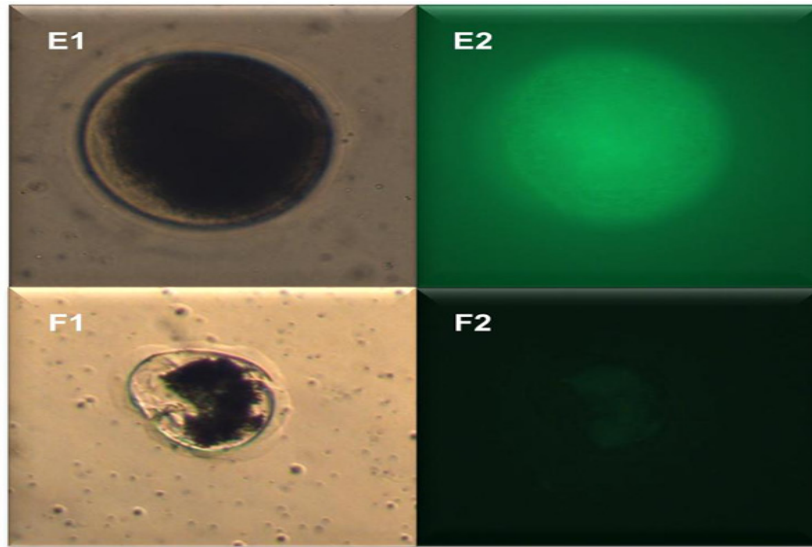


Figure 2. Thawed abalone oocytes. E1, oocyte with cytoplasmic membrane intact but with malformation of cytoplasm. E2, same oocyte (E1) stained with FDA showing no viability due to the loss of fluorescence especially in the left part of the oocyte where malformation or loss of cytoplasm in E1 can be observed; F1 completely damaged oocyte; F2 same oocyte F1 stained with FDA showing no viability with null fluorescence

Figura 2. Ovocitos de abulón descongelados. E1, ovocito con membrana citoplasmática intacta pero con malformación del citoplasma; E2, El mismo ovocito (E1) teñido con FDA mostrando no viabilidad debido a la pérdida de fluorescencia sobre todo en la parte izquierda del ovocito donde se observa la malformación o pérdida del citoplasma en E1; F1 ovocito dañado totalmente; F2 el mismo ovocito de F1 teñido con FDA mostrando no viabilidad con fluorescencia nula.

One of the main challenges in cryopreservation of oocytes in aquatic species is the ability of dehydrating the cell, whether it is using a cryoprotectant that penetrates the plasmatic membrane of the oocyte such as DMSO or alcohols such as methanol or glycerol or by increasing the osmotic pressure of the solution where oocytes are found with sugars such as glucose and thalose so that water can displace from the cell. According to investigations made in oocytes and embryos of fishes, it has been found that one of the main barriers that impede their cryopreservation is the chorion, due to few or null permeability of this structure to cryoprotectants (Hagedorn and Kleinhans, 2011). Abalone oocytes are covered with a rigid glycoprotein vitelline envelope of approximately 1 μm of thickness (Vacquier *et al.*, 1990), which according to research for oocytes of small abalone *Haliotis diversicolor diversicolor*, it has been proven that the DMSO can penetrate, although very slowly, but other cryoprotectants such as glycerol cannot penetrate it (Lin *et al.*, 1992;

Uno de los principales retos en la criopreservación de ovocitos de especies acuáticas es el poder deshidratar la célula, ya sea utilizando un crioprotector que penetre la membrana plasmática del ovocito tal como el DMSO o alcoholes como el metanol o glicerol o incrementando la presión osmótica de la solución donde se encuentran los ovocitos con azúcares tales como glucosa o trehalosa para que el agua pueda desplazarse fuera de la célula. De acuerdo a las investigaciones realizadas en ovocitos y embriones de peces se ha encontrado que una de las principales barreras que impiden su criopreservación es el corion, debido a la poca o nula permeabilidad de esta estructura a los crioprotectores (Hagedorn y Kleinhans, 2011). Los ovocitos de abulón se encuentran envueltos en una capa vitelina glicoproteica rígida de aproximadamente 1 μm de espesor (Vacquier *et al.*, 1990) que de acuerdo a investigaciones realizadas para ovocitos del abulón pequeño *Haliotis diversicolor diversicolor* se ha demostrado que el DMSO puede penetrar, aunque muy lentamente, pero otros crioprotectores tales como el glicerol no lo pueden hacer (Lin

Lin and Chao, 2011). In our research, we decided to use a non-penetrative cryoprotectant since in preliminary experiments using DMSO or glycerol, results were not successful. The objective was to use trehalose to dehydrate oocytes. One of the forms to observe if dehydration is working, is by measuring turgidity of the cell and the changes in the size of the cell, or by checking the osmotic behavior in equilibrium. Reports for small abalone indicate that osmotic behavior in equilibrium is much higher than the one calculated for mammals and plants (Lin and Chao, 2011).

In our research we used FDA and observations in the microscope to detect some change in the cell that would indicate its dehydration. According to the results found in the cytotoxicity experiment, significant differences were found in the treatments. Nevertheless, viability percentages were higher to 90 % in most of the cases, which can be considered as very similar percentages to those found in viabilities of oocytes that did not have any treatment. In addition, no changes in turgidity of oocytes compared to the control that indicated they were dehydrated. This helps us conclude that oocytes were not dehydrated and that trehalose concentrations used in this experiment were not effective to cryopreserve or to cause a toxic effect in the cells.

Thus, by not accomplishing dehydration in abalone oocytes, they kept water inside the cell. Therefore cells that kept a great amount of water within and are frozen with such a slow freezing rate as the one used in this work, allow formation of a great amount of intracellular ice that destroyed oocytes. Hence, we can conclude that to reach cryopreservation of red abalone oocytes, it is necessary first, to find a method to dehydrate the cells or make cryoprotectants penetrate in them. In this case, studies in the physical-chemical and biochemical area of vitelline envelope interaction of the abalone oocyte and the cryoprotectants would be of great importance to find the best method for penetration of cryoprotectants.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by SEP-CONACyT 2007 grant number CB-2007-01BC, Project No. 083764. We thank Abulones cultivados S.A. de C.V. for providing organisms for the realization of this project and CONACyT for providing a postgraduate scholarship to the first author.

et al., 1992; Lin y Chao, 2011). En nuestro estudio se decidió utilizar un crioprotector no penetrante debido a que en experimentos preliminares utilizando DMSO o glicerol no se tuvieron resultados exitosos. El objetivo era utilizar trehalosa para deshidratar los ovocitos. Uno de las formas de observar si la deshidratación está funcionando es el medir turgencia de la célula y los cambios en el tamaño de la célula o revisando el comportamiento osmótico en equilibrio. Reportes para el abulón pequeño indican que el comportamiento osmótico en equilibrio es mucho mayor que el calculado para mamíferos y plantas (Lin y Chao, 2011).

En nuestro estudio utilizamos FDA y observaciones al microscopio para detectar algún cambio en la célula que nos indicara su deshidratación. De acuerdo a los resultados encontrados en el experimento de citotoxicidad se tuvieron diferencias significativas en los tratamientos. Sin embargo, los porcentajes de viabilidad fueron mayores al 90% en la mayoría de los casos, los cuales se pueden considerar porcentajes muy parecidos a los encontrados en viabilidades de ovocitos sin haber tenido ningún tratamiento. Igualmente, no se observaron cambios en la turgencia de los ovocitos comparados con el control que indicaran que estaban deshidratados. Esto nos lleva a concluir que los ovocitos no fueron deshidratados y que las concentraciones de trehalosa utilizadas en este experimento no fueron efectivas a tal grado que no causaron ningún efecto tóxico a las células.

De esta manera, al no conseguir una deshidratación de los ovocitos de abulón, estos mantuvieron toda el agua dentro de la célula. Las células que mantienen una gran cantidad de agua dentro de ellas y son congeladas con una tasa de congelación tan lenta como la utilizada en este trabajo permite la formación de una gran cantidad de hielo intracelular que destruyeron a los ovocitos. Por lo tanto, podemos concluir que para poder llegar a criopreservar los ovocitos de abulón rojo es necesario, primeramente, encontrar un método para poder deshidratar a las células o hacer que los crioprotectantes penetren en ellas. En este caso, estudios en el área de la físico-química y bioquímica de la interacción de la capa vitelina del ovocito del abulón y los crioprotectores serían de gran importancia para encontrar el mejor método para la penetración de los crioprotectores.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con fondos de la convocatoria de investigación ciencia básica SEP-CONACyT 2007 Convocatoria CB-2007-01BC, Proyecto No. 083764. Agradecemos a Abulones cultivados S.A. de C.V. por proporcionar los organismos para la realización de este proyecto y a CONACyT por proporcionar una beca de maestría al primer autor.

References

- Adams, S.L., Kleinhans, F.W., Hessian, P.A. and Mladenov, P.V. 2003. Membrane permeability characteristics of eggs from the sea urchin, *Evechinus chloroticus*, *Cryobiology* 47: 1-13.
- Adams, S.L., Tervit, H.R., McGowan, L.T., Smith, J.F., Roberts, R.D., Salinas-Flores, L. et al. 2009. Toward cryopreservation of greenshell mussel (*Perna canaliculus*) oocytes. *Cryobiology* 58: 69-74.
- Bianchi, V., Coticchio, G., Fava, L., Flamigni, C. and Borini, A. 2005. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Human Reproduction* 20(4): 1078-1083.
- Bilio, M. 2007. Controlled reproduction and domestication in aquaculture – the current state of the art. Part I. *Aquaculture Europe* 32(1): 5-14.
- Boender, J. 1984. Fluorescein diacetate, a fluorescent dye compound stains for rapid evaluation of the viability of mammalian oocytes prior to *in vitro* studies. *The Veterinary Quarterly* 6(4): 236-240.
- Borini, A., Sciajino, R., Bianchi, V., Serini, E., Flamigni, C. and Coticchio, G. 2006. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Human Reproduction* 21(2): 512-517.
- Fabri, R., Porcu, E., Marsella, T., Rocchetta, G., Venturoli, S. and Flamigni, C. 2001. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human Reproduction* 16(3): 411-416.
- Fallu, R. Abalones. En: *Abalone Farming*. Fishing News Books, Oxford, United Kingdom: Blackwell Scientific Publications 1991; 1-5 pp.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 2014; 223 pp.
- Guan, M., Rawson, D.M. and Zhang, T. 2008. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology* 56: 204-208.
- Hagedorn, M. and Kleinhans, F.W. 2011. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In *Cryopreservation in aquatic species*, 2da. Edition. Tiersch TR and Green CC, Eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge Louisiana 483-502 pp.
- Hamaratoğlu, F., Eroğlu, A., Toner, M. and Sadler, K.C. 2005. Cryopreservation of starfish oocytes. *Cryobiology* 50: 38-47.
- Hanquet-Dufour, A.C., Kellner, K., Heude, C., Naimi, A., Mathieu, M. and Poncet, J.M. 2006. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: Viability and metabolic activity. *Cryobiology* 53: 28-36.
- Lin, T.T. and Chao, N.H. 2011. Cryopreservation of eggs and embryos of shellfish. In *Cryopreservation in aquatic species*, 2da. Edition. T. R. Tiersch and C.C. Green, editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge Louisiana 604-615 pp.
- Lin, T.T., Chen, F.L. and Chao, N.H. 1992. Osmometric characteristics of small abalone eggs. *Cryobiology* 29: 761.
- Salinas-Flores, L., Paniagua-Chavez, C.G., Jenkins, J. and Tiersch, T.R. 2005. Cryopreservation of sperm of red abalone *Haliotis rufescens*. *Shellfish Research* 24: 415-420.
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M.R. and Altamira, B. 2010. Current status of abalone fisheries and culture in México. *Journal of Shellfish Research* 29(3): 573-576.
- Tervit, H.R., Adams, S.L., Roberts, R.D., McGowan, L.T., Pugh, P.A., Smith, J.F. et al. 2005. Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Cryobiology* 51(2): 142-151.
- Tsai, S., Rawson, D.M. and Zhang, T. 2009. Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology* 58(3): 279-286.
- Vacquier, V.D., Karner, C.R. and Stout, D. 1990. Species specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proceeding of the National Academic of Science* 87: 5792-5796.
- Watson, P.F. and Fuller, B.J. 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos, En: *Cryobanking the genetic resources, wildlife conservation for the future?*. Watson PF and Holt WV, Eds. TAYLOR and FRANCIS, Nueva York, 21–43 pp.
- Zhang, T., Isayeva, A., Adams, S.L., Rawson, D.M. 2005. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* 50(3): 285-293.

Cite this paper/Como citar este artículo: Ramírez Torrez, A., Paniagua Chávez, C., Portillo López, A. (2015). First attempts to cryopreserve red abalone (*Haliotis rufescens*) oocytes. *Revista Bio Ciencias* 3(2): 79-87. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/168/148>

