

# Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación

J. Cerdà

Centro de Acuicultura-IRTA. Ctra. Poble Nou, km 6. E-43540 San Carles de la Ràpita (Tarragona), España. Correo electrónico: joan.cerda@irta.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

El futuro desarrollo del cultivo de peces marinos requiere la disponibilidad de líneas domesticadas con un óptimo crecimiento y eficiencia reproductora. No obstante, los programas de selección genética necesitan de eficaces métodos de criopreservación, tanto de gametos como de embriones, lo que permite el establecimiento de bancos genéticos completos y la correcta distribución de los individuos seleccionados dentro de la industria. Hasta la fecha, tanto los métodos de congelación controlada como de vitrificación de embriones de peces han dado como resultado tasas muy bajas de supervivencia, debido principalmente a su baja permeabilidad a las sustancias crioprotectoras y a su elevado contenido en agua (hidratación). En esta breve revisión se resumirá el conocimiento actual sobre los mecanismos biológicos implicados durante la hidratación de los huevos (y embriones) de peces, aspecto de enorme trascendencia para su criopreservación. Algunos de los recientes hallazgos en este campo pueden suponer el punto de partida para el desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas dirigidas a la criopreservación de gametos femeninos y embriones de peces de interés acuícola.

**Palabras clave:** Teleósteos, oocito, maduración meiótica, hidratación, embrión, criopreservación, vitrificación.

## ABSTRACT

*Physiological mechanisms during egg hydration in teleosts: Towards the development of new cryopreservation methods*

*The development of marine fish farming requires the availability of domesticated fish strains presenting optimum growth and reproduction levels. Moreover, breeding programs, need efficient cryopreservation methods for both gametes and embryos, making it possible to establish comprehensive genetic banks distributing selected individuals within the aquaculture industry. However, both controlled freezing and vitrification techniques have resulted in very low survival rates for fish embryos, mainly due to the embryo's low permeability to cryoprotectants and their remarkable water content (hydration). In this short review, we summarise current knowledge of the biological mechanisms leading to the hydration of fish eggs. Some of the recent findings in this field may be the starting point for biotechnological strategies directed towards the development of new cryopreservation methods for female gametes and embryos from aquacultural fish species.*

**Keywords:** Teleost, oocyte, meiotic maturation, hydration, embryo, cryopreservation, vitrification.

## INTRODUCCIÓN

La investigación sobre la biología de la reproducción de teleósteos marinos de interés para la acuicultura se ha dirigido en los últimos años hacia la optimización de métodos de control de la reproducción en cautividad y del cultivo larvario. Los resultados de esta investigación han conducido a importantes avances en la industria piscícola como, por ejemplo, el desarrollo de tecnologías para la inducción de la puesta fuera de la época natural de reproducción (Zohar y Mylonas, 2001). No obstante, para el futuro desarrollo de la piscicultura marina todavía es necesario la optimización, así como la adecuación para cada especie en particular, de aspectos esenciales para la rentabilidad de los cultivos, como el control de la ovulación y la calidad de los gametos, la nutrición de larvas y alevines o la disponibilidad de líneas o razas «domesticadas».

Recientemente, en la industria de producción de la dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, la lubina *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) o el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) se ha manifestado la necesidad de iniciar programas de selección genética con el fin de obtener poblaciones mejor adaptadas a las condiciones de cultivo, con un óptimo crecimiento y eficiencia reproductora. Para la obtención de líneas mejoradas de peces, no obstante, deben aplicarse métodos que aseguren la permanencia de los caracteres seleccionados, tanto maternos como paternos, a lo largo de las sucesivas generaciones. En acuicultura estos métodos resultan especialmente costosos, ya que aunque se dispone de métodos para la criopreservación de esperma, la tecnología para la eficaz criopreservación de gametos femeninos y embriones de peces no ha sido todavía establecida. Esta situación encarece en gran medida cualquier programa de selección genética sobre peces, ya que la imposibilidad de preservar especímenes biológicos a largo plazo obliga al mantenimiento de grandes instalaciones para inducir los cruzamientos deseados, así como para conservar las familias y poblaciones seleccionadas. Asimismo, la carencia de estas técnicas de criopreservación imposibilita la creación de bancos genéticos completos de las líneas seleccionadas, produce una dependencia de las condiciones ambientales para inducir la puesta de los reproductores, y dificulta el transporte de embriones entre los centros de producción.

Hasta la fecha han fracasado numerosos intentos para conseguir la criopreservación de embriones de peces, lo que representa un importante obstáculo para la aplicación de métodos genéticos o biotecnológicos en acuicultura. En esta breve revisión, se expondrán algunos de los principales obstáculos biológicos para la criopreservación que presentan los huevos y embriones de peces marinos y, especialmente, se tratarán las causas y consecuencias de su remarcable hidratación, aspecto de enorme trascendencia para la crioconservación.

## PROBLEMÁTICA DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE GAMETOS Y EMBRIONES DE PECES

La conservación a largo plazo de gametos y embriones animales se ha realizado tradicionalmente mediante técnicas de criopreservación, las cuales se deben optimizar para cada especie y tipo de espécimen en particular, con el fin de preservar al máximo su posterior viabilidad. Estas técnicas consisten básicamente en la congelación en contacto con agentes crioprotectores, como el dimetilsulfóxido, glicerol, metanol, polietilenglicol, sucrosa, etc., bajo diferentes velocidades de congelación, lo cual reduce la formación de hielo intracelular que es el principal causante de la mortalidad celular durante la criopreservación. Los crioprotectores pueden emplearse a altas concentraciones (2-6 M o más), lo que lleva a la solidificación del líquido por una elevación extrema de su viscosidad durante una congelación rápida. Este método, conocido como vitrificación, ha sido empleado con éxito para la crioconservación de tejidos y embriones animales y vegetales (Gábor, 2000; Rall, 1993). En especies de teleósteos cultivadas, las técnicas de criopreservación de esperma han resultado eficaces en un gran número de especies, obteniéndose suficientes tasas de viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación (Suquet *et al.*, 2000). No obstante, cuando las técnicas de congelación controlada o de vitrificación han sido empleadas sobre gametos femeninos o embriones de peces, los resultados no han sido satisfactorios, ya que los especímenes que se obtienen muestran una baja fertilizabilidad y supervivencia después de la descongelación (Rall, 1993; Hagedorn *et al.*, 1998).

Los embriones de peces, a diferencia de otros embriones animales que no acumulan grandes cantidades de vitelo, representan sistemas biológicos

multicompartimentales de difícil criopreservación. La introducción de solutos en el embrión para evitar la formación de hielo intracelular es crucial para el éxito del proceso de criopreservación, y la baja permeabilidad de los embriones de peces a la mayoría de los crioprotectores es posiblemente la principal causa de los efectos letales de la vitrificación sobre estos organismos (Zhang y Dawson, 1996). En los embriones de teleósteos, además del corion exterior, se encuentran membranas celulares de variable permeabilidad a los solutos, como la membrana que rodea al vitelo separando al blastodermo (membrana vitelina) cuya baja permeabilidad parece ser el principal obstáculo para la penetración de los crioprotectores en el vitelo del embrión (Hagedorn *et al.*, 1998). Recientes estudios han identificado también que la alta sensibilidad del embrión a las bajas temperaturas puede estar relacionada en parte con la ineficacia de los métodos de criopreservación (Zhang y Dawson, 1995). No obstante, las características ultraestructurales de la membrana vitelina todavía no explican satisfactoriamente la baja incorporación de los solutos crioprotectores en el vitelo, al menos en algunas especies como el pez zebra, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (Rawson *et al.*, 2000) y, por tanto, otros aspectos como la permeabilidad de las estructuras que rodean las vesículas de vitelo o la misma composición bioquímica de éste podrían afectar, asimismo, la permeabilidad de los embriones de peces a los crioprotectores.

Los gametos femeninos y embriones pelágicos de teleósteos presentan, además, otro obstáculo, de consecuencias incluso más determinantes para su criopreservación, como es su elevado contenido en agua. Los huevos pelágicos experimentan una remarkable hidratación durante su formación, llegando a alcanzar el contenido de agua en el huevo y en los embriones tempranos hasta el 95 % de su peso. Esta característica, junto con la baja permeabilidad del embrión a los crioprotectores, convierte a estos especímenes en sistemas muy complejos para su criopreservación debido a su elevado reservorio para la formación de hielo intracelular durante la congelación. El proceso de hidratación del huevo es, pues, de enorme trascendencia para la criopreservación de embriones de especies marinas de interés en acuicultura, ya que muchas de ellas producen gametos femeninos y embriones muy hidratados. El conocimiento de los mecanismos fisiológicos que conducen a la hidratación de

los gametos femeninos en estas especies puede ser, por tanto, esencial para el diseño de métodos de vitrificación más adecuados a estas especies.

## MECANISMOS FISIOLÓGICOS DURANTE LA HIDRATACIÓN DEL HUEVO DE TELEÓSTEOS

A diferencia de otros vertebrados, el 67-75 % del volumen final del huevo de teleósteos se alcanza durante la maduración meiótica del oocito previa a la ovulación, la cual es inducida por la hormona gonadotropa luteinizante (LH) a través de la síntesis de los esteroides inductores de la maduración (MIS) por las células somáticas (foliculares) que rodean al oocito. El cambio de volumen del oocito durante la maduración puede variar desde un ligero aumento en especies de agua dulce y eurihalinas (Hirose, 1976; Iwamatsu y Katoh, 1978; Wallace y Selman, 1978, 1979; Craik y Harvey, 1984, 1986; Selman, Wallace y Qi, 1993) hasta un aumento de varias veces de magnitud en especies marinas (Oshiro e Hibiya, 1981; Wallace y Selman, 1981; Watanabe y Kuo, 1986; Craik y Harvey, 1987; Adachi *et al.*, 1988; LaFleur y Thomas, 1991; Wallace *et al.*, 1993; Cerdà, Selman y Wallace, 1996). La incorporación de agua por el oocito durante la maduración meiótica, fenómeno denominado hidratación, es la principal causa del aumento de volumen de éste. De este modo, los huevos de teleósteos pueden clasificarse en huevos demersales, con una hidratación y flotabilidad nula o muy reducida, y huevos pelágicos, con un gran contenido en agua (que puede llegar a alcanzar el 90-95 %) y una flotabilidad positiva en la columna de agua, lo que facilita tanto el aporte de oxígeno al embrión como su dispersión en el medio marino.

El modelo general actualmente aceptado para explicar la hidratación del oocito de peces, aunque con numerosos interrogantes, asume que en los huevos pelágicos la principal fuerza osmótica causante de la entrada de agua hacia el oocito es el aumento de la concentración de aminoácidos libres en éste, como consecuencia de la lisis de las proteínas del vitelo durante la maduración meiótica. Por el contrario, en los huevos demersales la presión osmótica sería producida por el incremento en la concentración de solutos inorgánicos, como iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Cl}^-$ , en el oocito (figura 1). Entre los teleósteos con producción de huevos pelágicos se encuentran muchas de las especies actualmente cultivadas,

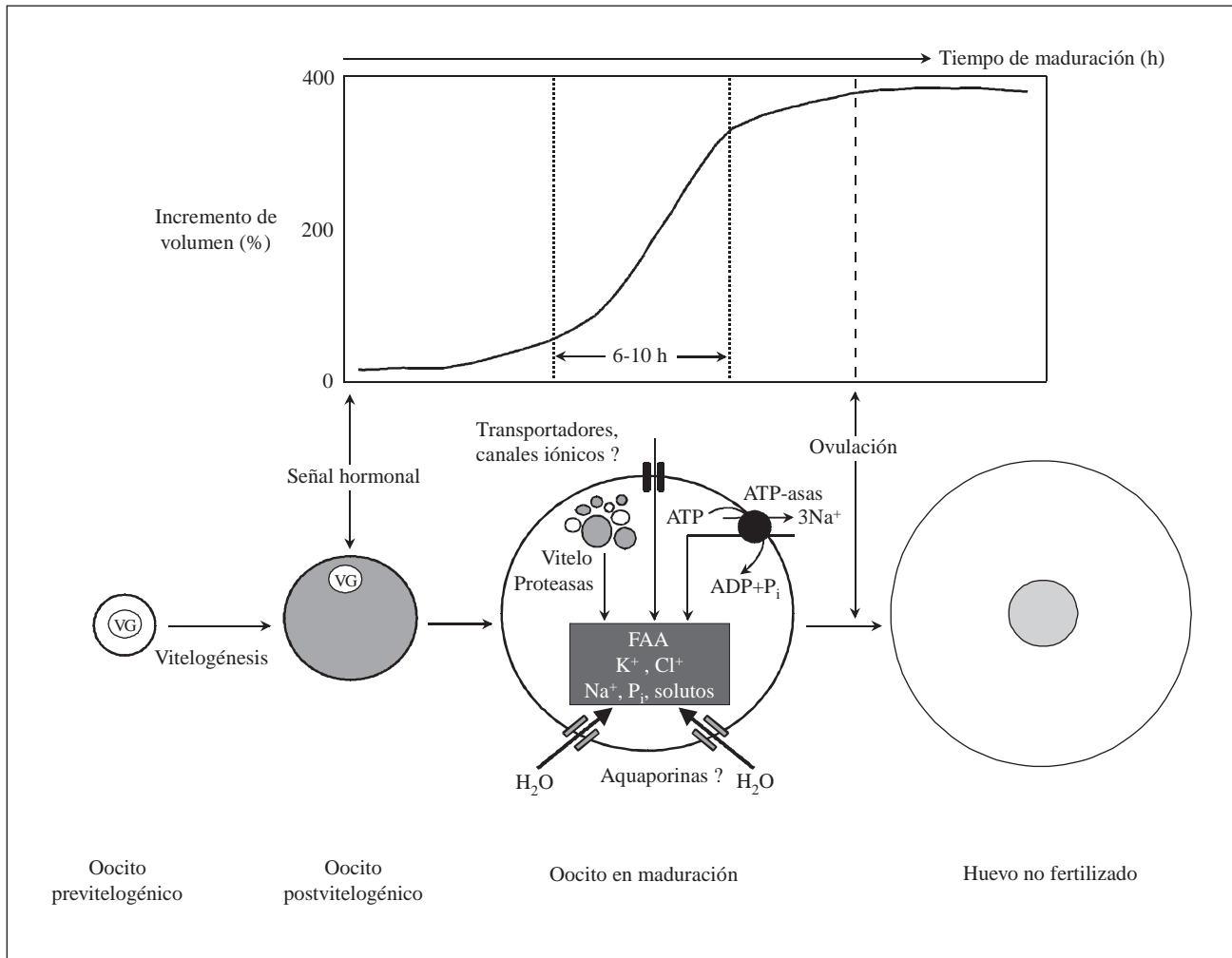


Figura 1. Diagrama de los cambios de volumen del oocito asociados a la hidratación durante la maduración meiótica en teleosteos que producen huevos pelágicos (flotantes), y principales mecanismos fisiológicos conocidos e hipotéticos implicados. (VG): vesícula germinal; (FAA): aminoácidos libres.

como la dorada o la lubina, así como otras con un gran potencial de futuro para la acuicultura mediterránea, como el dentón *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758), el pargo *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) o el lenguado *Solea solea* (Linnaeus, 1758) y *S. senegalensis* Kaup, 1858, mientras que muchos ciprinodontiformes de agua dulce o marinos, como los fundúlidos (por ejemplo, *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766)), producen huevos demersales.

El notable aumento de volumen de los huevos de teleosteos durante la oogénesis fue inicialmente observado por Fulton hace más de 100 años (Fulton, 1898), pero sus observaciones han sido prácticamente ignoradas durante mucho tiempo, lo que ha llevado actualmente a un gran desconocimiento de los mecanismos fisiológicos implicados. En 1978, Wallace y Selman descubrieron que los folículos ováricos de *F. heteroclitus* doblaban su

volumen durante la maduración meiótica y de modo independiente a la proteólisis del vitelo (Wallace y Selman, 1978; Greeley, Calder y Wallace, 1986; McPherson, Greeley y Wallace, 1989). Posteriores estudios han demostrado que la hidratación del oocito de esta especie es inducida principalmente por la acumulación de iones  $K^+$  en el oocito (Greeley, Hols y Wallace, 1991; Wallace, Greeley y McPherson, 1992), el cual es traslocado desde las células foliculares a través de estructuras celulares de comunicación química llamadas uniones íntimas o *gap junctions* (Wallace, Greeley y McPherson, 1992; Cerdà, Petrino y Wallace, 1993). En *F. heteroclitus*, no obstante, el supuesto mecanismo que conduciría al aumento de la concentración de iones  $K^+$  en el exterior del oocito, necesario para establecer un gradiente de concentración, no ha sido todavía descubierto. Sin embargo, puede con-

siderarse que la proteólisis de las proteínas del vitelo que acompaña la maduración del oocito (la cual, muy probablemente, afecta las propiedades de los péptidos para formar complejos con iones) podría inducir la entrada pasiva de iones  $K^+$  hacia el oocito. Esta hipótesis, aunque no ha sido demostrada todavía, puede estar apoyada por la observación de que en esta especie la estimulación hormonal de la maduración meiótica acelera la lisis del vitelo (McPherson, Greeley y Wallace, 1989; Cerdà y Fabra, en preparación). Finalmente, en especies de escaénidos, como *Micropogonias undulatus* (Linnaeus, 1766) y *Cynoscion nebulosus* (Cuvier, 1830), sí que han sido detectadas ATP-etasas de membrana  $Na^+$ ,  $K^+$  en el folículo ovárico, cuya actividad durante la maduración meiótica conduce al aumento de iones  $K^+$ ,  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  en el oocito induciendo su hidratación (LaFleur y Thomas, 1991). No obstante, no se conoce la localización celular en el folículo ovárico de dichas ATP-etasas.

En teleósteos, las proteínas del vitelo del oocito que suponen la fuente energética para el desarrollo del embrión son almacenadas y procesadas por el oocito a lo largo de su crecimiento a partir de la incorporación de la vitelogenina, fosfolipoproteína secretada por el hígado bajo regulación estrogénica (Wallace, 1985). Recientes estudios moleculares sugieren que tanto en peces como en otros vertebrados existen al menos dos genes distintos codificadores de vitelogenina (Lee *et al.*, 1994; LaFleur *et al.*, 1995), y estas dos proteínas son igualmente incorporadas por el oocito mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor (Wallace, 1985; Stifani *et al.*, 1990). La vitelogenina es entonces inmediatamente procesada, aparentemente por la acción de la proteasa lisosómica cathepsina D (Sire, Babin y Vernier, 1994; Brooks *et al.*, 1997; Carnevali *et al.*, 1999a, b), en dos moléculas distintas de menor peso molecular, la lipovitelina y la fosvitina, las cuales son almacenadas en el oocito en forma de vesículas de vitelo rodeadas de membrana (Wallace, 1985).

En los oocitos que han finalizado su crecimiento e inician el proceso de maduración meiótica para convertirse en huevos se detecta una importante acumulación de aminoácidos libres (Craik y Harvey, 1987; Thorsen, Fyhn y Wallace, 1993; Thorsen y Fyhn, 1996; Matsubara y Koya, 1997; Selman, Wallace y Cerdà, 2001). Este proceso es concomitante a la desaparición de ciertas proteínas del vitelo de elevado peso molecular (Greeley,

Calder y Wallace, 1986; Carnevali *et al.*, 1992, 1993; Matsubara *et al.*, 1995; Okumura *et al.*, 1995; Matsubara y Koya, 1997; Selman, Wallace y Cerdà, 2001), lo que sugiere que un segundo proceso de proteólisis en el oocito supone la fuente de aminoácidos causantes del aumento de la presión osmótica (Craik y Harvey, 1987; Thorsen y Fyhn, 1996; Matsubara y Koya, 1997; Selman, Wallace y Cerdà, 2001). Este proceso parece ocurrir tanto sobre las lipovitelininas como las fosvitinas (Matsubara *et al.*, 1999; Reith *et al.*, 2001) y, recientemente, se ha sugerido que el diferente grado de lisis de las dos lipovitelininas puede ser el factor que controle la disponibilidad de aminoácidos libres, tanto para la hidratación del oocito como para la nutrición del futuro embrión (Matsubara *et al.*, 1999). La cathepsina L, una típica cisteína proteínasa que también se encuentra en los lisosomas ovocitarios, es capaz de procesar in vitro la lipovitelina y muestra una alta actividad hacia la mitad de la vitelogénesis (Carnevali *et al.*, 1999a), por lo que se piensa que esta proteasa puede ser una de las enzimas implicadas en la proteólisis del vitelo durante la maduración del oocito. Sin embargo, los mecanismos para la activación de las cathepsinas D y L durante la vitelogénesis y la maduración meiótica, así como su relación con otras lipasas y cathepsinas (B, K, S, u otras), no son bien conocidos. Recientemente, no obstante, se ha observado que el influjo de iones  $K^+$  que ocurre en los oocitos que producirán huevos pelágicos (Milroy, 1898; Craik y Harvey, 1984; Watanabe y Kuo, 1986; LaFleur y Thomas, 1991; Thorsen y Fyhn, 1991; Selman, Wallace y Cerdà, 2001) -el cual parece promover la disolución de las estructuras del vitelo y la fusión de las vesículas del oocito- podría ser uno de los mecanismos para la activación de las cisteína proteinasas lisosómicas dependientes de pH (Selman *et al.*, 2001).

Estudios in vitro demuestran que durante la formación de los huevos, tanto pelágicos como demersales, la incorporación de agua al oocito durante la maduración meiótica se produce en un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, 6-10 h, a 20-25 °C). Durante años, este influjo de agua hacia el oocito se ha considerado como un trasiego pasivo a través de las membranas del folículo ovárico, la mayor parte de ellas de naturaleza lipídica y, por tanto, con cierta permeabilidad al agua. No obstante, el reciente descubrimiento de una nueva familia de proteínas de membrana canalizadoras de agua, llamadas aquaporinas (AQP),



existentes tanto en procariotas como en eucariotas (Nielsen y Agre, 1995), plantea la posibilidad del papel de proteínas similares durante la hidratación del oocito de peces. Las AQP son canales moleculares selectivamente permeables al agua y a otros solutos (como la urea o el glicerol), y aparecen en gran cantidad en tejidos animales que requieren un rápido y eficiente trasiego acuoso, como los túbulos proximales del riñón o varios de los tejidos ópticos (Nielsen y Agre, 1995; Borgnia *et al.*, 1999). En consecuencia, el folículo ovárico en hidratación de teleósteos pelágicos es un tejido donde cabría esperar la expresión de AQP. Esta hipótesis ha comenzado a ser comprobada mediante técnicas moleculares, y los resultados preliminares confirman la presencia de ARN mensajeros correspondientes a AQP, tanto en ovarios hidratados como en huevos no fertilizados de algunas especies pelágicas como la dorada (Fabra y Cerdà, en preparación). Las implicaciones de este hallazgo en los procesos fisiológicos conducentes a la hidratación del oocito está siendo investigada en detalle.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los mecanismos biológicos que ocurren durante el proceso de hidratación del oocito de peces sugieren que en este complejo proceso previo a la ovulación pueden intervenir distintos componentes celulares, como enzimas proteolíticas, ATP-asas, canales iónicos y de agua, etc. (figura 1), cuya actividad parece estar estrechamente regulada por la hormona gonadotropa LH y los MIS. No obstante, los mecanismos de regulación molecular ejercidos por la LH sobre los procesos intracelulares que conducen al proceso de hidratación del oocito no son bien conocidos. Por ejemplo, aunque se ha sugerido que el proceso de hidratación depende de la activación de mecanismos genómicos en el oocito por los MIS (LaFleur y Thomas, 1991), los genes que pueden ser específicamente controlados (por ejemplo, catepsinas, canales moleculares) todavía no han sido identificados. No obstante, el conocimiento en profundidad de los componentes y vías intracelulares implicados en la hidratación del oocito de peces puede ser de gran importancia para el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación de huevos y embriones, ya que su posible manipulación podría reducir la hidratación de estos especímenes o aumentar su permeabilidad a los crio-

protectores. En este sentido, el estudio del control genético y modo de acción de las AQP ováricas puede tener una gran aplicación para la criopreservación debido a la selectiva permeabilidad de algunas de estas proteínas a sustancias crioprotectoras como el glicerol. El creciente desarrollo de la genómica y proteómica aplicada al conocimiento de la acción de estos genes en peces deberá permitir, en un futuro cercano, el desarrollo de técnicas biotecnológicas en acuicultura dirigidas a la optimización de los métodos de criopreservación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, S., K. Ouchi, K. Hirose y Y. Nagahama. 1988. Induction of oocyte maturation in vitro by steroid hormones in the red sea bream *Pagrus Major*. *Nippon Suis. Gak.* 54: 165.
- Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel y P. Agre. 1999. Cellular and molecular biology of aquaporin water channels. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 425-458.
- Brooks, S., C. R. Tyler, O. Carnevali, K. Coward y J. P. Sumpter. 1997. Molecular characterization of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* 201: 45-54.
- Carnevali, O., G. Moscone, A. Roncarati, P. Belvedere, E. Limatola y A. M. Polzonetti-Magni. 1993. Yolk protein changes during oocyte growth in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *J. Appl. Ichthyol.* 9: 175-184.
- Carnevali, O., G. Moscone, A. Roncarati, P. Belvedere, M. Romano y E. Limatola. 1992. Changes in the electrophoretic pattern of yolk proteins during vitellogenesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 B: 955-962.
- Carnevali, O., R. Carletta, A. Cambi, A. Vita y N. Bromage. 1999a. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.* 60: 140-146.
- Carnevali, O., S. Centonze, S. Brooks, I. Marota y J. P. Sumpter. 1999b. Molecular cloning and expression of ovarian cathepsin D in seabream, *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.* 61: 785-791.
- Cerdà, J., K. Selman y R. A. Wallace. 1996. Observations on oocyte maturation and hydration in vitro in the black sea bass, *Centropristis striata* (Pisces: Serranidae). *Aquat. Living Resour.* 9: 325-335.
- Cerdà, J., T. R. Petrino y R. A. Wallace. 1993. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Dev. Biol.* 160: 228-235.
- Craik, J. C. A. y S. M. Harvey. 1984. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 24: 599-610.
- Craik, J. C. A. y S. M. Harvey. 1986. Phosphorus metabolism and water uptake during final maturation of ovaries of teleosts with pelagic and demersal eggs. *Mar. Biol.* 90: 285-289.

- Craik, J. C. A. y S. M. Harvey. 1987. The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. *J. Mar. Biol. Assoc. (UK)* 67: 169-82.
- Fulton, T. W. 1898. On the growth and maturation of the ovarian eggs of teleostean fishes. *Fish Board Scotland 16th Ann. Rep.* Part 3: 83-134.
- Gábor, V. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 357-364.
- Greeley, M. S., Jr., D. R. Calder y R. A. Wallace. 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Comp. Biochem. Physiol* 84 B: 1-9.
- Greeley, M. S., Jr., H. Hols y R. A. Wallace. 1991. Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 A: 639-647.
- Hagedorn, M., F. W. Kleinhans, D. Artemov y U. Pilatus. 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biol. Reprod.* 59: 1240-1250.
- Hirose, K. 1976. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 989-994.
- Iwamatsu, T. y T. Katoh. 1978. Maturation in vitro of oocytes of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, by steroid hormones and gonadotropins. *Ann. Zool. Japan* 51: 79-89.
- LaFleur, G. J., Jr., B. M. Byrne, C. Haux, R. M. Greenberg y R. A. Wallace. 1995. Liver-derived cDNAs: vitellogenin and vitelline envelope protein precursors (choriogenins). En: *Proceedings of the 5th International Symposium of Reproductive Physiology of Fish* (2-8 de julio, 1995. Austin, Texas, EE UU). F. W. Goetz y P. Thomas (eds.): 336-338. University of Texas. Austin (Texas), EE UU.
- LaFleur, G. J., Jr. y P. Thomas. 1991. Evidence for a role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the hydration of atlantic croaker and spotted sea trout oocytes during final maturation. *J. Exp. Zool.* 258: 126-136.
- Lee, B. H., E. H. Lim, T. J. Lam y J. L. Ding. 1994. Two major groups of vitellogenin cDNA clones from *Oreochromis aureus* (Steindacher). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 75-83.
- McPherson, R., M. S. Greeley, Jr. y R. A. Wallace. 1989. The influence of yolk protein proteolysis on hydration in the oocytes of *Fundulus heteroclitus*. *Develop. Growth & Differ.* 31: 475-483.
- Matsubara, T. y Y. Koya. 1997. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk protein during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.* 278: 189-200.
- Matsubara, T., N. Ohkubo, T. Andoh, C. V. Sullivan y A. Hara. 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* 213: 18-32.
- Matsubara, T., S. Adachi, S. Iijiri y K. Yamauchi. 1995. Change of lipovitellin during in vitro oocyte maturation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 61: 478-481.
- Milroy, T. H. 1898. The physical and chemical changes taking place in the ova of certain marine teleosteans during maturation. *Fish Board Scotland 16th Ann. Rep.* Part 3: 135-152.
- Nielsen, S. y P. Agre. 1995. The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int.* 48: 1057-1068.
- Okumura, H., T. Kabaya, Y. Kazeto, A. Hara, S. Adachi y K. Yamauchi. 1995. Changes in the electrophoretic patterns of lipovitellin during oocyte development in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 61: 529-530.
- Oshiro, T. y T. Hibiya. 1981. Water absorption of oocytes in the plaice *Limanda yokohamae* during meiotic maturation and its role in rupturing follicles. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 47: 835-841.
- Rall, W. F. 1993. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for application to the conservation of salmonid fishes. En: *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. J. G. Gloud y G. H. Thorgaard (eds.): 137-158. Plenum Press. Nueva York.
- Rawson, D. M., T. Zhang, D. Kalicharan y W. L. Jongebloed. 2000. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Res.* 31: 325-336.
- Reith, M., J. Munhokkand, J. Kelly, R. N. Finn y H. J. Fyhn. 2001. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.* 291: 58-67.
- Selman, K., R. A. Wallace y J. Cerdà. 2001. Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly and meiosis during maturation of sea bass oocytes. *J. Exp. Zool.* 290: 265-278.
- Selman, K., R. A. Wallace y X. Qi. 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.* 218: 203-224.
- Sire, M. F., P. J. Babin y J. M. Vernier. 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. *J. Exp. Zool.* 269: 69-83.
- Stifani, S., F. Le Menn, J. N. Rodriguez, W. J. Schneider. 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim. Biophys. Acta* 1045: 271-279.
- Suquet, M., C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson y R. Billard. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Res.* 31: 231-243.
- Thorsen, A., H. J. Fyhn y R. A. Wallace. 1993. Free amino acids as osmotic effectors for oocyte hydration in marine fishes. En: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. B. T. Walther y H. J. Fyhn (eds.): 94-98. University of Bergen. Oslo.
- Thorsen, A. y H. J. Fyhn. 1991. Osmotic effectors during preovulatory swelling of marine fish eggs. En: *Proceedings of the 4th International Symposium Reproductive Physiology of Fish «FishSymp'91»* (7-12 de julio, 1991. Norwich, Reino Unido). A. P. Scott *et al.* (eds.): 312-314. University of Sheffield. Sheffield, Reino Unido.
- Thorsen, A. y H. J. Fyhn. 1996. Final oocyte maturation in vivo and in vitro in marine fishes with pelagic eggs: yolk protein hydrolysis and free amino acid content. *J. Fish Biol.* 48: 1195-1209.

- Wallace, R. A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. En: *Developmental Biology*. L. W. Browder (ed.): 127-177. Plenum. Nueva York.
- Wallace, R. A. y K. Selman. 1978. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* I. Preliminary observations on oocyte maturation in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 62: 354-369.
- Wallace, R. A. y K. Selman. 1979. Physiological aspects of oogenesis in two species of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* L., and *Apeltes quadracus* (Mitchell). *J. Fish Biol.* 14: 551-564.
- Wallace, R. A. y K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21: 325-343.
- Wallace, R. A., M. S. Greeley y R. McPherson. 1992. Analytical and experimental studies on the relationships between  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and water uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro. *J. Comp. Physiol.* 162: 241-248.
- Wallace, R. A., S. M. Boyle, H. J. Grier, K. Selman y T. R. Petrino. 1993. Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in captive female snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture* 116: 257-273.
- Watanabe, W. O. y C. M. Kuo. 1986. Water and ion balance in hydrating oocytes of the grey mullet, *Mugil cephalus* (L.), during hormone-induced final maturation. *J. Fish Biol.* 28: 425-437.
- Zhang, T. T. y D. M. Dawson. 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 32: 239-246.
- Zhang, T. T. y D. M. Dawson. 1996. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 33: 1-13.
- Zohar, Y. y C. C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.