



## **INFORME FINAL**

### **PROTOCOLO PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN DE DORADA *Brycon moorei***

**VÍCTOR JULIO ATENCIO GARCÍA, U. de Córdoba, Cinpic, líder proyecto**  
**MARTHA PRIETO GUEVARA, U. de Córdoba, Cinpic**  
**JOSE ALONSO ESPINOSA, U. de Córdoba, Cinpic**  
**VICENTE PERTUZ BUELVAS, U de Córdoba, Cinpic**  
**CÉSAR DAVID MONTES PETRO; U de Córdoba, Cinpic**  
**MARIA DEL PILAR DORADO, AUNAP, EPR**  
**EMILIO NAVARRO, AUNAP, EPR**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PISCÍCOLAS, CINPIC**  
**MONTERÍA**  
**2015**

## CONTENIDO

|  | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN  | 4    |
| 1 INTRODUCCIÓN   | 5    |
| 2 OBJETIVOS  | 8    |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL   | 8    |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS  | 8    |
| 3 REVISIÓN DE LITERATURA   | 9    |
| 3.1 APLICACIONES DE LA CRIOCONSERVACIÓN EN LA ACUICULTURA              | 9    |
| 3.2 ESPERMATOZOIDE DE LOS PECES  | 9    |
| 3.3 EFECTO DEL DILUYENTE Y DEL CRIOPROTECTOR SOBRE EL AMBIENTE CELULAR | 10   |
| 3.3.1 Importancia de los diluyentes                                    | 12   |
| 3.3.2 Velocidad de congelación y descongelación                        | 13   |
| 3.3.3 Sistemas de empaqueo del semen                                   | 14   |
| 4 METODOLOGÍA  | 15   |
| 4.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO Y MATERIAL BIOLÓGICO              | 15   |
| 4.2 OBTENCIÓN DEL SEMEN  | 16   |
| 4.2.1 Evaluación macroscópica  | 16   |
| 4.2.2 Evaluación microscópica  | 16   |
| 4.3 TRATAMIENTOS Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN                           | 17   |
| 4.3.1 Congelación y descongelación                                     | 17   |
| 4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO                         | 18   |
| 2 EJECUCIÓN DE ACTIVIDADES TÉCNICAS                                    | 19   |
| 6 RESULTADOS   | 22   |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 6.1 | CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DORADA                                      | 22 |
| 6.2 | CALIDAD SEMINAL DEL SEMEN FRESCO Y CRIOCONSERVADO-DESCONGELADO DE DORADA | 22 |
| 7   | DISCUSIÓN  | 25 |
| 8   | CONCLUSIÓN   | 29 |
| 9   | BIBLIOGRAFÍA   | 30 |
| 10  | PRODUCTOS  | 31 |

## RESUMEN

El estudio se realizó en la Estación Piscícola de Repelón (EPR-AUNAP) y el Instituto de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba (CINPIC) con el objetivo de establecer un protocolo para la crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei*. Se seleccionaron nueve machos con dos años de edad, mantenidos bajo condiciones de cautiverio en la EPR. El semen fue obtenido induciendo machos con dosis única de 4.5 mg EPC/Kg de peso vivo. Del semen fresco fue evaluado volumen, color y microscópicamente fue evaluada la movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total, velocidad espermática, tiempo de activación y concentración espermática con ayuda de una cámara Makler y el programa para análisis de semen asistido por computadora Sperm Class Analyzer SCA®. Se utilizó como crioprotector interno dimetilsulfóxido (DMSO) a tres porcentajes de inclusión 5% (T2), 10% (T3) y 15% (T4); mientras que la solución crioprotectora estuvo compuesta por el crioprotector (DMSO) a los tres porcentajes de inclusión, glucosa 6% (p/v) yema de huevo 12% (v/v). El semen fresco fue considerando como tratamiento control (T1). El semen fue diluido en proporción 1:3 (semen: diluyente), depositado en macrotubos de 2.5 mL y su congelación se realizó durante 30 minutos en un dry shipper con vapores de nitrógeno; mientras que su descongelación se realizó a 35°C durante 90 seg en un baño serológico. En el semen descongelado se evaluó la movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total y velocidades post-descongelación, con la ayuda del SCA como fue descrito anteriormente. El color del semen de dorada estuvo en el rango de amarillo pardo a amarillo, con volumen seminal promedio de  $3.5 \pm 1.8$  mL, movilidad superior a 80% y tiempo de activación entre 28.5 y 41 seg; mientras que la concentración espermática osciló entre 10188.1 y 14590.2 millones/mL. La movilidad total del semen crioconservado-descongelado fue mayor cuando fue tratado con DMSO 5% ( $40.1 \pm 5.0\%$ ) y DMSO 10% ( $43.3 \pm 8.7\%$ ) sin observarse diferencia significativa entre estos tratamientos ( $p > 0.05$ ); mientras que DMSO 15% ( $30.6 \pm 7.9\%$ ) registró el menor valor ( $p < 0.05$ ). Los resultados permiten concluir que la solución crioprotectora compuesta por DMSO 5 a 10%, glucosa 6% y yema de huevo 12% es una alternativa viable para la crioconservación del semen de *Brycon moorei*.

## 1 INTRODUCCIÓN

La dorada *Brycon moorei*, es un pez endémico de Colombia, distribuido en las cuencas del Magdalena y el Caribe (Maldonado-Ocampo et al., 2008). En el Magdalena se distribuye en las sub-cuencas de los ríos Cauca, San Jorge, Cesar, La Miel, Manso; mientras que en el Caribe se ha reportado en el Ranchería, desde el Cercado hasta Cuestecita (Mojica et al., 2012). Conocida comúnmente como Dorada, mueluda, sardinata (Magdalena); lisa (Ranchería) (Mojica et al., 2012), es considerada una especie de gran importancia comercial, con potencialidad piscícola debido a su tamaño, rápido crecimiento, alimentación omnívora y aceptación de alimento artificiales (Rodríguez-Franco et al., 2014).

En la cuenca del Magdalena la dorada es considerada como una especie vulnerable a la extinción; debido a la alta presión pesquera a que es sometida y la fuerte alteración antrópica que experimenta la cuenca; mientras que en la cuenca del río Ranchería su situación es considerada crítica (Mojica et., 2012). Ante esta situación se requiere de acciones de conservación; entre las que se destaca la crioconservación de semen; la cual ha sido considerada una herramienta que permite la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción mediante el establecimiento de bancos genéticos que contribuyen al mantenimiento de la diversidad genética (Bobe & Labbé, 2009). Además la crioconservación ofrece ventajas como optimización de los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal asincrónica y ciclos reproductivos estacionales (Espinosa, 2013), así como un uso eficiente del semen durante los procesos de reproducción artificial (Lahnsteiner et al., 2004). Según Medina-Robles et al. (2005) la crioconservación trae beneficios a las actividades de reproducción en acuicultura, pues aumenta la posibilidad de reproducción por fuera de la temporada reproductiva, facilita el movimiento e intercambio de material genético entre productores, mejora la eficiencia en la utilización de los parentales y contribuye a disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores en procura de nuevos sementales.

En la literatura se registra la crioconservación de semen de más de 200 especies de organismos acuáticos en el mundo (Hiemstra et al., 2005; Tiersch & Green, 2011). Sin embargo en Colombia, los estudios de crioconservación de semen de peces nativos son recientes; destacándose los avances en el desarrollo de protocolos de crioconservación de cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Navarro et al., 2004, Ramírez-Merlano et al., 2005), yamú *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas et al., 2006; Velasco-Santamaría et al., 2006), bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Ramírez-Merlano et al., 2011), bocachico *Prochilodus magdalenae* (Atencio et al., 2013) y bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* (Atencio et al., 2014) con resultados satisfactorios en la reproducción artificial de estas especies con semen crioconservado. Sin embargo al tratar de utilizar estos protocolos en otras especies los resultados no han sido los mejores; lo cual sugiere la necesidad de ajustar los protocolos a la especificidad de cada especie (Mongkonpunya et al., 2000).

Para que un protocolo de crioconservación de semen de una especie de pez sea exitoso es necesario ajustar cada uno de los factores considerados críticos en la realización de este proceso entre los cuales se destacan la colección del semen, composición del diluyente, concentración del crioprotector, curvas de congelación y descongelación (Tiersch 2011, Irawan et al., 2010).

Los diluyentes o agentes crioprotectores son soluciones que tienen como función proteger la integridad del espermatozoide ante la acción tóxica de los productos generados por su propio metabolismo durante el proceso de crioconservación, además de reducir la temperatura de congelación del medio en el que se encuentran suspendidas las células para reducir o contrarrestar la formación de los cristales de hielo (Woods et al., 2004; Pegg, 2007), así como los cambios bruscos de temperatura y el aumento en el volumen seminal. Para el proceso de crioconservación los diluyentes deben poseer algunas características como la no presencia de sustancias tóxicas, simulación con la composición y osmolaridad seminal de cada especie, capacidad amortiguadora para proteger a los espermatozoides de las variaciones de pH, poseer sustancias que favorezcan la anaerobiosis, tales como citratos, fosfatos, glucosa, fructosa yema de huevo y leche (Cruz-Casallas et al., 2006).

Es por ello que se hace necesaria la consecución del porcentaje adecuado de crioprotector interno que permitan proteger a la célula espermática del criodañó y a la vez no genere toxicidad sobre la misma. Por tanto, el objetivo de presente estudio fue evaluar el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector en la conservación de semen de dorada *Brycon moorei* evaluando la calidad seminal post-descongelación.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer un protocolo para la crioconservación del semen de dorada *Brycon moorei*

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Caracterizar el tiempo de activación, movilidad total, velocidad, progresividad y concentración espermática de semen fresco de dorada mantenido en cautiverio.
  
- b) Comparar tiempo de activación, movilidad total, velocidad y progresividad espermática de semen de dorada crioconservado con DMSO a diferentes porcentajes de inclusión.
  
- c) Evaluar los porcentajes de fertilidad y eclosión con semen de dorada descongelado, crioconservado con DMSO a diferentes porcentajes de inclusión.

### **3. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **3.1 APLICACIONES DE LA CRIOCONSERVACIÓN EN LA ACUICULTURA**

La crioconservación es la rama de la criobiología que estudia la vida a bajas temperatura por medio de la cual se espera prolongar indefinidamente el potencial de vitalidad y las funciones metabólicas normales de la célula a temperaturas criogénicas generalmente de  $-196^{\circ}\text{C}$  permitiendo su conservación (Ramos, 1986).

El desarrollo de la inseminación artificial basada en gametos crioconservados ha permitido cambios trascendentales en la industria pecuaria. El semen congelado es usado mundialmente como una herramienta esencial en los programas de mejoramiento animal. En principio, beneficios similares pueden ser esperados de su aplicación en la industria piscícola. El uso de semen congelado es un medio práctico para aumentar el tamaño genéticamente efectivo de las poblaciones y mantener su diversidad genética, especialmente de aquellas mantenidas en cautiverio (Phrone, 1994). Además, aumenta la posibilidad de reproducción por fuera de la estación reproductiva, facilita el movimiento e intercambio de material genético entre productores, mejora la eficiencia en la utilización de los parentales y contribuye a disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores en procura de nuevos sementales.

La disponibilidad continua de semen que ofrece la crioconservación, facilita el manejo del asincronismo reproductivo de algunas especies ícticas, en las cuales las hembras presentan maduración gonadal aun cuando los machos no se encuentran en actividad reproductiva, ya sea por inmadurez o por disminución de la calidad seminal hacia finales de periodo reproductivo (González & Díaz, 2000).

#### **3.2 ESPERMAZOIDE DE LOS PECES**

El espermatozoide de los peces con fertilización externa, tiene una estructura simple de tipo primitivo (Andrade et al., 2001), la cabeza mide entre  $2-4\ \mu\text{m}$  y es casi esférica con

un collar que forma la pieza media donde se encuentran los centriolos y entre 2-9 mitocondrias, el flagelo por lo general está constituido por el axonema en arreglo de nueve pares de micro túbulos periféricos y un par central. El flagelo de algunos peces mide entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  y su membrana plasmática forma una especie de aleta en el plano horizontal confiriéndole una forma acintada (Cosson et al., 1999).

El flagelo de espermatozoides del grupo Otophysi (Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes y Gymnotiformes), caracterizado por poseer aparato de Weber, no muestra proyecciones laterales (Grassiotto et al., 2001). Los espermatozoides de peces se han clasificado en aquaespermatozoides y en introespermatozoides, según su modo de fertilización externo o interno. Los Cipriniformes, Characiformes y Siluriformes tienen el tipo aquaespermatozoides (Grassiotto et al., 2001).

### **3.3 EFECTO DEL DILUYENTE Y DEL CRIOPROTECTOR SOBRE EL AMBIENTE CELULAR**

Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de crioconservación, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado. Estas sustancias cumplen funciones como incrementar el volumen del eyaculado, proteger al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura. (Medina Robles et al., 2007).

Los diluyentes utilizados en peces han sido formulados simulando la composición y osmolaridad del plasma seminal de cada especie, con el propósito de no activar la movilidad, ya que soluciones no isosmóticas conducen a cambios iónicos en las membranas produciendo la activación espermática. De otro lado, la acción de los crioprotectores puede ser clasificada en dos grupos según la permeabilidad de la membrana a la sustancia. En el primer grupo se encuentran las sustancias que poseen bajos pesos moleculares (Mizukami et al., 1999) y que, por lo tanto, penetran al citoplasma celular (Holt, 2000), tales como glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, butanediol, acetamida y el dimetilsulfóxido (DMSO). El segundo grupo

reúne aquellas sustancias que no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular como el polivinil alcohol (PVA), hialuronato de sodio y la albúmina (Mizukami et al., 1999).

Los crioprotectores no permeables son usados para remover osmóticamente el agua intracelular, remplazándola por los crioprotectores permeables durante el enfriamiento y adicionalmente para prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Mizukami et al., 1999). La temperatura a la cual deben ser incorporados los crioprotectores a la solución de semen y el tiempo de exposición celular, depende del grado de toxicidad del crioprotector y de su velocidad de difusión a través de la membrana plasmática. Esta difusión puede verse afectada por el descenso de la temperatura, ya que durante este proceso la membrana celular aumenta la proporción de colesterol con el propósito de lograr mayor estabilidad mecánica; sin embargo, este aumento del colesterol también disminuye la permeabilidad de la membrana a pequeñas moléculas, pudiendo afectar la penetración del crioprotector en la célula de una manera efectiva (Spinel, 2002).

El crioprotector permeable ideal debe ser de bajo peso molecular, altamente soluble en solución acuosa de electrolitos, penetrar en la célula y no ser tóxico a altas concentraciones. Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de crioconservación, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular durante el periodo de almacenamiento. Estas sustancias cumplen funciones como proteger al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura (Medina-Robles et al., 2005). Los crioprotectores internos (permeables), atraviesan la membrana celular, desplazan parte del agua intracelular, impidiendo el daño de la membrana por aumento del volumen de agua al congelarse y la formación de cristales, que podrían causar rompimiento de las organelos y destrucción total celular. Además de esto, su bajo punto de congelación permite mantener un ambiente acuoso intracelular, que impide la formación de estructuras sólidas cristalizadas que incrementan el daño de la membrana y por tanto disminuye la viabilidad celular (Martínez, 2010).

En general el DMSO ha sido mostrado como uno de los más efectivos crioprotectores internos para espermatozoides de muchas especies de peces cuando se compara con otros como: metanol, dimetilacetamida, glicerol, etilenglicol y propilenglicol (Kerby, 1983; He & Woods, 2003).

Sin embargo, para *Pelteobagrus fulvidraco*, el DMSO junto con el glicerol como protectores espermáticos, resultaron ser superados en efectividad por el metanol, en términos de movilidad (65%), fertilización (90%) y tasa de eclosión (88%) (Pan et al., 2008). En ensayos con *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pinzón-Arciniegas et al., 2005), indicaron que concentraciones de DMSO iguales o superiores a 10%, pueden reducir considerablemente la viabilidad de los espermatozoides de bagre rayado, siendo necesario evaluar otras sustancias para identificar aquellas que registren menor toxicidad para las células espermáticas de estas especies. En experimentos de crioconservación de semen de *Clarias gariepinus*, el uso de DMSO y dimetilacetamida (DMA) en concentraciones de 10%, encontraron que en cuanto a movilidad masal resultó más efectivo DMSO ( $44\pm 9.7\%$ ) comparado con DMA ( $22.6\pm 18.1\%$ ); por el contrario, registraron elevadas tasas de fertilización utilizando DMA ( $86.8\pm 3.1\%$ ) en comparación con DMSO ( $67.1\pm 11.9\%$ ) (Horváth & Urbányi, 2000).

La efectividad de los crioprotectores como DMSO, varía de acuerdo a la especie (Velasco-Santamaría et al., 2006; Horváth et al., 2003); por lo que es necesario la adaptación y desarrollo de protocolos y concentraciones específicas de los crioprotectores para cada especie, en este caso para la Dorada.

**3.3.1 Importancia de los diluyentes.** La yema de huevo ha sido usada con éxito en diluyentes en combinación con crioprotectores intracelulares para crioconservar espermatozoides de peces y mamíferos para atenuar los daños ocasionados por el choque térmico durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Watson, 1981; Aboagla & Teerada, 2004; Cruz-Casallas, 2005; Martínez, 2010; Pérez, 2010). Un efecto de sinergia entre la yema y algunos crioprotectores como el glicerol ha proporcionado altas tasas de sobrevivencia post-descongelación en células espermáticas (Pace & Graham, 1974). Una explicación a este evento, es la composición

química de la yema de huevo en términos de colesterol, ácidos grasos, lipoproteínas y fosfolípidos, los cuales influyen en la protección del semen crioconservado (Bathgat, 2006). Se ha detectado que la eficiencia de la congelación de células espermáticas, se debe en gran parte a la acción protectora de la yema, debido a su contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL siglas en inglés) (Moussa et al., 2002), obteniéndose resultados exitosos en la significativa minimización de los daños en la integridad del DNA, utilizando concentraciones de 9% de LDL en el diluyente, en asociación con el glicerol como crioprotector (Jiang et al., 2007).

**3.3.2 Velocidad de congelación y descongelación.** La velocidad de enfriamiento juega un papel importante en el proceso de crioconservación. Si la congelación es suficientemente lenta el equilibrio es alcanzado a través del eflujo de agua, pero si la congelación es muy rápida, la célula no puede perder agua lo suficientemente rápido para alcanzar el potencial de equilibrio, congelándose intracelularmente (Mazur, 1980; Viveiros et al., 2001; Watson, 2000).

La congelación intracelular es letal para la célula dependiendo particularmente del tamaño y de la cantidad de cristales de hielo formados en el citoplasma. Normalmente, altas velocidades de enfriamiento producen cristales intracelulares pequeños que pueden llegar a ser inocuos, pero estos pueden unirse y crecer durante la descongelación por medio de un proceso denominado recristalización (Mazur, 1980). La congelación espermática en vapores del nitrógeno líquido (NL) es tal vez la técnica más utilizada en peces (Linhart et al., 2000; Taddei et al., 2001; Yao et al., 2000). No obstante, la congelación directa en hielo seco a  $-79^{\circ}\text{C}$  y luego la inmersión en NL a  $-196^{\circ}\text{C}$ , también es utilizada, aunque con menos frecuencia y casi siempre acompañada del método de envasado en pellets (Babiak et al., 1997). Aunque la velocidad de congelación es una de los factores más críticos en el proceso de crioconservación de semen, esta es la variable menos estandarizada en los estudios de crioconservación seminal en peces. En la congelación de semen de *Brycon siebenthalae*, se observó 69% de movilidad espermática posdescongelación, al ser utilizada una curva de congelación lenta o de descenso gradual de temperatura (Pardo, 2000).

Las pajillas congeladas y conservadas en nitrógeno líquido, se deben descongelar por inmersión directa en un baño serológico a 60°C por 8 segundos, ya que una descongelación rápida permite mejores resultados en cuanto a movilidad (Martínez et al., 2009). El tiempo máximo entre el retiro del termo y la inmersión en agua no debe ser mayor de tres segundos. Esta velocidad evita procesos de recristalización celular, que pueden ocasionar la muerte espermática (Holt, 2000).

**3.3.3 Sistemas de empaque del semen.** Con relación a los sistemas o volúmenes de empaque, se ha crioconservado semen de peces con éxito en pajillas de 0.25 o 0.5 ml, las cuales resultan prácticas para ensayos a nivel de laboratorio y para fertilizar pequeñas cantidades de ovocitos (Cruz-Casallas et al., 2004; Martínez 2010; Pérez. 2010). Protocolos de crioconservación de semen en macrotubos (5.0 mL.), también han sido probados para algunas especies de peces de agua dulce, tales como *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner et al., 1997), *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* (Lahnsteiner et al., 1997), *Polyodon spathula* (Brown y Mims, 1999), *Silurus glanis* (Bart et al., 1998) y especies marinas tales como *Dicentrarchus labrax* y *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson et al., 1999).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO Y MATERIAL BIOLÓGICO**

La investigación se realizó en la Estación Piscícola de Repelón (EPR) de la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP) y el Instituto de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba (CINPIC). La EPR está localizada en el municipio de Repelón (Atlántico) en las inmediaciones del embalse del Guájaro, a 60 Km de las ciudades de Barranquilla y Cartagena, coordenada geográficas 10°29' 46" latitud norte y 75°07'52" latitud oeste, a 10 msnm, con temperatura promedio anual de 32°C. El CINPIC, está ubicado en el municipio de Montería (Córdoba), coordenadas geográficas 8°47.5', latitud norte y 75°51.8' longitud oeste, a una altitud de 15 metros sobre el nivel del mar, humedad relativa de 80%, temperatura promedio anual 28.5°C y precipitación anual promedio de 1100 mm.

Se seleccionaron nueve machos de dorada de dos años de edad, obtenidos y mantenidos bajo condiciones de cautiverio en la EPR. La selección de los ejemplares se realizó con base en su estado de madurez sexual. Los machos se seleccionaron en fase de espermiación, los cuales se caracterizaron por la presencia de semen fluido en la papila urogenital después de aplicar una leve presión abdominal, en sentido cráneo-caudal. Los ejemplares seleccionados fueron trasladados a canales rectangulares en concreto (3 m<sup>3</sup>) con flujo constante (5 L/min), donde permanecieron durante 24 horas, con el propósito de habituarlos a las condiciones experimentales y reducir el estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente.

Los machos fueron inducidos con dosis única de extracto hipofisario de carpa (EPC) a razón de 4.5 mg/Kg de peso vivo. Los procedimientos empleados en la manipulación de los animales, fueron realizados utilizando como referencia las normas y procedimientos para el uso de animales en laboratorio, señaladas por el Committe on Care and Use of Laboratory Animal Resources (National Research Council USA, 2010).

## 4.2 OBTENCIÓN DEL SEMEN

El semen se obtuvo entre las 6-7 horas post-inducción y para su extracción los machos fueron previamente tranquilizados por inmersión directa en una solución de Eugenol (Proquident, Colombia) a razón de 0.5mL/10L de agua, hasta evidenciar la pérdida del eje de nado (aproximadamente 60 a 120 seg). Luego, cada uno de los machos fueron previamente secado en la región abdominal, donde se les aplicó una leve presión abdominal para provocar la expulsión de orina y de igual forma evitar la contaminación del semen con heces, sangre o agua. El semen fue colectado directamente en tubos Falcón de 15 mL estériles y secos. Inmediatamente después de colectada la muestra se procedió a realizar la evaluación seminal con el fin de conocer la calidad del semen fresco, observando el comportamiento de variables a nivel macroscópico y microscópico.

**4.2.1 Evaluación macroscópica.** Fue evaluado el volumen y color; el volumen se evaluó directamente en los tubos Falcón de 15 mL. El color se evaluó con la finalidad de evidenciar la posible presencia de sustancias contaminantes como heces y sangre.

**4.2.2 Evaluación microscópica.** Microscópicamente fue evaluada la movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total, velocidad espermática, tiempo de activación y concentración espermática.

**Movilidad total.** Se utilizó una cámara de conteo de Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel), a la cual se le agregó una muestra de 0.25  $\mu$ L de semen y 75  $\mu$ L de solución de bicarbonato de sodio 1% (dilución 1:300). Luego se homogenizó y con la ayuda de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa para análisis de semen asistido por computadora Sperm Class Analyzer SCA® (Microptic SL, SCA VET 01, España) se procedió a medir la movilidad total. De igual forma fueron calculados los tipos de movilidad (rápidos, medios, lentos y estáticos) y el porcentaje de progresividad total y los tipos de velocidad curvilínea (VCL) y en línea recta (VSL).

**Tiempo de activación.** Se determinó desde el instante en que se adicionó la solución activadora (agua destilada) a la muestra de semen, hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides dejaron de moverse.

**Concentración espermática.** Se utilizó 1  $\mu$ l de semen mezclado con 699  $\mu$ l de glucosa 6% en un Eppendorf de 2 ml (dilución 1:700), la mezcla fue homogenizada durante cinco segundos en un vortex a 1200 rpm (Velp Scientifica, Zxclasic, China). Luego fueron tomados 10  $\mu$ l y depositados en la cámara Makler para la determinación de la concentración mediante el SCA®. Este procedimiento se realizó seis veces por cada individuo para obtener un valor promedio de la concentración espermática del semen analizado.

#### **4.3 TRATAMIENTOS Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN**

Solo fue utilizado semen con movilidad superior a 80% para el proceso de crioconservación. Se utilizó como crioprotector interno dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a tres porcentajes de inclusión de DMSO 5% (T2), 10% (T3) y 15% (T4); mientras que la solución crioprotectora estuvo compuesta por el crioprotector (DMSO) a tres porcentajes de inclusión (5, 10, 15% v/v), glucosa 6% (p/v) yema de huevo 12% (v/v) llevándola al volumen deseado con agua destilada. El semen fresco fue considerando como tratamiento control (T1). El semen fue diluido en proporción 1:3 (semen: diluyente) (Velasco-Santamaría et al., 2006) y luego depositadas en macrotubos de 2.5 mL.

**4.3.1 Congelación y descongelación.** Los macrotubos fueron sometidos a vapores de nitrógeno líquido durante 30 minutos en un dry shipper (MVE, SC 4/2v, USA). La tasa de enfriamiento en el dry shipper fue de 27.3°C/min desde 28 a -20°C, de 29.9°C/min desde -20 a -100°C y de 5.5°C/min desde -100 a -196°C (Cruz-Casallas et al., 2006). Luego fueron trasladados a un termo de almacenamiento de 34 L (MVE, XC 34/18, USA) y sumergidos directamente en nitrógeno líquido (Cruz-Casallas et al., 2006). Los macrotubos fueron descongelados sometiéndolos a 35°C durante 90 segundos en un baño serológico (Mettler, WNB 7-45, Alemania). En el semen descongelado se

evaluaron las variables movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total y velocidades post-descongelación, con la ayuda del SCA como fue descrito anteriormente.

#### **4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó un diseño completamente al azar, un crioprotector interno: DMSO a tres porcentajes de inclusión: 5% 10%, 15% y un tratamiento control, resultando cuatro tratamientos cada uno con seis réplicas. Todas las variables estudiadas (movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total, velocidades espermáticas) fueron sometidas a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Para las variables que cumplieron estos supuestos se aplicó ANAVA a una sola vía, cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de Rango Múltiple de Tukey. En todos los casos  $p < 0.05$  fue utilizado como criterio estadístico para establecer la diferencia significativa. Los datos de las variables analizadas fueron expresados como valores promedios  $\pm$  desviación estándar. Los análisis se realizaron con ayuda de programa Statgraphic Plus for Windows 2.0 (Statistical Graphics Corp, 1996).

## 5. EJECUCIÓN DE ACTIVIDADES TÉCNICAS

La tabla 1 relaciona las actividades técnicas desarrolladas y su porcentaje de ejecución por cada objetivo específico en el marco del presente del proyecto.

Tabla 1. Actividades técnicas ejecutadas por cada objetivo específico y porcentaje de ejecución.

| Objetivo específico  | Actividad propuesta   | Actividades ejecutada  | Ejecución de la actividad (%) | Ejecución del objetivo (%) |
|--|---|--|-------------------------------|----------------------------|
| a) Caracterizar el tiempo de activación, movilidad total, velocidad, progresividad y concentración espermiática de semen fresco de dorada mantenido en cautiverio. | Revisión de características de maduración en reproductores machos de dorada | Fueron revisados machos de dorada, seleccionados mediante características presuntivas (subjetivas) para establecer su estado de maduración testicular. Se seleccionaron aquellos que se encontraron en estado de espermiación (aptos para inducción hormonal). | 100%                          | 100%                       |
|  | Inducción hormonal de reproductores machos de dorada                        | Se realizaron procesos de inducción hormonal en machos de dorada, en fase de espermiación, utilizando EPC como inductor a razón de 4.5 mg/Kg de peso vivo (hipofización).  | 100%                          |                            |
|  | Evaluación de características macroscópicas del semen de dorada             | Evaluación del volumen y color del semen de dorada inducidos mediante la técnica de hipofización   | 100%                          |                            |
|  | Evaluación de características microscópicas del semen de dorada             | Evaluación de la movilidad total, tipos de movilidad, velocidades espermiáticas, progresividad, concentración y tiempo de activación del semen de dorada mediante el análisis de semen asistido por computadora (SCA, Microptic, España)                       | 100%                          |                            |

|  |   |   |      |      |
|--|---|---|------|------|
|  | Congelación de semen de dorada utilizando DMSO a diferentes porcentajes de inclusión como crioprotector.                    | Congelación de semen de dorada (n=9) con DMSO como crioprotector interno incluido a tres porcentajes de inclusión (5, 10 y 15%).  | 100% |      |
| b) Comparar tiempo de activación, movilidad total, velocidad y progresividad espermática de semen de dorada criopreservado con DMSO a diferentes porcentajes de inclusión. | Descongelación de pajillas de semen criopreservado con DMSO a diferentes porcentajes de inclusión.                          | Descongelación de semen de dorada criopreservado con DMSO incluido a tres porcentajes de inclusión (5, 10 y 15%).   | 100% | 100% |
|  | Evaluación de características microscópicas del semen de dorada luego de los procesos de criopreservación y descongelación. | Evaluación de la movilidad total, tipos de movilidades, velocidades espermáticas (lineal y curvilínea), progresividad, concentración y tiempo de activación mediante el análisis de semen asistido por computador (SCA, Microptic, España). | 100% |      |
|  | Revisión periódica de características de maduración en hembras de dorada para realizar inducciones hormonales               | Revisión de hembras de dorada seleccionadas mediante características presuntivas (subjetivas) y confirmativas (biopsia ovárica). Selección de hembras en fase de maduración final para ser sometidas a inducción hormonal.                  | 100% |      |
| 3.. Evaluar los porcentajes de fertilidad y eclosión con semen de dorada descongelado, criopreservado con DMSO a diferentes porcentajes de inclusión                       | Inducción hormonal de hembras de dorada para realización de pruebas de fertilidad   | Inducción hormonal de hembras de dorada utilizando EPC como inductor a razón de 6.0 mg/Kg de peso vivo. Las hembras ovularon pero los ovocitos resultaron de baja calidad (cambios de coloración y baja flotabilidad).                      | 100% | 88%  |
|  | Fertilización de ovocitos de dorada con semen fresco y criopreservado   | Descongelación de pajillas de semen de dorada criopreservado con DMSO a diferentes porcentajes de inclusión (5, 10, 15%), para inseminación de ovocitos. Un grupo de ovocitos se  | 100% |      |

|   |   |     |
|---|---|-----|
|   | inseminó con semen fresco de dorada.  |     |
| Estimación de porcentajes de fertilidad y eclosión de ovocitos de dorada fertilizados con semen fresco y criopreservado | Se realizaron seis experimentos para la estimación de la capacidad fertilizante del semen criopreservado de dorada con DMSO; sin embargo no fue posible estimar esta capacidad por la pobre calidad de los ovocitos. Las pruebas con semen control también resultaron negativas, confirmado que la nula capacidad fertilizante del semen (criopreservado y fresco) estaba asociada a la pobre calidad de los ovocitos de las hembras de dorada. | 50% |
| Estado de ejecución del proyecto  |   | 96% |

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DORADA

La tabla 2, presenta las características del semen fresco de dorada, obtenidos por inducción hormonal. El color del semen de dorada estuvo en el rango de amarillo pardo a amarillo, con volumen seminal promedio de  $3.5 \pm 1.8$  mL, movilidad superior a 80% y tiempo de activación entre 28.5 y 41 seg; mientras que la concentración espermática osciló entre 10188.1 y 14590.2 millones/ml.

Tabla 2. Características de los machos y del semen fresco de dorada *Brycon moorei* obtenidos por inducción hormonal.

| Características                                |                      |
|--|----------------------|
| Número de individuos (n)                       | 9                    |
| Peso (Kg)                                      | $1.0 \pm 0.2$        |
| Color semen                                    | amarillo             |
| Volumen seminal (ml)                           | $3.5 \pm 1.8$        |
| Concentración espermática ( $\times 10^6$ /ml) | $12393.1 \pm 1486.8$ |
| Movilidad total (%)                            | $84.0 \pm 3.2$       |
| Tiempo de activación (seg)                     | $33.7 \pm 3.3$       |

### 6.2 CALIDAD SEMINAL DEL SEMEN FRESCO Y CRIOCONSERVADO-DESCONGELADO DE DORADA

La tabla 3, presenta la calidad del semen fresco y crioconservado-descongelado con DMSO. Los valores de movilidad total ( $84.0 \pm 3.2\%$ ), progresividad total ( $52.4 \pm 8.8\%$ ), velocidad curvilínea ( $118.7 \pm 23.1$   $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) y velocidad lineal ( $65.9 \pm 15.7$   $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) de semen fresco fueron mayores y con diferencia significativa a los valores registrados en el semen descongelado ( $p < 0.05$ ). El semen fresco también registró el mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida ( $44.0 \pm 9.6\%$ ) y media ( $16.6 \pm 4.7\%$ ) y el menor

porcentaje de espermatozoides estáticos ( $17.0 \pm 3.7\%$ ), observándose diferencia significativa con respecto a los de semen descongelado ( $p < 0.05$ ).

La movilidad total del semen crioconservado-descongelado fue mayor cuando fue tratado con DMSO 5% ( $40.1 \pm 5.0\%$ ) y DMSO 10% ( $43.3 \pm 8.7\%$ ) sin observarse diferencia significativa entre estos tratamientos ( $p > 0.05$ ); mientras que DMSO 15% ( $30.6 \pm 7.9\%$ ) registró el menor valor ( $p < 0.05$ ). Sin embargo el porcentaje de espermatozoides rápidos en el semen descongelado osciló entre  $6.2 \pm 4.3\%$  (DMSO 5%) y  $1.8 \pm 1.3\%$  (DMSO 15%), sin observarse diferencia significativa entre estos tratamientos ( $p > 0.05$ ); asimismo el porcentaje de espermatozoide con movilidad media osciló entre  $7.3 \pm 5.5\%$  (DMSO 5%) y  $5.8 \pm 3.3\%$  (DMSO 15%) sin observarse diferencia estadística entre estos valores ( $p > 0.05$ ); mientras que el semen tratado con DMSO 15% registró el mayor porcentaje de espermatozoides estáticos, observándose diferencia significativa con el resto de tratamientos ( $p > 0.05$ ). Cuando el semen fue crioconservado con DMSO 5%, el porcentaje de espermatozoides con movilidad lenta fue de  $26.7 \pm 6.4\%$ ; valor que no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con los de semen fresco ( $21.9 \pm 5.0\%$ ) ni con los crioconservados con DMSO 15% ( $23.0 \pm 5.1\%$ ).

La progresividad total del semen crioconservado-descongelado osciló entre  $9.9 \pm 5.9\%$  (DMSO 5%) y  $4.4 \pm 2.7\%$  (DMSO 15%) sin observarse diferencia entre estos valores ( $p > 0.05$ ).

La velocidad curvilínea del semen crioconservado-descongelado con DMSO osciló entre  $48.3 \pm 17.8 \mu\text{m}/\text{seg}$  (DMSO 5%) y  $35.3 \pm 9.2 \mu\text{m}/\text{seg}$  (DMSO 15%) sin observarse diferencia significativa entre estos valores ( $p > 0.05$ ). Una tendencia similar fue observada para velocidad lineal la cual osciló  $25.7 \pm 9.3 \mu\text{m}/\text{seg}$  (DMSO 5%) y  $15.9 \pm 5.7 \mu\text{m}/\text{seg}$  (DMSO 15%).

Tabla 3. Características seminales del semen fresco y crioconservado-descongelado de la dorada *Brycon moorei*. Letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

| Características               | Semen<br>Fresco         | DMSO<br>5%             | DMSO<br>10%           | DMSO<br>15%           |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Movilidad total (%)           | 84.0±3.2 <sup>a</sup>   | 40.1±5.0 <sup>b</sup>  | 43.3±8.7 <sup>b</sup> | 30.6±7.9 <sup>c</sup> |
| Rápidos (%)                   | 44.0±9.6 <sup>a</sup>   | 6.2±4.3 <sup>b</sup>   | 4.5±3.1 <sup>b</sup>  | 1.8±1.3 <sup>b</sup>  |
| Medios (%)                    | 16.6±4.7 <sup>a</sup>   | 7.3±5.5 <sup>b</sup>   | 6.8±4.1 <sup>b</sup>  | 5.8±3.3 <sup>b</sup>  |
| Lentos (%)                    | 21.9±5.0 <sup>b</sup>   | 26.7±6.4 <sup>ab</sup> | 32.1±6.7 <sup>a</sup> | 23.0±5.1 <sup>b</sup> |
| Estáticos (%)                 | 17.0±3.7 <sup>a</sup>   | 59.0±5.0 <sup>b</sup>  | 56.7±8.7 <sup>b</sup> | 69.4±7.9 <sup>c</sup> |
| Velocidad curvilínea (µm/seg) | 118.7±23.1 <sup>a</sup> | 48.3±17.8 <sup>b</sup> | 36.1±8.8 <sup>b</sup> | 35.3±9.2 <sup>b</sup> |
| Velocidad lineal (µm/seg)     | 65.9±15.7 <sup>a</sup>  | 25.7±9.3 <sup>b</sup>  | 17.9±6.1 <sup>b</sup> | 15.9±5.7 <sup>b</sup> |
| Progresividad total (%)       | 52.4±8.8 <sup>a</sup>   | 9.9±5.9 <sup>b</sup>   | 7.1±4.6 <sup>b</sup>  | 4.4±2.7 <sup>b</sup>  |

## 7. DISCUSIÓN

Los resultados de la característica seminal de *B. moorei* del presente estudio son los primeros registros para la especie de machos mantenidos en cautiverio, cuyo semen fue obtenido mediante inducción hormonal (hipofización). Sin embargo existe reportes de las características seminales de otros co-específicos del genero *Brycon*, también en cautiverio y cuyo semen ha sido obtenido mediante hipofización como *B. sinuensis* (Montes & Salgado, 2014), *B. amazonicus* (Cruz-Casallas et al., 2006) y *B. henni* (Montoya et al., 2006).

Montes & Salgado (2014) obtuvieron una concentración espermática de 10058.1 millones/mL y tiempo de activación de 30.7 seg para semen fresco de *B. sinuensis*; mientras que Cruz–Casallas et al. (2006) reportaron una concentración espermática de 7598 millones/mL y un tiempo de activación de 40 seg. Valores que podrían considerarse similares o cercanos a los valores obtenidos en el presente estudio para *B. moorei*. Sin embargo los datos de concentración espermática reportada para *B. henni* (50000 millones/mL, Montoya et al., 2006) se encuentran muy por encima de la concentración espermática de los brycónidos migratorios (*B. moorei*, *B. sinuensis*, *B. amazonicus*).

La movilidad total y la capacidad fecundante del semen crioconservado son considerados criterios de calidad espermática, que permiten medir el éxito o fracaso del proceso de crioconservación. Padilla (2014) señaló que desde el mismo momento en que el semen entra en contacto con la solución crioprotectora se produce daños en las mitocondrias, membrana espermática y fragmentación del DNA como consecuencia del choque hiperosmótico y la toxicidad del crioprotector y que estos daños se incrementan durante los procesos de congelación y descongelación. La magnitud de los daños criogénicos puede resultar en la disminución de la movilidad en asociación con reducción de la velocidad y la fertilidad (Ramírez-Merlano et al., 2010).

En los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró que en todos los casos el proceso de criopreservación y descongelación con DMSO causó una reducción sobre todas las variables que definen la calidad espermática.

La movilidad total del semen descongelado se redujo aproximadamente a la mitad de la registrada por el semen fresco (84.0%) cuando fue tratado con DMSO 5% o DMSO 10% y cayó a alrededor de la tercera parte cuando fue tratado con DMSO 15%. Aunque estadísticamente no se observó diferencia en el porcentaje de espermatozoides rápidos en el semen descongelado; este tipo de espermatozoides disminuyó a una séptima parte cuando fue tratado con DMSO 5% y a una veinticuatro parte cuando fue tratado con DMSO 15% con relación al semen fresco ( $44.0 \pm 9.6\%$ ).

De igual forma el porcentaje de espermatozoides con movilidad media del semen descongelado a las diferentes inclusiones del crioprotector no presentó diferencias significativas; pero cuando DMSO se utilizó a 5%, la presencia de los espermatozoides medios se redujo aproximadamente 56% con relación al semen fresco; mientras que cuando DMSO fue utilizado a 15% este tipo de espermatozoides se redujo en 65%.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides estáticos (sin movimiento) se registró un aumento de tres veces cuando DMSO se utilizó a 5 y 10% con relación a semen fresco; pero se incrementó a cuatro veces cuando DMSO se utilizó a 15%.

De otra parte los valores de movilidad total en el semen criopreservado con DMSO 5% y 10%, fueron mayores a los registros con DMSO 15%, sugiriendo que porcentajes de inclusión por encima de 10% pueden ser perjudiciales para espermatozoides de dorada por un posible proceso de intoxicación al momento de descongelar la solución, y que porcentajes de inclusión de DMSO entre el 5% y 10% son adecuadas para la dilución del semen de esta especie, evitando la formación de cristales de hielo durante el proceso de criopreservación.

Usualmente la criopreservación provoca un bajo porcentaje de movilidad, disminución del tiempo de activación y la presencia de altos porcentajes de movimientos circulares

(Lahnsteiner et al., 2000; Wamecke & Pluta, 2003). Aunque el criodañó exacto que reduce la velocidad del nado todavía es desconocido, se puede afirmar que este evento reduce la probabilidad de que el espermatozoide alcance el micrópilo (Lahnsteiner et al., 2000).

Cruz-Casallas et al. (2006) encontraron que DMSO a niveles de inclusión entre el 5% ( $76\pm 2\%$ ) y 10% ( $33\pm 4\%$ ) permitieron buenos porcentajes de movilidad del semen descongelado de *B. amazonicus*, registrando porcentajes de movilidad cercanas a las reportadas con semen fresco. Pineda-Santis et al. (2013), en *B. henni* registraron altos porcentajes de movilidad total (59.78%) en semen crioconservado-descongelado con DMSO al 5%. valores similares a los reportados en el presente estudio.

De igual manera Murgas et al. (2001) reportaron valores de movilidad espermática del (53%) en piracanjuba *Brycon orbygnyanus*, utilizando DMSO 10% y bicarbonato de sodio al 1% como solución activadora, valores muy cercanos a los obtenidos en el presente estudio.

Se sugiere que la reducción de la movilidad espermática se presenta como consecuencia del choque hiperosmótico entre la solución crioprotectora y el semen; así como en el proceso de congelación y descongelación del semen (Padilla, 2014).

Según Padilla (2014) la disminución de la movilidad total y reducción del porcentaje de espermatozoides rápidos y medios e incremento de los lentos y estáticos; así como disminución de las velocidades espermáticas (VSL, VCL) son consecuencia de los daños que sufren las mitocondrias, membranas y DNA en la fase de pre congelación, congelación descongelación.

Martínez & Pardo (2010), afirmaron que disminuciones en la movilidad espermática en el semen descongelado, se atribuyen a la ausencia y degradación de proteínas, fundamentales en los eventos de señalización intracelular que dan lugar a la movilidad espermática, lo que explicaría las pérdidas de movilidad en los tratamientos con semen crioconservado-descongelado. No obstante autores como Taddei et al. (2001), afirman

que cuando los niveles de DMSO se elevan a un porcentaje de inclusión superior a 15%, provocan daños en la membrana cercanos al 61% de las células espermáticas y de un 23% en membrana nuclear.

Martínez. (2010) crioconservando semen de *Prochilodus magdalenae* con DMSO como crioprotector, evidenció una reducción sobre los tipos de movilidad, rápida, media, progresividad total, VCL y VSL, al igual que un aumento sobre el número de espermatozoides inmóviles (md) en relación al semen fresco, presentando los mejores resultados cuando utilizó DMSO a 10%; valores muy similares a los obtenidos en la presente investigación.

El papel de las mitocondrias se considera un factor clave de la funcionalidad del espermatozoide, en peces particularmente, se necesita preservar la actividad mitocondrial, ya que esta se permite mantener alta la movilidad del semen (Figuroa et al., 2013). Ogier de Baulny et al. (1999) argumentaron que la crioconservación provoca una limitación a la actividad mitocondrial y por consiguiente una disminución en los niveles de ATP de la célula espermática. Además el DNA de las mitocondrias de las células animales codifica, en su mayoría, las proteínas de la respiración aeróbica celular que da lugar a la producción de ATP (Andersson et al., 2003).

También la producción en exceso de especies reactivas de oxígeno (EROS) por la célula se asocia a la disminución de la movilidad por descenso en la fosforilación de proteínas del axonema (O'Connell et al., 2002; Paasch et al., 2004; Martin et al., 2004). Martínez & Pardo (2010) afirmaron que la crioconservación reduce la ineficiencia de la síntesis de proteínas implicadas en la producción energética celular lo que provoca la disminución de la movilidad espermática.

Fraser & Strzezek (2007) sustentaron que la disminución de la movilidad está asociada con daños en la mitocondria. Martínez & Pardo (2010) creen probable que los crioprotectores interactúan directamente con las reservas de ATP, lo cual disminuye su concentración en la célula espermática, como consecuencia del estrés osmótico por la adición del crioprotector y/o por la congelación del agua externa (Ogier-De Baulny et al.,

1997). He & Woods (2004) al crioconservar semen de *Morone saxatilis*, encontraron que el nivel de ATP de semen precongelado disminuyó considerablemente cuando el crioprotector estuvo en contacto con las células espermáticas, y posteriormente, su descenso fue mucho mayor después de la congelación, lo cual indicó un daño en las mitocondrias. En estudios similares evaluando los daños en la célula espermática de *Pagrus major* con DMSO 15% como crioprotector, reportaron daños en mitocondria de 22.6% (Li et al., 2007). Por su parte Figueroa et al. (2013) reportaron daños en mitocondria de 63.8% en semen de trucha arco iris revertida sexualmente, utilizando como crioprotector DMSO 10%, resultados similares a los observados en el presente estudio con semen descongelado.

La funcionalidad de la mitocondria juega un papel importante en la activación espermática, ya que suministra la energía en forma de ATP necesaria el movimiento del espermatozoide y la duración del mismo (Ogier de Baulny et al., 1997; Medina-Robles et al., 2005). El alto coeficiente de correlación ( $R^2=0.9796$ ) entre el daño mitocondrial y la movilidad total, puede explicar la importancia de la actividad de las mitocondrias sobre la movilidad espermática, observándose una relación de tipo polinómica, es decir un descenso de la movilidad está relacionado con el incremento de daños en mitocondrias.

## **8. CONCLUSIÓN**

Basados en los resultados obtenidos en términos de calidad seminal luego de realizado el proceso de crioconservación y descongelación se concluye que la solución crioprotectora compuesta por DMSO 5 a 10%, glucosa 6% y yema de huevo 12% es una alternativa viable para la crioconservación del semen de dorada *Brycon moorei*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Aboagla EM, Terada T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa, *Theriogenology* 2004; 62:1160–1172.

Andersson G, Karlberg O, Canback B, Kurland C. On The Origin Of Mitochondria: A Genomics Perspective. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358:165-179.

Atencio-García V, Pardo-Carrasco S, Espinosa-Araujo J, Pérez-Almanza E. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Med Vet* 2013; 45, 151-158.

Atencio-García VJ, Dorado M, Navarro E, Pérez F, Herrera B, Movilla J, Espinosa-Araujo JA. Evaluación de etilenglicol como crioprotector en la crioconservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*, Pimelodidae). *Acta biol. Colomb.* 2014; 19(2):271-280.

Babiak IJ, Glogowski E, Brzuska J, Szumiec JA. Cryopreservation of sperm of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquacult Res*, 1997; 7:567-571.

Bathgat R, Maxwell WM, Evans G. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality, *Reproduction Domestic Animal* 2006, 41: 68–73.

Bart AN, Wolfe DF, Dunhan RA. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. *Trans am Fish Soc* 1998; 127:819-570.

Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinolgy.* 2009; 165 (3): 535-548.

Brown GG, Mims SD. Cryopreservation of padllefish *Polyodon spathula* milt. *J. World Aquacult Soc*, 1999; 30:245-249

Cosson J, Billard R, Cibert C, Dréanno C. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C, editor. *The Male Gamete: from basic knowledge to clinical applications*. Vienna: Cache River Press; 1999. p. 161-186.

Cruz-Casallas PE, Pardo-Carrasco SC, Arias-Castellanos JA, Lombo Castellanos PE, Lombo-Rodríguez DA, Pardo-Mariño JE. Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *J. the World Aquacult Soc* 2004; 35(4):529-535.

Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco Santamaría Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev Col Cienc Pec* 2006; 19(2): 152-159.

Espinosa J. Crioconservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*). Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Básicas. Maestría en Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 2013.

Figueroa E, Risopatrón J, Sánchez R, Isachenko E, Merino O, Isachenko V, Valdebenito I. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 2013; 372–375: 119– 126.

Fraser L, Strzezek J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing thawing. *Anim Reprod Sci*. 2007; 99: 317- 329

González S.E & Díaz. J. principios básicos de la crioconservación de semen de peces. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. 2000. P. 253- 264.

Grassiotto Q, Negräu JN, Carvalho ED, Foresti F. Ultraestructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) *J Fish Biol* 2001;59:1494-1502.

Hiemstra S, Van der Lende T, Woelder H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for Animal Genetic Resources Conservation Strategies. In: The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry animal and fishery genetic resources: International Workshop, 5-7 March 2005, Turin, Italy. p. 25-35.

He S, Woods L. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 2004; 48: 254–262.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3-22  
chondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 2004; 48: 254–262.

Horváth A, Urbányi B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Res* 2000; 31:317-24.

Irawan H, Vuthiphandchai V, Nimrat S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Anim Reprod Sci* 2010; 122, 236-243.

Jiang Z, Li Q, Li W, Hu J, Zhao H, Zhang S. Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing–thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*.2007; 99:401-407.

Kerby J. Cryogenic preservation of sperm from striped bass, *Trans. Am. Fish. Soc* 1983; 112: 86– 94.

Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the starlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Res* 2004; 35:519-528

Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B, Weismann T. Cryopresevation of spermatozoa in cyprindid fishes. *Theriogenology* 2000; 54: 1477- 1496.

Li Z, Lin Q, Liu R, Xie W, Xiao W. Reducing oxidative DNA damage by adding antioxidants in human semen samples undergoing cryopreservation procedure. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87: 3174 –77.

Linhart O, Rodina M, Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 2000; 41:241-250.

Maldonado-Ocampo J, Vari R, Usma J. Checklist of the freshwater fishes of Colombia. *Biota Colombiana* 2008; 9 (2): 143-237.

Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis- like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 2004; 71: 28-37.

Martínez JG, Atencio-García VJ, Tarazona AM, Pardo-Carrasco SC. Estandarización de protocolos para la crioconservación de semen de bocachico y el análisis de la movilidad mediante el software sperm class analyzer. *Rev Fac Nal Agr* 2009.

Martínez G. Efecto del crioprotector y osmolaridad del diluyente sobre la calidad espermática y el material genético en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Tesis Maestría en Biotecnología, Universidad Nacional sede Medellín, Colombia.2010

Martínez J G, Pardo-Carrasco S. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta biológica. Colombiana* 2010; 15(2):3-24 Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Martínez J, Atencio-García V, Pardo-Carrasco S. Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). Revista MVZ Córdoba 2011; 16(2):2554-2563.

Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. En: 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Madrid, España, 1980. p. 99-114.

Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. Rev Col Cienc Pec 2005; 18:34-48.

Medina Robles V, Guarnizo- Pineda M, Ramírez Merlano J, Otero Paternina A, Mira T, Pacheco- Murillo R, et al. Caracterización y ensayos preliminares de crioconservación seminal de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus, 1766). En memorias XIII Jornada de Acuicultura. Universidad de los Llanos 2007; 68-72.

Mizukami A, Carrell DT, Peterson CM. Cryopreservation of embryos. En: Encyclopedia of reproduction. vol 1. Utah: Academic Press; 1999. p. 765-772.

Mojica J, Castellanos C, Usma S, Álvarez R. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, Colombia; 2012.

Mongkonpunya K, Pupipat T, Tiersch TR. Cryopreservation of sperm of Asian catfishes, including the endangered Mekong giant catfish. In: Tiersch TR, Mazik PM (eds). Cryopreservation in Aquatic species. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA 2000; Pp 108-116

Montes C, Salgado S. Efecto de la concentración de glucosa sobre la movilidad espermática de la dorada *Brycon sinuensis* [Trabajo de pregrado]. Montería (Col) Universidad de Córdoba; 2014.

Montoya-López A, Olivera-Ángel M, Carrillo L. Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la Sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Pisces: Characidae). Rev Col Cienc Pec 2006; Vol. 19:2.

Moussa M, Marinet V, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from the hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen, Theriogenology 2002; 57:1695–1706.

Murgas L, Gualhanone A, Silva M, Mello C, Freitas R, Zan geronimo G. Calidad seminal del pez piraicanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. Universidad Federal de Lavras-UFLA. AN. VET. (MURCIA) 2001; 17:3-10.

Navarro O, Velasco-Santamaría Y, Cruz-Casallas P. Evaluación de cinco crioprotectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev Colom Cienc Pec 2004; 17, 53-59.

O'Connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Human Reproduction 2002; 1: 704–709.

Ogier-De Baulny B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maisse G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Cryobiology 1997; 34: 141-149.

Ogier- De Baulny B, Labbe C, Maisse G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectans. Cryobiology 1999; 39: 177-184.

Paasch U, Sharma R, Gupta A, Grunewald S, Mascha E, Thomas A, Glander H, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71: 1828-1837.

Padilla D. Evaluación de daños en el espermatozoide de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* durante la crioconservación con etilenglicol. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Básicas. Maestría en Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 2014.

Pan J, Ding S, Ge J, Yan W, Hao C, Chen J, Huang Y. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. *Aquaculture* 2008; 279:173-176.

Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal Animal Science*. 1974; 39: 1144–1149.

Pardo J. Congelación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*). Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia, 2000. 61 p.

Pegg D. Principles of Cryopreservation. In: Day, J.G & G.N. Stacey (Eds.). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology* 368. Human Press, New Jersey. 2007; 39-57.

Pérez E. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* [Trabajo de pregrado]. Montería (Col) Universidad de Córdoba; 2010.

Pineda-Santis H, Rendon-Toro V, Grisales-Pérez E, Montoya-Páez J, Acevedo-Villa O, Gómez-Oquendo J, Restrepo-Betancourt G. Evaluación de la movilidad espermática en semen fresco y post-descongelado de la sabaleta *Brycon henni* mediante el sistema

SCA. Memorias IV Conferencia Latinoamericana sobre cultivos de Peces Nativos Latin American and Caribbean Aquaculture 2013 LCQUA2013 XIX Jornada de Acuicultura y el VI Foro regional de Acuicultura. Villavicencio (Col) 2013.

Pinzón- Arciniegas S, Mojica Rodríguez J, Cruz Casallas P. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766). Rev Orinoquia 2005; 9(2): 28- 37.

Phronen J. Composition and cryopreservation of sperm from some finfish teleost fish. Finfish Fish Res 1994; 15:27-48.

Ramírez-Merlano J, Velasco-Santamaría Y, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Crioconservación de semen de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818): efectos del volumen de empaque y de la sustancia crioprotectora sobre la calidad seminal. Rev Colomb Cienc Pecu 2005; (resumen) 18, 331.

Spinel C. Biología molecular de la célula eucariótica animal. 1 ed. Medellín (Colombia): Fondo editorial Biogénesis; 2002. p. 31-68.

Ramírez- Merlano J, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. Rev Orinoquia 2010; 14(1): 59- 71.

Ramírez-Merlano J, V Medina-Robles, P Cruz-Casallas. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. Arch Med Vet 2011; 43, 135-144.

Ramos S. Anotaciones sobre inseminación artificial. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá 1986.

Richardson GF, Wilson CE, Crim LW, Yao XZ. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. Aquaculture 1999; 174, 89-94.

Rodriguez-Franco N, Castañeda Alvarez G, David Ruales C. Ensayo preliminar de engorde de dorada *Brycon moorei*, manejando dos densidades de siembra. Memorias VI Congreso Colombiano de Acuicultura. Universidad de Los Llanos, Villavicencio, Col. 2014.

Taddei AR, et al. Is cryopreservation a homogeneous process Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). Cryobiology 2001; 244-255.

Tiersch TR. Introduction to the second edition. In: Tiersch TH, Grenn CC (eds). Cryopreservation in aquatic species. 2nd ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 2011; Pp 1-17.

Tiersch R, Green C. Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd ed. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. U.S.A. 2011; 423.

Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles VM, Cruz-Casallas PE. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture 2006; 256:264-271.

Viveiros AT. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. Cryobiology 2001; 43:276-287.

Wamecke D, Pluta H. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L) sperm using dimetil-acetamida as the main cryoprotectant. Aquaculture 2003;187: 361- 375

Watson PF, Holt WV. Cryobanking the Genetic Resource, Wildlife Conservation for the Future. London, UK: Taylor and Francis; 1981.

Woods E, Benson J, Agca Y, Critser J. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48 (2): 146- 156.

Yao Z, Crim LW, Richardson GF, Emerson CJ. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus*) sperm after cryopreservation. *Aquaculture* 2000; 181: 361-375.

## 10. PRODUCTOS

| RESULTADOS ESPERADOS DEL PROYECTO |  |                              |   |   |                          |  |
|-----------------------------------|--|------------------------------|---|---|--------------------------|--|
| Resultado                         |  | Tipo<br>(parcial o<br>final) | Objetivo(s)<br>especifico(s)<br>asociado(s) | Impacto o importancia<br>para objetivo(s)<br>asociado(s): Alta, Media<br>o Baja | Avance en<br>el proyecto | Observaciones  |
| N°                                | Nombre   |                              |   |   |                          |  |
| 1                                 | Protocolo para<br>crioconservar semen<br>de dorada con DMSO. | Final                        | 2, 3  | Alta  | 96%                      | Se desarrolló un protocolo de criopreservación de semen de dorada cuya solución crioprotectora debe contener DMSO 5 a 10%, glucosa 6% y yema de huevo 12%. La descongelación debe realizarse a 35°C durante 90 segundos. No fue posible medir la capacidad fertilizante del semen criopreservado por la pobre calidad de los ovocitos, |
| 2                                 | Características de los<br>productos sexuales de<br>dorada.   | Final                        | 1   | Media   | 100%                     | Finalizado   |
| 3                                 | Ponencia en eventos<br>científicos.                          | Final                        | 1, 2, 3                                     | Media   | 100%                     | Finalizado<br>(ver anexo 1)  |
| 4                                 | Artículo científico en<br>revista indexada A.                | Final                        | 1,2,3                                       | Alta  | 50%                      | En borrador para someter a<br>revista científica   |