

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE LOS LLANOS – IALL  
PROGRAMA DE POSTGRADO EN ACUICULTURA

**EVALUACION DE LA VIABILIDAD DE CONGELACIÓN DE  
EMBRIONES DE CACHAMA BLANCA (*Piaractus  
brachypomus*), OBTENIDOS POR REPRODUCCION  
ARTIFICIAL EN PRESENCIA DE DIFERENTES  
SUSTANCIAS CRIOPROTECTORAS**



**JAVIER OSWALDO GONZÁLEZ GONZÁLEZ**

**Villavicencio, Meta - Colombia**

**2013**

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE LOS LLANOS – IALL  
PROGRAMA DE POSTGRADO EN ACUICULTURA

**EVALUACION DE LA VIABILIDAD DE CONGELACIÓN DE  
EMBRIONES DE CACHAMA BLANCA (*Piaractus  
brachypomus*), OBTENIDOS POR REPRODUCCION  
ARTIFICIAL EN PRESENCIA DE DIFERENTES  
SUSTANCIAS CRIOPROTECTORAS**

**JAVIER GONZÁLEZ GONZÁLEZ**

Tesis presentada como requisito parcial  
para la obtención del título de Magister  
en Acuicultura - Aguas continentales

Orientador  
Víctor Mauricio Medina Robles, MSc  
Profesor IALL

**Villavicencio, Meta – Colombia**

**2013**

## COMISIÓN EVALUADORA

Profesora Martha Nelly Mesa Granda, MV, MSc  
Universidad de Antioquia

Profesora Delmis Omar Camargo Rodríguez, MVZ, MSc, PhD  
Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

Profesor Darci Carlos Fornari, MSc, PhD  
Universidad Estadual de Maringá – Brasil



---

Profesor Víctor Mauricio Medina Robles, MSc  
Universidad de los Llanos, Colombia  
Orientador

## DEDICATORIA

Dios y la Virgen Santísima, acompañan de grandeza, son amigos que guían hacia el logro de metas, fortaleciendo virtudes claves como la sabiduría y haciendo realidad los sueños.

A mis padres por ser mi soporte, por su amor inagotable, su esmero y sacrificio, así como la confianza brindada por mi esposa Alba Luz y el amor que ha llegado a nuestras vidas.



## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos:

A mi director, profesor Víctor Mauricio Medina Robles, por su orientación, apoyo, dedicación, colaboración y consejo en la realización de mi trabajo de grado.

Al doctor Pablo Emilio Cruz Casallas por su orientación y motivación ofrecida durante el desarrollo de esta investigación.

A la profesora Yohana María Velasco Santamaría, por su gran apoyo, motivación y confianza.

Al Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana (IIOC) por permitir parte de la financiación y desarrollo de esta investigación.

Al laboratorio de microscopía electrónica de la facultad de Geología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el acertado asesoramiento en la toma de las imágenes incluidas en el presente informe.

Al Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL), por su apoyo logístico, al igual que sus trabajadores.

Al grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos –GRITOX, en especial a Alexander Torres Tabares y Nubia Cruz Casallas.



MET  
00018  
EJ 1

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Tratamientos aplicados a cada una de las muestras de embriones de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) de 10 HPF, los porcentajes corresponden a un volumen final de 50 ml, para cada diluyente (crioprotector soluble + crioprotector insoluble + solución salina al 0,9%).	57
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes consolidados de viabilidad promedio de los embriones de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) del grupo control y los expuestos a las diferentes concentraciones de crioprotectores (CPA), internos (Dimetil-sulfóxido (DMSO), Metanol (MET), Etilen-glicol (ETG) y Dimetil-acetamida (DMA) y externos (Glucosa), luego de la sexta hora de mediciones post-congelación e inmediatamente antes de la eclosión.	66
<b>Tabla 3.</b> Características físicas y químicas del agua de las incubadoras de flujo ascendente tipo Woynarovich, durante el desarrollo embrionario de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ), hasta eclosión.	74
<b>Tabla 4.</b> Descripción morfológica y daños estructurales de embriones decorionizados (10 HPF) de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ), sometidos a tratamiento crioprotector y refrigeración a -14°C durante una hora. Embriones fijados en formaldehido bufferado al 10%; ph: 6,7 - 6,8; 1260 mosm. y tratados pormicroscopía electrónica de barrido. Aumento (225 – 260x).	75
<b>Tabla 5.</b> Descripción morfológica y daños estructurales de embriones decorionizados (10 HPF) de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ), sometidos a tratamiento crioprotector y refrigeración a -14°C durante una	

hora. Embriones fijados en formaldehído bufferado al 10%; ph: 6,7 - 6,8; 1260 mosm. Y tratados por microscopía electrónica de barrido. Aumento (235 – 300x). 76

**Tabla 6.** Hallazgos macroscópicos de embriones control de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de 10 HPF pre congelación estereoscopio bifocal aumento (3X), en comparación con los reportados para la especie y con imagen de microscopía electrónica de barrido. Aumento (230x). 77

**Tabla 7.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de metanol (MET) como crioprotector. Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 78

**Tabla 8.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-sulfóxido (DMSO) como crioprotector. Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 79

**Tabla 9.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de etilén-glicol (ETG) como crioprotector. Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 80

**Tabla 10.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-acetamida (DMA) como crioprotector.



Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 81

**Tabla 11.** Descripción morfológica de embriones control (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sin contacto con tratamiento crioprotector. Vista obtenida posterior a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 82

**Tabla 12.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de metanol (MET) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración a -14°C por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 83

**Tabla 13.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-sulfóxido (DMSO) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración a -14 °C por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 84

**Tabla 14.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de etilén-glicol (ETG) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración a -14 °C por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x). 85

**Tabla 15.** Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-acetamida (DMA) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración



a – 14 °C por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

86



## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Secuencia en las que se observa: selección del material biológico (A); Pileta circular de manejo de reproductores (6 m <sup>3</sup> ) (B); inducción hormonal (C) y el procedimiento de anestesia de los reproductores (D).	50
<b>Figura 2.</b> Secuencia en las que se observa Obtención de oocitos de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) (A); Obtención de semen (B); Fertilización de los oocitos (C); Activación de espermatozoides (D); Conteo de embriones en 6 cc. (E); Incubación por 10 horas (incubadora woynarovich) (F); Toma de muestras de embriones 10 HPF previo a la aplicación de tratamientos (G).	54
<b>Figura 3.</b> Embriones de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) de 10 HPF; saco vitelino (a), parte anterior (b) corion (c), parte posterior (d), espacio perivitelínico (e), membrana vitelina (f) (A); Embrión 10 HPF aumento (3X) estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón), saco vitelino (a), parte anterior (b) corion (c), parte posterior (d), espacio perivitelínico (e), membrana vitelina (f), ectodermo (g) (B); Selección de embriones, viables (translúcidos) – no viables (opacos) (flechas) (C); Empaque de embriones en tubos plásticos falcon (12 ml.) (D).	56
<b>Figura 4.</b> Distribución y aplicación de tratamientos a cada grupo de embriones (A) y (B); Observación de los embriones sometidos a tratamiento antes del enfriamiento con estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón) (C); Embriones 10 HPF en contacto con el diluyente crioprotector con expulsión de vitelo hacia espacio perivitelínico (flechas) (D).	59



**Figura 5.** Aplicación tiempo de equilibrio en cava de icopor (6,2°C X 10 min.) (A); Enfriamiento en congelador programable (Samsung RS20) (-14°C x 1 hora) (B); Descongelación por inmersión en agua de incubación (12 min.) (C); Vaciado de los grupos de embriones tratados en recipientes rotulados según el caso (D) - (E); Lavado de los embriones con agua de incubación (F); Observación de los embriones post-descongelación con estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón) (G); Embriones post descongelación con expulsión de vitelo hacia espacio perivitelinico (a), pliegues en corion (b), oscurecimiento de vitelo (c) (H). 61

**Figura 6.** Secuencia de procedimientos llevados a cabo durante el proceso de criopreservación de embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) 63

**Figura 7.** Siembra de los tratamientos en incubadoras experimentales tipo funil (2 lts) (A); Tanque de 500 Lts de capacidad de con instalación de incubadoras experimentales (B); Varilla de vidrio para conteo y clasificación de embriones (C) – (D); Larvas recién eclosionadas (flechas) (E); Larva en estado previo a la eclosión proveniente del tratamiento DMSO 12 – Glucosa 17% vista con estereoscopio binocular aumento 3X (Nikon SMZ 800, Japón) (F). 64

**Figura 8.** Viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) sometidos a diferentes sustancias crioprotectoras. Control (C); dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA). Se observa la diferencia en el porcentaje de viabilidad consolidado, para el control y cada uno de los dieciséis tratamientos aplicados. <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Valores mostrados como media  $\pm$  SEM. 65

**Figura 9.** Indica la diferencia en el porcentaje total de viabilidad consolidada de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al grupo control (sin tratamiento) y a cada uno de los cuatro tratamientos dispuestos a base de metanol; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA), hasta eclosión. <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). 67

**Figura 10.** Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de metanol (MET), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*\*). <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). 67

**Figura 11.** Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de dimetil sulfóxido (DMSO), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*\*). No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ni a lo largo del tiempo ( $p > 0.05$ ). 68

**Figura 12.** Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de etilén glicol (ETG), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*\*); <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). 68

**Figura 13.** Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10

HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de dimetil acetamida (DMA), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*\*). <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

69

**Figura 14.** Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad embrionaria consolidado, para embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), expuestos a los cuatro diferentes crioprotectores internos [metanol; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA)], en concentraciones del 12% y 20%, comparados con el control. <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> barras con letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

69

**Figura 15.** Indica las curvas de temperatura y velocidad de enfriamiento consolidadas para cada uno de los cuatro crioprotectores utilizados para el tratamiento de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), durante el tiempo de equilibrio a  $6,2^{\circ}\text{C} \times 10 \text{ min}$ .

72

**Figura 16.** Indica las curvas de temperatura y velocidad de enfriamiento consolidadas de cada uno de los cuatro crioprotectores utilizados para el tratamiento de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), durante la congelación a  $-14^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ hora}$ .

72

**Figura 17.** Indica las curvas de temperatura y velocidad de calentamiento consolidadas de cada uno de los cuatro crioprotectores utilizados para el tratamiento de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), durante la descongelación en agua de incubación a temperatura ambiente  $\times 12 \text{ min}$ .

73

**Figura 18.** Parte anterior de embrión decorionizado (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento control. Se observa vesícula óptica (vo) y saco vitelino (sv). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía de microscopía electrónica de barrido. Aumento (500x).

82

**Figura 19.** Eclosión de larvas vivas provenientes de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) sometidos a diferentes sustancias crioprotectoras. Control (C); metanol; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA). Se observa la diferencia en el porcentaje de eclosión consolidado, para el control y cada uno de los dieciséis tratamientos aplicados. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Valores mostrados como media  $\pm$  SEM.

88

**Figura 20.** Indica diferencia en porcentaje de eclosión total consolidado para embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), expuestos a cada una de las cuatro (4) clases de crioprotector; metanol ; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA), comparados con el control (embriones sin tratamiento). <sup>a,b,c</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

88

**Figura 21 .** Larva control de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*); parte anterior (pa); parte caudal (pc); saco vitelino (sv); somita (sm); ectodermo (ec); tubo digestivo distal (td); membrana vitelina (mv). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (120x).

89

**Figura 22.** Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente



xiv

al tratamiento control. Se observa, detalle de parte caudal del saco vitelino (sv); somita (sm); ectodermo (ec); tubo digestivo distal (td); membrana vitelina (mv). Fijación (formaldehido bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (500x). 89

**Figura 23.** Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento DMSO 12 - 10%, post-congelación. Se observa, parte anterior (pa); cola (c); membrana vitelina (mv); saco vitelino (sv); ectodermo (ec). Fijación (formaldehido bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (120x). 90

**Figura 24.** Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento MET 12 - 17 post-congelación. Se observa, parte anterior (pa); acortamiento de la cola (c); membrana vitelina (mv); saco vitelino (sv); somitas (sm); ectodermo (ec). Fijación (formaldehido bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (140x). 90

**Figura 25.** Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento DMSO 12 - 17 post-congelación. Se observa en detalle acortamiento del tercio medio de la cola (ac); membrana vitelina (mv); saco vitelino (sv); somitas (sm); ectodermo (ec). Fijación (formaldehido bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (500x). 91

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	18
2. ABSTRACT	19
3. INTRODUCCIÓN	20
4. CAPÍTULO 1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	21
<i>Tecnología de crioconservación para embriones de peces tropicales de importancia comercial</i>	21
<i>Resumen</i>	22
<i>Abstract</i>	23
<i>Introducción</i>	23
<i>Generalidades del embrión de peces</i>	25
<i>Ventajas de la criopreservación en embriones de peces</i>	26
<i>Problemática de la crioconservación para embriones de peces</i>	27
<i>Congelación de gametos y embriones</i>	28
<i>Componentes en la tecnología de crioconservación</i>	29
<i>Expectativas de investigación</i>	34
<i>Referencias bibliográficas</i>	36
5. OBJETIVOS	44
5.1. <i>Objetivo general</i>	44
5.2. <i>Objetivos específicos</i>	44
6. CAPÍTULO 2. <i>Crioconservación de embriones de Cachama blanca (Piaractus brachypomus) bajo diferentes soluciones crioprotectoras</i>	45
<i>Resumen</i>	45
<i>Abstract</i>	46
<i>Introducción</i>	47
<i>Materiales y métodos</i>	49
<i>Localización y descripción del área de estudio</i>	49



<i>Material biológico</i>	50
<i>Monitoreo de la calidad del agua</i>	51
<i>Inducción hormonal a la maduración final y obtención de embriones</i>	52
<i>Evaluación de características ovocitarias</i>	53
<i>Fertilización e incubación de huevos</i>	55
<i>Aplicación de diluyentes y empaque</i>	55
<i>Aplicación de protocolos de congelación – descongelación</i>	58
<i>Evaluación morfológica y determinación de viabilidad embrionaria pre-congelación y post-descongelación</i>	58
<i>Análisis estadístico</i>	62
<i>Resultados</i>	62
<i>Discusión</i>	91
<i>Referencias bibliográficas</i>	104
<b>7. CONCLUSIONES</b>	111
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	113
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	114

## 1. RESUMEN

Para perpetuar las especies ícticas, es necesario realizar estudios de técnicas para la conservación de su material genético. Este estudio, evaluó viabilidad de congelación de embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), obtenidos por reproducción artificial, de animales adultos inducidos hormonalmente según protocolo. Se evaluaron 16 tratamientos (n=4): cuatro crioprotectores, Metanol (MET), Dimetil sulfóxido (DMSO), Etilenglicol (ETG) y Dimetil acetamida (DMA) a concentraciones (12 y 20 %) y dos niveles de glucosa (10 y 17 %). La incubación se realizó en incubadoras Woynarovich de 200 L ( $26,8 \pm 0,1$  °C), tomándose muestras (6 ml) de embriones (10 HPF) (~422 embriones), empacándose en tubos plásticos (13 ml) en proporción 1:1 con el diluyente. El tiempo de equilibrio se realizó en cava refrigerada ( $6,2$  °C x 10 min.), llevando a conservación ( $-14$  °C x 1 hora) y posterior descongelación en baño de agua ( $27$  °C x 12 min.), continuando incubación en incubadoras (2 L) ( $26,8 \pm 0,1$  °C), evaluando viabilidad embrionaria hasta eclosión mediante muestreo (~30 embriones). Embriones sin tratamiento (control). El tratamiento DMSO 12 – 17 %, obtuvo mejor viabilidad embrionaria ( $93,3 \pm 6,1$  %) y el tratamiento MET 12 – 17 % mayor porcentaje de eclosión ( $92,76 \pm 4,5$  %). El tratamiento DMA 20 – 10 % presentó la menor viabilidad embrionaria ( $23,8 \pm 6,5$  %) sin eclosión. Conclusión, embriones de *P. brachypomus* (10 HPF) conservados ( $-14$  °C x 1 hora) en DMSO 12 – 17 % o MET 12 – 17 %, muestran viabilidad embrionaria y eclosión satisfactorios, sirviendo para establecer protocolos de conservación a  $-196$  °C.

**Palabras clave:** *Piaractus brachypomus*, conservación, eclosión, viabilidad embrionaria.



## 2. ABSTRACT

To perpetuate fish species, are necessary technical studies for the conservation of their genetic material. This study evaluated the feasibility of freezing embryos Pacu (*Piaractus brachypomus*), obtained per artificial reproduction, from hormonally induced adult animals according to protocol. 16 treatments were evaluated (n = 4): four cryoprotectants, methanol (MET), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (ETG) and dimethylacetamide (DMA) at concentrations (12 and 20%) and two levels of glucose (10 and 17%). Incubation was performed at 200 L Woynarovich incubators ( $26.8 \pm 0.1$  ° C), taking samples (6 ml) of embryos (10 HPF) (~ 422 embryos), packing in plastic tubes (13 ml) in proportion 1:1 with diluent. The equilibrium time was performed in cooled cava ( $6.2$  ° C x 10 min.) Carrying preservation ( $-14$  ° C x 1 hour) and subsequent thawing in water bath ( $27$  ° C x 12 min.) continuing incubation in incubators (2 L) ( $26.8 \pm 0.1$  ° C), assessing embryo viability until hatching through sampling (~ 30 embryos). Embryos without treatment (control). DMSO treatment 12 to 17%, obtained better embryo viability ( $93.3 \pm 6.1\%$ ) and MET treatment 12 to 17% higher hatching rate ( $92.76 \pm 4.5\%$ ). DMA treatment 20 to 10% had the lowest embryo viability ( $23.8 \pm 6.5\%$ ) without hatching. Conclusion, embryos of *P. brachypomus* (10 HPF) preserved ( $-14$  ° C x 1 hour) in DMSO 12 to 17% or MET 12 to 17%, showing satisfactory embryo viability and hatching, serving to establish conservation protocols at  $-196$  ° C.

**Keywords:** *Piaractus brachypomus*, conservation, hatching, embryo viability.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de crioconservación y vitrificación de embriones en peces se basan en estudios previos sobre los métodos aplicados en humanos, algunos mamíferos y semen de varias especies de peces. En Latinoamérica, países como Brasil y Colombia han venido siendo pioneros en el trabajo de estandarización de métodos para crioconservación de embriones, obteniendo porcentajes de viabilidad y fertilidad promisorios en peces nativos de importancia comercial como el Pacú (*Piaractus mesopotamicus*), (Ribeiro, 2008). Los beneficios de este proceso en embriones, radican en su habilidad para detener todos los procesos biológicos y colocar sus células en un estado de animación suspendida. Tal interrupción de la embriogénesis por un periodo de tiempo cualquiera, permite controlar la reproducción animal a partir de una rápida evolución en el campo de la criobiología, embriología y reproducción animal (Rall, 1992), que permite realizar programas para preservar la diversidad genética de especies amenazadas. Adicionalmente, tiene aplicación en crianza selectiva para mejoramiento de la resistencia de los animales a las enfermedades (Chen et al., 2005). También es importante tener en cuenta que factores como el tiempo de exposición, la concentración del crioprotector, el estado de desarrollo del embrión y las interacciones que existan por la influencia de todos estos factores simultáneamente, proveen evidencia acerca de la posibilidad de manipular la presión hidrostática, la temperatura de exposición al crioprotector, así como las condiciones osmóticas de los materiales siendo estos determinantes para el mejoramiento y optimización de los protocolos de exposición a los diferentes crioprotectores (Routray et al., 2002).

El nivel de absorción adecuado de los crioprotectores al interior de embriones de peces y el establecimiento de protocolos de congelación óptimos (temperatura y tiempo), reducen la formación de “hielo intracelular”, lo cual se reporta posiblemente como la principal causa, junto a la alta hidratación del mismo, de los

efectos letales sobre estas células durante el proceso de congelación (Zhang et al., 1996).

En Colombia, la aplicación de la crioconservación se ha venido implementando mediante la realización de trabajos dirigidos hacia la conservación a temperaturas criogénicas de gametos masculinos de especies nativas como el yamú (*Brycon amazonicus*) (Cruz et al., 2006), cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (Fresneda et al., 2004; Navarro et al., 2004) y algunos silúridos (Ramírez, 2010), sin embargo, trabajos orientados a la conservación de embriones completos de especies nativas aún no han sido implementados en el país, abriendo una gran posibilidad de investigación que permita desarrollar protocolos efectivos de conservación y desarrollo tecnológico.

#### **4. MARCO TEÓRICO**

##### **4.1 Capítulo 1**

##### ***Tecnología de crioconservación para embriones de peces tropicales de importancia comercial***

Embryo - cryopreservation Technology for tropical fish of commercial importance

González-González J.

Universidad de los Llanos, Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos GRITOX, Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, Km 12 vía Puerto López, A.A. 110, Villavicencio, Meta, Colombia.

[javier.gonzalez@correo.policia.gov.co](mailto:javier.gonzalez@correo.policia.gov.co)

## Resumen

La aplicación adecuada y el entendimiento de la criopreservación de material biológico son fundamentales en laboratorios y bancos de células. Esta revisión recopila información concerniente a su aplicación en embriones de peces tomando como base las experiencias realizadas en diferentes especies tropicales que incluyen géneros con un alto potencial en la acuicultura continental, sin embargo, las investigaciones en este campo son escasas. El conocimiento de ciertos parámetros inherentes al proceso y de las características específicas de la célula, pueden incidir en la viabilidad del producto congelado en pro de lograr la técnica adecuada. La introducción de esta tecnología en la industria piscícola ha generado beneficios respecto al aumento de la población y la diversificación de especies de interés comercial. Este capítulo se basará en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y/o el tejido, pues este proceso es afectado por diferentes variables como permeabilidad celular, volumen osmóticamente inactivo y relación superficie/área de la célula, la cual es variable de acuerdo a la especie, tipo y estadio de la célula a congelar. La crioconservación incluye aspectos importantes como la eficiencia de los protocolos en la disminución de los daños causados por el estrés mecánico y los cambios marcados de temperatura que inducen lesiones a nivel del corion y estructuras internas de los embriones, siendo estas condiciones, las principales responsables de la disminución en el porcentaje de viabilidad embrionaria luego de la aplicación de esta técnica. El hallar el protocolo adecuado será lo que garantice el funcionamiento y viabilidad celular.

**Palabras clave:** crioconservación, embriones, especies tropicales, importancia comercial.

## Abstract

Proper application and understanding of the cryopreservation of biological material are critical in laboratories and cell banks. This review collects information concerning their application in fish embryos on the basis of experiences in different genres including tropical species with a high potential for inland aquaculture, however, research in this field are scarce. The knowledge of certain parameters of the process and specific characteristics of the cell, can affect the viability of the frozen product towards achieving the proper technique. The introduction of this technology in the aquaculture industry has generated benefits with respect to population growth and diversification of commercial species. This chapter is based on knowledge of the physicochemical properties of the cell and / or tissue, as this process is affected by many variables such as cell permeability, osmotically inactive volume and surface / area relation of the cell, which is variable according the kind, type and stage of the cell to freeze. Cryopreservation includes important aspects such as efficiency of the protocols in reducing the damage caused by mechanical stress and strong changes in temperature that induce marked injury to the chorion and internal structures of the embryos, being these conditions, the primary responsibility for decrease in the percentage of embryonic viability after the application of this technique. Finding the appropriate protocol for ensure the functioning and cell viability.

**Keywords:** cryopreservation, embryos, tropical species, commercial importance.

## Introducción

Los inicios de la criobiología datan desde 1940, cuando Luyet y Gehenio, publican el clásico "Vida y Muerte a bajas temperaturas", que fue la base para los descubrimientos de Polge (Polge et, al., 1949) y que viene logrando grandes



avances en las últimas décadas, principalmente en criocirugía y criopreservación, esperándose beneficios en lo referente a tratamientos sin dolor o derramamiento de sangre (Zhmakin, 2009), la conservación de la biodiversidad y la superación de las dificultades médicas, mediante la posibilidad de crioconservar sin fertilizar oocitos y espermatozoides, entre muchas otras clases de material biológico (Royere y Bernard, 1996). Los avances en la investigación sobre la criopreservación de gametos y embriones de organismos acuáticos son moderados en comparación con el trabajo hecho en los animales terrestres y plantas (Chao y Liao, 2001). Sin embargo, la crioconservación de embriones de peces ha sido estudiada desde 1978 (Wittingham y Rosenthal, 1978), sin lograrse de manera exitosa en especies ícticas (Calvi y Maisse, 1998; Chao y Liao, 2001; Cabrita et al., 2003; Xiao et al., 2008). Como resultado a los estudios realizados sobre la crioconservación de embriones de peces, se han podido establecer dos métodos de crioconservación, la refrigeración lenta controlada y la vitrificación (Lin et al., 2009). Una crioconservación exitosa está sujeta a dos factores principales propuestos por Mazur en 1970 y 1972, la primera consiste en que las células pueden ser dañadas por la formación de hielo intracelular y por la recristalización cuando son congeladas a una tasa de enfriamiento más alta que la óptima; y la segunda consiste en los "efectos solución" letales que pueden sufrir las células, cuando experimentan enfriamientos por debajo de la tasa óptima. La aplicación de esta biotecnología en embriones de peces implica una serie de procesos fisicoquímicos y dinámicos de la temperatura y el transporte del agua entre el embrión y el medio circundante (Bart, 2000). Para lograr una crioconservación exitosa, el movimiento rápido del agua y de los crioprotectores a través de la membrana es esencial (Delgado et al., 2005; Jr. et al., 2005), los cuales deben ser ajustados cuidadosamente en un protocolo (Beirão et al., 2006). Así mismo, deberá ser analizado teniendo en cuenta varios factores como la toxicidad del crioprotector y la velocidad de congelación y descongelación.

Así las cosas, se hace indispensable un esquema no solo cualitativo sino



cuantitativo de los procesos biofísicos que los biomateriales experimentan durante la crioconservación., siendo indispensable una herramienta analítica cuantitativa, modelos matemáticos que permitan comprender y cuantificar las respuestas biofísicas de células y tejidos expuestos a protocolos de enfriamiento - calentamiento; dichos estudios, generaron en la criobiología cuantitativa un gran progreso, Kleinhans en 1.998, afirmó que el formalismo de “dos-parámetros” y el modelo Kedem-Katchalsky, son frecuentemente usados por criobiólogos para determinar la permeabilidad del agua y los crioprotectores en la membranas celulares. Algunos modelos cuantitativos que describen la cinética de la pérdida de agua, formación de hielo intracelular y crecimiento de las células durante la congelación, fueron desarrollados y aplicados ampliamente en búsqueda de diseños de criopreservación más adecuados en su aplicación (Weng, et al., 2010).

Dentro del contexto nacional y teniendo en cuenta lo anterior, es imperante la necesidad de contribuir a la preservación de la diversidad e integridad genética de las especies, aumentar su posibilidad de reproducción por fuera de la estación reproductiva, facilitar el movimiento e intercambio de material genético y facilitar la disminución de la presión sobre las poblaciones silvestres, ello se genera mediante la estandarización de protocolos encaminados a la crioconservación de sus gametos y embriones. De igual forma, para producir especies de importancia comercial, es necesario tener un abastecimiento permanente de gametos y embriones viables, que aseguren una disponibilidad constante de larvas, lo cual puede obtenerse a través de la reproducción artificial.

### **Generalidades del embrión en peces.**

El embrión de los peces teleósteos guarda características morfológicas especiales a modo de gran tamaño (1 - 7 mm. de diámetro) (Chen et al., 2005); dado por la abundante cantidad de vitelo, que ocupa un 95% representado en agua y varias barreras estructurales como el corion exterior, membranas celulares de variable

permeabilidad a 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., 1997; Chen et al., 2005).

Cuando el huevo inicia su hidratación, el corion se separa del vitelo, a los 00:08 minutos comienza el período de “cigote”, se forma el blastodisco, y aparece el espacio perivitelino. A los 00:10 minutos comienza el período de “clivaje”, donde se observa el paso de 2 a 64 células entre los 10 minutos y 1:45 horas pos inseminación. El período de “Blástula” y “Gástrula” se caracterizan por la formación del epiboly y el tubo ectodermal (diferenciación de cabeza y cola). A las 10:05 horas aproximadamente se da el engolfamiento del vitelo. Seguido a las 11:00 horas por el período de “Segmentación”, continuando con el de faringulación correspondientes al desarrollo de somitas (rudimentos de la columna vertebral), diferenciación de órganos básicos, vesícula óptica y los segmentos del mesodermo; a las 17:10 horas se diferencia claramente el saco vitelino y las somitas. Alrededor de las 19:00 horas pos-inseminación se da la eclosión de las larvas (Botero et al., 2004).

### **Ventajas de la crioconservación de embriones de peces.**

Los beneficios de este proceso, radican en su habilidad para detener todos los procesos biológicos y colocar sus células en un estado de animación suspendida. Tal interrupción de la embriogénesis por un periodo de tiempo cualquiera, permite controlar el proceso reproductivo, a partir del rápido avance de la criobiología, embriología y reproducción animal (Rall, 1992), que permite realizar programas para preservar la diversidad genética de especies amenazadas y su aplicación en crianza selectiva para mejoramiento de la resistencia de los animales a las enfermedades (Chen et al., 2005), siendo importante para la producción de semilla, manejo genético de los reproductores (Cabrita et al., 2003), la



conservación de especies en peligro de extinción y el manejo de poblaciones silvestres en la piscicultura, (Chao y Liao, 2001; Liu et al., 2001; Kusuda et al., 2002), permitiendo almacenamientos por periodos largos de tiempo a bajo costo (Bart, 2000).

### **Problemática de la crioconservación para embriones de peces.**

La insuficiente deshidratación y penetración de los crioprotectores dentro de los embriones por su gran tamaño (1-7mm), debido a un alto contenido en saco vitelino y por la presencia de membranas y compartimientos con diferentes soluciones, son las principales causas por las cuales no se ha logrado con éxito la congelación de embriones de peces teleósteos (Cabrita et al., 2003; Cabrita et al., 2006), conllevando problemas como la formación de cristales de hielo intracelular y daños por enfriamiento (Chen y Tian, 2005). Así mismo, una de las estructuras que impide el intercambio de agua y crioprotector es el corion que rodea al embrión (Cabrita et al., 2003), cuya morfología difiere según la especie (Robles et al., 2007). Para superar estos obstáculos, es necesario conocer diferentes aspectos como toxicidad, combinación y concentración del crioprotector, junto con protocolos de refrigeración adecuados; estudios preliminares realizados sobre la sensibilidad a la congelación, permeabilidad y toxicidad de los crioprotectores, demostraron ser problemas durante el proceso de crioconservación de embriones de peces (Cabrita et al., 2003). Actualmente existen procedimientos convencionales para la crioconservación de embriones que causan sensibilidad en estos, debido a que proveen las condiciones requeridas para minimizar la mortalidad por la formación de hielo intracelular y los daños por lesiones osmóticas (Chen y Tian, 2005). Estos métodos, tales como el congelador programable, se basan en la refrigeración relativamente lenta y controlada durante la formación temprana de hielo, demostrando ser apropiada para la criopreservación de espermatozoides pero no siempre para la criopreservación de embriones (Chao y Liao, 2001).

## **Congelación de gametos y embriones.**

Las técnicas de crioconservación y vitrificación de embriones en peces se basan en estudios previos sobre los métodos aplicados en humanos, algunos mamíferos y semen de varias especies de peces. En Latinoamérica, países como Brasil y Colombia han venido siendo pioneros en el trabajo de estandarización de métodos para crioconservación de embriones, obteniendo porcentajes de viabilidad y fertilidad bajos en peces nativos de importancia comercial como el Yamú (Arias, 2006). Los beneficios de este proceso en embriones, radican en su habilidad para detener todos los procesos biológicos y colocar sus células en un estado de animación suspendida. Tal interrupción de la embriogénesis por un periodo de tiempo cualquiera, permite controlar la reproducción animal a partir de una rápida evolución en el campo de la criobiología, embriología y reproducción animal (Rall, 1992); que permite realizar programas para preservar la diversidad genética de especies raras y amenazadas a futuro. Adicionalmente, tiene aplicación en crianza selectiva para mejoramiento de la resistencia de los animales a las enfermedades (Chen et al., 2005).

También es importante tener en cuenta que factores como el tiempo de exposición, la concentración del crioprotector, el estado de desarrollo del embrión y las interacciones que existan por la influencia de todos estos factores a la vez, proveen evidencia en la posibilidad de manipular la presión hidrostática, la temperatura de exposición al crioprotector así como las condiciones osmóticas de los materiales siendo estos determinantes para el mejoramiento y optimización de los protocolos de exposición a los diferentes crioprotectores (Routray et al., 2002).

### *Mecanismos fisiológicos (hidratación)*

La incorporación de agua al oocito durante su maduración meiótica, se denomina hidratación, que es la principal causa del aumento de volumen de agua en éste. Así 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 (90-95%) y una flotabilidad positiva en la columna de agua, que facilita tanto el aporte de oxígeno al embrión como su dispersión en el medio marino (Cerdá, 2002). Lo anterior hace que los embriones pelágicos de teleósteos presenten un obstáculo de consecuencias incluso más determinantes para su criopreservación, como es su elevado contenido en agua. Los huevos pelágicos experimentan una remarcable hidratación durante su formación, llegando a alcanzar el contenido de agua en el huevo y en los embriones tempranos hasta casi el total de su peso. Dicha característica facilita, por su elevado reservorio de agua la formación de hielo intracelular durante la congelación. El proceso de hidratación del huevo es de enorme trascendencia para la criopreservación de embriones de especies de interés en acuicultura, ya que muchas de ellas producen gametos femeninos y embriones muy hidratados, por tal motivo, se hace prioritario un conocimiento detallado de los mecanismos fisiológicos que conducen a la hidratación de los embriones en estas especies con el fin de diseñar métodos de vitrificación más adecuados a estas especies (Cerdá, 2002). El modelo 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 (Cerdá, 2002).

### **Componentes en la tecnología de crioconservación.**

Los procesos de crioconservación involucran varios aspectos dentro del proceso, como la dilución de los embriones con los diluyentes, concentración de las

sustancias crioprotectoras, periodo de equilibrio, tasas de congelación, volúmenes de empaque y tiempos de descongelación.

### *Diluyentes*

Los diluyentes son soluciones que tienen como función proteger la integridad del embrión ante la acción tóxica de los productos generados por su propio metabolismo, de los crioprotectores, así como los cambios bruscos de temperatura y el aumento en el volumen del embrión (Zhang et al., 1996; Chao et al., 2001). Para el proceso de crioconservación de embriones en peces los diluyentes se han generado con ciertas características en su composición, como son: la ausencia de sustancias tóxicas, simulación con la composición y osmolaridad interna del embrión de cada especie, capacidad amortiguadora para proteger a los embriones de las variaciones de pH, poseer sustancias que favorezcan la anaerobiosis, tales como citratos, fosfatos, glucosa, fructosa, yema de huevo y leche (Serean et al., 2005 citado por Rawson et al., 2005).

### *Agentes crioprotectores*

Los agentes crioprotectores, como el dimetilsulfóxido, glicerol, metanol, polietilenglicol, sucrosa, entre otros poseen características como: solubilidad en soluciones acuosas de electrolitos, capacidad de atravesar las membranas celulares e inocuidad a altas concentraciones; estos componentes centran su efecto en la deshidratación y la concentración del citosol controlada, con mínimos daños por la cristalización en el citosol durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Chao et al., 2001; Lua et al., 2005). Manteniendo así la viabilidad del embrión o célula, durante un periodo determinado previniendo el daño celular durante el proceso de congelación y descongelación, por la reducción de la formación de hielo intracelular el cual es el principal causante de mortalidad durante la criopreservación (Cerdá, 2002). 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



(Babin et al., 2006); siendo eficaces en la crioconservación de tejidos y embriones de animales y vegetales (Cerdá, 2002).

La toxicidad del crioprotector cambia con el estado de desarrollo del embrión y su concentración. Para estados de mórula y medio de epiboly en estudios realizados con Carpa (*Cyprinus carpio*) por (Dinnyes et al., 1998) en embriones, observo que el glicerol afecta más la tasa de eclosión larvaria que el dimetil sulfóxido (DMSO) y el metanol. Para la etapa de latido cardiaco la afección fue menor con metanol comparado con glicerol y este a su vez, fue superado por el efecto presentado con dimetil sulfóxido en una hora de exposición al crioprotector. Por lo cual una solución compuesta de 10% de glicerol + 20% de propil glicol o 20% de glicerol + 10% propil glicol es menos toxica que soluciones del 30% de glicerol o propil glicol solos. Igualmente otra prueba de la acción conjunta de los crioconservantes puede ser dada al adicionar un componente neutralizante de la toxicidad de otros, como la acetamida que es considerada ser una neutralizadora toxica que mitiga daños y efectos tóxicos del DMSO (Chao et al., 2001; Albarracin, 2005). Sin embargo se han reportado embriones viables protegidos con 8 -14% de dimetil sulfóxido (Me<sub>2</sub>SO) a -55°C (Hagedorn et al., 2004).

#### *Volumen de empaque*

El volumen del recipiente en el que los embriones se empaican para los diferentes procesos de almacenamiento en refrigeración-congelación, han demostrado ser de significativa importancia, reportándose que el uso de pajillas de 1 ml permite envasar grandes volúmenes de embriones y son más adecuados para la vitrificación en razón a que producen una tasa mayor de embriones morfológicamente intactos luego de la descongelación, atribuyendo lo anterior a la menor presión existente entre ellos comparada con la que se presenta en pajillas de 0.5 ml, pero con las desventajas de una presión mecánica y distribución agua-crioconservantes desigual, las cuales son mayores alrededor de los embriones situados más externamente que en los del centro. Se han obtenido porcentajes de

49% de embriones intactos post-congelación mediante el método de pajillas y 80% mediante el método individual de congelación en rejilla de cobre, pero este último no aplicaría para programas de almacenamiento a gran escala (Robles, 2003). Algunos autores reportan el buen uso de pajillas de 0.25 ml, 0.5 ml, para la colección de los embriones y su posterior refrigeración y congelación (Lin et al., 2009), o el uso de tubos de ensayo y/o pajillas (IMV France) con el fin de llevarlos a temperatura de vitrificación según el caso (Cabrita et al., 2003). También se han utilizado tubos Eppendorf de 1.5 ml (Zhang et al., 2003). Para la presente investigación serán usados tubos Falcon los cuales poseen una capacidad de 13 ml, ocupando parte de ese volumen (6 ml) con embriones para completar un volumen total de 12 ml con un diluyente preparado previamente antes de su aplicación con el fin de llevar los embriones allí colectados, a temperaturas de congelación.

#### *Tasas de congelación.*

Se han reportado estudios de lesiones producidas por refrigeración, velocidad de enfriamiento y toxicidad del crioprotector en varios estados de desarrollo del embrión en distintas especies de peces, estableciéndose que la criopreservación para embriones de peces es más difícil que la reportada para oocitos y embriones de mamíferos (Chao et al., 2001; Chen et al., 2005). La vitrificación, o congelación ultrarrápida se presenta como una alternativa a la congelación tradicional y permite eliminar los daños asociados a la susceptibilidad al frío y a la formación de cristales de hielo, particularmente en la rehidratación extensiva, el daño osmótico, el incremento de la fuerza iónica concentrada y las soluciones eutécticas (Katkov et al., 2006); pasando rápidamente por la zona de mayor peligro que está situada entre los 15 y los  $-5^{\circ}\text{C}$  (Martino et al., 1996; Albarracín, 2005); solidificando a baja temperatura sin que el citosol se llegue a cristalizar debido a un enorme incremento de la viscosidad (Fahy, 1986); manteniendo la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación (Fahy et al., 1984; Albarracín, 2005). Las temperaturas en el proceso van desde un rápido enfriamiento a  $4^{\circ}\text{C}$ , hasta



alcanzar temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  (Leveroni et al., 1998); donde el punto más crítico se da en la baja de temperatura entre los  $0^{\circ}\text{C}$  a  $-40^{\circ}\text{C}$  (Chao et al., 2001).

Este tipo de proceso utiliza altas concentraciones de solutos (crioprotectores y azúcares) que eliminan rápidamente el agua de la célula y favorecen la entrada de los crioprotectores, permitiendo almacenar en nitrógeno líquido (congelación ultrarrápida) o con vapores de nitrógeno (congelación rápida). Las tasas de congelación conseguidas con estas técnicas se encuentran entre los ( $11000$  a  $14000^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ) (Martino et al., 1996; Albarracín, 2005). Por ello, los protocolos de congelación rápida se dividen en dos subcategorías dependiendo si existe (congelación rápida o ultrarrápida) o no (vitricación), esta última no debe presentar formación de cristales de hielo intracelular o extracelular, durante la congelación y descongelación; lo cual si puede ocurrir con trazas en la congelación ultrarrápida (Shwan et al., 2000; Albarracín, 2005).

El principal objetivo de un protocolo de vitricación debe ser la disminución de la toxicidad sin una pérdida de la efectividad de los agentes crioprotectores (Hagedorn et al., 2004). Esta técnica se ha desarrollado en embriones de mamíferos con bastante éxito y representa en la actualidad una de las perspectivas de futuro para la congelación de embriones en peces (Cabrita et al., 2006); aclarando que si el rango de congelamiento es muy rápido (de  $-4$  a  $-8$  grados centígrados hasta llegar  $-196^{\circ}\text{C}$  de inmediato), hay posibilidad de no disponer de tiempo suficiente para la deshidratación celular, provocando lisis por cristalización intracelular (Chao et al., 2001; Cabrita et al., 2003). En contraste si el rango de enfriamiento es muy suave o lento, los embriones pueden presentar daños irreparables, por deshidratación excesiva del citoplasma (Mazur, 1963; Mazur, 1990; Hagedorn et al., 1997). Así la velocidad de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores, los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentración de electrolitos

intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas de la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto y/o el contacto entre células (Chao et al., 2001; Cerdá, 2002; Albarracín, 2005), comprendiendo temperaturas desde la recolección celular hasta la baja de temperatura a  $-9^{\circ}\text{C}$ , teniendo a las temperaturas hipotérmicas como promedio a los  $4^{\circ}\text{C}$  para un almacenaje durante periodos cortos de 1 a 4 días (Arav et al., 1994; Chao et al., 2001). Al respecto, Martínez et al., (2008), reportó estudios sobre periodos cortos de preservación térmica embriones, en los que se han demostrado ciertas proteínas conocidas como de histéresis térmica (THPs) o “proteínas anti-congelamiento” (AFPs), las cuales pueden interactuar con la membrana celular y proteger a los embriones expuestos a temperaturas hipotérmicas ( $4^{\circ}\text{C}$ ), siendo este efecto más evidente cuando son refrigerados bajo altas velocidades de enfriamiento en presencia de metanol (Zhang et al., 2003).

#### *Determinación de la velocidad de enfriamiento – calentamiento*

Existen muchos reportes respecto a que para la mayoría de los tipos celulares, la formación de hielo intracelular es letal. Más aún cuando se ha demostrado que una tasa de enfriamiento y calentamiento altas reducen drásticamente el porcentaje de supervivencia, ya que coinciden con la formación de hielo intracelular Mazur (1977), reportado por Pegg (2010). Lo anterior, basado en que la probabilidad de formación de hielo intracelular, es controlada por la tasa de enfriamiento y la permeabilidad de las células al agua; si el enfriamiento es lo suficientemente lento, teniendo en cuenta el área, el volumen y la tasa de conductividad hidráulica de la célula, el agua podrá salir de la misma cuando la temperatura baje, formando únicamente hielo extracelular, que es inocuo.

#### **Expectativas de investigación.**

América Latina y el Caribe, es la región del mundo que presenta la mayor tasa de crecimiento en su producción acuícola, (FAO, 2009). El crecimiento medio anual

de la acuicultura en la región fue de 22% para el periodo entre 1970 - 2006, mientras que el promedio mundial fue de 8,8%, lo que tiene una enorme importancia a futuro en la reducción de la extracción de recursos naturales marinos y dulceacuícolas. La producción nacional de peces de cultivo está representada principalmente por especies como la tilapia, la trucha y la cachama, cuya participación conjunta desde 1993 ha sido del 96,3% del total de la piscicultura y del 65,3% de la producción acuícola. En particular, la producción de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) ha participado en 31% de la actividad piscícola, concentrándose en la región de la Orinoquía, donde el departamento del Meta participó con el 14,5% (1.140 Ton) de la producción nacional en el año 2005 (Espinal, 2005). Teniendo en cuenta que las especies ícticas nativas de las cuencas pertenecientes al territorio Colombiano presentan un ciclo reproductivo estacionario (al inicio del año durante la época de lluvia), hace que la disponibilidad de alevinos durante todo el año sea limitada, obligando a la comunidad científica a implementar biotecnologías que coadyuven en la satisfacción de la demanda de peces en esta época, como lo es la crioconservación de embriones de peces.



## Referencias bibliográficas

Albarracín, J., 2005. Vitrificación de ovocitos de bovinos mediante la técnica open pulled straw, Tesis de doctorado Universidad Autónoma de Barcelona.

Arias, J.A., 2006. Estado actual del conocimiento sobre el yamú (*Brycon amazonicus*) Instituto de Acuicultura (IALL) de la Universidad de los Llanos, A.A. 24-30, Villavicencio, Colombia.

Arav, A., Rubinsky, B., Seren, E., et al. 1994. The role of thermal hysteresis protein during cryopreservation of oocitos and embryos. *Theriogenology* 41 (1):107-112.

Babin, J. P., André, M., Forge, J., Knoll-Gellida, A., Rawson, D.M., & Zhang, T., 2006. Development of oocyte viability molecular signature (OVMS) assays for zebrafish (*Danio rerio*) oocyte cryopreservation studies. *Cybiurn*, 32 (2) suppl.: 217.

Bart, A., 2000. New approaches in cryopreservation of fish embryos. *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society 179 – 187.

Beirão, J., Robles, V., Herráez, M.P.C., Sarasquete, Dinis, M.T., Cabrita, E., 2006. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 261 897–903.

Botero, M., Fresneda, A., 2004. Descripción del desarrollo embrionario de cigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macroporum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17 (4): Suplemento.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., Herráez, M.P., 2003. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot

embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 47: 204–213.

Cabrita, E., Chereguini, O., Luna, M., Paz, P.d., Herráez, M.P., 2003. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 221, 593-604.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Paz, P.d., Anel, L., Herráez, M.P., 2003. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology* 60, 463-473.

Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C., Sarasquete, M.C., Herráez, M.P., 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 251: 245 – 255.

Calvi, S.L., Maise, G., 1998. Cryopreservation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Blastomeres: Influence of Embryo Stage on Postthaw Survival Rate. *Cryobiology* 36, 255-262.

Cerdà, J., 2002. Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 18, 145-152.

Cruz, P.E., Medina, V.M., Velasco, Y., 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19, 152-159.

Chao, N.H., Liao, I.C., 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos Taiwan Fisheries Research Institute, 199 Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan. *Aquaculture* 197:161–189.

Chen, S.L., Tian, Y.S., 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63: 1207-1219.

Delgado M. Valdez Jr., Akira Miyamoto, Takao Hara, Shinsuke Seki, Magosaburo Kasai, Edashige, K., 2005. Water- and cryoprotectant-permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology* 50, 93-102.

Dinnyés, A., Urbányi, B., et, al. 1998. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* 50: 1-13.

Espinal, C., Martínez H., González F., 2005. La cadena de la piscicultura en Colombia. "Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005". Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 4-5.

Fahy, G.M., Farlane, M., Angell, C. A., Meryman, H.T., 1984. Vitrification as an approach cryopreservation. *Cryobiology* 21(4): 407 -426.

Fahy, G. M., 1986. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. *Pro Clin. Biol. Res* 224:305-335.

Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E., Ángel, M.O., 2004. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17, 46-52.

Hagedorn, M., Hsu E., Kleinhans, F.W., and Wildt, D.E., 1997. New Approaches for Studying the Permeability of Fish Embryos: Toward Successful Cryopreservation1. *Cryobiology* 34:335–347 Article CY972014.

Hagedorn M, Kleinhans F. W, Wildt D. E, Rall W. F, 1997. Chill sensitivity and

cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology* 34:251–63.

Hagedorn, M., Paterson, A., Mazur, P., Kleinhans, F.W., 2004. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow – freezing is not an option. *Cryobiology* 49, 181–189.

Hochi S., Akiyama, M., Minagawa, G., Kimura, K., and Hanada, A, 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. *Cryobiology* 42 (1): 69 – 73.

Jr, D.M.V., Miyamoto, A., Hara, T., Edashige, K., Kasai, M., 2005. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology* 64, 112-122.

Jr, D.M.V., Miyamoto, A., Hara, T., Seki, S., Kasai, M., Edashige, K., 2005. Water and cryoprotectant permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology* 50, 93-102.

Katkov, I., Isachenkob, V., Isachenkob, E., Kim, M. S., Lulatd, A.G., Mackay, A.M., Levine, F., 2006. Low- and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells. *International Journal of Refrigeration* 29: 346–357.

Kusuda, S., Teranishi, T., Koide, N., 2002. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology* 45, 60-67.

Lin, C., Spikings, E., Zhang, T., Rawson, D.M., 2009. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. *Cryobiology* 59, 42-47.



Lin, C., Spikings, E., Zhang, T., Rawson, D., 2009. Housekeeping genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. *Theriogenology* 71: 1147-1155.

Lua, I., Erogluc, A., Kirsten, M.C., Sadlera, B., 2005. Cryopreservation of starfish oocytes Fisun Hamaratog. Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Cryobiology .United States 50: 38–47.

Martínez, S., Pérez, S., Robles, V., Anel, L., Herraéz., M.P., 2008. Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non – invasive method. *Cryobiology* 56: 216 – 222.

Martino, A., Songsasen, Leibo, S.P., 1996. Development into blastocysts of bovine ovocytes cryopreserved by ultra rapid cooling. *Biol Reprod* 54(5): 1059 – 1069.

Mazur, P., 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* 47, 347–369.

Mazur, P., Leibo, S.P., Chu, E.H., 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp. Cell Res.* 71:2, 345.

Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology* 14, 254.

Mazur, P., 1990. Equilibrium, quasi – equilibrium, nonequilibrium freezing of the mammalian embryos, *Cel Biophys.* 17(1):53-92.

Navarro, O.J., Velasco Y.M., Cruz Casallas, P.E., 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17: Suplemento: 53-59.



Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de pesca y acuicultura, 198.

Pegg, D.E., 2010. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology* 60, S36–S44.

Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 4172, 666.

Portillo, L., Madero, J., López, Claudia., 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57 (4): 291 – 300.

Rall, W. F., 1992. Cryopreservation of oocitos and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science* 28 (1-4): 237-245.

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

Ramírez, J.A., 2010. Evaluación de la calidad y crioconservación seminal del bagre rayado (*Pseudoplatystoma sp.*), bajo diferentes protocolos de congelación, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Maestría en Acuicultura. Universidad de los Llanos, Villavicencio, pp. 108.

Rawson, D. M., Zhang, T., 2005. New approaches to the Cryopreservation of fish oocytes and embryos. The role of biotechnology. Italia.

Ribeiro, P., 2008. Utilización de crioprotectores intra y extracelulares en embriones de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Tesis de doctorado. Centro de Ciencias

Agrarias. Universidad Estadual de Maringá

Robles, V., Real, M., Álvarez, R., and Herráez, M.P., 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* 47, 30-39.

Robles, V., Cabrita, E., Paz, P.d., Herráez, M.P., 2007. Studies on chorion hardening inhibition and dechorionization in turbot embryos. *Aquaculture* 262, 535-540.

Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., Lansac, J., 1996. Cryopreservation of spermatozoa: review. *Hum. Reprod. Update* 2:6, 553.

Routray, P., Susuki, T., Strussmann, C. A., Takai, R., 2002. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka (*Oryzias latipes*). *Theriogenology* 58: 1483-1496.

Shwan, J.M., Oranratnachai, A., Trouson, A.O., 2000. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarium tissue. *Theriogenology* 53(1): 59-72.

Weng, L., Li, W., Zuo, J., 2010. Kinetics of osmotic water flow across cell membranes in non-ideal solutions during freezing and thawing. *Cryobiology* 61, 194–203.

Wittingham, D.G., Rosenthal, H., 1978. Attempts to preserve herring embryos at subzero temperatures. *Arch Fischereiwiss* 29, 75-79.

Xiao, Z.Z., Zhang, L.L., Xu, X.Z., Liu, Q.H., Li, J., Ma, D.Y., Xu, S.H., Xue, Y.P., Xue, Q.Z., 2008. Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* 70, 1086-1092.

Zhang, T., Rawson, D.M., 1996. Feasibility studies on vitrification of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Criobiology*, 33: 1-13.

Zhang, T., Liu, X.H., et al. 2003. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 59: 1545-1556.

Zhmakin, A.L., 2009. *Fundamentals of Cryobiology: Physical Phenomena and Mathematical Models*. Springer - Verlag.

## 5. OBJETIVOS

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la viabilidad de congelación de embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), obtenidos por reproducción artificial.

### **5.2 Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de diferentes sustancias crioprotectoras y niveles de glucosa sobre la viabilidad embrionaria pre y post-congelación de embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) obtenidos por reproducción artificial.

Determinar el porcentaje de eclosión de embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) obtenidos por reproducción artificial y sometidos a sustancias crioprotectoras y nivel de glucosa para su congelación.

Contribuir a la estandarización de un protocolo de congelación para embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) obtenidos por reproducción artificial.

## 6. Capítulo 2

### **Crioconservación de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), bajo diferentes soluciones crioprotectoras**

Cryopreservation of embryos from cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)  
under different cryoprotective solutions

González-González J.

Universidad de los Llanos, Grupo de Investigación sobre Reproducción y  
Toxicología de Organismos Acuáticos GRITOX, Instituto de Acuicultura de la  
Universidad de los Llanos, Km 12 vía Puerto López, A.A. 110, Villavicencio, Meta,  
Colombia.

[javier.gonzalez@correo.policia.gov.co](mailto:javier.gonzalez@correo.policia.gov.co)

### **Resumen**

Los protocolos de congelación para embriones de peces, son estrategias de conservación de especies en peligro o comerciales. Este estudio evaluó viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), bajo cero, en presencia de crioprotectores. Se evaluaron 16 tratamientos (n=4): cuatro crioprotectores, Metanol (MET), Dimetil-sulfóxido (DMSO), Etilenglicol (ETG) y Dimetil-acetamida (DMA)}, a concentraciones de 12 y 20% y dos niveles de glucosa (10 y 17%). La incubación se realizó en incubadoras Woynarovich de 200L (26,8±0,1°C), tomando 6ml de embriones (10HPF) (~422 embriones), empacándolos en tubos plásticos de 13 ml en proporción 1:1 con el diluyente. El tiempo de equilibrio se realizó en cava refrigerada (6,2°Cx10 min); llevándolos a

conservación (-14°Cx1hora). La descongelación se realizó en baño de agua (27°Cx12min); continuando incubación en incubadoras experimentales de 2L (26,8±0,1°C), evaluando viabilidad hasta eclosión mediante muestreo (~30 embriones). Embriones sin tratamiento (control). El tratamiento DMSO 12–17%, presentó la mejor viabilidad embrionaria (94.14 ± 0.96%), significativamente diferente (p<0.05) de, MET (12–10%, 20–10% y 20–17%); DMSO (20-17 %); ETG (12–10%, 20–10% y 20–17%) y los tratamientos con DMA y el tratamiento MET 12–17% mayor eclosión (92.77±3.79%), diferente significativamente (p<0.05) respecto a, MET (20–10% y 20–17%); ETG (12–10%, 20–10% y 20–17%) y los tratamientos con DMA. El tratamiento DMA 20–10 % presentó la menor viabilidad embrionaria (23,8±6,5%) sin eclosión. Concluyendo, embriones de *P. brachypomus* (10HPF), conservados en DMSO 12–17% o MET 12–17% a -14°Cx1hora, reflejan viabilidad embrionaria y eclosión satisfactorios, hacia protocolos de conservación a -196°C.

**Palabras clave:** conservación, eclosión, peces comerciales, viabilidad embrionaria

### Abstract

Freezing protocols for fish embryos are conservation strategies of endangered or commercial species. This study evaluated embryo viability Pacu (*Piaractus brachypomus*) below zero, in the presence of cryoprotectants. 16 treatments were evaluated (n = 4): four cryoprotectants, methanol (MET), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (ETG) and dimethylacetamide (DMA), at concentrations of 12 and 20% and two levels of glucose (10 and 17%). Incubation was performed in incubators Woynarovich 200L (26.8 ± 0.1 ° C), taking 6ml of embryos (10HPF) (~ 422 embryos) packing them in plastic tubes of 13ml 1:1 with diluent. The equilibrium time was in cooled cava (6.2 ° Cx10min.), Leading them to storage (-14 ° Cx1hora). Thawing was performed in a water bath (27 ° Cx12min) continuing

experimental hatchery incubation 2L ( $26.8 \pm 0.1$  ° C) until hatching viability assessed by sampling (~ 30 embryos). Embryos without treatment (control). 12-17% DMSO treatment had the best embryo viability ( $94.14 \pm 0.96\%$ ), significantly different ( $p < 0.05$ ), MET (12-10%, 20-10% and 20-17%), DMSO (20 - 17%) ETG (12-10%, 20-10% and 20-17%) and DMA treatments and treatment MET hatching 12-17% higher ( $92.77 \pm 3.79\%$ ), significantly different ( $p < 0.05$ ) respect, MET (20-10% and 20-17%) ETG (12-10%, 20-10% and 20-17%) and DMA treatments. DMA treatment had the lowest 20-10% embryo viability ( $23.8 \pm 6.5\%$ ) without hatching. In conclusion, *P. embryos brachypomus* (10HPF), preserved in DMSO MET 12-17% or 12-17% to  $-14^{\circ}\text{C} \times 1\text{hora}$  reflect embryo viability and hatching satisfactory to preservation protocols to  $-196$  ° C.

**Keywords:** conservation, hatching, commercial fishes, embryo viability

## Introducción

La criopreservación como tecnología aplicada a la conservación de los embriones de peces en la acuicultura tiene un papel importante en la producción de semillas, manejo genético de los reproductores y la conservación de los recursos acuáticos. A partir de la década de los 70, esta técnica se ha aplicado con éxito en varias especies de mamíferos (Rall, 1993), sin embargo, la aplicación de esta técnica a los embriones de peces sigue siendo un problema. Los principales esfuerzos se han realizado con especies de agua dulce, como el pez cebra y la carpa (Zhang y Rawson, 1996; Leveroni et al, 1996). El obstáculo primordial, es el control del flujo de salida y entrada de agua y crioprotector, a través del embrión o dentro y fuera de sus compartimientos (Hagedorn et al., 1997). Una de las estructuras que obstaculizan este intercambio es el corion que rodea al embrión durante su desarrollo. Esta capa externa está compuesta principalmente de glucoproteínas y confiere protección contra daños mecánicos y el estrés osmótico. La

permeabilidad del corion varía según la especie y los cambios durante el desarrollo (Hagedorn y Kleinhans, 2002) y podría actuar como una barrera a la penetración de soluciones crioprotectoras. Zhang y Rawson (1996) demostraron que el corion del pez cebra es permeable al agua, solutos y algunos crioprotectores. Varios métodos han sido utilizados para permeabilizar y mejorar la permeabilidad del crioprotector en peces, ejemplo de ello es la eliminación mecánica del corion o la digestión enzimática que se utilizaron en embriones del pez cebra (Zhang y Rawson, 1996; Hagedorn et al, 1997) y embriones carpa (Leveroni et al., 1996). Estos métodos pueden ser tóxicos o perjudiciales para los embriones que afectan a la viabilidad del embrión. La viabilidad de los métodos de permeabilización no siempre es clara, ya que es difícil determinar la entrada del crioprotector y el movimiento del agua. Los cambios volumétricos de embriones se suelen utilizar para detectar la deshidratación y rehidratación de embriones y, de esta manera, evaluar la permeabilidad al crioprotector, sin embargo, la aplicación de estos métodos en los embriones de los peces tiene problemas específicos debido al desconocimiento de su mecanismo de regulación osmótica (Hagedorn et al., 1997). Otros métodos se han utilizado para determinar la entrada del crioprotector al embrión, Magnus et al., (1995) utilizó crioprotectores radiomarcados en la carpa, mientras que Suzuki et al., (1995) utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de DMSO en varias especies de peces, y Hagedorn et al., (1997) comprobó la entrada de diferentes crioprotectores en el pez cebra mediante microscopía de resonancia magnética. Lo anterior, hace necesario continuar investigaciones que permitan simplificar, describir y consolidar paquetes tecnológicos para congelación de embriones de peces de agua dulce.

La cachama blanca "*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818", nativa de las cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas es considerada como la especie de mayor potencial productivo y comercial en la piscicultura extensiva, semi intensiva e intensiva de aguas cálidas continentales de América tropical; es resistente al





manejo en cautiverio, presenta alta docilidad, rusticidad y resistencia a enfermedades con fácil adaptación a condiciones limnológicas desfavorables por períodos no prolongados (Mesa et al., 2007). Los esfuerzos de investigación en cachama blanca en Colombia, han sido orientados principalmente al conocimiento de su biología, anatomía y hematología básica, sanidad, hábitos alimenticios, requerimientos, criopreservación de gametos y manipulación de su ciclo reproductivo bajo condiciones de cautiverio (Fresneda y Lenis, 2004; Martino, 1994). Los estudios morfológicos de la cachama blanca se han centrado en la descripción macro y microscópica del bazo, la descripción del tejido sanguíneo y la organización general del sistema circulatorio (Eslava et al., 1995; Herrera et al., 1996; Pardo et al., 1999 y Mesa et al., 2007).

Por tanto, el presente estudio tuvo como fin, evaluar el efecto de la crioconservación, sobre la morfología y viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestos a cuatro crioprotectores internos (Metanol, Dimetilsulfóxido, Etilenglicol y Dimetilacetamida), en dos porcentajes (12% y 20%), mas la adición de un crioprotector externo (glucosa) en dos porcentajes (10% y 17%), para un total de dieciséis tratamientos; cuyos resultados, contribuyen al diseño de métodos de crioconservación de embriones, adecuados para la especie.

## **Materiales y métodos**

### **Localización y descripción del área del estudio.**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de Peces Tropicales de la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, localizado a 4 Kilómetros de la ciudad de Villavicencio,

Departamento del Meta, en la vereda Barcelona. El clima se caracteriza por una altura promedio de 420 metros sobre el nivel del mar, temperatura de 25°C, precipitación pluvial de 4050 mm y humedad relativa del 75%.

### Material biológico.

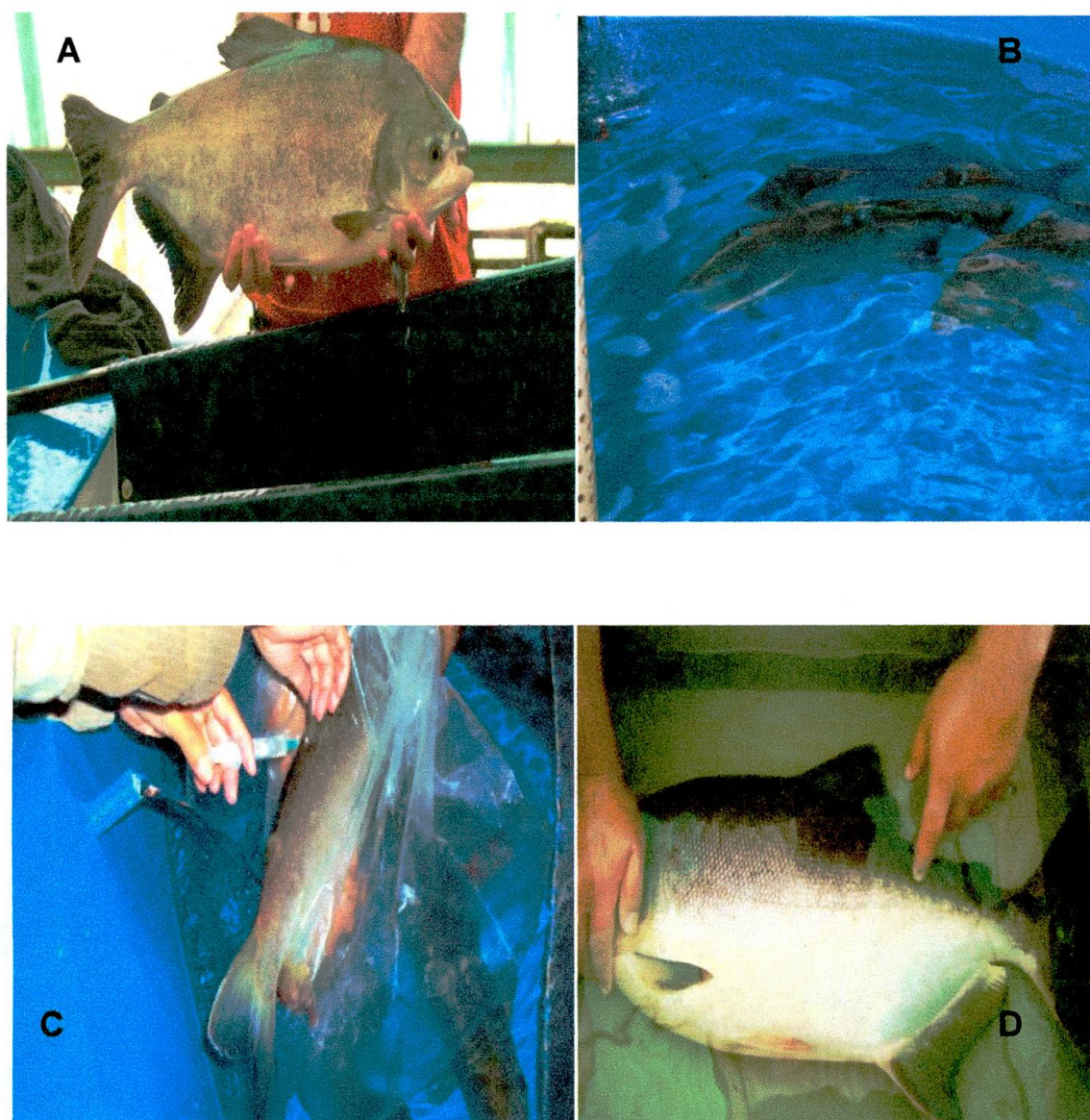


Figura 1. Secuencia en la que se observa: Selección del material biológico (A); Pileta circular de manejo de reproductores (6 m<sup>3</sup>) (B); Inducción hormonal (C) y Procedimiento de anestesia de los reproductores (D).

Fueron utilizados hembras y machos adultos de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), con un peso promedio de  $5\pm 1$  Kg, provenientes del Laboratorio de Reproducción de Peces Tropicales, de la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL – UNILANOS); para la selección de los ejemplares, se tuvo en cuenta desarrollo corporal y condición de madurez sexual, la hembra se evaluó mediante biopsia ovárica, para determinar el estado de desarrollo de los oocitos y la posición de sus núcleos según Arias (2006). En machos se determinó por la presencia de semen en la papila urogenital después de un masaje cráneo-caudal del abdomen. Los ejemplares fueron pescados y trasladados a piletas circulares de manejo ( $6\text{ m}^3$ ), donde permanecieron durante 48 horas, con el propósito de habituarlos a las condiciones experimentales, administrar los tratamientos de inducción de maduración final de las gónadas para propiciar el desove y la espermiación (ver figura 1). Los reproductores fueron identificados por colores mediante la inserción de señaladores superficiales instalados sobre la base de la aleta dorsal, registrando, la longitud total (cm) y peso corporal (kg) (Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources - National Research Council, USA (1996)).

### **Monitoreo de la calidad del agua.**

Antes y durante cada una de las jornadas experimentales, se registraron los siguientes parámetros físico - químicos de los estanques que alojaron a los reproductores y al agua presente dentro de las incubadoras experimentales, así:

- Oxígeno disuelto. Se determinó con oxímetro digital (Sonda multiparamétrica YSI 556); procurando mantener un rango entre 3,0 a 6,0 ppm.
- Conductividad eléctrica. Se midió con la sonda para conductividad eléctrica del equipo YSI 556. Se procuró conservar un rango entre 20 a  $50\text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

- Potencial hidrogeniónico (pH). Se midió con la sonda para potencial hidrogeniónico del equipo YSI 556, procurando mantener un rango de pH entre 6,0 a 7,0.
- Temperatura. Se tomó mediante equipo adecuado (Sonda multiparamétrica YSI 556), al agua de todos los tanques en los que se instalaron las incubadoras experimentales, al momento de sembrar los embriones control y luego al sembrar los embriones que previamente habían sido sometidos al contacto con diferentes crioprotectores, luego a congelación (a  $-14^{\circ}\text{C}$  por una hora) y por último a descongelación. Procurando mantener el rango entre  $26$  y  $28^{\circ}\text{C}$ .

### **Inducción a la maduración final y obtención de embriones.**

Para la maduración final y ovulación de las hembras estas fueron inducidas mediante la administración intramuscular de extracto de hipófisis de carpa (EHC, Stoller Fisheries, USA) a dosis de  $5.75 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso corporal, distribuida en tres aplicaciones, a las 0 ( $0.25 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), 24 ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) y 36 horas ( $5.0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) del tratamiento hormonal.

Para los machos el aumento seminal se indujo administrando  $4.0 \text{ mg.kg}^{-1}$  de EHC, en una sola inyección, aplicada simultáneamente con la segunda inyección de la hembra (ver figura 1).

La extracción de gametos se realizó mediante masaje cráneo-caudal del abdomen entre 6 y 9 horas después de la última dosis con el inductor. Previamente los reproductores fueron tranquilizados por inmersión en 2-fenoxietanol (300 ppm, Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, USA), durante 5 min, hasta la pérdida del eje de nado (Velasco, 2006); los animales fueron extraídos y secados en la región abdominal aplicándose una leve presión para provocar la expulsión de orina y heces evitando así contaminar la muestra.

Los oocitos se recibieron en un recipiente plástico seco y limpio, a su vez, el semen se colectó en tubos de vidrio estériles. Las muestras fueron mantenidas bajo condiciones de laboratorio ( $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ); para las posteriores evaluaciones macroscópicas y microscópicas se tomó el protocolo descrito por Cruz (2006), dentro de los 30 minutos siguientes a la obtención de la muestra (ver figura 2)

### **Evaluación de características ovocitarias.**

Las características más comunes en las hembras maduras son el abultamiento del abdomen como consecuencia del crecimiento de los oocitos (vitelogénesis), y el enrojecimiento de la papila genital; mientras que en la muestra de oocitos se deben observar el tamaño de estos, la homogeneidad del color, la posición de la vesícula germinal y la posición del núcleo de los mismos (Arias, 2006). Es de vital importancia tener conocimiento del momento exacto de la maduración final y ovulación de la hembra inducida, para proceder al desove con las características descritas anteriormente.

El muestreo de huevos se realizó mediante biopsia ovárica, empleando para ello sondas plásticas, con el propósito de obtener muestras de oocitos, los cuales se colocaron en un recipiente y cubiertos con suero fisiológico para la determinación del diámetro oocitario. Posteriormente, los oocitos se depositaron en una caja de petri y una vez retirado el suero fisiológico se procedió a adicionar una solución aclaradora (Líquido de Serra), constituida de 7 partes de etanol, 2 partes de formol y 1 parte de ácido acético glacial, en la cual se dejaron aclarar para verificar la posición del núcleo (central, migrando, periférico, ausente), que es un indicador del grado de maduración de los oocitos. La mayoría de los oocitos presentaron núcleos en migración, indicando que los individuos fueron aptos para ser inducidos (Senhorini, 2005).

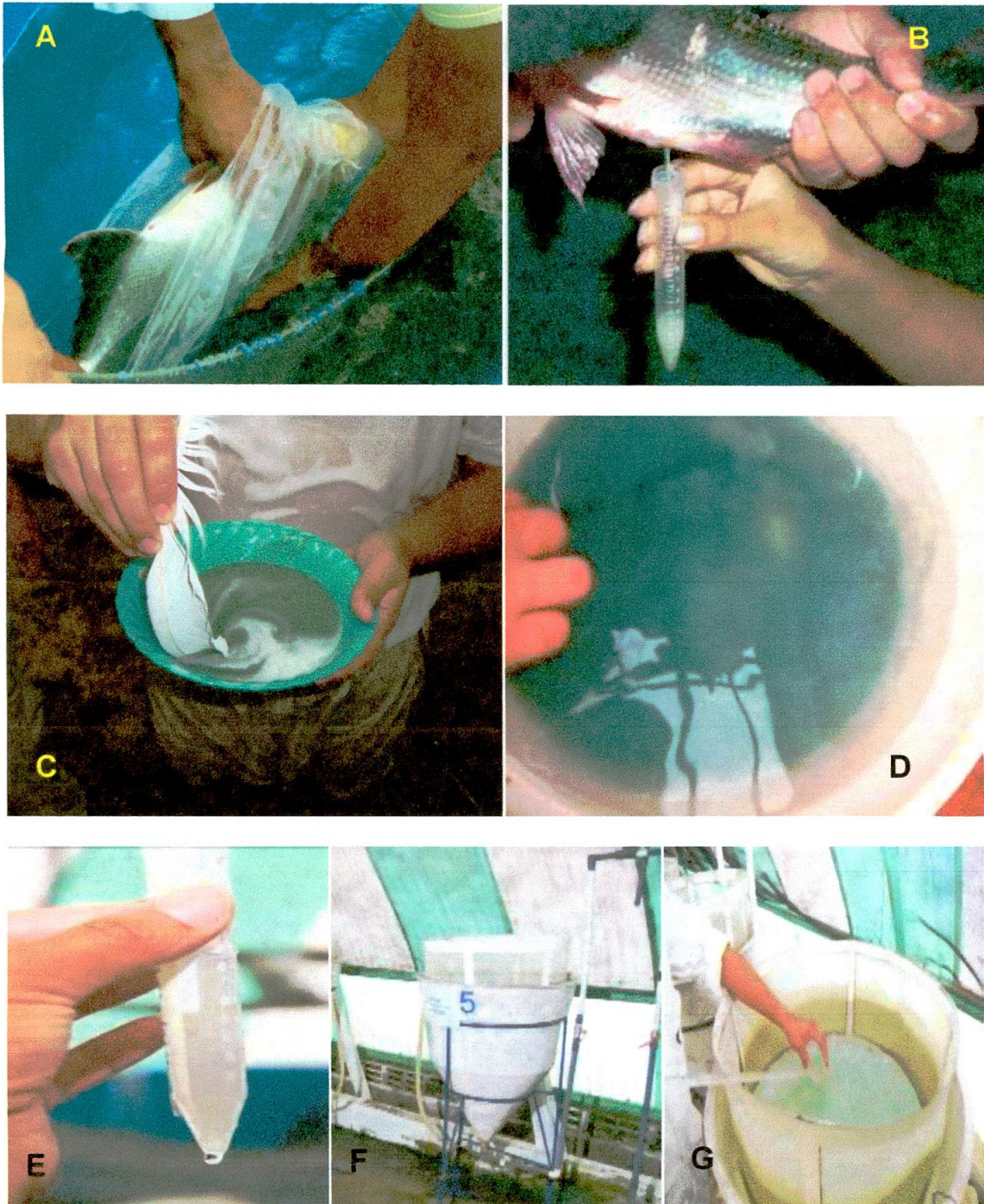


Figura 2. Secuencia en la que se observa: Obtención de oocitos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (A); Obtención de semen (B); Fertilización de los oocitos (C); Activación de espermatozoides (D); Conteo de embriones en 6 cc. (E); Incubación por 10 horas (incubadora woynarovich) (F); Toma de muestras de embriones 10 HPF previo a la aplicación de tratamientos (G).

## **Fertilización e incubación de huevos.**

La fertilización se realizó durante los primeros minutos posteriores al desove, para evitar daños morfológicos y disminución de la fertilidad, mezclando uniformemente el semen fresco sobre los oocitos, anotando la hora de la activación de los espermatozoides mediante la adición de agua de incubación por un lapso de 5 minutos de fecundación e hidratados mediante varios lavados, durante 20 minutos (ver figura 2), luego, se tomó muestra de embriones para conteo (ver figura 3) y finalmente se colocaron en incubación en dos incubadoras experimentales (Mojica, 2002) Woynarovich con 200 L (Cruz, 2006) de capacidad de flujo ascendente durante 1 hora, posteriormente, luego de diez horas post-fertilización (10 HPF), se tomaron muestras que fueron distribuidas según la aplicación de los tratamientos propuestos (ver tabla 1), seguidamente, se sometieron a periodos de equilibrio, congelación y descongelación; posteriormente, los embriones se sembraron por separado de acuerdo a cada tratamiento aplicado, incluyendo 6 muestras control (sin tratamiento) en incubadoras experimentales tipo funil con 2.0 L de capacidad y flujo ascendente, evaluando la viabilidad embrionaria cada hora hasta eclosión o muerte de los embriones mediante el uso de un tubo de embolo en vidrio transparente (ver figuras 4, 5 y 7).

## **Aplicación de diluyentes y empaque.**

### *Empaque*

Las muestras para cada tratamiento se envasaron hasta 6 ml de embriones en tubos Falcon de 13 ml de capacidad, por medio de pipeta de Pasteur (Brand, Germany); la aplicación de tratamientos se realizó luego de 10 horas post-fertilización, llevando el volumen de empaque de 6 a 12 ml con diluyente, agitando suavemente, hasta lograr un contacto uniforme con los embriones.

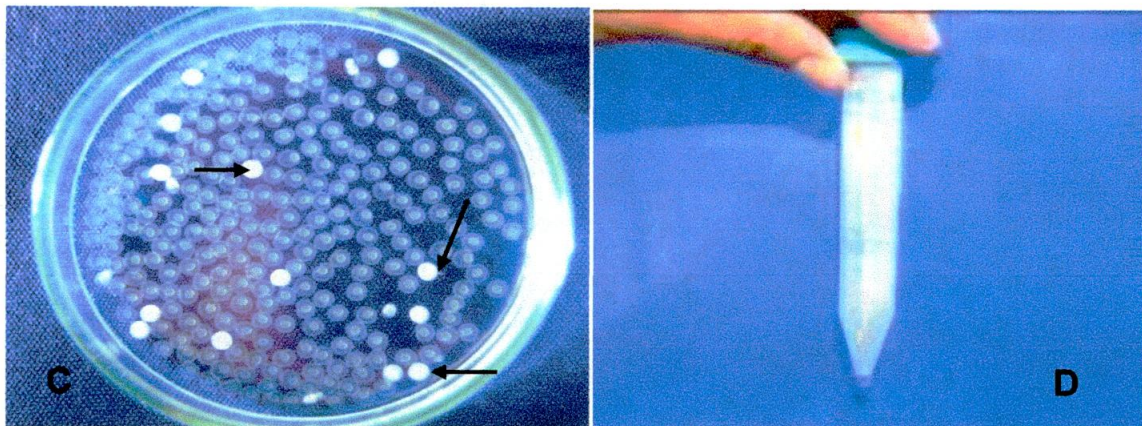
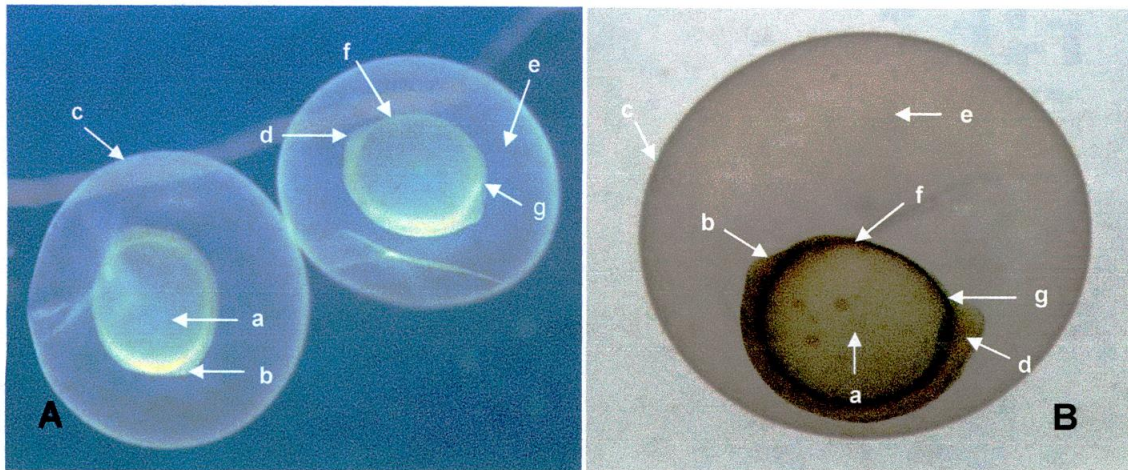


Figura 3. **A.** Embriones de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) de 10 HPF; saco vitelino (a), parte anterior (b) corion (c), parte posterior (d), espacio perivitelínico (e), membrana vitelina (f), ectodermo (g). **B.** Embrión (10 HPF). Aumento (3X) estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón); saco vitelino (a), parte anterior (b) corion (c), parte posterior (d), espacio perivitelínico (e), membrana vitelina (f), ectodermo (g). **C.** Selección de embriones, viables (translúcidos) y no viables (opacos) (flechas). **D.** Empaque de embriones en tubos plásticos falcon (12 ml).

#### *Aplicación de diluyentes.*

Para los tratamientos se utilizó Glucosa reactiva (Sigma-Aldrich, USA) a concentraciones de 10 y 17%, tomándola en polvo mediante cucharilla plástica estéril y pesando 5 y 8,5 grs. respectivamente a través de una báscula electrónica (400grs. Ohaus, USA). Adicionalmente, el diluyente incluyó Solución Salina Fisiológica al 0.9% ( NaCl 0.9%) + Crioprotector al porcentaje programado,



Tabla 1. Tratamientos (TTO) aplicados a cada una de las muestras de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de 10 HPF, los porcentajes corresponden a un volumen final de 50 ml, para cada diluyente (crioprotector soluble + crioprotector insoluble + solución salina al 0,9%).

Tratamiento	Crioprotector soluble	Crioprotector insoluble	Disolvente
1	Metanol al 12%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
2	Metanol al 20%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
3	Metanol al 12%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
4	Metanol al 20%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
5	Etilenglicol 12%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
6	Etilenglicol 20%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
7	Etilenglicol 12%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
8	Etilenglicol 20%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
9	Dimetil Sulfóxido 12%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
10	Dimetil Sulfóxido 20%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
11	Dimetil Sulfóxido 12%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
12	Dimetil Sulfóxido 20%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
13	Dimetil Acetamida 12%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
14	Dimetil Acetamida 20%	Glucosa al 10%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
15	Dimetil Acetamida 12%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%
16	Dimetil Acetamida 20%	Glucosa al 17%	Solución Salina Fisiológica al 0.9%

llevando a un volumen final de 50 ml. Para esto, inicialmente se depositó en un beaker 15 ml de solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) y la glucosa, mezclando con un agitador de vidrio hasta disolverla totalmente. Seguidamente, se tomó el volumen necesario de cada uno de los crioprotectores (6 ml para la concentración de 12% y 10 ml para la concentración de 20%) mediante pipeta de vidrio con capacidad de 5ml y se agregó al beaker que contiene la glucosa correspondiente para cada tratamiento (ver figura 4). Las muestras se empacaron en tubos Falcon de 13 ml, en proporción 1:1 (6ml de embriones: 6ml de diluyente). Se tomaron embriones de 10 Horas Post Fertilización (HPF) para cada uno de las réplicas de

los tratamientos, teniendo como base cuatro crioprotectores experimentales: Metanol (MET, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Etilen-glicol (ETG, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis) y Dimetil Acetamida (DMA, Sigma Chemical Co., St. Louis), a concentraciones del 12 y 20%. Finalmente, se constituyeron 16 tratamientos con cuatro replicas cada uno, obteniendo un modelo de fórmula de 4x2x2 (ver tabla 1).

### **Aplicación de protocolos de congelación-descongelación.**

Una vez envasados los embriones con cada tratamiento, se dio inicio al periodo de congelación. Cada tratamiento fue sometido a un periodo de equilibrio en una cava de icopor con hielo a 6.2 °C durante 10 minutos, para favorecer el ingreso de los crioprotectores al interior de los embriones, llevando luego las muestras a congelación a una temperatura de -14° C por una hora en un congelador programable (Samsung RS20- 555lt, USA). Inmediatamente después, se realizó la descongelación mediante inmersión de las muestras en agua de incubación a temperatura ambiente (28°C) durante 12 minutos, dicho lapso, se estandarizó basándose en el tiempo que duraron los tratamientos en igualar la temperatura del agua circundante. Las mediciones de temperatura dentro de los tratamientos fueron tomadas por medio de dos termocouplas (Fluke 51 K/J Thermemoeter, USA) digitales cuyo sensor se ubicó en contacto directo con los tratamientos congelados y el baño de agua de descongelación (ver figura 5).

### **Evaluación morfológica y determinación de viabilidad embrionaria pre-congelación y post-descongelación.**

#### *Evaluación morfológica pre-congelación.*

Se tomaron inicialmente dos muestras de embriones de los tratamientos control mediante varilla de vidrio para realizar los siguientes procesos antes de ser congelados; una primera muestra de embriones fue colocada en caja de petri con

agua de incubación, para registro fotográfico de los embriones con aumento 3X mediante un software de imagen ACT-2U, conectado a un controlador (Nikon Digital Sight, DS-U1) y éste a una cámara digital (Nikon Digital Sight, DS-5M,

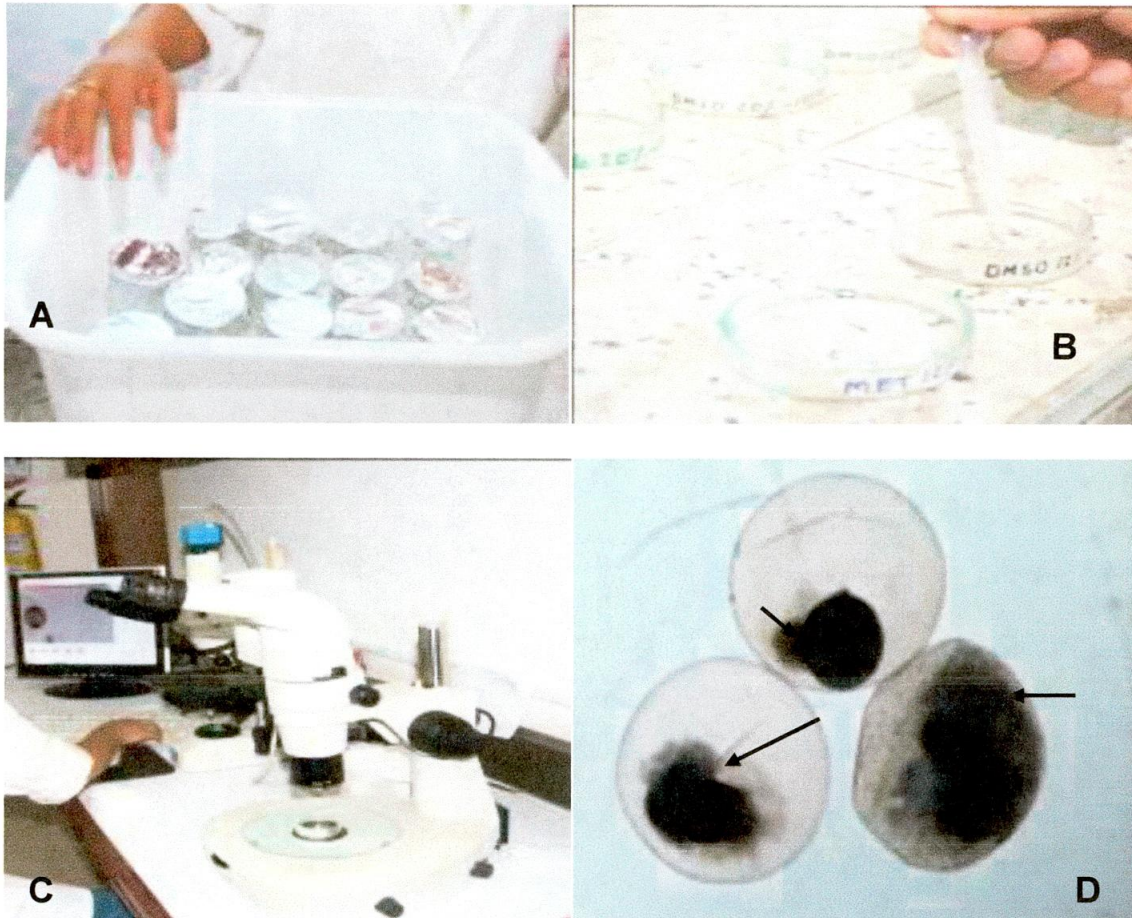


Figura 4. Distribución y aplicación de tratamientos a cada grupo de embriones (A) y (B); Observación de los embriones sometidos a tratamiento antes del enfriamiento con estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón) (C); Embriones 10 HPF en contacto con el diluyente crioprotector con expulsión de vitelo hacia espacio perivitelínico (flechas) (D).

Japón) ajustada a un estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón). Dicho registro fotográfico fue realizado con dos objetivos principales: observar y registrar el estado de desarrollo en el cual los embriones fueron congelados (10HPF), teniendo como referencia la hora cero de iniciada la incubación artificial del control y evaluar la morfología embrionaria pre-congelación (estado del corion y de las

estructuras del embrión) sin la adición de diluyentes, para tomarlos como referencia y así compararlos con las muestras a las que se les adicionó diluyentes en sus respectivas concentraciones. La segunda muestra se dividió en dieciséis sub-muestras repartidas en cajas de petri, donde a cada una se le añadió un tratamiento (ETG 12%, ETG 20%, MET 12%, MET 20%, DMSO 12%, DMSO 20%, DMA 12% Y DMA 20%), cada uno de los anteriores acompañados de concentraciones de glucosa al 10 y 17% mediante pipeta plástica de pasteur. A estas sub-muestras, se les tomó registro fotográfico con aumento 3X a través del mismo software de imagen utilizado anteriormente para las muestras control, con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración del diluyente sobre la morfología de los embriones pre-congelación, observando el estado del corion y de las estructuras del embrión. Las muestras se compararon con los registros fotográficos obtenidos de los embriones control (ver figura 4).

#### *Evaluación morfológica post-descongelación.*

Pasada la hora de congelación a  $-14^{\circ}\text{C}$  y una vez descongelados los embriones, se obtuvo una sub-muestra de cada uno de los dieciséis tratamientos mediante pipeta plástica de pasteur (Brand, Germany), colocándolas en cajas de petri identificadas con el nombre del diluyente al que correspondió cada muestra. Se tomó registro fotográfico post-descongelación con aumento de 3X mediante software de imagen ACT-2U, conectado a un controlador (Nikon Digital Sight, DS-U1) y este a una cámara digital (Nikon Digital Sight, DS-5M, Japón) ajustada a un estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón). En esta etapa, el objetivo del registro fotográfico fue observar la morfología de los embriones para determinar si había o no cambios en las estructuras del embrión. Se tuvo como referencia las imágenes obtenidas de los embriones pre-congelación impregnados en los diluyentes (ver figura 5). Durante la incubación, se midió la viabilidad de los embriones cada hora en todas las muestras hasta la muerte de los mismos u obtención de eclosión, tomando tres muestras representativas al azar de cada réplica, refiriendo las larvas no eclosionadas sobre el total de larvas contadas

(treinta larvas) en cada medición o muestreo (ver figura 7). El resultado de la eclosión se expresó en porcentaje (%) (ver figura 6).

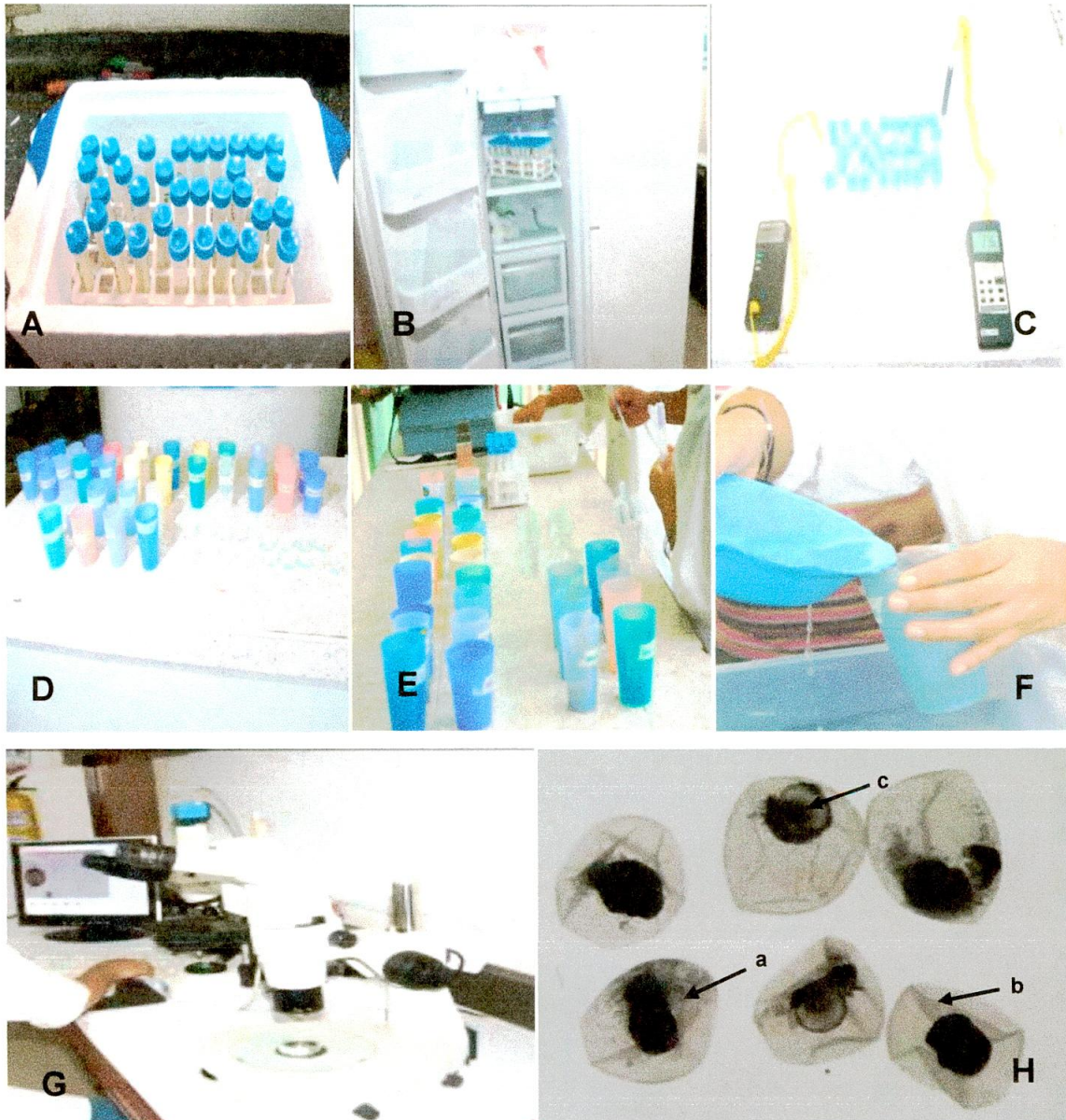


Figura 5. Aplicación tiempo de equilibrio en cava de icopor (6,2°C X 10 min.) (A); Enfriamiento en congelador programable (Samsung RS20) (-14°C x 1 hora) (B); Descongelación por inmersión en agua de incubación (12 min.) (C); Vaciado de los grupos de embriones tratados en recipientes rotulados según el caso (D) - (E); Lavado de los embriones con agua de incubación (F); Observación de los embriones post-descongelación con estereoscopio binocular (Nikon SMZ 800, Japón) (G); Embriones post descongelación con expulsión de vitelo hacia espacio perivitelinico (a), pliegues en corion (b), oscurecimiento de vitelo (c) (H).

## **Análisis estadístico.**

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado en el tiempo, efecto fijo, balanceado, donde los tratamientos fueron asignados aleatoriamente, en arreglo factorial 4x2x2, donde los factores fueron: crioprotector (DMA, DMSO, MET Y ETG); concentración de crioprotector (12% y 20%); concentración de glucosa (10% y 17%), como variable respuestas se evaluaron porcentajes (%) de viabilidad y eclosión. Los análisis fueron expresados de manera descriptiva exploratorio unidimensional por medio de la media, error estándar (SEM) y coeficiente de variación. Se validaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas por medio del test de Kruskal- Wallis y el test de Levene's, respectivamente, tomando como nivel de significancia ( $p < 0.05$ ). Puesto que las variables de respuesta no cumplieron con los supuestos del modelo, estas fueron transformadas Box Cox (raíz cuadrada), sin que los supuestos se cumplieran por tanto los datos fueron organizados por medio de ranks para proceder al ANOVA de dos vías y posterior test the Tukey para comparar las diferencias entre tratamientos. En todos los casos, ( $p < 0.05$ ), fue usado como nivel de significancia para diferencias estadísticas entre tratamientos. Los datos fueron analizados con el software SAS versión 9.2 para Windows (2002-2008 por SAS Institute Inc, Cary, NC. USA).

## **Resultados**

### *Viabilidad post-descongelación.*

La figura 8 y la tabla 2, muestran la media y el error estándar de los porcentajes de viabilidad embrionaria consolidada de los tratamientos aplicados durante el estudio, destacando que las soluciones crioprotectoras compuestas por DMSO 12 % - glucosa 17 % y MET 12 % - glucosa 17 %, con porcentajes de viabilidad embrionaria de  $94.14 \pm 0.96\%$  y  $93.68 \pm 0.91\%$ , respectivamente, fueron superiores a los resultados obtenidos por la muestra control ( $89.27 \pm 0,73 \%$ ), sin

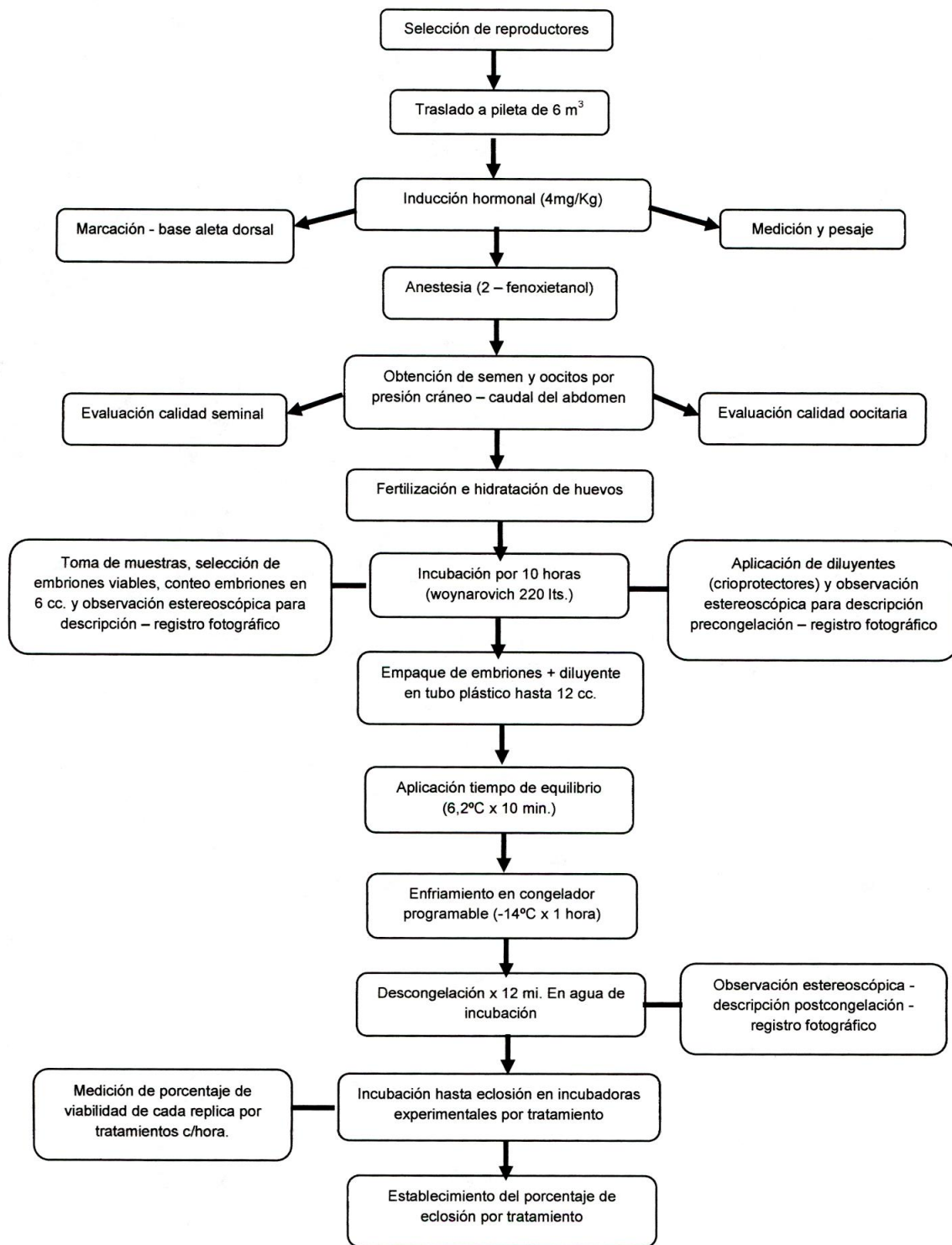


Figura 6. Secuencia de procedimientos llevados a cabo durante el proceso de crioconservación de embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

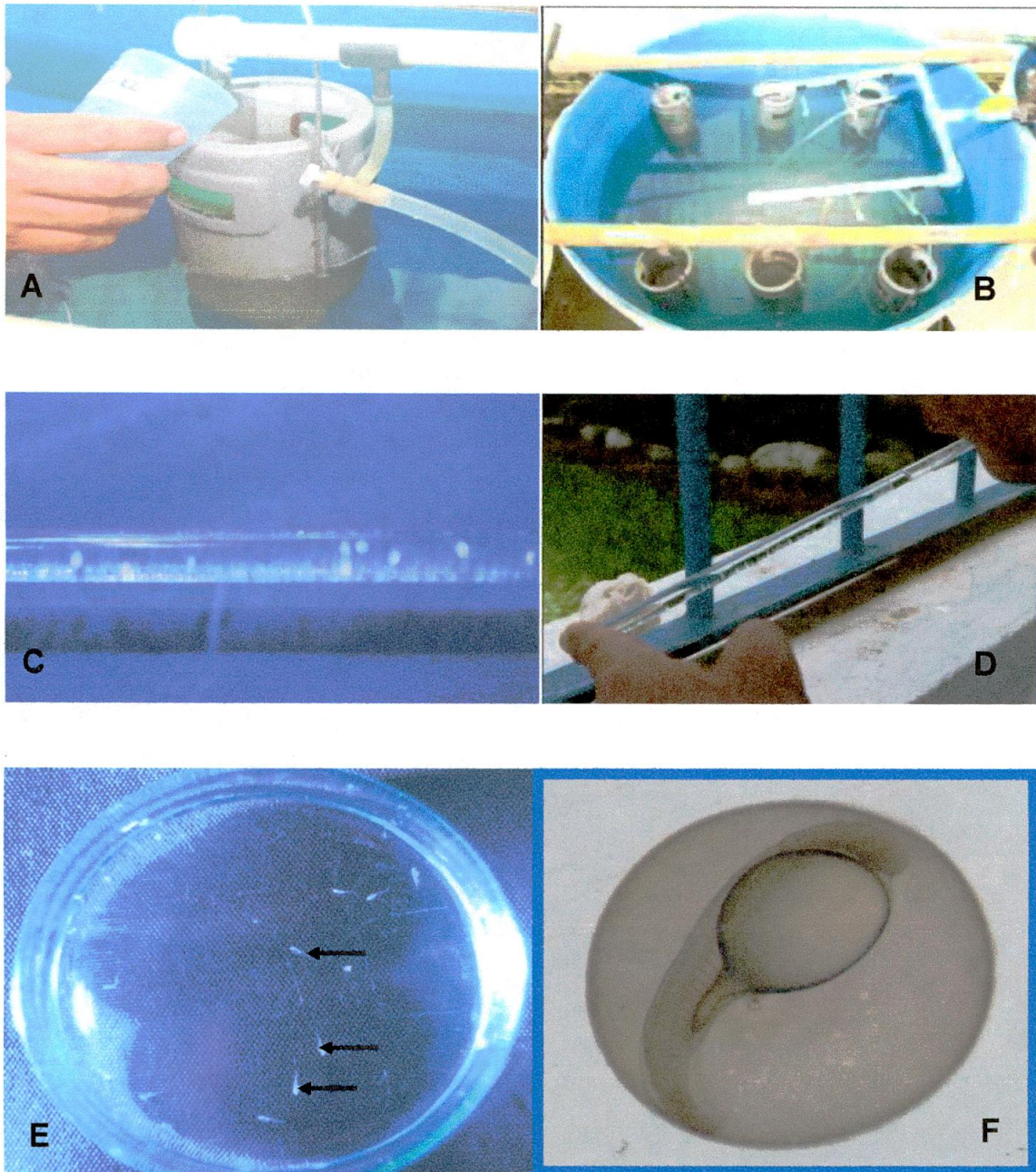


Figura 7. Siembra de los tratamientos en incubadoras experimentales tipo funil (2 lts) (A); Tanque de 500 Lts de capacidad de con instalación de incubadoras experimentales (B); Varilla de vidrio para conteo y clasificación de embriones (C) – (D); Larvas recién eclosionadas (flechas) (E); Larva en estado previo a la eclosión proveniente del tratamiento DMSO 12 – Glucosa 17% vista con estereoscopio binocular aumento 3X (Nikon SMZ 800, Japón) (F).

presentar diferencia significativa entre sí ( $p > 0.05$ ), ni con los tratamientos DMSO



12% - glucosa 10%; DMSO 20% - glucosa 10%; DMSO 20% - glucosa 17%; ETG 12% - glucosa 17% y DMA 12% - glucosa 10%, por lo cual, el DMSO podría ser el crioprotector con mayor poder de protección de embriones de 10 HPF, de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en las cuatro concentraciones utilizadas para este estudio; por el contrario, los cuatro tratamientos a base de DMA reportaron porcentajes de viabilidad mínimos, con un máximo de  $53.1 \pm 7.12\%$  para DMA 12% - glucosa 10%, sin diferencia significativa con el control ( $p > 0.05$ ) y un mínimo de  $2.17 \pm 1.72\%$ , para DMA 20% - glucosa 10%, significativamente distinto al control ( $p > 0.05$ ). Los diluyentes basados en (MET, ETG o DMA al 20%), acompañados de glucosa al 17%, presentaron niveles de viabilidad embrionaria mínimos, a excepción de lo encontrado para el diluyente DMSO 20% - glucosa 17%. Por último, la figura 9, muestra que los tratamientos con base en DMSO

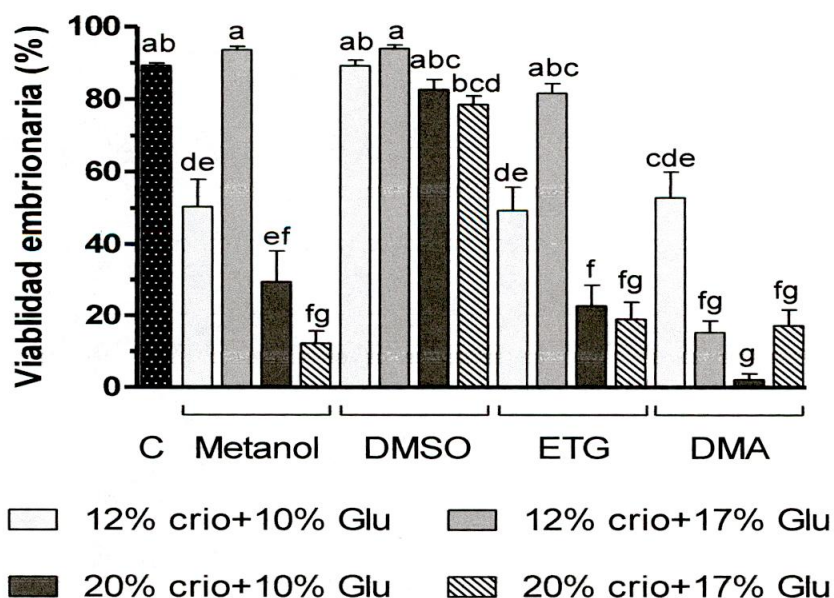


Figura 8. Viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) sometidos a diferentes sustancias crioprotectoras. Control (C); dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA). Se observa la diferencia en el porcentaje de viabilidad consolidado, para el control y cada uno de los dieciséis tratamientos aplicados. <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Valores mostrados como media  $\pm$  SEM.

Tabla 2. Porcentajes consolidados de viabilidad promedio de los embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) del grupo control y los expuestos a las diferentes concentraciones de crioprotectores (CPA), internos (Dimetil-sulfóxido (DMSO), Metanol (MET), Etilen-glicol (ETG) y Dimetil-acetamida (DMA) y externos (Glucosa), luego de la sexta hora de mediciones post-congelación e inmediatamente antes de la eclosión.

Crioprotector (CPA)			Concentración (%) de CPA (interno – externo)			
Interno	Externo	Control	12 - 10	12 - 17	20 - 10	20 - 17
Viabilidad embrionaria (%)						
DMSO			89.39±1.57 <sup>ab</sup>	94.14±0.96 <sup>a</sup>	82.82±2.82 <sup>abc</sup>	78.73±2.39 <sup>bcd</sup>
MET	Glucosa	89.27±0.73 <sup>ab</sup>	48.17±7.49 <sup>de</sup>	93.68±0.91 <sup>a</sup>	29.47±8.63 <sup>ef</sup>	12.27±3.53 <sup>fg</sup>
ETG			49.58±6.34 <sup>de</sup>	81.88±2.70 <sup>abc</sup>	22.83±5.77 <sup>f</sup>	19.07±4.83 <sup>fg</sup>
DMA			53.10±7.12 <sup>cde</sup>	15.35±3.26 <sup>fg</sup>	2.17±1.72 <sup>g</sup>	17.27±4.45 <sup>fg</sup>

Valores con diferentes letras son significativamente diferentes del control ( $p < 0.05$ ), los datos muestran la media  $\pm$  SEM

con porcentajes de viabilidad consolidados de  $86.27 \pm 1.20\%$ , no tuvieron diferencia significativa con los resultados obtenidos a partir de la muestra control ( $89.27 \pm 0.73\%$ ), que fue el de mayor porcentaje de viabilidad embrionaria consolidado; mientras que los tratamientos a base de MET ( $45.87 \pm 4.41\%$ ) y ETG ( $43.34 \pm 3.68\%$ ), presentaron diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ), al igual que los tratamientos a base de DMA, que fueron los de menor eficacia ( $21.97 \pm 3.03\%$ ), diferenciándose significativamente de los demás ( $p < 0.05$ ) (Ver tabla 2).

#### *Viabilidad embrionaria a lo largo del tiempo.*

En general, todos los diluyentes aplicados mostraron disminución progresiva de la viabilidad embrionaria en mayor o menor proporción a medida que transcurrió el tiempo de incubación. Para las soluciones crioprotectoras basadas en DMSO, el mejor porcentaje de viabilidad embrionaria en la primera hora de medición, lo mostró el diluyente DMSO 12% - glucosa 17%, ( $97.77 \pm 1.11\%$ ), superior al control ( $90.84 \pm 1.44\%$ ), sin que se presentara diferencia significativa ( $p > 0.05$ ),



con este último, ni con las otras tres soluciones crioprotectoras dispuestas para el mismo, a lo largo del tiempo, durante el cual fueron disminuyendo sus porcentajes

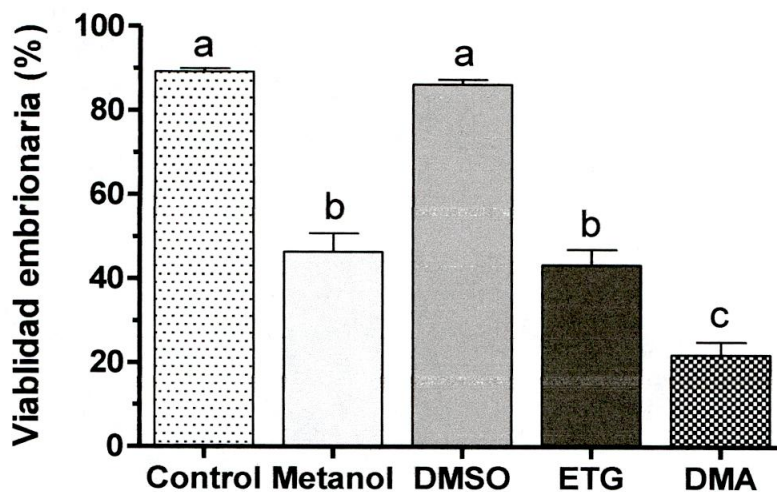


Figura 9. Indica la diferencia en el porcentaje total de viabilidad consolidada de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al grupo control (sin tratamiento) y a cada uno de los cuatro tratamientos dispuestos a base de metanol; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA), hasta eclosión. <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

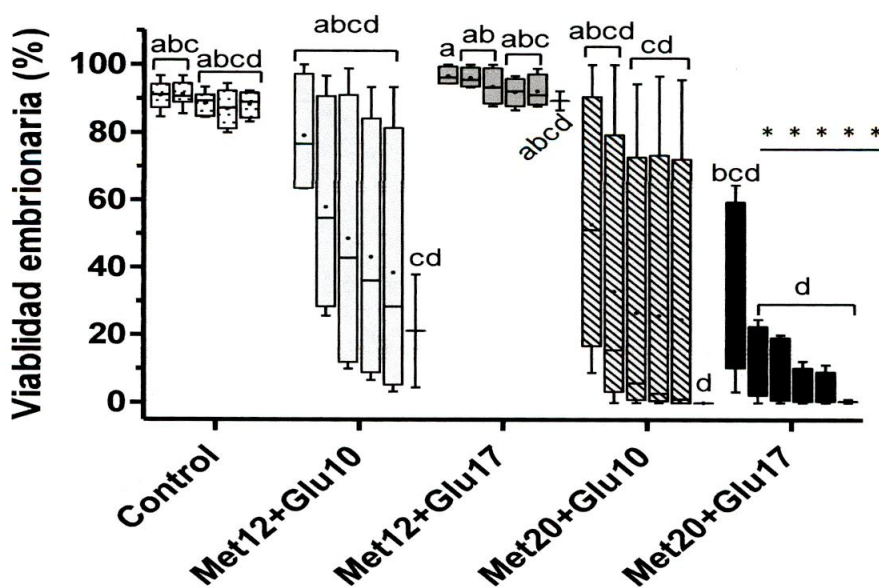


Figura 10. Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de metanol (MET), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*). <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

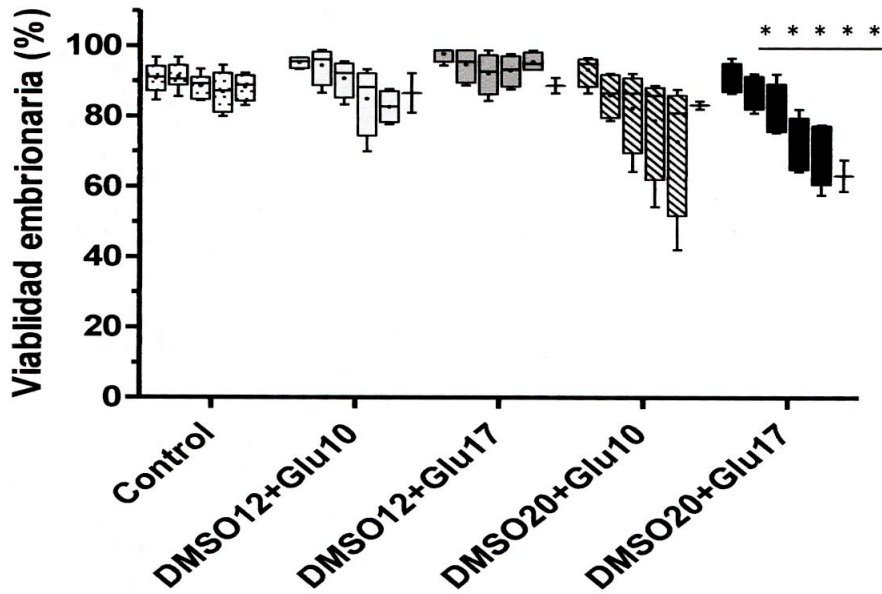


Figura 11. Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de dimetil sulfóxido (DMSO), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*\*). No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ni a lo largo del tiempo ( $p > 0.05$ ).

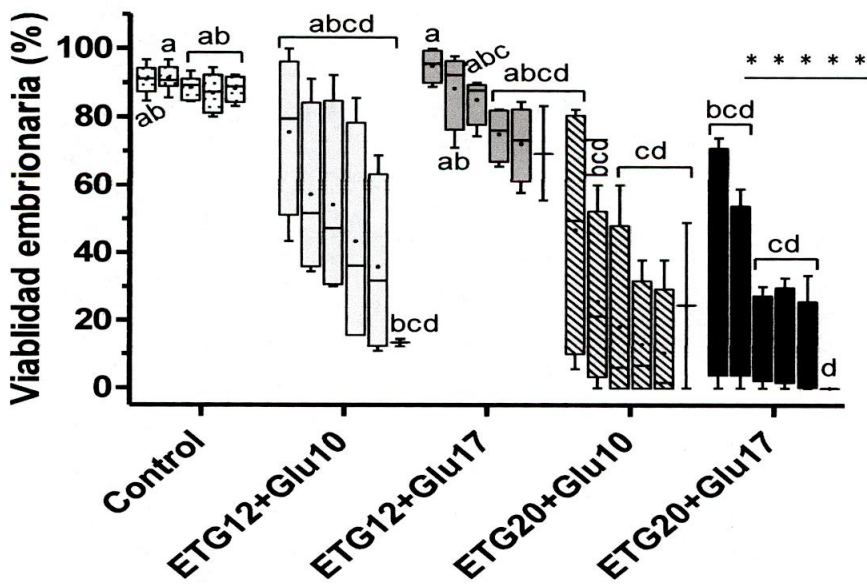


Figura 12. Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de etilén glicol (ETG), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*\*); <sup>a,b,c,d</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

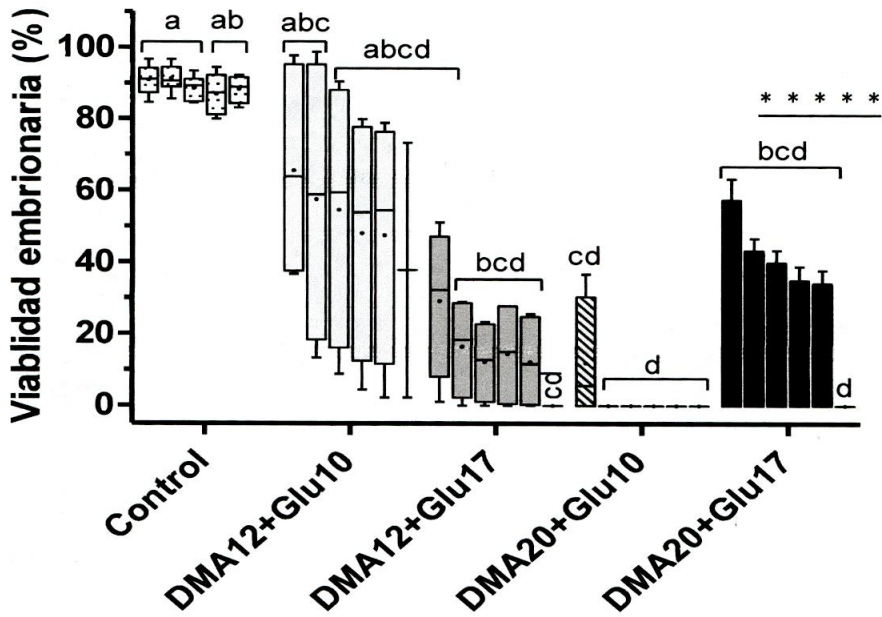


Figura 13. Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), pertenecientes al control y a los cuatro tratamientos dispuestos a base de dimetil acetamida (DMA), consolidado para cada hora de incubación post-descongelación (6 horas), hasta eclosión (\*\*\*\*). a,b,c,d barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

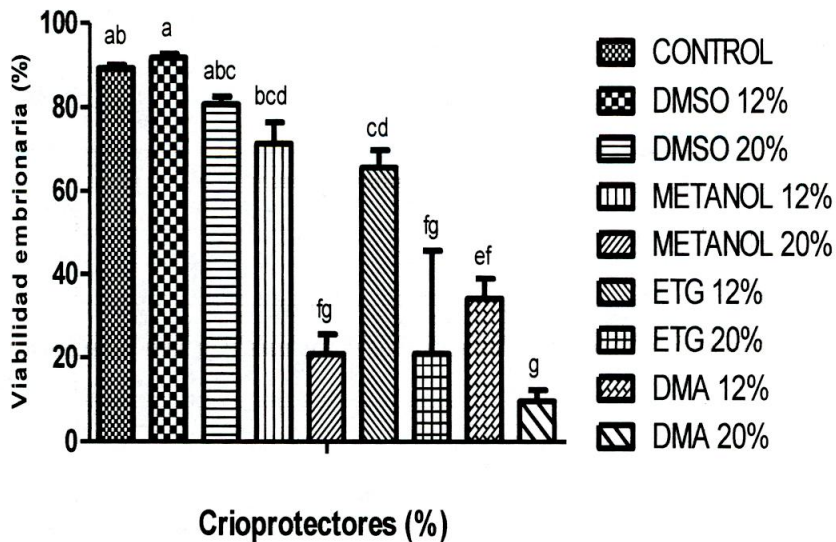


Figura 14. Indica la diferencia del porcentaje de viabilidad embrionaria consolidado, para embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), expuestos a los cuatro diferentes crioprotectores internos [metanol; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA)], en concentraciones del 12% y 20%, comparados con el control. a,b,c,d,e,f,g barras con letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

de viabilidad hasta llegar a un mínimo consolidado de  $83.33 \pm 1.11\%$  mostrado por el diluyente DMSO 20% - glucosa 10% en la hora sexta de medición (ver figura 11). La primera hora de medición para MET, presentó al diluyente MET 12% - glucosa 17% con viabilidad promedio de ( $96.66 \pm 1.36\%$ ), también superior al encontrado en el control ( $90.84 \pm 1.44\%$ ), dicho porcentaje fue disminuyendo, hasta llegar a la sexta hora de medición, con viabilidad embrionaria de  $89.44 \pm 2.78\%$ ; por el contrario, el diluyente de menor porcentaje de viabilidad embrionaria fue MET 20% - glucosa 17% ( $35.83 \pm 12.82\%$ ) en la primera hora de medición, terminando a la sexta hora, con un valor promedio de  $0.56 \pm 0.56\%$ , destacando que dicho porcentaje fue nulo para MET 20% - glucosa 10%, en la misma medición (ver figura 10). Respecto a ETG, la solución crioprotectora que mostró mejor resultado en la primera hora de medición fue ETG 12% - glucosa 17% con  $95.00 \pm 2.47$ , superior al reportado para el control ( $90.84 \pm 1.44\%$ ), sin que se presentara diferencia significativa entre sí, ni con los demás tratamientos dispuestos para ETG hasta la segunda hora de medición ( $p > 0.05$ ); a partir de la tercera hora de medición, los diluyentes ETG 20% - glucosa 10% y ETG 20% - glucosa 17%, presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (ver figura 12). Por último, respecto a DMA, la mejor solución crioprotectora en la primera hora de medición fue DMA 12% - glucosa 10% con  $65.55 \pm 15.86\%$ , sin presentar diferencia significativa con el control ( $p > 0.05$ ) durante las seis horas de medición. Durante la primera hora de medición, el diluyente DMA 12% - glucosa 17%, no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), respecto a las tres primeras horas de medición en la muestra control. Los datos obtenidos para el diluyente DMA 20% - glucosa 10% son estadísticamente distintos a los del control ( $p < 0.05$ ), contrario a los datos obtenidos hasta la quinta hora de medición del diluyente DMA 20% - glucosa 17%, los cuales se asemejan estadísticamente a los datos obtenidos del control hasta la quinta hora de medición, pero, a la sexta hora de medición, los resultados fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (ver figura 13), la solución crioprotectora DMA 20% - glucosa 10% reportó el menor porcentaje promedio de viabilidad

embrionaria ( $11.94 \pm 8.65\%$ ), en la primera hora de medición, destacando, que a partir de la segunda hora, dicho diluyente reportó viabilidad cero, al igual que los resultados obtenidos solo hasta la sexta hora de medición para el diluyente DMA 20% - glucosa 17%.

#### *Velocidad de enfriamiento - calentamiento*

Como trabajo complementario dentro de este estudio, se llevó a cabo la medición detallada de las diferentes temperaturas y velocidades de enfriamiento - calentamiento al interior de cada uno de los diluyentes evaluados durante todas las etapas del proceso. Para dicho cálculo se tuvo en cuenta la temperatura inicial, la temperatura final y el tiempo de refrigeración del diluyente. Se dispuso de dos rangos de medición dentro del periodo de congelación, el primero, desde la temperatura inicial hasta el punto  $0^{\circ}\text{C}$  (R1) y el segundo, desde  $0^{\circ}\text{C}$  hasta la temperatura final (R2), reportando los resultados en ( $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ). Durante el tiempo de equilibrio (12 minutos), las velocidades de enfriamiento promedio para los distintos crioprotectores, fueron: MET ( $0,856^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ), DMSO ( $0,920^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ), ETG ( $0,79^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) y DMA ( $0,694^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ); durante la hora de enfriamiento (a  $-14^{\circ}\text{C}$ ) fueron: MET R1 ( $0,640^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) - R2 ( $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ), DMSO R1 ( $0,621^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) - R2 ( $0,165^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ), ETG R1 ( $0,697^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) - R2 ( $0,140^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ), DMA R1 ( $0,577^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) - R2 ( $0,148^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) y durante el periodo de calentamiento, las velocidades fueron: MET ( $1,979^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ), DMSO ( $1,921^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ), ETG ( $1,894^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) y DMA ( $2,007^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ); dichas velocidades de enfriamiento-calentamiento se encuentran, al parecer, dentro de los rangos necesarios para la aplicación de este tipo de procedimientos en la especie objeto de estudio, teniendo en cuenta las altas tasas de viabilidad post-descongelación de los embriones, sin olvidar, que para cada tipo celular hay una óptima tasa de enfriamiento y que ello depende particularmente del volumen celular (Portillo *et al.*, 2006). Las curvas para cada diluyente fueron similares entre sí, en todas las etapas, coincidiendo con las curvas promediadas y consolidadas de cada crioprotector, (ver figuras 15 - 17).



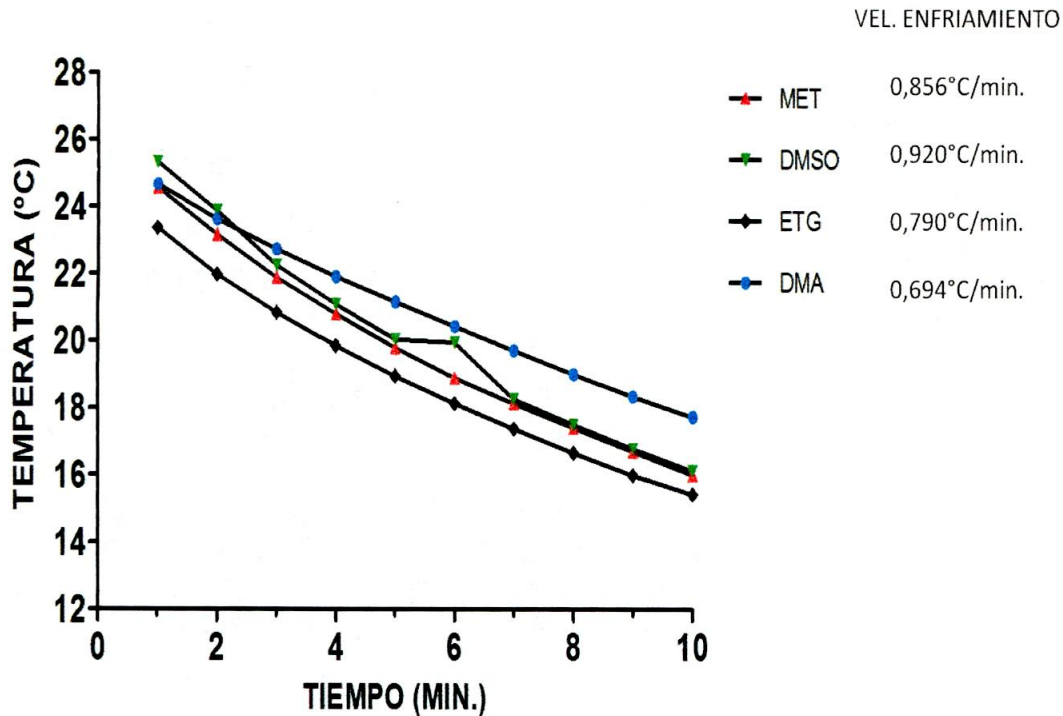


Figura 15. Indica las curvas de temperatura y velocidad de enfriamiento consolidadas de cada uno de los cuatro crioprotectores utilizados para el tratamiento de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), durante el tiempo de equilibrio a 6,2°C x 10 min.

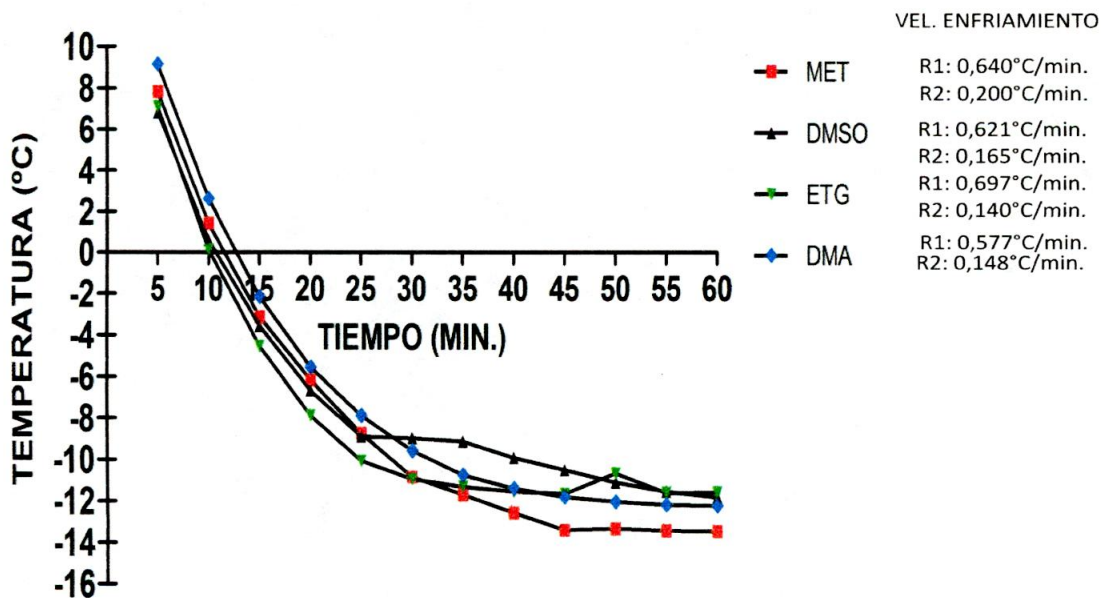


Figura 16. Indica las curvas de temperatura y velocidad de enfriamiento consolidadas de cada uno de los cuatro crioprotectores utilizados para el tratamiento de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), durante la congelación a -14°C x 1 hora.



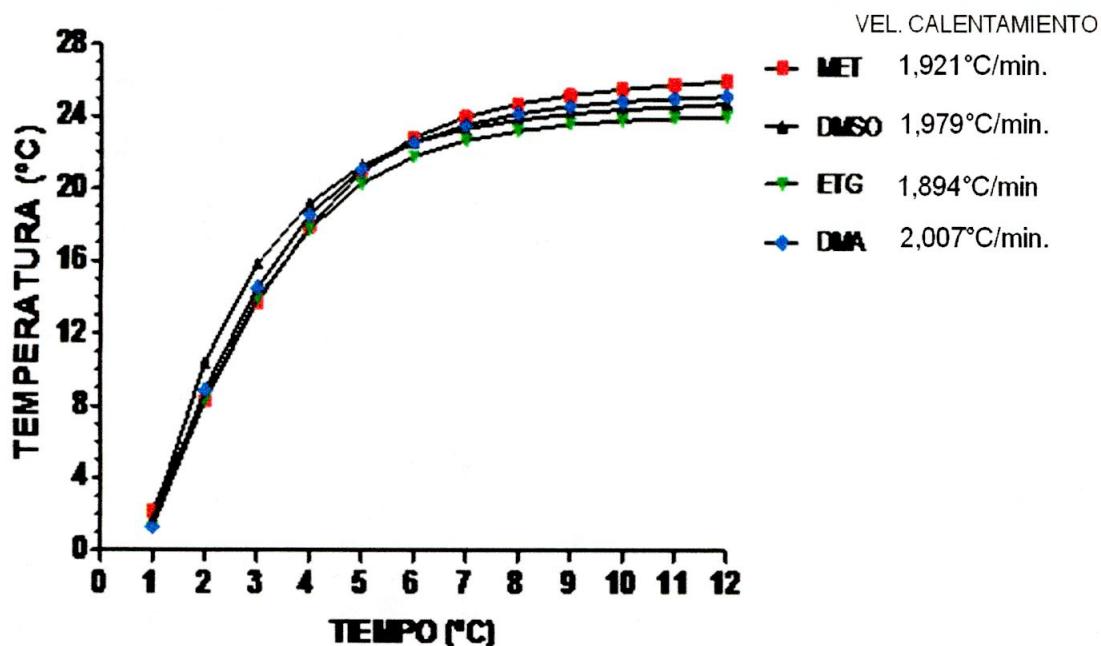


Figura 17. Indica las curvas de temperatura y velocidad de calentamiento consolidadas de cada uno de los cuatro crioprotectores utilizados para el tratamiento de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), durante la descongelación en agua de incubación a temperatura ambiente x 12 min.

#### *Descripción morfológica de las muestras al contacto con cada diluyente.*

##### *Pre congelación.*

La tabla 3 resume las características físicas y químicas del agua en las incubadoras Woynarovich durante la incubación de los embriones de *P. brachypomus*, las cuales se mantuvieron relativamente constantes y corresponden a los rangos adecuados para la especie (Núñez et al., 2008; Landinez & Mojica, 2006).

La tabla 6, resume las diferentes estructuras identificadas macro y microscópicamente de los embriones del tratamiento control obtenidos en la jornada experimental, las cuales fueron comparadas con las reportadas en la literatura para la especie en anteriores estudios (Botero et al., 2004; Díaz et al., 2010), estableciendo su semejanza, con el fin de validar los cambios morfológicos

Tabla 3. Características físicas y químicas del agua de las incubadoras de flujo ascendente tipo Woynarovich, durante el desarrollo embrionario de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), hasta eclosión.

	Temperatura (°C)	O <sup>2</sup> Disuelto mg. L <sup>-1</sup>	pH	Salinidad (ppm)	Conductividad (mS.cm <sup>-1</sup> )	Total sólidos disueltos
<i>P. brachypomus</i>	26.7 ± 0.35	4.84 ± 0.24	6.8 ± 0.05	0.02 ± 0	53.15 ± 3.85	2.925 ± 0.31

encontrados en los embriones luego de ser sometidos al contacto con las diferentes soluciones crioprotectoras programadas previamente al proceso de congelación (ver tabla 6). Los embriones sometidos al contacto con los cuatro diluyentes basados en MET, presentan cambios morfológicos similares, consistentes en pliegues de la superficie del corion, oscurecimiento de estructuras internas en parte centro - caudal del embrión y saco vitelino, el cual, a su vez, presenta borde irregular y menor tamaño; algunos embriones presentaron coloración gris oscuro bien delimitada en zona central del vitelo (ver tabla 7). Los embriones sometidos a contacto con las cuatro soluciones crioprotectoras basadas en DMSO, mostraron principalmente, pliegues múltiples en corion, menor diferenciación y tamaño de estructuras internas con oscurecimiento de la región centro – caudal, además, superficie irregular de la membrana vitelina con deformación y menor tamaño del saco vitelino, a veces, con cambio de coloración gris oscuro delimitado a zona central del vitelo (ver tabla 8). Para los embriones sometidos a los cuatro tratamientos a base de ETG, se encontró principalmente, pliegues en corion, menor diferenciación del embrión, estructuras internas de menor tamaño y oscurecimiento en tercio caudal del saco vitelino en todos los tratamientos, excepto para ETG 12% - glucosa 10%, que mostró únicamente menor tamaño y borde irregular del saco vitelino (ver tabla 9). El grupo sometido al contacto con los cuatro tratamientos dispuestos para DMA, presentó en general, pliegues en superficie del corion, ruptura del saco vitelino con salida de vitelo al espacio perivitelínico, oscurecimiento e indiferenciación de estructuras embrionarias con destrucción de las mismas en algunos casos,

en comparación con la descripción morfológica descrita para los embriones control (ver tabla 10).

Tabla 4. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones decorionizados (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*), sometidos a tratamiento crioprotector y refrigeración a -14°C durante una hora. Embriones fijados en formaldehído bufferado al 10%; ph: 6,7 - 6,8; 1260 mosm. y tratados pormicroscopía electrónica de barrido. Aumento (225 – 260x).

No.	Tratamiento	Imágenes	Descripción morfológica
1	Metanol		<p>A. Embrión MET 12 – 10%. menor desarrollo y diferenciación de estructuras con deformación (d) del saco vitelino (sv), parte anterior (pa), parte caudal (pc), vesícula óptica (vo). B. Embrión MET 12 – 17%. saco vitelino (sv), parte anterior (pa), parte caudal (pc), vesícula óptica (vo). C. Embrión MET 20 – 10%. ruptura membrana vitelina (rp), deformación (d) y menor tamaño de saco vitelino(sv). D. Embrión MET 20 – 17%. ruptura membrana vitelina (rp), deformación (d) y menor tamaño de saco vitelino(sv).</p>
2	DMSO		<p>A. Embrión DMSO 12 – 10%. saco vitelino (sv), parte anterior (pa), parte caudal (pc), vesícula óptica (vo) y ectodermo (ec), ruptura membrana vitelina (rp) B. Embrión DMSO 12 – 17%. menor desarrollo y diferenciación de estructuras, parte anterior (pa), parte caudal (pc), vesícula óptica (vo), deformación (d) y menor tamaño de saco vitelino(sv). C. Embrión DMSO 20 – 10%. menor desarrollo y diferenciación de estructuras, parte anterior (pa), parte caudal (pc), ruptura membrana vitelina (rp), saco vitelino(sv). D. Embrión DMSO 20 – 17%. menor desarrollo y diferenciación de estructuras, parte anterior (pa), parte caudal (pc), deformación(d) y menor tamaño de saco vitelino(sv).</p>

Tabla 5. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones decorionizados (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), sometidos a tratamiento crioprotector y refrigeración a -14°C durante una hora. Embriones fijados en formaldehído bufferado al 10%; ph: 6,7 - 6,8; 1260 mosm. Y tratados por microscopía electrónica de barrido. Aumento (235 – 300x).

No.	Tratamiento	Imágenes	Descripción morfológica
3	ETG		<p><b>A.</b> Embrión ETG 12 – 10%. menor desarrollo y diferenciación de estructuras, ectodermo (ec), ruptura membrana vitelina (rp), deformación (d) del saco vitelino (sv), parte anterior (pa), parte caudal (pc), vesícula óptica (vo).</p> <p><b>B.</b> Embrión ETG 12 – 17%. menor desarrollo y diferenciación de estructuras, ruptura membrana vitelina (rp), saco vitelino (sv), parte anterior (pa), parte caudal (pc), vesícula óptica (vo).</p> <p><b>C.</b> Embrión ETG 20 – 10%. rupturas en membrana vitelina (rp), deformación (d) y menor tamaño de saco vitelino (sv), pérdida de contenido vitelino (cv), parte caudal (pc).</p> <p><b>D.</b> Embrión ETG 20 – 17%. rupturas en membrana vitelina (rp), saco vitelino (sv).</p>
4	DMA		<p><b>A.</b> Embrión DMA 12 - 10%. menor desarrollo estructural, parte anterior (pa), parte caudal (pc), saco vitelino (sv), vesícula óptica (vo), ruptura membrana vitelina (rp).</p> <p><b>B.</b> Embrión DMA 12 - 17%. menor desarrollo estructural, parte anterior (pa), parte caudal (pc), saco vitelino (sv), rupturas membrana vitelina (rp), pérdida de vitelo (cv).</p> <p><b>C.</b> Embrión DMA 20 - 10%. destrucción estructuras embrionarias (de), menor tamaño y deformidad (d) de saco vitelino (sv), ruptura membrana vitelina (rp) y pérdida de vitelo (cv).</p> <p><b>D.</b> Embrión DMA 20 - 17%. estructuras embrionarias, menor tamaño y deformidad (d) saco vitelino (sv), ruptura membrana vitelina (rp) y pérdida de vitelo (cv).</p>

*Post congelación.*

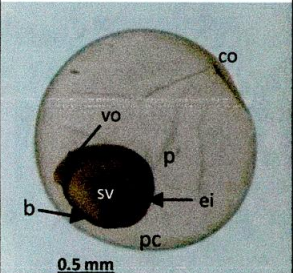
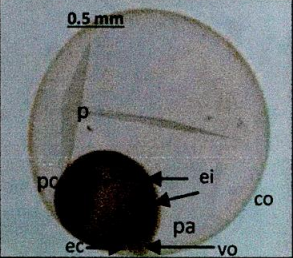
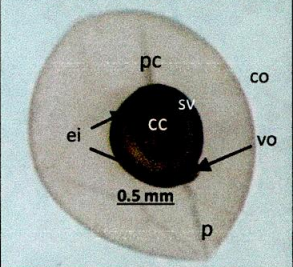
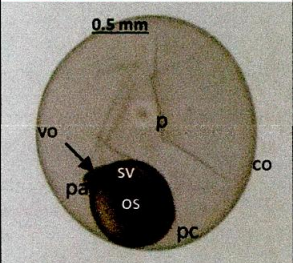
Inmediatamente después del periodo de congelación y antes de iniciar el periodo final de incubación hasta eclosión, se tomaron al azar, embriones de cada uno de

Tabla 6. Hallazgos macroscópicos de embriones control de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) de 10 HPF pre congelación imagen de estereoscopio bifocal aumento (3X), en comparación con los reportados para la especie y con imagen de microscopía electrónica de barrido. Aumento (230x).

No.	Tratamiento	Imágenes	Descripción morfológica
1	Embriones control 10 HPF ( <i>Piaractus brachyomus</i> ) (Reportes de literatura)		<p>Periodo de segmentación. Embrión diferenciado. Diferenciación de somitas Ectodermo (a), Somita (b), Ojo (c) (Botero <i>et al.</i>, 2004).</p> <p>Periodo de segmentación. Embrión diferenciado cráneo-caudal, dispuesto sobre el saco vitelino (sv) en forma arqueada. somita (sm), vesícula óptica (vo), parte anterior (pa), parte caudal (pc) (Díaz <i>et al.</i>, 2010).</p>
2	Control 10 HPF (Jornada experimental)		<p>Embrión diferenciado, extendiéndose hacia adelante y caudalmente sobre el saco vitelino (sv), coincide con embriones control reportados en anteriores estudios, en el desarrollo de las diferentes estructuras luego de 10 HPF. somita (sm), vesícula óptica (vo), parte anterior (pa), parte caudal (pc), notocorda (n), corion (co).</p>
3	Control 10 HPF (Jornada experimental) (Microscopía electrónica de barrido 230x)		<p>Embrión diferenciado, extendiéndose hacia adelante y caudalmente sobre el saco vitelino (sv), que coincide con embriones control reportados en anteriores estudios, sobre el desarrollo de las diferentes estructuras 10 HPF., somitas (sm), vesícula óptica (vo), parte anterior (pa), parte caudal (pc).</p>

los 16 tratamientos establecidos para observar y reportar los cambios morfológicos producidos en las diferentes estructuras debido al enfriamiento, con el fin de compararlos con los hallazgos encontrados,

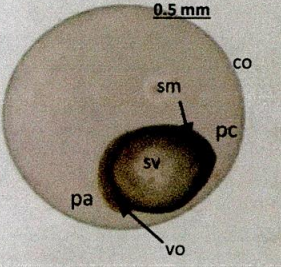
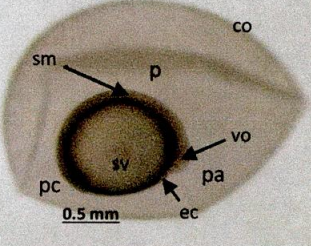
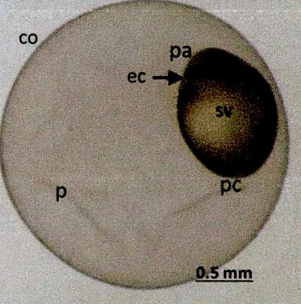
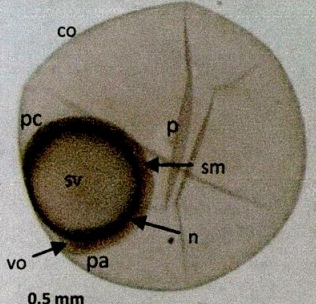
Tabla 7. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de metanol (MET) como crioprotector. Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscópica	Descripción morfológica
4	Metanol 12% glucosa 10%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), borde del saco vitelino irregular (b), oscurecimiento del vitelo en zona central, parte caudal del embrión (pc) y estructuras internas del embrión (ei), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), vesícula óptica (vo), corion (co).
5	Metanol 12% glucosa 17%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), parte anterior del embrión (pa), oscurecimiento del vitelo en zona central, parte caudal del embrión (pc) y estructuras internas (ei), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), vesícula óptica (vo), ectodermo (ec), corion (co).
6	Metanol 20% glucosa 10%		Embrión poco diferenciado, con menor desarrollo y mas pequeño de lo normal, que se extiende antero – posteriormente, saco vitelino (sv), oscurecimiento del vitelo hacia la parte caudal del embrión (pc) y estructuras internas del embrión (ei), coloración del vitelo bien delimitado en zona central (cc), corion con pliegues (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), parte anterior del embrión (pa), vesícula óptica (vo), corion (co).
7	Metanol 20% – glucosa 17%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), oscurecimiento del vitelo en zona central (os), parte caudal del embrión (pc); parte anterior del embrión (pa), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), vesícula óptica (vo), corion (co).

en los embriones, antes de la congelación. Los embriones control no presentaron diferencia alguna con los observados antes de la congelación ni con los reportados en anteriores estudios para la especie (ver tabla 11). En los embriones sometidos al contacto con las

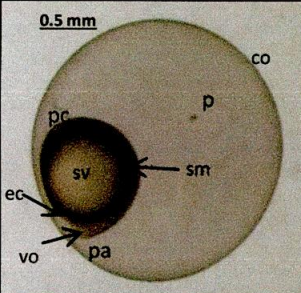
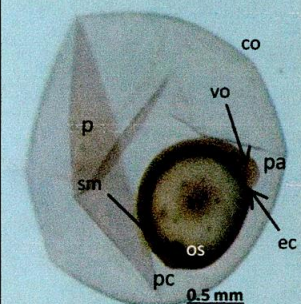
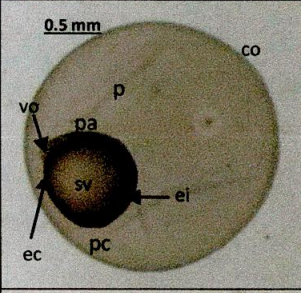
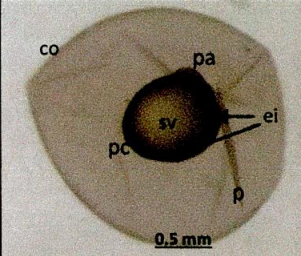


Tabla 8. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-sulfóxido (DMSO) como crioprotector. Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscópica	Descripción morfológica
8	DMSO 12 % - Glucosa 10%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), parte anterior del embrión (pa), vesícula óptica (vo), corion (co), somita (sm); no presenta diferencias significativas con la descripción morfológica de los embriones control 10 HPF.
9	DMSO 12 % - Glucosa 17%		Embrión diferenciado que se extiende antero–posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), parte anterior del embrión (pa), vesícula óptica (vo), corion (co), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), somita (sm), ectodermo (ec), no presenta diferencias significativas con la descripción morfológica de los embriones control 10 HPF.
10	DMSO 20 % - Glucosa 10%		Embrión diferenciado que se extiende antero–posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), parte anterior del embrión (pa), parte caudal del embrión (pc), vesícula óptica (vo), corion (co), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), ectodermo (ec), no presenta diferencias significativas con la descripción morfológica de los embriones control 10 HPF.
11	DMSO 20 % - Glucosa 17%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), parte anterior del embrión (pa), parte caudal del embrión (pc), vesícula óptica (vo), corion (co), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), somita (sm), notocorda (n), no presenta diferencias significativas con la descripción morfológica de los embriones control 10 HPF.

cuatro soluciones crioprotectoras basadas en MET, se encontró menor

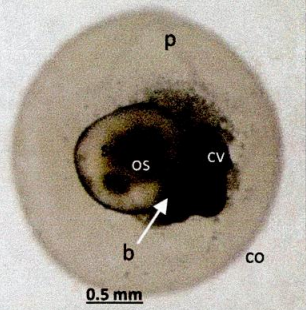
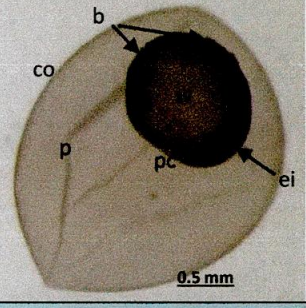
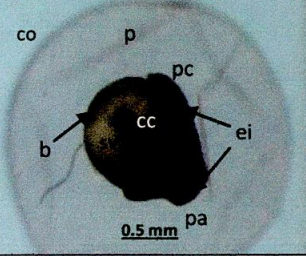
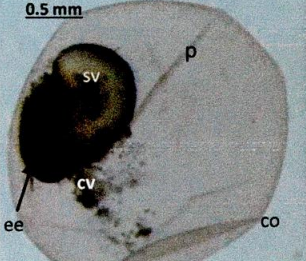
Tabla 9. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de etilén-glicol (ETG) como crioprotector. Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscopica	Descripción morfológica
12	ETG 12% - Glucosa 10%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre saco vitelino (sv), parte anterior del embrión (pa), pliegues en corion (p), parte caudal del embrión (pc), vesícula óptica (vo), corion (co), somita (sm), no presenta diferencias significativas con la descripción morfológica de los embriones control 10 HPF.
13	ETG 12% - Glucosa 17%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), menor diferenciación de estructuras internas, menor tamaño que el embrión control, oscurecimiento (os) del vitelo hacia la parte caudal del embrión (pc), parte anterior del embrión (pa), vesícula óptica (vo), corion (co), somita (sm), ectodermo (ec), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), no se evidencian diferencias significativas con la descripción morfológica de los embriones control 10 HPF.
14	ETG 20% - Glucosa 10%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), menor diferenciación de estructuras internas, menor tamaño que el embrión control, oscurecimiento de estructuras internas (ei) parte caudal (pc), parte anterior (pa), vesícula óptica (vo), corion (co), ectodermo (ec); pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), no se evidencian diferencias significativas con la descripción morfológica de los embriones control 10 HPF.
15	ETG 20% - Glucosa 17%		Embrión diferenciado que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), menor diferenciación de estructuras internas, menor tamaño que el embrión control, oscurecimiento de estructuras internas del embrión (ei), parte caudal del embrión (pc), parte anterior del embrión (pa), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co).

menor diferenciación y tamaño de estructuras internas, borde irregular y oscurecimiento del saco vitelino, pliegues en superficie del corion y cambio de



Tabla 10. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-acetamida (DMA) como crioprotector. Vista previa a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscopica	Descripción morfológica
16	DMA 12% - Glucosa 10%		No se evidencian estructuras embrionarias en desarrollo sobre el saco vitelino (sv), con borde irregular y de menor volumen (b), oscurecimiento del vitelo en parte central (os), pliegues en corion (p) (posible deshidratación por ingreso del crioprotector), ruptura de membrana vitelina y salida de vitelo hacia espacio perivitelinico (cv), corion (co).
17	DMA 12% - Glucosa 17%		Parte caudal del embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño en comparación con el embrión control 10 HPF, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), borde del saco vitelino irregular (b), parte caudal del embrión (pc), oscurecimiento de estructuras internas del embrión (ei), corion con pliegues (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co).
18	DMA 20% - Glucosa 10%		Embrión con menor diferenciación y tamaño de estructuras internas en comparación con el embrión control 10 HPF, que se extiende antero – posteriormente, sobre saco vitelino (sv) de menor volumen (b), oscurecimiento del vitelo en zona central (cc) (posible conformación irregular), y estructuras internas del embrión (ei), parte caudal del embrión (pc), parte anterior del embrión (pa); pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co).
19	DMA 20% - Glucosa 17%		Se evidencian estructuras embrionarias indiferenciadas (ee), saco vitelino (sv) con oscurecimiento y de forma irregular con menor tamaño que el control 10 HPF, pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), salida de vitelo hacia espacio perivitelinico (cv), corion (co).

coloración (gris oscuro), delimitado a zona central del vitelo (Ver tablas 4 y 12).

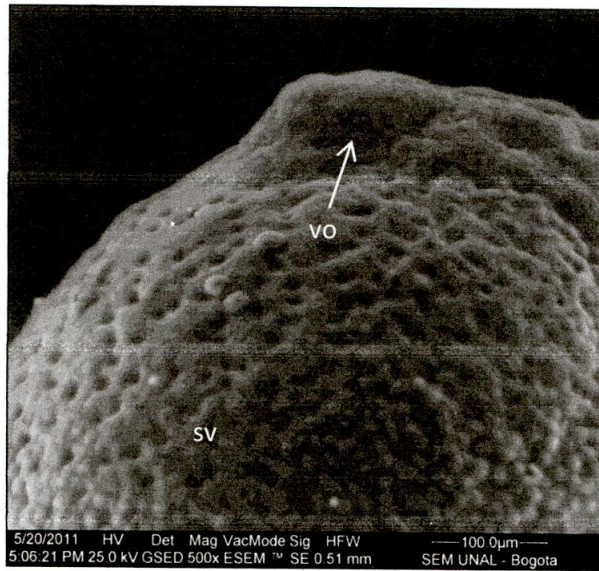
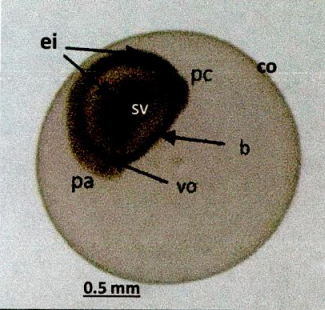
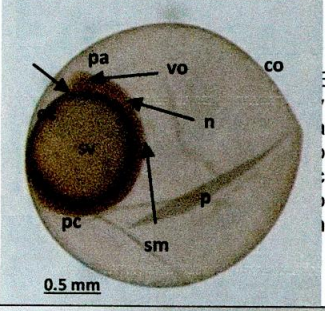
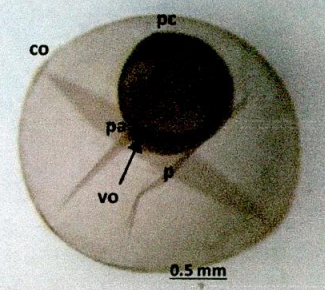
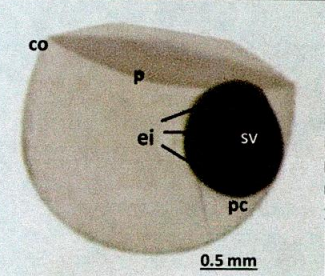


Figura 18. Parte anterior de embrión decolonizado (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento control. Se observa vesícula óptica (vo) y saco vitelino (sv). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía de microscopía electrónica de barrido. Aumento (500x).

Tabla 11. Descripción morfológica de embriones control (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sin contacto con tratamiento crioprotector. Vista obtenida posterior a la aplicación del protocolo de refrigeración. Estereoscopio bifoçal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imágenes	Descripción morfológica
1	Control 10 HPF		<p>Embrión diferenciado, extendiéndose hacia delante y caudalmente sobre el saco vitelino (sv), coincide con embriones control reportados en anteriores estudios, en el desarrollo de las diferentes estructuras (10 HPF). somita (sm), vesícula óptica (vo), parte anterior (pa), parte caudal (pc), corion (co), notocorda (n), ectodermo (ec). No presenta diferencias estructurales significativas comparadas con las encontradas en los embriones control pre congelación.</p>
2	Control 10 HPF		<p>Embrión diferenciado, extendiéndose hacia delante y caudalmente sobre el saco vitelino (sv), coincide con embriones control reportados en anteriores estudios, en desarrollo estructural 10 HPF). somita (sm), vesícula óptica (vo), parte anterior (pa), parte caudal (pc), corion (co), ectodermo (ec). No presenta diferencia estructural significativa comparada con los embriones control pre congelación.</p>

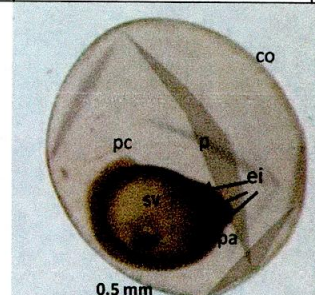
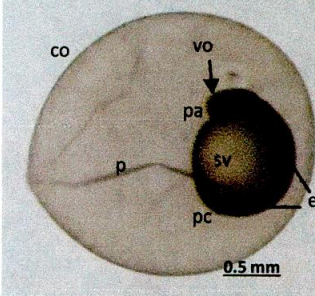
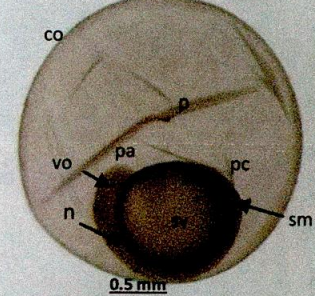
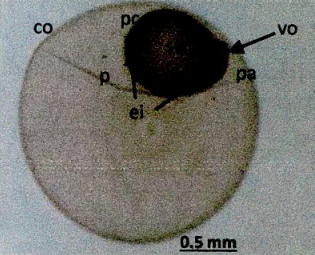
Tabla 12. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de metanol (MET) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración a - 14°C por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscopica	Descripción morfológica
3	Metanol 12% – Glucosa 10%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), borde del saco vitelino irregular (b), oscurecimiento del vitelo en zona central, parte caudal del embrión (pc) y estructuras internas del embrión (ei), vesícula óptica (vo), corion (co), parte anterior del embrión (pa).
4	Metanol 12% – Glucosa 17%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño que el control 10 HPF, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), parte caudal del embrión (pc), vesícula óptica (vo), corion (co), parte anterior del embrión (pa), notocorda (n), ectodermo (ec), somita (sm).
5	Metanol 20% – Glucosa 10%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), deforme con cambio de orientación de su eje principal y de menor tamaño, parte caudal del embrión (pc); pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p). (vo) vesícula óptica, (co) corion, (pa) parte anterior del embrión.
6	Metanol 20% – Glucosa 17%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), oscurecimiento del vitelo en zona central, parte caudal del embrión (pc) y estructuras internas del embrión (ei), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co).

En embriones post-congelación, sometidos al contacto con los diluyentes basados en contacto con los diluyentes basados en DMSO, se identificó principalmente,

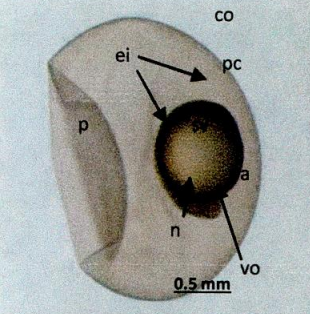
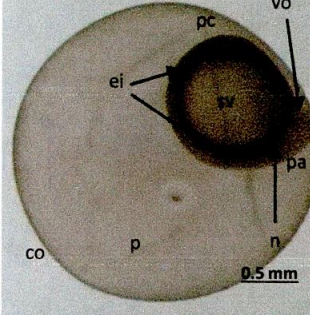
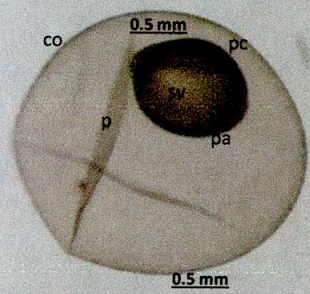
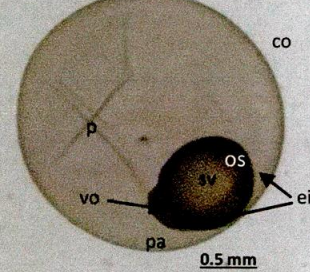


Tabla 13. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-sulfóxido (DMSO) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscopica	Descripción morfológica
7	DMSO 12 % - Glucosa 10%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas menor tamaño, parte anterior del embrión (pa), oscurecimiento estructuras internas (ei) y parte caudal del embrión (pc), corion con pliegues (posible deshidratación o ingreso del crioprotector) (p), saco vitelino (sv), corion (co), cambio de coloración bien delimitado en zona central del saco vitelino (cc).
8	DMSO 12 % - Glucosa 17%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas menor tamaño, que se extiende antero - posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), parte anterior del embrión (pa), oscurecimiento estructuras internas (ei) parte caudal del embrión (pc), corion con pliegues (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co), vesícula óptica (vo).
9	DMSO 20 % - Glucosa 10%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas menor tamaño que el control 10 HPF, que se extiende antero - posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), parte caudal del embrión (pc), vesícula óptica (vo), corion (co), parte anterior del embrión (pa), otocorda (n), somita (sm).
10	DMSO 20% - Glucosa 17%		Embrión con menor diferenciación de estructuras internas menor tamaño, que se extiende antero - posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), parte caudal del embrión (pc), parte anterior (pa), oscurecimiento estructuras internas del embrión (ei), corion con pliegues (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co).

pliegues en corion en todos los tratamientos, menor diferenciación y desarrollo de estructuras internas, oscurecimiento en el tercio caudal del embrión y área

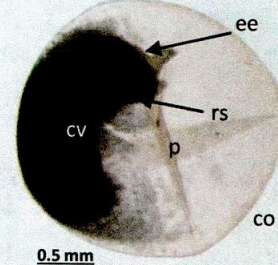
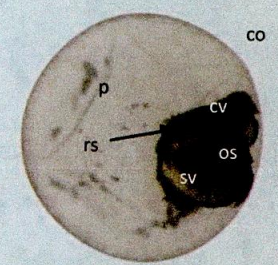
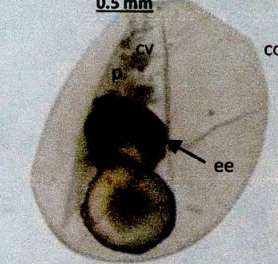
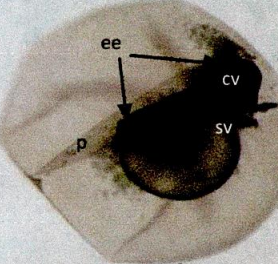
Tabla 14. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de etilén-glicol (ETG) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscopica	Descripción morfológica
11	ETG 12% - Glucosa 10%		<p>Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño que el control 10 HPF, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), oscurecimiento estructuras internas del embrión (ei), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), parte caudal del embrión (pc), corion (co), parte anterior del embrión (pa), notocorda (n).</p>
12	ETG 12% - Glucosa 17%		<p>Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño que el control 10 HPF, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), oscurecimiento estructuras internas del embrión (ei), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), parte caudal del embrión (pc), corion (co), parte anterior del embrión (pa), notocorda (n), vesícula óptica (vo).</p>
13	ETG 20% - Glucosa 10%		<p>Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño que el control 10 HPF, que se extiende antero – posteriormente, sobre el saco vitelino (sv), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), parte caudal del embrión (pc), corion (co), parte anterior del embrión (pa).</p>
14	ETG 20% - Glucosa 17%		<p>Embrión con menor diferenciación de estructuras internas y menor tamaño que el control 10 HPF, oscurecimiento parte caudal del vitelo (os), oscurecimiento estructuras internas del embrión (ei), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), saco vitelino (sv), corion (co), parte anterior del embrión (pa), vesícula óptica (vo).</p>



En cuanto a los embriones sometidos al contacto con los cuatro diluyentes

Tabla 15. Descripción morfológica y daños estructurales de embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), sometidos al contacto con los tratamientos a base de dimetil-acetamida (DMA) como crioprotector. Vista obtenida posteriormente a la aplicación del protocolo de refrigeración a - 14 °C por una hora. Estereoscopio bifocal aumento (3x).

No.	Tratamiento	Imagen estereoscópica	Descripción morfológica
15	DMA 12% - Glucosa 10%		<p>Se evidencian estructuras embrionarias (ee) indiferenciadas con algún grado de desarrollo, ruptura de saco vitelino (rs), corión con pliegues (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), salida de contenido del saco de vitelo hacia espacio perivitelínico (cv), corion (co).</p>
16	DMA 12% - Glucosa 17%		<p>Se evidencian estructuras embrionarias en desarrollo sobre el saco vitelino (sv), ruptura del saco vitelino (rs), espesamiento del vitelo en parte central (os) pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), salida de contenido del saco de vitelo hacia espacio perivitelínico (cv), corion (co).</p>
17	DMA 20% - Glucosa 10%		<p>Se evidencian estructuras embrionarias indiferenciadas (ee); desprendimiento del saco vitelino (sv) con espesamiento zona central y menor tamaño que el control 10 HPF, salida del contenido del saco de vitelo hacia espacio perivitelínico (cv), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co).</p>
18	DMA 20% - Glucosa 17%		<p>Se evidencian estructuras embrionarias indiferenciadas (ee) con desprendimiento del saco vitelino (sv) con espesamiento zona central y menor tamaño que el control 10 HPF, salida del contenido vitelino hacia espacio perivitelínico (cv), pliegues en corion (posible deshidratación por ingreso del crioprotector) (p), corion (co).</p>

dispuestos a base de ETG, se encontró principalmente pliegues múltiples en corion, menor tamaño y desarrollo de estructuras internas y oscurecimiento en parte caudal del vitelo, sin diferencias apreciables en comparación con los cambios observados en los embriones antes de la congelación (Ver tablas 5 y 14). Finalmente, los embriones sometidos al contacto con los cuatro tratamientos basados en el uso de DMA como crioprotector, mostraron mayor daño a nivel estructural, comparado con los demás crioprotectores, evidenciando menor desarrollo, daño extenso en membrana vitelina con destrucción y oscurecimiento de estructuras internas; no se detectaron diferencias apreciables en comparación con los cambios observados en los embriones pre-congelación (ver tablas 5 y 11).

#### *Eclosión de larvas.*

La figura 19, muestra diferencias en tasa de eclosión entre tratamientos, donde el DMSO, se ubicó como el crioprotector con mejores porcentajes promedios de eclosión sumadas sus cuatro presentaciones; las soluciones crioprotectoras, MET 12% - glucosa 17% y DMSO 12% - glucosa 17% con porcentajes de  $92.77 \pm 3.79\%$  y  $90.79 \pm 5.02\%$  respectivamente, superaron al tratamiento control ( $87.63 \pm 6.49\%$ ), sin presentar diferencia significativa entre sí. Los tratamientos DMSO 12% - glucosa 10%, DMSO 20% - glucosa 10%, DMSO 20% - glucosa 17%, ETG 12% - glucosa 10% y ETG 12% - glucosa 17%, tampoco presentaron diferencias significativas con respecto al control ( $p > 0.05$ ), contrario a los tratamientos a base de MET ( $39.70\% \pm 10.93\%$ ) y ETG ( $29.50 \pm 7.62\%$ ), tuvieron diferencias significativas respecto al tratamiento control ( $p < 0.05$ ). Cabe destacar, que los diluyentes cuya concentración de crioprotector (MET, ETG o DMA) fue del 20%, reportaron porcentajes de eclosión bajos, así como el porcentaje nulo de eclosión en todas las réplicas de la solución crioprotectora DMA 20% - glucosa 10%. Por último, los tratamientos a base de DMA ( $16.39 \pm 5.91\%$ ), reportaron baja eclosión y diferencia significativa con los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ), excepto con los tratamientos a base de ETG (Ver figuras 19 y 20).

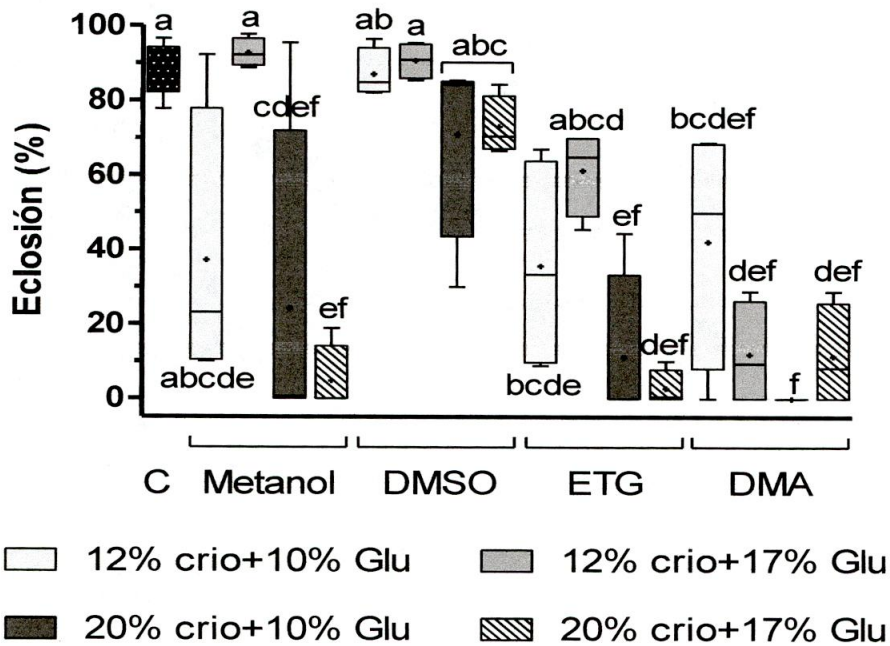


Figura 19. Eclosión de larvas vivas provenientes de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) sometidos a diferentes sustancias crioprotectoras. Control (C); metanol; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA). Se observa la diferencia en el porcentaje de eclosión consolidado, para el control y cada uno de los dieciséis tratamientos aplicados. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Valores mostrados como media  $\pm$  SEM.

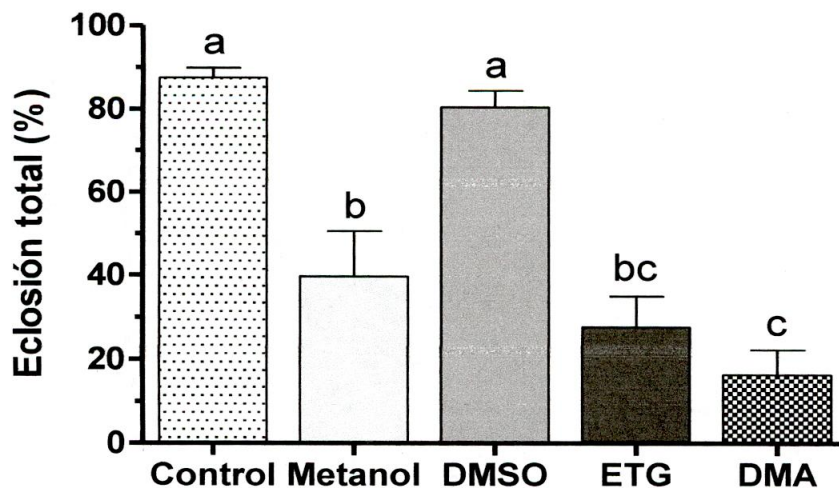


Figura 20. Indica diferencia en porcentaje de eclosión total consolidado para embriones (10 HPF) de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), expuestos a cada una de las cuatro (4) clases de crioprotector; metanol ; dimetil sulfóxido (DMSO); etilén glicol (ETG) y dimetil acetamida (DMA), comparados con el control (embriones sin tratamiento). <sup>a,b,c</sup> barras con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



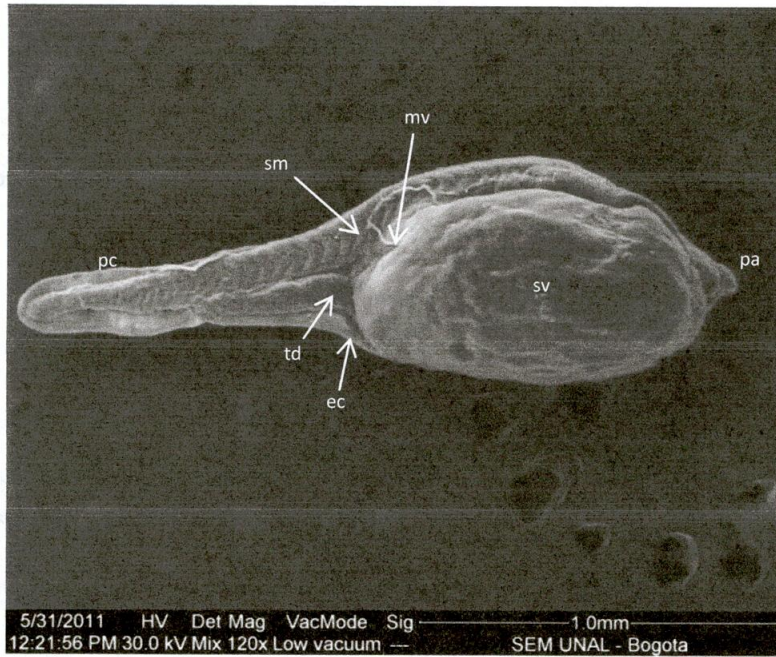


Figura 21. Larva control de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*); parte anterior (pa); parte caudal (pc); saco vitelino (sv); somita (sm); ectodermo (ec); tubo digestivo distal (td); membrana vitelina (mv). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (120x).

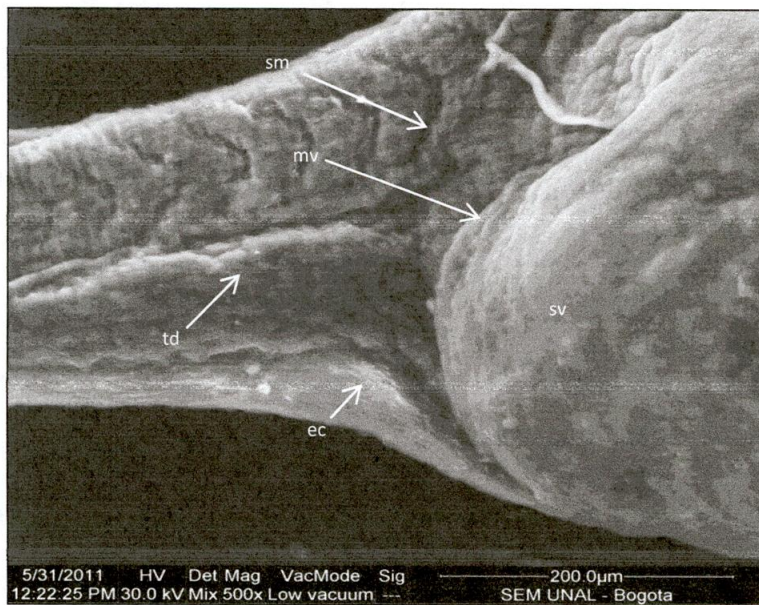


Figura 22. Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento control. Se observa, detalle de parte caudal del saco vitelino (sv); somita (sm); ectodermo (ec); tubo digestivo distal (td); membrana vitelina (mv). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (500x).

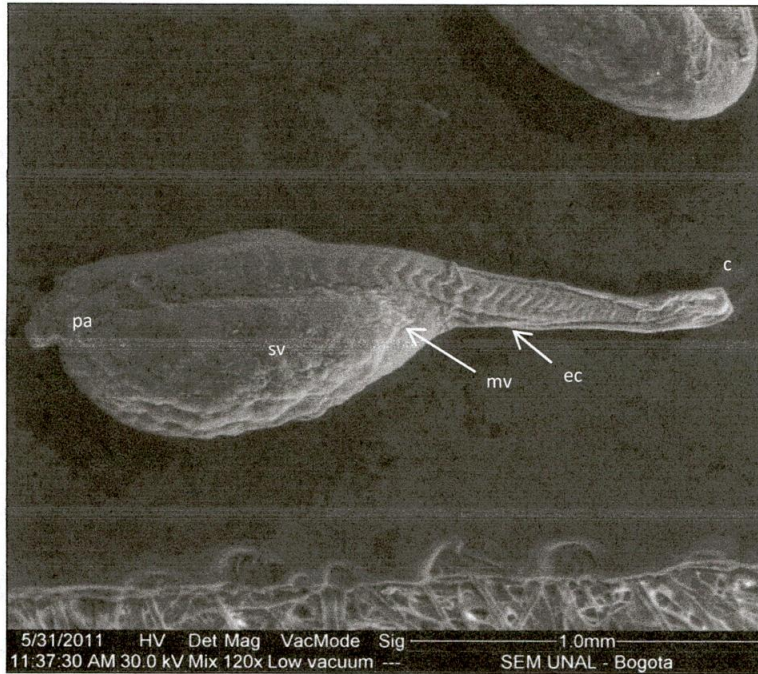


Figura 23. Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento DMSO 12 – 10%, post-congelación. Se observa, parte anterior (pa); cola (c); membrana vitelina (mv); saco vitelino (sv); ectodermo (ec). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (120x).

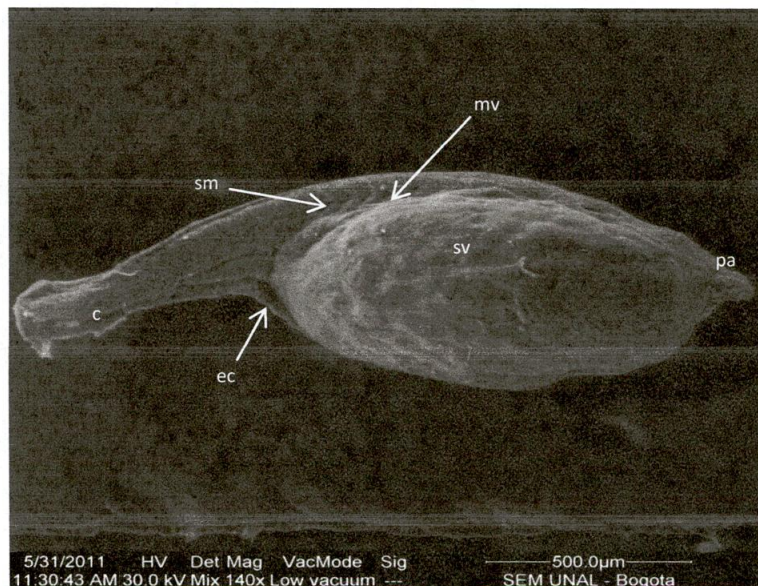


Figura 24. Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento MET 12 - 17 post-congelación. Se observa, parte anterior (pa); acortamiento de la cola (c); membrana vitelina (mv); saco vitelino (sv); somitas (sm); ectodermo (ec). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (140x).



Figura 25. Larva cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), perteneciente al tratamiento DMSO 12 - 17 post-congelación. Se observa en detalle acortamiento del tercio medio de la cola (ac); membrana vitelina (mv); saco vitelino (sv); somitas (sm); ectodermo (ec). Fijación (formaldehído bufferado al 10%; pH: 6,7 - 6,8; 1260 mosm.). Fotografía microscopía electrónica de barrido. Aumento (500x).

### Discusión.

Los embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) poseen una membrana externa, el corion, tras el cual se encuentra un espacio perivitelínico que proporciona mayor protección del ambiente. La mayoría de las características de los embriones control (10 HPF), observados en este trabajo se asemejan a los reportados en la literatura, estas, son separadas en etapas, según el tiempo de desarrollo y los eventos ocurridos a los embriones en cada hora, enunciándolas, para 10 HPF, como etapa final del periodo gástrula – inicio de organogénesis, caracterizada por diferenciación céfalo- caudal, con simetría bilateral del embrión, dispuesto sobre el vitelo en forma arqueada, morfogénesis, desarrollo de somitas y elongación del embrión (segmentación) (Botero et al., 2004; Díaz et al., 2010).

La terminología utilizada para describir el desarrollo embrionario se basó en trabajos de Cardoso et al., (1995); Botero et al., (2004); Pereira et al., (2006); Faustino et al., (2007) y Marques et al., (2008), reportados por Díaz, (2010). De acuerdo a lo anterior, se midió el efecto de los crioprotectores sobre las estructuras del embrión, estableciendo los porcentajes de viabilidad de los embriones post-congelación, mediante evaluación visual y estereoscópica de sus características, con el fin de comparar dicho efecto, con los cambios morfológicos identificados y describir diferencias entre tratamientos; de esta manera, se encontró que los embriones tratados con DMSO 12% - glucosa 17% y MET 12% - glucosa 17%, lograron un mayor porcentaje de viabilidad embrionaria de  $94.14 \pm 4.5\%$  y  $93.68 \pm 4.29\%$  respectivamente, superando al resultado del tratamiento control ( $89.27 \pm 4.38\%$ ); similar a lo reportado por Fogli da Silveira, (1990) en estudios sobre crioconservación de semen en Cachama y Minardi, (2007) en embriones de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran al DMSO, como el crioprotector con mayor poder de protección del material biológico (embriones 10 HPF), en las cuatro concentraciones utilizadas, ya que sus resultados (% de viabilidad) no tuvieron diferencia significativa con los obtenidos por el tratamiento control, como lo reportado por Navarro et al., (2004) para semen de *Piaractus brachypomus*; otro aspecto a tener en cuenta es la posible mayor rapidez con que este crioprotector ingresa a través del corion y desplaza al agua fuera del espacio perivitelínico, causando disminución del volumen del embrión, impidiendo en cierta forma que el crioprotector tenga efecto tóxico sobre estructuras internas del embrión (Cabrita et al., 2003), e impide la formación de cristales nocivos que causan efectos letales luego del proceso de congelación. Contrario a lo que se pudo apreciar en los cuatro tratamientos a base de DMA como crioprotector, que reportaron porcentajes de viabilidad mínimos, con un máximo de  $53.1 \pm 7.12\%$  para el tratamiento DMA 12% - glucosa 10% y un mínimo de  $2.17 \pm 1.72\%$ , para el tratamiento DMA 20% - glucosa 10%, ambos, con diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), respecto al tratamiento control (ver tabla 2). En general, los diluyentes



que tuvieron como base crioprotectores internos a concentraciones del 20%, presentaron los menores valores promedios de viabilidad embrionaria, a excepción de lo encontrado para los dos diluyentes basados en DMSO al 20%, que presentaron un porcentaje consolidado de viabilidad aceptable ( $80.78 \pm 1.85\%$ ) (ver figura 14). Sin embargo, Beirao, (2006), reportó que bajo el procedimiento de micro inyección de DMSO en embriones de dorada (*Sparus aurata*), observó que soportaban concentraciones superiores al 40% sin reducción de su tasa de supervivencia, aclarando que dicha resistencia al crioprotector era específico para cada especie. De otra parte Chao, (1997) concluyó, que luego del poco éxito obtenido con el uso de DMSO al 15% como crioprotector para embriones tardíos de ostras, se establecieron programas que incluyeron el uso de DMSO al 23.4%, en los cuales se obtuvo tasas de supervivencia entre 50.8 y 71.2%, siendo superiores y diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ), de los promedios obtenidos para los demás grupos de crioprotectores utilizados. Lo anterior se asemeja a lo reportado por Catcoparco, (2010), en la evaluación de motilidad de espermatozoides de anchoveta peruana en contacto con DMSO al 15%, donde los valores de motilidad espermática observados a los 0 y 5 min, fueron ( $70,3 \pm 4,3\%$  y  $42,9 \pm 6,1\%$ ), respectivamente, siendo significativamente diferentes a los obtenidos con etanol, glicerol y propilenglicol ( $P < 0,05$ ), cuya motilidad espermática fue menor al 20%; semejante a lo encontrado por Martínez et al., (2010) quien evaluó el mismo efecto sobre la motilidad rápida de espermatozoides de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) usando DMSO al 15%. Por último, teniendo en cuenta el porcentaje de viabilidad consolidado para cada uno de los cuatro crioprotectores (ver figura 9), se observa que el porcentaje de viabilidad embrionaria de los tratamientos con base en DMSO ( $86.27 \pm 1.20\%$ ), no tuvo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con el grupo control ( $89.27 \pm 0.73\%$ ), que logró el mayor porcentaje de supervivencia, ajustándose a lo reportado por Ramírez en el 2010, para crioconservación espermática en siluriformes donde el DMSO presentó una rápida penetración celular y relativamente baja toxicidad a bajas temperaturas, siendo ampliamente

recomendado. Los tratamientos a base de MET ( $45.87\% \pm 4.41\%$ ) y ETG ( $43.34 \pm 3.68\%$ ), presentaron porcentajes de viabilidad medios, con diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ), pero similares entre sí. Los tratamientos a base de DMA con porcentaje de viabilidad embrionaria consolidado de  $21.97 \pm 3.03\%$ , lo muestran como el de más bajo rendimiento, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ), lo cual es similar a los resultados de Wayman et al., (1996), reportado por Chao, (2001), en donde se evaluó al DMA en comparación con tres crioprotectores más (DMSO, metanol y glicerol), para la criopreservación de semen proveniente de trucha plateada (*Cynoscion nebulosus*), encontrando que DMA, metanol y glicerol, fueron inferiores a DMSO al 10%. De Baulny et al., (1997), también trató de criopreservar semen de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), utilizando DMA como crioprotector, pero falló. Lo anterior posiblemente por la mayor toxicidad que ejerce el DMA sobre las estructuras internas con mayor presentación de lesiones reportadas durante la congelación y descongelación convencionales dentro de los rangos de temperatura convencionales, muchos de las lesiones ocurren dentro de rangos de temperaturas entre  $0$  y  $-40^{\circ}\text{C}$ ; dos de las mayores causas, eliminación de calor y aplicación de crioprotectores; otras causas del criodaño incluyen: fluctuación de Ph, choque térmico, formación de cristales de hielo, efecto de la presión osmótica y la toxicidad del crioprotector. La fluctuación del ph a una temperatura entre  $0$  y  $-55^{\circ}\text{C}$  durante la congelación y/o descongelación, hace que en los tejidos el efecto buffer de las sales se destruya, y el Ph de la solución biológica, cambie ocasionado criodaño temporal o permanente. Con respecto a los efectos del choque de frío, son causados por el cambio de los lípidos de membrana de la fase líquida a la sólida durante la refrigeración ( $10^{\circ}\text{C}$  a  $-16^{\circ}\text{C}$ ), en la cual hay formación espontánea de cristales de hielo, deshidratando los lípidos de la membrana e induciendo al incremento en la tensión y daños en la superficie de membrana. por su parte, los efectos de la presión osmótica tienen un rol importante dentro de la crioinjuria, en razón a que el agua es menos removida de las áreas menos permeables durante la congelación, con la consecuente

formación de cristales en los alrededores de las células deshidratándolos y causando aumento en la concentración de solutos fuera de las células así como imbalance en la concentración de sales, que perjudica a los tejidos; por último, otro de los factores que puede afectar la viabilidad de las células y explicar estas fallas, es la toxicidad del crioprotector del cual depende en gran manera la tolerancia de los tejidos al procedimiento de crioconservación, ya que se deben tener en cuenta su baja toxicidad, alta solubilidad en agua y capacidad de fácil penetración de barreras para calcular exactamente cuál es la concentración de crioprotector a utilizar, por cuanto tiempo de exposición y a que temperatura para cada tipo de tejido o célula en particular, con el fin de minimizar las injurias a los tejidos por este concepto durante el proceso de congelación; es de aclarar que es también importante el estado de desarrollo en que se encuentran de los embriones en este caso, por lo cual es primordial determinar el punto de equilibrio entre la eficiencia crioprotectiva del crioprotector y la tolerancia a la toxicidad de los tipos de células a criopreservar, por lo anterior, se aduce dicho fallo a que el espermatozoide disminuye su viabilidad rápidamente, lo que parece ocurrir también para las estructuras internas del embrión, las cuales se pueden ver mayormente afectadas por el crioprotector, que en este caso, se podría asumir para DMA, sobretodo en etapas iniciales de desarrollo ya que los mecanismos de protección del embrión no se han desarrollado en su total dimensión, como lo referenciado por ahammad et al., (2003) en embriones de rohu (*labeo rohita*).

#### *Viabilidad embrionaria a lo largo del tiempo*

En general, todos los tratamientos aplicados mostraron disminución progresiva de la

viabilidad embrionaria en mayor o menor proporción a medida que transcurrió el tiempo de incubación. Para las soluciones crioprotectoras basadas en DMSO, el mejor porcentaje de viabilidad embrionaria del estudio ( $97.77 \pm 1.11\%$ ) en la primera hora de medición, lo mostró el diluyente DMSO 12% - glucosa 17%, siendo superior al mostrado por el tratamiento control ( $90.84 \pm 1.44\%$ ), sin

diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con este último ni con las cuatro soluciones crioprotectoras dispuestas para DMSO a lo largo del tiempo, las cuales fueron disminuyendo sus porcentajes de viabilidad hasta llegar a un mínimo consolidado de  $83.33 \pm 1.11\%$  obtenido por el diluyente DMSO 20% - glucosa 10% en la hora sexta de medición (ver figura 11); la misma tendencia fue observada por Cabrita et al., (2006), al evaluar la viabilidad de embriones de dorada (*Sparus aurata*), en dos etapas de desarrollo embrionario, expuestos a soluciones vitrificantes basadas en DMSO con la adición de crioprotectores externos como la sucrosa, los cuales no afectaron la tasa de eclosión y fueron similares a los obtenidos por el control; los mejores valores fueron obtenidos con el uso de DMSO al 7,81%, con una eclosión de 98.6%, luego de 30 minutos de exposición a la solución vitrificante. El segundo lugar, luego de finalizada la primera hora de incubación fue para el diluyente MET 12% - glucosa 17%, obtuvo porcentaje de viabilidad promedio alta ( $96.66 \pm 1.36\%$ ), siendo también superior al encontrado en el tratamiento control ( $90.84 \pm 1.44\%$ ), dicho resultado fue disminuyendo con el tiempo de incubación, hasta llegar a la sexta hora de medición con un promedio de  $89.44 \pm 2.78\%$  y eclosión simultánea del tratamiento control ( $83.05 \pm 2.24\%$ ), (ver figura 10); Ahammada et al., (2003), encontró resultados similares en carpa común (*Cyprinus carpio*), donde la eclosión de embriones estuvo entre 44 y 45%, los mejores resultados se lograron cuando se combinó el efecto del metanol al 4.8% con sucrosa al 17.1%, observando una interacción clara entre la temperatura de almacenamiento y la concentración del crioprotector, debido a la baja toxicidad del mismo a bajas temperaturas, sin embargo, la eclosión tiende a declinar con el incremento del periodo de almacenamiento ; Zhang y Rawson, (1995) encontraron necesario incrementar la concentración de metanol de 3.2% a 16% para bajar la temperatura de enfriamiento de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$  para embriones de pez cebra, ello implicaría que una concentración de metanol de 4.8% que es buena para temperaturas de  $4^{\circ}\text{C}$ , pudiera no ser útil para mantener la eclosión a temperaturas de  $-2^{\circ}\text{C}$ , por lo que fue requerida una alta concentración de metanol para prevenir lesiones por



enfriamiento en embriones de carpa común. Zhang y Rawson, (1989) detectaron una concentración óptima de metanol suplementado con sucrosa, así: 3.2% a 0°C; 6.4% a - 5°C; 9.6% a - 10°C y 16% a - 15°C. En lo referente a ETG, la solución crioprotectora que mostró un mayor porcentaje de viabilidad en la primera hora de medición fue ETG 12% - glucosa 17% con  $95.00 \pm 2.47$ , superior al reportado para el tratamiento control ( $90.84 \pm 1.44\%$ ), sin que se presentara diferencia significativa entre sí, ni con los demás tratamientos dispuestos para ETG hasta la segunda hora de medición ( $p > 0.05$ ), a partir de la tercera hora de medición, los diluyentes ETG 20% - glucosa 10% y ETG 20% - glucosa 17%, presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento control (ver figura 12). De acuerdo a lo anterior, Minardi et al., (2007), reportó una tendencia semejante en embriones de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*), en los que el metanol obtuvo porcentajes de supervivencia cercanos a los del grupo control sin diferencia significativa entre ellos, contrario a lo relacionado con ETG, donde el tratamiento control presentó una tasa de eclosión superior con diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) a -8°C por 6 horas de almacenamiento, infiriendo que el metanol podría ser mejor crioprotector en comparación con etilenglicol para este caso. Llama la atención, que no se obtuvo eclosión de larvas en los tratamientos a base de etilenglicol a pesar de que este último fue considerado menos tóxico que el metanol por Streit Jr., (2005), para embriones de pacú (*Piaractus mesopotamicus*), a concentraciones del 10%, pero a temperaturas de 26,1°C; no obstante, el etilenglicol mostró ser ineficiente en cuanto a protección del embrión durante el enfriamiento a una temperatura de - 8°C, en dicho estudio. Por último, los tratamientos basados en DMA obtuvieron los porcentajes más bajos de viabilidad en la primera hora de medición, donde el diluyente DMA 12% - glucosa 10% con una viabilidad promedio de  $65.55 \pm 15.86\%$ , fue el más cercano al promedio reportado para el tratamiento control ( $90.84 \pm 1.44\%$ ), sin diferencia significativa con este último, durante las seis horas de medición; el diluyente DMA 20% - glucosa 10% reportó el menor porcentaje promedio de viabilidad embrionaria ( $11.94 \pm 8.65\%$ ), en la primera hora de medición, destacando, que a

partir de la segunda hora de medición, reportó viabilidad cero, lo cual ocurrió solo hasta la sexta hora de medición para el diluyente DMA 20% - glucosa 17%; lo que parece indicar, según Fahy, (2010) para este diluyente en particular, que una mayor proporción de crioprotector externo (glucosa 17%), puede ejercer un efecto protector adicional indirecto (su efecto no previene intrínsecamente la toxicidad del crioprotector interno), en contra de los efectos tóxicos que ocasionaría al embrión, por la presencia de altos niveles de crioprotector interno (DMA 20%), basado en la reducción del volumen embrionario, que, cubierto por el crioprotector externo, permite una entrada gradual del crioprotector interno, disminuyendo el shock osmótico ocasionado por la abrupta entrada del mismo y por el efecto "dilución" obtenido de la mezcla entre los dos tipos de crioprotector, llevándolos a niveles sub-tóxicos durante la congelación; lo anterior se explica refiriéndose al corion como la estructura embrionaria que protege al embrión del medio externo y responsable de la regulación del intercambio de fluidos con el entorno, allí radica la importancia de la acción del crioprotector externo (glucosa al 17%), si se tiene en cuenta que su efecto es de tipo mecánico al cubrir y proteger la superficie del corion de las cambiantes condiciones externas, dicho efecto benéfico podría cambiar en nivel de efectividad, de acuerdo a las características intrínsecas del corion las cuales cambian entre especies. Farkas, (2001), referenciado por Junior, (2007), evidenció lo anterior, evaluando la acción de la sacarosa como crioprotector externo, en el mantenimiento de la estabilidad de membrana celular, para disminuir la deformación mecánica provocada por la salida de agua y el ingreso del crioprotector interno, sin afectar estructural o funcionalmente la bicapa fosfolipídica cuando el tejido se expone a una nueva temperatura, basándose en lo encontrado por Rall, (1987), quien confirmó una mayor eficiencia de la sacarosa como crioprotector externo en relación con la glucosa, debido a que es un oligosacárido que posee un efecto adicional de protección celular sobre otros azúcares de cadena más simple, como la glucosa, por provocar una mayor y más rápida deshidratación de los embriones, evitando la formación de cristales de hielo intracelular.

### *Descripción morfológica de las muestras al contacto con cada diluyente*

#### *Pre congelación.*

Como lo reportan Botero et al., (2004) y Díaz et al., (2010), los embriones control del estudio no presentaron diferencia alguna con los reportados en anteriores estudios para la especie. (Ver tabla 4). En embriones sometidos al contacto con los cuatro diluyentes basados en DMSO, que fue el crioprotector que mejor porcentaje consolidado de viabilidad embrionaria presento posiblemente gracias a que se observaron menos cambios morfológicos que los presentados para MET y los demás crioprotectores evaluados en el estudio, consistiendo principalmente en, pliegues en corion (en todos los tratamientos), Hagedorn et al., (1997), reporta que los cambios de volumen (hidratación o deshidratación), son debidos a la permeabilidad al agua y / o a los crioprotectores; el mismo patrón fue verificado durante el presente estudio en todos los tratamientos programados para los diferentes grupos de embriones (10 HPF), antes y después del proceso de congelación – descongelación; otros cambios estructurales consistieron en la menor diferenciación de estructuras internas, disminución del tamaño del embrión, oscurecimiento de estructuras internas en parte centro - caudal del mismo y del área central del saco vitelino, cuya membrana presenta borde irregular con cambio de coloración delimitado a zona central del vitelo, presentándose principalmente, para los embriones sometidos al contacto con los diluyentes DMSO 12% - glucosa 17%, DMSO 20% - glucosa 10% y DMSO 20% - glucosa 17% (ver tabla 8); Magnus y Lubzens, (1995), trabajando con carpa, confieren dichos cambios, a las diferentes concentraciones detectadas de crioprotector (DMSO), en cada una de las estructuras que componen al embrión, destacando, que había penetración del DMSO dentro del saco vitelino, sin embargo, dicha concentración fue muy baja. Hagedorn et al., (1996), trabajando con pez cebra (*Danio rerio*), observó que el DMSO penetró el espacio perivitelinico pero no el compartimento de la yema. Cabrita et al., (2003), reportó que barreras como el corion pueden interferir con el contenido de DMSO en el interior y que el DMSO entrante es localizado solo en un pequeño compartimento como lo es el espacio perivitelinico, haciendo que el

crioprotector pudiera haber alcanzado equilibrio con el medio externo en el compartimento permeable al DMSO, pero no para otros compartimentos embrionarios los cuales no serán beneficiados por la acción del crioprotector. Los embriones sometidos al contacto con los diluyentes basados en MET, presentan cambios morfológicos leves, consistentes en pliegues de la superficie del corion, oscurecimiento de estructuras internas en parte centro-caudal del embrión y área central del saco de la yema, el cual aparece de menor tamaño, con membrana vitelina irregular (MET 12% - glucosa 10%) y cambio de coloración delimitado al área central (MET 20% - glucosa 10%) (Ver tabla 4 y 12), coincidiendo con los cambios morfológicos descritos por Lopes et al., (2011), quien aduce dichos cambios o daños por frío, a algunos factores relacionados con la baja permeabilidad de los diferentes compartimentos estructurales del embrión en ésta etapa del desarrollo (10 HPF), y a problemas de control de la osmoregulación en varios compartimientos del embrión, los cuales deberían ser considerados antes de aplicar la técnica de crioconservación con el fin de mejorar el porcentaje de supervivencia de los embriones luego de la descongelación, hasta su eclosión, para embriones de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*), refrigerados en varias etapas del desarrollo, estableciendo que no hubo diferencias entre los diámetros de los embriones con tiempos de desarrollo entre 8 y 13.3 hpf, a enfriamiento de  $-8^{\circ}\text{C}$ , comparados con embriones control, basado en que los estados embrionarios intermedios (8 – 13.3 HPF), son más resistentes a lesiones por enfriamiento o por la toxicidad del crioprotector, ya que sus membranas permiten reguladamente la entrada del crioprotector y sus vías metabólicas están mejor desarrolladas, dichos resultados coinciden con lo reportado por Ahammad et al., (2003) en embriones de rohu (*Labeo rohita*), los cuales en su estado intermedio de desarrollo obtuvieron los niveles más altos de supervivencia embrionaria, también aduce que los pocos cambios morfológicos, en etapas tardías ( $> 13.3$  hpf), se deben a que estos embriones entran en contacto con el crioprotector, siendo menos susceptibles que los embriones en etapas tempranas de desarrollo, los cuales, según Zhang y Rawson en 1995, son menos resistentes al enfriamiento debido a su alta

concentración de lípidos, que afecta la acción del crioprotector, además, la falta de desarrollo de las vías de regulación metabólica, los hace más sensibles a los efectos tóxicos del crioprotector, aclarando que los embriones en estados tardíos, tienen la limitante de ser más complejos y no permitir la entrada del mismo, por tanto son también muy susceptibles al frío, muriendo poco antes de la eclosión o presentando larvas no eclosionadas. En embriones sometidos al contacto con los cuatro diluyentes basados en ETG, los cambios consistieron principalmente en pliegues en corion, menor diferenciación y tamaño de estructuras internas, con oscurecimiento del área centro – caudal del saco de la yema (en todos los tratamientos); excepto para ETG 12% - glucosa 17%. Es de anotar que los embriones sometidos al tratamiento ETG 12% - glucosa 10%, además de lo anteriormente descrito, mostraron menor tamaño del saco vitelino y membrana vitelina irregular (ver tabla 9). Dichos cambios morfológicos son menores a los presentados por DMA y más evidentes que los presentados en los embriones del grupo MET, lo cual es corroborado por Zhang et al., (2005); Chen y Tian, (2005) y Lahnsteiner, (2008), quienes coinciden en que para embriones de platija (*Paralichthys olivaceus*), el MET, es menos tóxico que el DMSO o el ETG. Por el contrario Cabrita et al., (2006), encontró que para dorada el ETG, fue el crioprotector menos tóxico; lo que puede indicar que probablemente pueden existir crioprotectores adecuados para una especie en particular que son inadecuados para otra, lo cual podría explicarse por la gran variedad de diferencias específicas de tamaño, contenido de agua y estructuras internas y entre los embriones de las diferentes especies de peces. Los embriones sometidos al contacto con los cuatro tratamientos dispuestos para el crioprotector DMA, presentaron en general, pliegues en superficie del corion, ruptura del saco vitelino con salida de vitelo al espacio perivitelínico, oscurecimiento e indiferenciación de estructuras embrionarias en comparación con la descripción morfológica de los embriones control (ver tabla 10). Este hecho lo reporta Lahnsteiner, (2008), en donde establece que los crioprotectores internos más tóxicos utilizados para su estudio en pez cebra (*Danio rerio*), fueron metanol (MET) y dimetil acetamida (DMA) y



que los crioprotectores externos (sucrosa y glucosa), fueron menos tóxicos comparados con los anteriores, ello puede deberse, según lo reportado por Fahy, (2010), a que en la medida en que aumente la proporción de crioprotector externo en el diluyente que está en contacto con el embrión, este puede ejercer un efecto protector adicional indirecto ya que no previene por sí mismo la toxicidad del crioprotector interno, sino que basado en la reducción del volumen embrionario, mediante el favorecimiento de la extracción rápida del agua y un efecto de cobertura sobre la superficie del corion, regula la entrada del crioprotector interno, disminuyendo el shock osmótico ocasionado por la brusca entrada del mismo y por el efecto "dilución" obtenido de la mezcla entre los dos tipos de crioprotector, llevándolos a niveles sub-tóxicos disminuyendo sus efectos adversos.

#### *Post congelación.*

Los embriones control no presentaron diferencia alguna con los controles observados antes de la congelación ni con los reportados en anteriores estudios para la especie objeto del presente estudio (ver tabla 11). En los embriones sometidos al contacto con las cuatro soluciones crioprotectoras basadas en MET, se encontró menor diferenciación y tamaño de estructuras internas, oscurecimiento del saco vitelino, de borde irregular, pliegues en superficie del corion y cambio de coloración delimitado a zona central del vitelo (Ver tabla 12). En embriones postcongelación, sometidos al contacto con los diluyentes basados en DMSO, se observaron menos cambios morfológicos que los presentados para MET, consistiendo principalmente en, pliegues en corion (en todos los tratamientos), menor diferenciación de estructuras internas, menor tamaño del embrión, oscurecimiento en parte central y caudal del embrión, área central del saco vitelino, de borde irregular, menor tamaño y cambio de coloración delimitado en zona central del vitelo, sin diferencias apreciables en comparación con el análisis fotográfico realizado para los mismos tratamientos antes de la congelación (ver tabla 13). En cuanto a los embriones sometidos al contacto con los cuatro diluyentes dispuestos a base de ETG, se encontró principalmente

pliegues múltiples en corion, menor tamaño y desarrollo de estructuras internas y oscurecimiento en parte caudal del vitelo, sin diferencias apreciables en comparación con los cambios observados en los embriones antes de la congelación (ver tabla 14). Los embriones sometidos al proceso de congelación en contacto con los cuatro tratamientos basados en el uso de DMA como crioprotector, mostraron mayores daños a nivel estructural sobre los embriones, comparados con los observados por el efecto de las otras tres clases de crioprotectores durante el estudio. Evidenciándose principalmente sobre la membrana vitelina, oscurecimiento de estructuras internas con menor desarrollo y/o destrucción de las mismas; no se detectaron diferencias apreciables en comparación con los cambios observados en los embriones antes de la congelación (ver tabla 15). Lo anterior sugiere, como lo explican Zhang y Rawson en 1995, para embriones de pez cebra (*Danio rerio*), que teniendo en cuenta la ausencia de diferencias marcadas en los hallazgos de las anomalías morfológicas encontradas en embriones sometidos a distintos diluyentes antes y después del proceso de congelación - descongelación, se puede inferir, que fueron causados preferentemente por la dificultad de ingreso del crioprotector al interior de embriones con desarrollo entre intermedio y tardío (embriones 10 HPF utilizados para este estudio), privándolos de la acción protectora del mismo, que los hace más susceptibles a sufrir lesiones estructurales por acción de las bajas temperaturas de enfriamiento durante un tiempo de almacenamiento determinado, siendo esto específico para cada especie Suzuki et al., (1995) y Cabrita et al., (2006).

## Referencias bibliográficas

Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D., Jana, B.B., 2003. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio L.*) embryos stored at 4 and -2°C in different concentrations of methanol and sucrose. *Theriogenology* 60:1409–1422.

Ahammad, MM, Bhattacharyya D, Jana BB., 2003. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* 46:1–16.

Arias, J.A., 2006. Estado actual del conocimiento sobre el yamú (*Brycon amazonicus*) Instituto de Acuicultura (IALL) de la Universidad de los Llanos, A.A. 24-30, Villavicencio, Colombia.

Beirão, J., Robles, V., Herráez, M.P.C., Sarasquete, Dinis, M.T., Cabrita, E., 2006. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 261 897–903.

Botero, M., Fresneda, A., 2004. Descripción del desarrollo embrionario de cigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17 (4): Suplemento.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., Herráez, M.P., 2003. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 47: 204–213.

Cabrita, E., Chereguini, O., Luna, M., Paz, P.d., Herráez, M.P., 2003. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 221, 593-604.



Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Paz, P.d., Anel, L., Herráez, M.P., 2003. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology* 60, 463-473.

Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C., Sarasquete, M.C., Herráez, M.P., 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 251: 245 – 255.

Catcoparco, C., 2010. Criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). *Revista de biología marina y oceanografía* 45 (1): 121 – 126.

Chen, S.L., Tian, Y.S., 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63: 1207-1219.

Cruz, P.E., Medina, V.M., Velasco, Y., 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19, 152-159.

Díaz-Olarte, J.; Marciales-Caro L. J.; Cristancho, V. F. & Cruz-Casallas, P. E., 2010. Comparación del desarrollo embrionario de *Piaractus brachypomus* (Serrasalminidae) y *Pseudoplatystoma sp.* (Pimelodidae). *Int. J. Morphol.*, 28(4):1193-1204.

De Baulny, B.O., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Maise, G., 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 34 (2), 141–149.

Eslava, P. R., Hernández, C. P., Gómez, L. A., 1995. Hematología básica de la

cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. MVZ Unillanos 1: 3-5.

Fahy, G.M., 2010. Cryoprotectant toxicity neutralization. 21st Century Medicine. Cryobiology 60 (3): (1), S45–S53.

Farkas, T.; Fodor, E.; Kitajka, K.; Halver, J.E. 2001. Response of fish membranes to environmental temperature. Aquaculture Research, v.32, p.645–655.

Fogli da Silveira W, Kavamoto ET, Narahara MY., 1990. Avaliação espermática, preservação criogenica do semen do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), proveniente de reprodução induzida. Boletim do Instituto de pesca. 17: 1-13.

Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E., Ángel, M.O., 2004. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 17, 46-52.

Hagedorn, M., Hsu E., Kleinhans, F.W., and Wildt, D.E., 1997. New Approaches for Studying the Permeability of Fish Embryos: Toward Successful Cryopreservation1. Cryobiology 34:335–347 Article CY972014.

Hagedorn M, Kleinhans FW, Wildt DE, Rall WF, 1997. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, (*Brachydanio rerio*). Cryobiology 34:251–63.

Hagedorn M, S.L. Lance, D.M. Fonseca, F.W. Kleinhans, D. Artimov, R. Fleischer, A.T.M.S. Hoque, M.B. Hamilton, B.S. Pukazhenthii., 2002. Altering Wsh embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation, Biol.Reprod 67:961–966.

Herrera, D. C., Eslava, P. E., legui C. A., 1996. Aspectos de anatomía macro y

microscópica del bazo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. ACOVEZ 21:16-21.

Júnior, D.P.S., Digmayer, M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Moraes, G.V.d., Galo, J.M., 2007. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. 42, 1199-1202.

Lahnsteiner F., 2008. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Theriogenology 69:384 –96.

Landines, M. A. & Mojica, H. O. 2006. Manejo y reproducción de Carácidos. En: Daza, P.; Landines, M. & Sanabria, A. (Eds.) Reproducción de Peces en el Trópico. Ed. Imprenta Nacional de Colombia. Bogotá. 1 : 91-104.

Lopes, T. da S., Romagosa, E., Streit Jr, D.P., Ribeiro, R.P., Digmayer, M., 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. Theriogenology 75: 570–576.

Magnus, Y., Ar, A., Lubzens, E., 1995. Permeability and toxicity of H DMSO to developing ornamental carp eggs. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, 2 – 8 July. University of Texas, Austin.

Martinez., J. G., 2010. Efecto de la concentración de dmsó y glucosa sobre la calidad espermática y el material genético en semen crioconservado de bocachico (*prochilodus magdalenae*). Proyecto de Grado Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 56 – 77, 111-122.

Martino, G., 1994. Ensayos preliminares sobre criopreservación de espermatozoides de

cachama (*Colossoma macropomum*) y morocoto (*Piaractus brachypomus*). Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura y V Seminario Nacional de Acuicultura. Acuicultura y Desarrollo Sostenible. Bogotá; 354 – 356.

Mesa-Granda, M.N., Botero, M.C., 2007. La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. 2 Grupo GRICA. Facultad de ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 20:1.

Minardi, J., Digmayer M., Streit Júnior, D. P., 2007. Resfriamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com diferentes soluções crioprotetoras. Jaboticabal UNESP: 1- 3.

Navarro, O.J., Velasco Y.M., Cruz Casallas, P.E., 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 17: Suplemento: 53-59.

Nuñez, J., Duqué, R., 2008. Induced breeding and larval rearing of Surubí (*Pseudoplatystoma fasciatum*) (Linnaeus, 1766), from the Bolivian Amazon. Aquaculture. Res., 39:764-76, 2008.

Pardo-Carrasco, S., Atencio, V., Arias, A., 1999. Contribución al conocimiento del aparato circulatorio de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. Asoc Col Ict 3:63-68.

Rall, W.F., 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 24: 387-402.

Rall, W.F., 1993. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for

application to the conservation of salmonid fishes, in: J.G. Cloud, G.H. Thorgaard (Eds.), Genetic Conservation of Salmonid Fishes, Plenum, New York. pp. 137–158.

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

Senhorini, J.A., Parra, M.A.L., 2005. Reproducción de peces en el trópico. “Generalidades sobre el manejo y selección de reproductores de peces reofílicos”. Instituto Colombiano de Desarrollo Rural (INCODER) 79 - 88. ISBN 958 – 33 – 8515 – 8.

Streit Júnior, D. P., 2005. Resfriamento de Embriões de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com diferentes crioprotetores. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 76 p., Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.

Suzuki, T., Komada, H., Takai, R., Arii, K., Kozima, T.T., 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant Me<sub>2</sub>SO and its concentration in several fish embryos. *Fisheries Science* 61, 193–197.

Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R., 1996. Cryopreservation of sperm of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gulf Res. Rep.* 9 (3), 183–188.

Wittingham, D.G., Rosenthal, H., 1978. Attempts to preserve herring embryos at subzero temperatures. *Arch Fischereiwiss* 29, 75-79.

Zhang XS, Zhao TC, Hua TC, Zhu HY., 1989. A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos. *Cryo-Lett* 10:271–8.

Zhang, T., Rawson, D.M., 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydamio rerio*) embryos. *Criobiology*, 32: 239 – 46.

Zhang, T., Rawson, D.M., 1996. Feasibility studies on vitrification of zebrafish (*Brachydamio rerio*) embryos. *Criobiology*, 33: 1-13.

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J., Chen, S.L., 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology* 63, 763-773.



## 7. CONCLUSIONES

- Los embriones de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en estados intermedios de desarrollo (8 – 10 HPF), mostraron en general, niveles de supervivencia viables, superiores a los reportados para embriones en etapas tempranas o tardías de desarrollo, para esta especie, en presencia de un crioprotector interno y externo, demostrando que dicha etapa de desarrollo debe ser tomada en cuenta para futuros trabajos.
- El diluyente compuesto por dimetil-sulfóxido (DMSO) al 12% (crioprotector interno), acompañado de glucosa al 17% (crioprotector externo), obtuvo resultados similares al tratamiento control, en cuanto a porcentaje de viabilidad final y eclosión, por lo cual se recomienda para ser tenido en cuenta en la ejecución de futuros estudios que involucren un varios tiempos de almacenamiento a una temperatura similar a la programada en el presente estudio.
- El dimetil-sulfóxido (DMSO), obtuvo niveles altos de viabilidad y eclosión dentro del estudio, que lo indicaría, como el crioprotector de elección, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en otros reportes con similares condiciones.
- El tiempo de exposición al crioprotector dentro del proceso de crioconservación, podría ser el principal problema de las fallas encontradas hasta el momento; ello debería ser optimizado mediante la aplicación de técnicas acordes a las características de los embriones objeto de estudio, que permitan lograr una concentración uniforme del crioprotector en los diferentes compartimientos del mismo.

- Embriones de *P. brachypomus* (10HPF), obtenidos por reproducción artificial y conservados en DMSO 12–17% o MET 12–17% a  $-14^{\circ}\text{C}$  x 1 hora, reflejan porcentajes de viabilidad embrionaria y eclosión satisfactorios, siendo susceptible su conservación a temperaturas bajo cero y sirviendo como base para establecer protocolos de conservación a  $-196^{\circ}\text{C}$ .



## 8. RECOMENDACIONES

Los estudios sobre almacenamiento de embriones a bajas temperaturas, deben propender por la adecuación de un paquete tecnológico como herramienta para la crioconservación de material genético con fines comerciales y de importancia biológica (especies en peligro de extinción o amenazadas), a partir de estudios detallados para cada especie en lo referente a la identificación del estadio embrionario ideal para llevar a cabo la congelación, vitrificación y/o conservación a temperaturas criogénicas de los mismos; como también la estandarización e implementación de protocolos de congelación y descongelación de embriones que mitiguen los riesgos de daño celular que ocurren durante este proceso de crioconservación. Así mismo, la estandarización de las concentraciones adecuadas de los crioprotectores y estudios sobre permeabilidad de los mismos, se convierten en un punto clave para lograr con éxito esta biotecnología, disminuyendo así la tasa de mortalidad embrionaria a causa de la toxicidad originada por efecto de los diluyentes.

Se deben realizar investigaciones adicionales que incluyan el uso de crioprotectores nuevos y otras interacciones entre crioprotectores intracelulares y extracelulares, que puedan ser más efectivos en la penetración de los embriones de peces que faciliten una distribución uniforme en todos sus compartimentos y por tanto una menor toxicidad.

El conocimiento del curso de penetración del crioprotector al interior del embrión antes de la congelación sería muy útil para el diseño de un método de criopreservación adecuado para cada caso.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D., Jana, B.B., 2003. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio L.*) embryos stored at 4 and -2°C in different concentrations of methanol and sucrose. *Theriogenology* 60:1409–1422.

Ahammad, MM, Bhattacharyya D, Jana BB., 2003. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* 46:1–16.

Albarracín, J., 2005. Vitricación de ovocitos de bovinos mediante la técnica open pulled straw, Tesis de doctorado Universidad Autónoma de Barcelona.

Arav, A., Rubinsky, B., Seren, E., et al. 1994. The role of thermal hysteresis protein during cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 41 (1):107-112.

Arias, J.A., 2006. Estado actual del conocimiento sobre el yamú (*Brycon amazonicus*) Instituto de Acuicultura (IALL) de la Universidad de los Llanos, A.A. 24-30, Villavicencio, Colombia.

Babin, J. P., André, M., Forge, J., Knoll-Gellida, A., Rawson, D.M., & Zhang, T., 2006. Development of oocyte viability molecular signature (OVMS) assays for zebrafish (*Danio rerio*) oocyte cryopreservation studies. *Cybio*, 32 (2) suppl.: 217.

Bart, A., 2000. New approaches in cryopreservation of fish embryos. *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society 179 – 187.

Beirão, J., Robles, V., Herráez, M.P.C., Sarasquete, Dinis, M.T., Cabrita, E., 2006. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 261 897–903.

Botero, M., Fresneda, A., 2004. Descripción del desarrollo embrionario de cigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macroporum*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 17 (4): Suplemento.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., Herráez, M.P., 2003. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Cryobiology 47: 204–213.

Cabrita, E., Chereguini, O., Luna, M., Paz, P.d., Herráez, M.P., 2003. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 221, 593-604.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Paz, P.d., Anel, L., Herráez, M.P., 2003. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. Theriogenology 60, 463-473.

Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C., Sarasquete, M.C., Herráez, M.P., 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquaculture 251: 245 – 255.

Calvi, S.L., Maise, G., 1998. Cryopreservation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Blastomeres: Influence of Embryo Stage on Postthaw Survival Rate. Cryobiology 36, 255-262.

Catcoparco, C., 2010. Criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). Revista de biología marina y oceanografía 45 (1): 121 – 126.

Cerdà, J., 2002. Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación. Boletín Instituto Español de Oceanografía 18, 145-152.

Chao, N.H., Ta-Te Lin; Yun-Ju Chen; Hui-Wen Hsu; I-Chiu Liao., 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. Aquaculture 155:31-44.

Chao, N.H., Liao, I.C., 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos Taiwan Fisheries Research Institute, 199 Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan. Aquaculture 197:161-189.

Chen, S.L., Tian, Y.S., 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. Theriogenology 63: 1207-1219.

Critser, J.K., Agca, Y., Gunasena, K.T., 1997. The cryobiology of mammalian oocytes. In: Karrow A.M, Crister J. K, editors. Reproductive tissue banking. San Diego: Academic Press. 332-358 pp.

Cruz, P.E., Medina, V.M., Velasco, Y., 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 19, 152-159.

De Baulny, B.O., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Maise, G., 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) spermatozoa. Cryobiology 34 (2), 141-149.

Delgado M. Valdez Jr., Akira Miyamoto, Takao Hara, Shinsuke Seki, Magosaburo Kasai, Edashige, K., 2005. Water- and cryoprotectant-permeability of mature and



immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology* 50, 93-102.

Denniston, R.S., Michelet, S., Godke, R.A., 2000. Principles of cryopreservation. In. Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Ed). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 59-74.

Díaz-Olarte, J.; Marciales-Caro L. J.; Cristancho, V. F. & Cruz-Casallas, P. E., 2010. Comparación del desarrollo embrionario de *Piaractus brachypomus* (Serrasalminidae) y *Pseudoplatystoma* sp. (Pimelodidae). *Int. J. Morphol.*, 28(4):1193-1204.

Dinnyés, A., Urbányi, B., et, al. 1998. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* 50: 1-13.

Eslava, P.R., Hernández, C.P., Gómez, L.A., 1995. Hematología básica de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev. MVZ Unillanos* 1: 3-5.

Espinal, C., Martínez H., González F., 2005. La cadena de la piscicultura en Colombia. "Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005". Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 4-5.

Fahy, G.M., Farlane, M., Angell, C. A., Meryman, H.T., 1984. Vitrification as an approach cryopreservation. *Cryobiology* 21(4): 407 -426.

Fahy, G. M., 1986. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. *Pro Clin. Biol. Res* 224:305-335.

Fahy, G.M., 2010. Cryoprotectant toxicity neutralization. *21st Century Medicine. Cryobiology* 60 (3): (1), S45–S53.

Farkas, T.; Fodor, E.; Kitajka, K.; Halver, J.E. 2001. Response of fish membranes to environmental temperature. *Aquaculture Research*, v.32, p.645–655.

Fogli da Silveira W, Kavamoto ET, Narahara MY., 1990. Avaliação espermática, preservação criogenica do semen do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), proveniente de reprodução induzida. *Boletim do Instituto de pesca*. 17: 1-13.

Fornari, D., 2010. Freezing injuries in the embryos of "*Piaractus mesopotamicus*". *Zygote* 1- 6.

Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E., Ángel, M.O., 2004. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17, 46-52.

Hagedorn, M., Hsu E., Kleinhans, F.W., and Wildt, D.E., 1997. New Approaches for Studying the Permeability of Fish Embryos: Toward Successful Cryopreservation<sup>1</sup>. *Cryobiology* 34:335–347 Article CY972014.

Hagedorn M, Kleinhans FW, Wildt DE, Rall WF, 1997. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology* 34:251–63.

Hagedorn M, S.L. Lance, D.M. Fonseca, F.W. Kleinhans, D. Artimov, R. Fleischer, A.T.M.S. Hoque, M.B. Hamilton, B.S. Pukazhenthii., 2002. Altering Wsh embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation, *Biol.Reprod* 67:961–966.

Hagedorn, M., Paterson, A., Mazur, P., Kleinhans, F.W., 2004. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow – freezing is not an option. *Cryobiology* 49, 181–189.

Herrera, D.C., Eslava, P.E., Ilegui C.A., 1996. Aspectos de anatomía macro y microscópica del bazo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. ACOVEZ 21:16-21.

Hochi S., Akiyama, M., Minagawa, G., Kimura, K., and Hanada, A, 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. Cryobiology 42 (1): 69 – 73.

Janik, M., Kleinhans, F.W., Hagedorn, M., 2000. Overcoming a Permeability Barrier by Microinjecting Cryoprotectants into Zebrafish Embryos (*Brachydanio rerio*). Cryobiology 41, 25-34.

Jr, D.M.V., Miyamoto, A., Hara, T., Edashige, K., Kasai, M., 2005. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. Theriogenology 64, 112-122.

Jr, D.M.V., Miyamoto, A., Hara, T., Seki, S., Kasai, M., Edashige, K., 2005. Water and cryoprotectant permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). Cryobiology 50, 93-102.

Júnior, D.P.S., Digmayer, M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Moraes, G.V.d., Galo, J.M., 2006. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. 42, 1199-1202.

Katkov, I., Isachenkob, V., Isachenkob, E., Kim, M. S., Lulatd, A.G., Mackay, A.M., Levine, F., 2006. Low- and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells. International Journal of Refrigeration 29: 346–357.

Kusuda, S., Teranishi, T., Koide, N., 2002. Cryopreservation of chum salmon

blastomeres by the straw method. *Cryobiology* 45, 60-67.

Lahnsteiner F., 2008. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 69:384 –96.

Leibo, S.P., 2000. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. Department of Biological Sciences, University of New Orleans, Audubon Center for Research of Endangered Species, Lakeshore Drive, New Orleans, USA.

Leveroni, S., Maise, G., 1998. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on Postthaw survival rate. *Cryobiology* 36, 225 – 262.

Lopes, T.daS., Romagosa, E., Streit Jr, D.P., Ribeiro, R.P., Digmayer, M., 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* 75 570–576.

Lin, C., Spikings, E., Zhang, T., Rawson, D.M., 2009. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. *Cryobiology* 59, 42-47.

Lin, C., Spikings, E., Zhang, T., Rawson, D., 2009. Housekeeping genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. *Theriogenology* 71: 1147-1155.

Liu, X.-H., Zhang, T., Rawson, D.M., 2001. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 55, 1719-1731.



Lua, I., Erogluc, A., Kirsten, M.C., Sadlera, B., 2005. Cryopreservation of starfish oocytes Fisun Hamaratog. Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Cryobiology .United States 50: 38–47.

Magnus, Y., Ar, A., Lubzens, E., 1995. Permeability and toxicity of H DMSO to developing ornamental carp eggs. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, 2 – 8 July. University of Texas, Austin.

Martínez, S., Pérez, S., Robles, V., Anel, L., Herraéz., M.P., 2008. Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non – invasive method. Cryobiology 56: 216 – 222.

Martinez., J. G., 2010. Efecto de la concentración de dmsó y glucosa sobre la calidad espermática y el material genético en semen crioconservado de bocachico (*prochilodus magdalenae*). Proyecto de Grado Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 56 – 77, 111-122.

Martino, G., 1994. Ensayos preliminares sobre criopreservación de esperma de cachama (*Colossoma macropomum*) y morocoto (*Piaractus brachypomus*). Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Acuicultura y V Seminario Nacional de Acuicultura. Acuicultura y Desarrollo Sostenible. Bogotá; 354 – 356.

Martino, A., Songsasen, Leibo, S.P., 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra rapid cooling. Biol Reprod 54(5): 1059 – 1069.

Mazur, P., 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J. Gen. Physiol. 47, 347–369.

Mazur, P., 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at

supraoptimal rates, *Cryobiology* 14, 254.

Mazur, P., 1990. Equilibrium, quasi – equilibrium, nonequilibrium freezing of the mammalian embryos, *Cell Biophys.* 17(1):53-92.

Medina, V., Velasco, Y., Cruz, P., 2005. Aspectos generales de la crioconservación en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 18 (1):34 – 46.

Mesa-Granda, M.N., Botero, M.C., 2007. La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. 2 Grupo GRICA. Facultad de ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 20:1.

Minardi, J., Digmayer M., Streit Júnior, D. P., 2007. Resfriamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com diferentes soluções crioprotetoras. Jaboticabal UNESP: 1-3.

Miyake, T., Kasai, M., Zhu, S.E., Sakurai, T., Machida, T., 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylen based solution by a simple method. *Theriogenology* 40, 121-134.

Muller, F., Lele, Z., Váradi, L., Menczel, L., Orbán, L., 1993. Efficient transient expression system based on square pulse electroporation and in vivo luciferase assay of fertilized fish eggs. . *FEBS Lett* 1, 27–32.

Navarro, O.J., Velasco Y.M., Cruz Casallas, P.E., 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17: Suplemento: 53-59.



Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de pesca y acuicultura, 198.

Pardo-Carrasco, S., Atencio, V., Arias, A., 1999. Contribución al conocimiento del aparato circulatorio de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. Asoc Col Ict 3:63-68.

Pegg, D.E., 2010. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. Cryobiology 60, S36–S44.

Portillo, L., Madero, J., López, Claudia., 2006. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 57 (4): 291 – 300.

Rall, W.F., 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 24: 387-402.

Rall, W. F., 1992. Cryopreservation of oocitos and embryos: methods and applications. Animal Reproduction Science 28 (1-4): 237-245.

Rall, W.F., 1993. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for application to the conservation of salmonid fishes, in: J.G. Cloud, G.H. Thorgaad (Eds.), Genetic Conservation of Salmonid Fishes, Plenum, New York. pp. 137–158.

Ramírez, J. A., 2009. Evaluación de la calidad y crioconservación del bagre rayado (*Pseudoplatystoma sp.*), bajo diferentes protocolos de congelación. Trabajo de tesis Instituto de acuicultura de los llanos (IALL) 72.

Ramírez Merlano, J. A., Medina Robles, V. M., Cruz Casallas P.E., 2010.

Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *Orinoquia* 14(1):59-71.

Ramírez, J.A., 2010. Evaluación de la calidad y crioconservación seminal del bagre rayado (*Pseudoplatystoma sp.*), bajo diferentes protocolos de congelación, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Maestría en Acuicultura. Universidad de los Llanos, Villavicencio, pp. 108.

Rawson, D. M., Zhang, T., 2005. New approaches to the Cryopreservation of fish oocytes and embryos. The role of biotechnology. Italia.

Ribeiro, P., 2008. Utilização de crioprotectores intra e extracelulares em embriões de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Universida Estadual de Maringá. Tese de grado 34 – 48.

Robles, V., Real, M., Álvarez, R., and Herráez, M.P., 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* 47, 30-39.

Robles, V., Cabrita, E., Herráez, M.P., 2004. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot embryos. *Cryobiology* 49, 317–318.

Robles, V., Cabrita, E., Paz, P.d., Herráez, M.P., 2007. Studies on chorion hardening inhibition and dechorionization in turbot embryos. *Aquaculture* 262, 535-540.

Routray, P., Susuki, T., Strussmann, C. A., Takai, R., 2002. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka (*Oryzias latipes*). *Theriogenology* 58: 1483-1496.

Senhorini, J. A., Parra, M. A. L., 2005. Reproducción de peces en el trópico.

“Generalidades sobre el manejo y selección de reproductores de peces reofílicos”. Instituto Colombiano de Desarrollo Rural (INCODER) 79 - 88. ISBN 958 – 33 – 8515 – 8.

Shwan, J.M., Oranratnachai, A., Trouson, A.O., 2000. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53(1): 59-72.

Streit Júnior, D. P., 2005. Resfriamento de Embriões de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com diferentes crioprotetores. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 76 p., Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.

Streit Júnior, D. P., Digmayer M., Ribeiro, R. P., 2007. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.8, p.1199-1202.

Suzuki, T., Komada, H., Takai, R., Aii, K., Kozima, T.T., 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant Me<sub>2</sub>SO and its concentration in several fish embryos. *Fisheries Science* 61, 193–197.

Valdez Jr. D.M., Miyamoto, A., Hara, T., Seki, S., Kasai M., Edashige, K., 2005. Water- and cryoprotectant-permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*), *Cryobiology* 50 93–102.

Wayman, W.R., Thomas, R.G., Tiersch, T.R., 1996. Cryopreservation of sperm of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gulf Res. Rep.* 9 (3), 183–188.

Wittingham, D.G., Rosenthal, H., 1978. Attempts to preserve herring embryos at subzero temperatures. *Arch Fischereiwiss* 29, 75-79.

Xiao, Z.Z., Zhang, L.L., Xu, X.Z., Liu, Q.H., Li, J., Ma, D.Y., Xu, S.H., Xue, Y.P., Xue, Q.Z., 2008. Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* 70, 1086-1092.

Zhang XS, Zhao TC, Hua TC, Zhu HY., 1989. A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos. *Cryo-Lett* 10:271–8.

Zhang L, Liu X, Lu D, Chen S, Fang J., 1992. Effects of several factors on the survival rate of embryo before it cryopreserved (Sic). *Freshwater Fish Danshui Yuye* 1:20–4.

Zhang T, Rawson DM, Morris BJ., 1993. Cryopreservation of prehatch embryo of zebrafish. *Aquat Living Resource* 6:145–53.

Zhang, T., Rawson, D.M., 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydamio rerio*) embryos. *Criobiology*, 32: 239 – 46.

Zhang, T., Rawson, D.M., 1996. Feasibility studies on vitrification of zebrafish (*Brachydamio rerio*) embryos. *Criobiology*, 33: 1-13.

Zhang, T., Liu, X.H., et al. 2003. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 59: 1545-1556.

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J., Chen, S.L., 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology* 63, 763-773.