

**EVALUACIÓN DE ETILENGLICOL Y LECHE EN POLVO DESCREMADA COMO  
CRIOPROTECTORES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE  
BOCACHICO *Prochilodus magdalenae***

**SOAD SAMIRA CABRALES HESSEN**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
DIVISIÓN DE POSTGRADOS  
SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
MONTERÍA - CÓRDOBA  
2020**

**EVALUACIÓN DE ETILENGLICOL Y LECHE EN POLVO DESCREMADA COMO  
CRIOPROTECTORES EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE  
BOCACHICO *Prochilodus magdalenae***

**SOAD SAMIRA CABRALES HESSEN**

**Trabajo de grado presentado  
como requisito para optar al título de  
Magíster en Ciencias Ambientales**

**Víctor Julio Atencio García, MSc.  
José Alonso Espinosa, MSc.  
Directores**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
DIVISIÓN DE POSTGRADOS  
SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
MONTERÍA - CÓRDOBA  
2020**

Nota de aceptación

---

---

---

Jurado

---

Jurado

Montería, febrero de 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Sistema de Universidades Estatales del Caribe SUE- Caribe y a la Universidad de Córdoba, la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en Ciencias Ambientales.

Al Instituto de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba CINPIC, por su contribución con la infraestructura, equipos y materiales necesarios para la realización de esta investigación.

A los profesores Víctor Julio Atencio García y José Alonso Espinosa Araujo, por su tiempo e incondicional orientación durante la realización de esta investigación.

A todos los colegas, amigos y trabajadores de campo del CINPIC por el apoyo, motivación y confianza.

## DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme con su amor y sabiduría en todo momento, a mi mamá, mi hija y toda mi familia siempre han estado conmigo apoyándome y brindándome su amor incondicional, a cada una de las personas que contribuyeron a este logro. Gracias.*

*Soad*

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.	11
2. MARCO TEORICO	13
2.1 GENERALIDADES DEL BOCACHICO <i>Prochilodus magdalenae</i> .....	13
2.1.1 Bio-ecología	13
2.2 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN	14
2.2.1 Generalidades en peces	14
2.2.3 Crioconservación de semen en peces de Colombia	16
2.3 CRIOPROTECTORES	19
2.3.1 Crioprotectores permeables	20
2.3.2 Crioprotectores no permeables	21
2.3.3 Leche en polvo (LP) y etilenglicol (EG) como crioprotectores	23
2.4 CALIDAD SEMINAL	25
2.4.1 Movilidad espermática	25
2.4.2 Tiempo de motilidad o actividad espermática	25
2.4.3 Velocidades espermáticas	25
2.5 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GENERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	28
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO	28
4.2.1. Selección de reproductores	28
4.2.2. Inducción al desove	29
4.3 OBTENCIÓN DEL SEMEN	29
4.4 TRATAMIENTOS Y CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN	29
4.4.1. Congelación y descongelación del semen	30

4.5 CALIDAD SEMINAL	31
4.5.1. Volumen y color	31
4.5.2. Movilidad total, velocidad y progresividad espermática	31
4.5.3. Tiempo de activación	32
4.5.4. Concentración espermática	32
4.6 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO	32
4.6.1. Fertilidad	33
4.6.2. Eclosión	33
4.7 CALIDAD DE AGUA	34
4.8 CONSIDERACIONES ETICAS	34
4.9 ANALISIS ESTADISTICOS.	34
5. RESULTADOS Y DISCUSION	35
5.1 EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO	35
5.2 EVALUACIÓN DE SEMEN CRIOCONSERVADO	36
5.2.1 Efecto de factores y su interacción	36
5.3 CALIDAD DEL SEMEN CRIOCONSERVADO (DESCONGELADO)	37
5.3.1 Movilidad total	39
5.3.2 Progresividad total	40
5.3.3 Tipos de movilidades	41
5.3.4 Velocidades espermáticas	42
5.4 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE SEMEN CRIOCONSERVADO...	44
5.4.1 Fertilidad	44
5.4.2 Eclosión	46
6. CONCLUSION	49
7. BIBLIOGRAFIA	50

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reporte sobre el uso de crioprotectores y diluyentes en crioconservación de semen de peces	18
Tabla 2. Diseño experimental para evaluación del etilenglicol (EG) y leche en polvo (LP) en la crioconservación de semen de Bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i>	30
Tabla 3. Características generales de los productos sexuales frescos de machos y hembras de Bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i>	35
Tabla 4. Efecto de los porcentaje de inclusión de EG (Factor A), porcentaje de inclusión de Leche en polvo (LP) (Factor B) y su interacción sobre la calidad seminal de espermatozoides de <i>P. magdalenae</i>	36
Tabla 5. Comportamiento de las variables de calidad seminal post-descongelación de <i>Prochilodus magdalenae</i> encontrados en el presente estudio. Letras diferentes en una misma fila indican diferencia estadística significativa entre tratamientos según test de Tukey ( $p < 0.05$ )	38



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ejemplar adulto de bocachico, <i>Prochilodus magdalenae</i> Foto: Instituto de investigación piscícola (CINPIC, 2019).	13
Figura 2. Instituto de Investigación Piscícola de Universidad de Córdoba. (CINPIC, 2019).	28
Figura 3. Porcentajes de fertilización encontrados en el presente estudio. Letras diferentes en columnas indicas diferencia significativa ( $p<0.05$ ).	44
Figura 4. Porcentajes de eclosión encontrados en el presente estudio. Letras diferentes en columnas indicas diferencia significativa ( $p<0.05$ )	47

## RESUMEN

Bocachico *Prochilodus magdalenae* es una especie endémica de Colombia y sus volúmenes de captura la ubican como la más importante de las pesquerías continental colombiana; no obstante, en los últimos cuarenta años sus capturas han disminuidos aproximadamente el 70%, por tanto ha sido categorizada como vulnerable a la extinción. Entre las causas de este declive se señalan la degradación ambiental, pérdida de planos inundables y la fuerte presión pesquera. La criopreservación se destaca como una estrategia importante de conservación *ex situ in vitro* en especies con riesgo de extinción o vulnerables. Por tanto el objetivo del estudio fue evaluar el etilenglicol (EG) y la leche en polvo descremada (LP) en la criopreservación de semen de bocachico. La solución crioprotectora estuvo compuesta por EG (6%, 8% o 10%), LP (3%, 5% o 7%) y como diluyente se utilizó una solución de glucosa al 6%. El semen fue diluido en proporción 1:3 (semen:diluyente) a temperatura de  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  y envasado en pajillas de 0.5 mL. Se utilizó un diseño factorial (3x3) completamente al azar, para un total de nueve tratamientos y se analizó el semen fresco como control para comparar la calidad del semen descongelado. En el semen fresco se evaluó volumen, color, tiempo de activación, movilidad total y concentración espermática; mientras que en el semen descongelado se evaluó movilidad total, tipos de movilidad y velocidad espermática. El porcentaje de inclusión de EG en el rango evaluado (6-10%), no afectó significativamente ( $p>0.05$ ) ninguna de las variables de calidad seminal analizadas con excepción de la tasa de eclosión ( $p<0.05$ ). Mientras que la LP presentó efectos significativos ( $p<0.05$ ) sobre el porcentaje de espermatozoides estáticos y altamente significativo ( $p<0.01$ ) sobre el desempeño reproductivo (tasa de fertilización y eclosión). El mayor valor de movilidad total se obtuvo cuando se criopreservó con EG10xLP7 ( $38.4\pm 18.4\%$ ) sin observarse diferencia significativa ( $p<0.05$ ) con los tratamientos que utilizaron EG al 6 y 8% a cualquier porcentaje de inclusión de la LP (3-7%) que oscilaron entre  $27.8\pm 4.8\%$  (EG8xLP3) y  $34.3\pm 18.1\%$  (EG8xLP7). La mayor fertilidad fue de  $64.2\pm 15.1\%$  se encontró en el semen criopreservado EG6xLP3, lo que equivale al tratamiento con menor inclusión de crioprotectores. Los resultados del estudio permitieron concluir que concentraciones mayores a 6% de EG con porcentajes de inclusión de LP mayores a 5% pueden tener efecto negativo sobre el espermatozoide de *Prochilodus magdalenae*, causándole una disminución de su calidad y afectando su capacidad fertilizante.

**Palabras clave:** Criopreservación, Colombia, especie nativa, reproducción, sostenibilidad ambiental.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Colombia el Bocachico *Prochilodus magdalenae*, es la principal especie de la pesquería continental, considerada una especie alternativa para la piscicultura extensiva y semi-extensiva por las ventajas que representa su régimen alimenticio (detritívoro) (Atencio-García et al., 2013); sin embargo, en los últimos cuarenta años ha sido reportada una disminución en las capturas de hasta 70%, pasando de 38.000 ton en 1978 a 12.728 ton 2017 (SEPEC, 2017). Entre las causas de este declive se señalan: la degradación ambiental, pérdida de planos inundables y la fuerte presión pesquera. Situación ya ha llevado a (Mojica et al., 2012) a ubicarla en la categoría vulnerable en el Libro Rojo de Peces Dulceacuícolas de Colombia

En Colombia existen 80 especies de peces de agua dulce con algún grado de amenaza, entre las que se encuentra el bocachico (Mojica et al., 2012), siendo la criopreservación de gametos una herramienta importante para la conservación de especies amenazadas, al permitir la diversidad genéticas de los organismos acuáticos (Boskurt, 2019).

Kumar & Betsy (2015), describen la criopreservación de semen como una herramienta biotecnológica cuya finalidad radica en aumentar la longevidad de los gametos durante años, custodiando su eficiencia o potencia. Otros autores la describen como un método seguro para almacenar y conservar material genético a temperaturas bajas por un período indefinido, haciendo indispensable el uso de crioprotectores que se encargan de proteger las células de lesiones criogénicas, evitar daño osmótico y formación de hielo intracelular, que afectan negativamente la supervivencia de los gametos (Mazur et al., 2008; Cuevas-Urbe et al., 2013; Cabrita et al., 2014).

Paredes et al., (2018), afirman que los protocolos desarrollados para la crioconservación de peces son considerados una herramienta fundamental que permiten y facilitan el acceso a productos sexuales, aun por fuera de la temporada reproductiva natural. En los peces esta técnica se adoptó inicialmente para

salvaguardar aquellas especies amenazadas o en peligro de extinción, toda vez que se pueden almacenar los gametos en los denominados bancos de genes, teniendo especial importancia la preservación de espermatozoides (Kumar & Betsy, 2015).

En este sentido, la evaluación de etilenglicol y leche en polvo descremada como crioprotectores en la crioconservación de semen de *P. magdalenae* permitirían avanzar en el almacenamiento de material genético como estrategia de conservación *ex situ in vitro*, al permitir una eficiencia en la utilización de parentales en la reproducción en cautiverio y contribuiría a la disminución de la presión sobre las poblaciones silvestres ejercidas por los piscicultores en procura de nuevos reproductores.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DEL BOCACHICO *Prochilodus magdalenae*

**2.1.1 Bioecología e importancia.** El Bocachico *Prochilodus magdalenae*, (Steindachner, 1878) pertenece al Orden Characiformes, suborden Characoidei y a la familia Prochilodontidae (figura 1).



**Figura 1.** Ejemplar adulto de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Foto Instituto de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba - CINPIC (2019).

Según Mojica (2012) el bocachico se encuentra distribuido en los ríos Magdalena, Cesar, Ranchería, Cauca, San Jorge, Sinú y Atrato; hasta aproximadamente 1000 msnm pudiendo llegar a los 1500 msnm (Jaramillo-Villa et al., 2010). Este pez de agua dulce y de comportamiento migratorio, se puede encontrar tanto en ciénagas como en ríos; realiza desplazamientos con fines reproductivos y alimenticios, denominados *subienda* y *bajanza*, se considera la principal especie de la pesquería continental colombiana y la cuarta especie más cultivada en el país (Atencio-García et al., 2013; Ayazo-Genes et al., 2018).

La importancia comercial de *P. magdalenae*, va mucho más allá de su contribución a la seguridad alimentaria de las poblaciones que la consumen y se atribuye a la idiosincrasia y arraigo cultural heredado de los ancestros, razón por la cual se viene ejerciendo una fuerte presión antrópica sobre la especie (pesca indiscriminada); así también, procesos de intervención en los cuerpos de aguas donde se desarrolla (construcción de embalses, desviación y taponamiento de cauces), la contaminación de los ríos, la deforestación y posterior sedimentación de las

cuencas, las artes de pesca y tallas de capturas ilegales (CCI, 2008), han provocado la emisión de estado de alerta respecto a la vulnerabilidad de extinción del bocachico (CCI, 2010; Mojica et al., 2012). En consecuencia, se ha incrementado la demanda de sus alevinos con el fin de expandir su cultivo (piscicultura) y ejecutar programas de repoblamiento en las principales cuencas hidrográficas (Atencio-García et al., 2010; Atencio-García et al., 2013); de esta manera se obliga al sector piscícola a la adopción de tecnologías como la crioconservación de semen para apoyar la optimización de los sistemas de producción actuales (Atencio-García et al., 2013).

## **2.2 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN**

**2.2.1 Generalidades en peces.** La crioconservación o criopreservación se define como la rama de la criobiología que tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas (Ávila-Portillo et al., 2006). Por medio de ésta ciencia se busca prolongar por tiempo indefinido la vitalidad y el funcionamiento metabólico que en condiciones normales presenta una célula; asimismo, se busca la estabilización de las células a temperaturas criogénicas generalmente de  $-196^{\circ}\text{C}$  en la que se detiene la actividad metabólica y su preservación por periodos de tiempo indefinidos (Cruz-Casallas et al., 2006).

La crioconservación de semen de peces es considerada una herramienta con diversos fines, entre los más relevantes se cuenta, el establecimiento de bancos de recursos genéticos (BRG), la contribución a disminuir la presión pesquera sobre las poblaciones silvestres (Medina-Robles et al., 2006), la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Bobe & Labbé, 2009; Atencio-García et al., 2015). Asimismo, la crioconservación permite la disponibilidad de semen de calidad y lo convierte en un método seguro para el suministro de semilla a la industria piscícola (Cabrita et al., 2014).

Kumar & Betsy (2015) afirmaron que la crioconservación es una tecnología fundamental para el desarrollo de una Acuicultura sostenible, con ventajas como:

- Posibilidad de reproducciones en diferentes épocas del año, explicada por una asincronía entre machos y hembras por algún factor ambiental
- Simplificación en el manejo de los reproductores, puesto que se podría reducir el número de machos mantenidos durante todo el año como reproductores.
- Transporte de gametos e intercambio entre piscifactorías.
- Almacenamiento de germoplasma para programas de selección genética y/o conservación de especies amenazadas.

A pesar que la crioconservación es una herramienta biotecnológica importante en la conservación de la biodiversidad; precisa del desarrollo de protocolos de criopreservación especie-específicos; ya los resultados de la calidad del semen descongelado son muy variables, lo cual sugiere una alta sensibilidad a los protocolos propuestos, lo cual hace necesario, en la mayoría de los casos, ajustar el procedimiento para cada especie (Carolsfeld et al., 2003; Navarro et al., 2004). Actualmente, la falta de estandarización de los procedimientos reportados en la literatura científica para las especies acuáticas, evidencian la dificultad en la crioconservación de espermatozoides para algunas especies de peces no logrando adaptar su uso a otras especies con similitudes biológicas (Nynca et al., 2015; Balamurugan & Munuswamy, 2017).

En peces de agua dulce la crioconservación de semen ofrece ventajas como la optimización de los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal asincrónica y ciclos reproductivos estacionales; también contribuye a disminuir la presión pesquera sobre las poblaciones silvestres (Martínez-Páramo et al., 2017). El uso de semen criopreservado también puede reducir los costos de mantenimiento, ya que permite reducir el número de reproductores en una granja de peces necesarios para preservar la variabilidad genética deseada (Cabrita et al., 2010; Martínez-Páramo et al., 2017; Judycka et al., 2019).

Autores como Mira et al. (2007) evaluaron el crecimiento y sobrevivencia de alevinos en yamu *Brycon amazonicus*, con semen crioconservado y fresco. Más recientemente Akter et al. (2014), en *Puntius sarana*, un ciprínido concluyendo que las larvas producidas a partir de esperma crioconservado son igualmente compatibles en el crecimiento y la sobrevivencia con las larvas producidas a partir de semen fresco. Por tanto, se sugiere que la crioconservación de espermatozoides no tiene ningún efecto perjudicial sobre el crecimiento de la descendencia y que se puede aplicar esperma crioconservado para la fertilización artificial y la producción sostenible de especies amenazadas. La implementación de estas técnicas aportaría a la disminución de la dependencia de reproductores capturados del medio natural.

**2.2.3 Crioconservación de semen en peces de Colombia.** El Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF, en sus siglas inglés) en su informe del año 2017, cita la información consignada en los Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia, donde se señala que el 2.22% de las especies presentes en el país se encuentran en una de las tres categorías de amenaza de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Peligro Crítico, Amenazada o Vulnerable). WWF afirma que la mayor cantidad de especies dulceacuícolas amenazadas son peces y que las cuencas de los ríos Magdalena, Orinoco y Amazonas presentan signos claros de una declinación alarmante de sus pesquerías. Las capturas en la cuenca del Magdalena disminuyeron casi 90% desde la década de 1970, los desembarcos pesqueros en la cuenca del Orinoco declinaron 85% entre 1997 y 2009 y en la cuenca del río Putumayo el descenso registrado entre 1992 y 2009 fue cercano a 80% (WWF, 2017).

En Colombia, la crioconservación de semen de peces es un campo relativamente nuevo, en el cual todavía no se han logrado los progresos necesarios para su utilización a gran escala y los protocolos existentes sólo son aplicables a un reducido número de especies de interés comercial (Cruz-Casallas et al., 2004; Carneiro et al., 2012; Restrepo et al., 2017), como los casos de Yamú *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas et al., 2006), Cachama blanca *Piaractus brachypomus*



(Navarro et al., 2004), Bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pinzón-Arciniegas et al., 2005), Bocachico *Prochilodus magdalenae* (Martínez et al., 2011; Atencio et al., 2013), Bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Ramírez-Merlano et al., 2011), Bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* (Espinosa, 2013; Atencio-García et al., 2014; Pardo-Carrasco, 2015); Dorada *Brycon moorei* (Atencio-García et al., 2017), Cachama negra *Colossoma macropomum* (Medina-Robles et al., 2019). Estos estudios en peces nativos se han orientado a la estandarización de protocolos de congelación, evaluación de crioprotectores y diluyentes para disminuir los efectos amenazantes y el daño criogénico sobre la célula espermática (Martínez et al., 2011; Restrepo et al., 2017).

La demanda de alevinos de la especie *P. magdalenae* ha incrementado, dado su facilidad de cultivo y utilización en repoblamientos, González et al. (2011) ya advertían la indispensable necesidad de profundizar en la investigación para la conservación de las características de la especie y comenzar a desarrollar técnicas tendientes a mejorarlas. Se destacan los estudios de crioconservación de esta especie realizados por Atencio-García et al., (2015); Atencio-García et al., (2013) y Martínez et al. (2012).

La tabla 1 presenta diferentes crioprotectores y diluyentes utilizados para la estandarización de protocolos reproducibles en la crioconservación de semen de diversas especies ícticas.

**Tabla 1.** Reporte sobre el uso de crioprotectores y diluyentes en crioconservación de semen de peces.

Especie	Crioprotector	Diluyente	Autor
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	DMSO 10%	Diluyente Stein y Bayrle <sup>1</sup>	Folgli da Silveira et al. (1990)
<i>Ictalurus furcatus</i>	Metanol 15% y DMSO 10%	HBSS <sup>2</sup> + 15 % leche en polvo	Bart et al. (1998)
<i>Cyprinus carpio</i>	DMSO 10%	Medio kurokura <sup>3</sup>	Linhart et . (2000)
<i>Clarias gariepinus</i>	Metanol (2.47M)	Ginzburg Fish Ringer <sup>4</sup>	Viveiros et al. (2000)
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	DMSO 7.5%	5.5% glucosa + 12% yema de hueva	Mojica & Pinzón (2002)
<i>Piaractus brachypomus</i>	DMSO 5, 10, 15% GLY 5, 10, 15% MET 5, 10, 15% PPG 5, 10, 15% EG 5, 10, 15%	Glucosa 5.5 % + yema de huevo 7% + Leche entera en polvo 15%	Navarro et al. (2004)
<i>Brycon siebenthalae</i>	DMSO <sup>3</sup> 10%	5.5% glucosa + 12 % yema de huevo	Cruz-Casallas et al. (2005)
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	DMSO 0%, 5%, 7.5%, 10% y 15%	Glucosa 5.5% + Yema de huevo 20% + Solución de Stein y Bayrle	Pinzon-Arciniegas et al. (2005)
<i>Brycon amazonicus</i>	DMSO 10%	Glucosa 5.5% + Yema de huevo 12%	Velasco-Santamaría et al. (2006)
<i>Pseudoplatystoma metaense</i>	DMSO 10% MET 12% DMA 10%	Glucosa 5.5% + yema de huevo 12% + leche en polvo entera 5%	Ramírez-Merlano et al. (2011)
<i>Piaractus brachypomus</i>	DMSO 10% MET 10% EG 5%	Glucosa 5.5% + yema de huevo	Ramírez-Merlano et al. (2011)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	DMSO 5, 10 y 15%	Glucosa 5.5%, 6% y 6.5% + yema de huevo 12%	Martínez et al., (2012)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	DMSO 10%	Glucosa 6% + yema de huevo 12%	Martínez & Pardo (2013)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	DMA 8%, 10% y 12%	Glucosa 6% + Yema de huevo 12%	Atencio-García et al. (2013)
<i>Sorubim cuspicaudus</i>	EG 5%, 10% y 15%	Glucosa 6% + Leche en polvo descremada 5%	Atencio-García et al., 2014

<i>Prochilodus magdalenae</i>	DMSO 10%	Glucosa 5.5% + Yema de huevo 12%	Atencio-García et al. (2014)
<i>Colossoma macropomum</i>	Metilglicol 10%	Glucosa 5% + Yema de huevo 5%	Nizio et al. (2015)
<i>Brycon henni</i>	DMF <sup>5</sup> 5% DMSO 5% EG 5%	Yema de huevo 5%	Pineda-Santis et al. (2015)
<i>Brycon moorei</i>	DMSO 5%, 10% y 15%	Glucosa 6% + Yema de huevo 12%	Atencio-García et al. (2017)
<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>	DMSO 5, 10% DMA 5, 10% EG 5, 10%	Glucosa 6% + Leche en polvo descremada 3% + Vitamina E 0.4%	Herrera-Cruz et al., 2018
<i>Colossoma macropomum</i>	DMSO 10% MET 10% EG 5%	Glucosa 5.5% + con y sin Yema de huevo 12%	Medina-Robles et al., 2019

**Fuente:**

<sup>1</sup>750 mg NaCL, 200 mg NaHCO<sub>3</sub>, 38 mg KCL, 100 mg de glucosa, 20 ml yema de huevo, 100 ml agua destilada.  
<sup>2</sup>8 g/l NaCL, 0.40 g/l KCL, 0.14 g/l CaCL<sub>2</sub>, 0.20 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0,06 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.17 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 g/l glucosa.

<sup>3</sup>1284 mM NaCL, 2.7mM KCL, 1.4 mM CaCL<sub>2</sub>, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>.

<sup>4</sup>123.2mM NaCL, 3.7mM KLC, 3.0 mM CaCL<sub>2</sub>, 2.65 mM NaHCO.

<sup>5</sup>Dimetilformamida

### 2.3 CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que ayudan a minimizar los daños criogénicos y a proteger la célula de la cristalización del hielo intracelular (Moskovtsev et al., 2012); asimismo, permiten el descenso del punto eutéctico, lo que implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Ávila-Portillo et al., 2006). La formación de hielo dañará los orgánulos de la célula y conducirá a la muerte celular (Kumar & Betsy, 2015). Scott & Baynes (1980) explicaron que los crioprotectores pueden unir las moléculas de agua y reducir la formación de cristales de hielo puro en la célula cuando se crioconservan. El crioprotector ideal debe ser de bajo peso molecular, altamente soluble en solución acuosa de electrolitos, penetrar en la célula y no ser tóxico a altas concentraciones (Sarmiento & Sarmiento, 2000).

En general, no existe un criterio que determine el éxito de una solución crioprotectora de formulación simple (uno a dos ingredientes) o una compleja (mezcla de uno o varios aditivos de alto peso molecular) (Cabrita et al., 2009;

Atencio-García et al., 2014); ya que los protocolos de crioconservación son específicos y deben ser optimizado para cada especie (Glogowski et al., 1999; Atencio-García et al., 2014); sin embargo, para determinar si una solución crioprotectora es apropiada es importante que prevenga la activación de los espermatozoides y permita la homeostasis celular (Atencio-García et al., 2014). Según Xin et al. (2017) los crioprotectores pueden clasificarse según su capacidad para penetrar en la membrana plasmática en permeables e impermeables

**2.3.1 Crioprotectores permeables.** Son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular; reducen la tasa de difusión del agua de la célula a los cristales de hielo, reducen los cambios del volumen de la célula con la concentración salina, disminuyen la temperatura de nucleación homogénea, aumentan la temperatura de transformación de cristales y aumentan la viscosidad dentro de la célula, evitando así que las moléculas de agua formen cristales de hielo (Pegg, 2010; Xin et al., 2017). Muchlisin (2005) señala que estos crioprotectores pueden ser extremadamente tóxicos cuando se encuentran a altas temperaturas ya que pueden inducir la desnaturalización de proteínas intracelulares. Los crioprotectores permeables comúnmente utilizados son:

- ***Dimetilsulfóxido (DMSO, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>)***. Es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; su acción crioprotectora se atribuye principalmente a la habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua; sin embargo, se advierte que su utilización puede derivar en problemas de citotoxicidad (Ávila-Portillo et al., 2006; Xin et al., 2017; Trindade et al., 2019). Es uno de los crioprotectores más comunes utilizados en semen de peces del orden Characiformes (Salmito-Vanderley et al., 2014; Trindade et al., 2019).
- ***Etilenglicol (EG, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)***. Es un polialcohol, cuyo peso molecular (62.07) es inferior al del glicerol (92.10), una característica que podría resultar en una menor

toxicidad y alta permeabilidad celular (Massip, 2001; Choez, 2016). Es un crioprotector que ha sido utilizado universalmente en la congelación de tejido ovárico y de embriones de muchas especies (Rodríguez et al., 2009), en las primeras experiencias donde se reporta su uso como crioprotector en semen de toro, destacando que ejerce un menor efecto inhibitorio en la movilidad espermática, respecto del glicerol o el DMSO (Guthrie et al., 2002). La difusión del EG es rápida, la variación en el volumen de la célula pasa desapercibida (Sztein, 2013).

**2.3.2 Crioprotectores no permeables.** No penetran en la célula y su capacidad de crioprotección está relacionada con su capacidad de reducir el punto de congelación y aumentar la temperatura de cristalización en la solución extracelular. Específicamente los lípidos, con su potencial de disminuir la temperatura en la fase de transición de la membrana, son utilizados para minimizar los daños de la membrana durante el inicio del enfriamiento (choque de frío) y congelación (Fornari et al., 2011; Costa da silva et al., 2018). Su principal función crioprotectora es la de elevar la presión osmótica, disminuyendo, de esta forma, la cantidad requerida de crioprotector permeable y su toxicidad, favoreciendo la deshidratación de la célula (Albarracín, 2005). Choez (2016) los definió como sustancias necesarias para mantener o incrementar la viabilidad espermática.

Hafez (2002) y Choez (2016) mencionaron como funciones adicionales de los crioprotectores no permeables, el aporte de nutrientes como fuente de energía, mantenimiento del pH equilibrado, presión osmótica y balance electrolítico adecuados, inhibición del crecimiento bacteriano y aumento del volumen seminal que se podría utilizar para múltiples inseminaciones. Entre los crioprotectores no permeables de mayor uso se encuentran:

- **Azúcares.** Las más usadas son sacarosa y glucosa. Se estima que los grupos OH presente en los azúcares reemplazan el agua e interactúan con los fosfolípidos formando uniones con la membrana plasmática (Lazo-Javalera et al.,

2017). Estas macromoléculas tienen la capacidad de extraer el agua libre del interior de la célula, utilizando la diferencia de presión osmótica pero sin penetrar en la célula (Albarracín, 2005). Estudios evidencian que estas moléculas son capaces de encapsular al gameto en una matriz viscosa que previene la cristalización intracelular durante el choque térmico (Kuleshova et al., 1999; Albarracín, 2005;) y actuando como tampón al choque osmótico que podría resultar de la dilución del crioprotector; también se ha observado que la adición de azúcares a los medios de criopreservación favorece la estabilidad de la membrana plasmática durante la congelación y descongelación (Liebermann et al., 2002).

- **Polímeros.** Los más comunes son dextrosa, hidroxietileno, almidones, polietilenglicoles. A los polímeros sintéticos se les atribuyen efectos potencialmente benéficos cuando se adicionan a una solución de congelación, toda vez que aumentan la viscosidad de las soluciones y reducen la toxicidad que éstas pudieran presentar debido a las concentraciones que se utilizan (Liebermann & Tucker, 2002).

- **Proteínas.** Las más usadas son yema de huevo, suero y leche. Jiang et al. (2007) señalaron que la adición de lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) a las soluciones criopreservantes incrementan el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, movilidad espermática e integridad de la membrana plasmática. Fernández et al. (2009) afirmaron que las proteínas utilizadas en la criopreservación podrían cambiar la composición lipídica de la membrana celular mejorando su fluidez y, que la albúmina en el medio de congelación se adhiere rápidamente a la membrana espermática en el momento de la dilución, modifica las composiciones lipídicas del espermatozoide mediante intercambio lipídico o hidrólisis, promueve la hidrólisis de las proteínas de membrana plasmática, causa la entrada de iones  $Ca^{2+}$  en el citoplasma y disminuye el colesterol y la cantidad de fosfolípidos en la membrana plasmática del espermatozoide; esta disminución del colesterol induce una mayor fluidez de membrana y por tanto resistencia a la congelación. Hu et al. (2010) presentaron una síntesis del papel de las proteínas en

la criopreservación al afirmar que durante la congelación y descongelación, las LDL pierden su organización y los fosfolípidos son liberados al medio formando una cubierta protectora en la superficie de las células espermáticas.

**2.3.3 Leche en polvo (LP) y etilenglicol (EG) como crioprotectores.** Entre los crioprotectores externos (no permeables) más usados en los protocolos de criopreservación de semen de peces se destaca la yema de huevo y la leche en polvo (lipoproteínas), los cuales ayudan a estabilizar la membrana plasmática, en combinación con diluyentes que contienen glucosa (Viveiros & Gondinho, 2009). Sin embargo, a pesar de los beneficios de la yema de huevo como crioprotector externo, esta puede presentar problemas de bioseguridad (riesgo sanitario) que incluyen la producción de metabolitos y toxinas perjudiciales y el riesgo de infección, resultando en la reducción de la calidad del semen (Althouse et al., 2008; Akhter et al., 2012; Yildiz et al., 2013), además, no siempre es posible combinarla con algunos crioprotectores permeables (Maria et al., 2006).

La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstituir, siendo esta última la más universal. Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salomon & Maxwell, 2000; Choez, 2016). Los componentes activos en la protección espermática por parte de la leche en polvo están basados en micelas de caseína, las cuales interactúan con las proteínas de la membrana plasmática para su protección y evitar la remoción de fosfolípidos y colesterol de la misma (Bergeron & Manjunath, 2006), lo que la convierte en una alternativa para reemplazar la yema de huevo. Salomon & Maxwell (2000) señalaron que la caseína también tiene un efecto antioxidante y por lo tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Salomon & Maxwell, 2000).

El crioprotector EG es más permeable al embrión que el propilenglicol y éste a su vez es más permeable que el glicerol. Este orden se relaciona inversamente con la embriotoxicidad, lo cual es una evidencia de la relación de los componentes bioquímicos con la embriotoxicidad de los crioprotectores (Cabrera et al., 2006).

Investigadores como Ball & Vo (2001) y Choez (2016) plantearon la posibilidad de que el EG produce menos daños osmóticos que otros crioprotectores en el espermatozoide, considerando que un espermatozoide con limitada capacidad de tolerancia a condiciones aniso-osmóticas, tendría como consecuencia un menor perjuicio para la movilidad y la viabilidad pos-descongelación.

Navarro et al. (2004) luego de evaluar diferentes crioprotectores en *Piaractus brachyomus*, concluyeron que el tratamiento donde se utilizó leche entera con etilenglicol 5% fue el que presentó mejores resultados porcentaje de fertilidad pos-descongelación; teniendo en cuenta esto y considerando la similitud entre las especies respecto a su orden (Characiformes) y su condiciones reproductivas (reofílicas – migratorias), es válida la evaluación de estos crioprotectores para una de las especies de mayor importancia pesquera del país.

En *P. magdalenae*, Martínez et al. (2012) reportaron una interacción significativa representada por una alta correlación entre fragmentaciones de ADN y daños en la membrana espermática, cuando evaluaron concentraciones de DMSO y glucosa como crioprotectores; de allí entonces, se hace necesario considerar la implementación de nuevas sustancias crioprotectoras con menores afectaciones directas sobre las células espermáticas.

Atencio-García et al. (2014) sugieren que la solución crioprotectora compuesta por EG 5%, glucosa 6% y leche en polvo 5% es una alternativa viable para la crioconservación de semen de *Sorubim cuspicaudus* con fecundaciones similares al usar semen fresco.

## **2.4 CALIDAD SEMINAL**

Desde un punto de vista biológico, es la habilidad y capacidad que tiene el espermatozoide para fertilizar exitosamente un óvulo y subsecuentemente



desarrollar un embrión viable (Dumorné et al., 2017; López-Hernández et al., 2018); dicha habilidad está regida por parámetros que permiten predecir y determinar el grado de calidad del gameto. Las variables que permiten inferir la calidad y bienestar de la célula espermática son: movilidad, integridad de la membrana plasmática, concentración de nucleótidos (metabolismo energético), actividad mitocondrial, integridad de ADN, morfología y tasa de fertilización (Bobe & Labbé, 2010). Recientemente se ha observado que los daños provocados a células espermáticas por prácticas biotecnológicas como la criopreservación y ginogénesis, confieren importancia a estas variables de calidad del espermatozoide y su relación con el desarrollo embrionario, la malformación y la sobrevivencia larval (Kato et al., 2001).

**2.4.1 Movilidad espermática.** La movilidad es la condición por la cual el espermatozoide puede alcanzar el ovocito para lograr exitosamente la fertilización (Tabares et al., 2005). La activación de la movilidad espermática en peces de fertilización externa ocurre por los cambios iónicos y de osmolaridad que suceden cuando los espermatozoides entran en contacto con el agua una vez liberados en el proceso de reproducción (Linhart et al., 2002).

**2.4.2 Tiempo de movilidad o actividad espermática.** Se mide principalmente en segundos, inicia desde el momento en que los espermatozoides son activados con agua o fluido ovárico, hasta la disminución o cese total del movimiento flagelar (Arias-Rodríguez, 2001; López-Hernández et al., 2018).

**2.4.3 Velocidades espermáticas.** Es expresado como la dirección que la célula toma en su trayectoria motil, esto indica si el espermatozoide está en su máxima capacidad progresiva para fecundar el óvulo desde el momento de la activación, es decir, que el flagelo está en constante movimiento vigoroso por tiempo prolongado durante la vida motil del espermatozoide (Arias-Rodríguez, 2001; Rurangwa et al., 2004; López-Hernández et al., 2018).

## **2.5 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO**

Atencio-García et al. (2012) definen el desempeño reproductivo de los peces como la respuesta positiva a los protocolos de reproducción inducida, produciendo gametos de calidad, adecuadas tasas de fertilización, eclosión y sobrevivencia larval; ya sea utilizando inducción hormonal para obtener gametos en fresco o productos de crioconservación. La fertilización es definida como el proceso en el cual un gameto haploide masculino interactúa con uno femenino para formar un cigoto diploide; en este evento el espermatozoide realiza dos grandes contribuciones: proporciona el material genético paterno al huevo e inicia la ruta de señalización intracelular que permite la activación del ovocito y desarrollo del embrión, aportes sin los cuales la fertilización no podría darse (Whitaker & Swann, 1993; Martínez & Pardo-Carrasco, 2010). En bocachico una manera de medir el desempeño reproductivo es estimando la tasa de fertilización y eclosión a las cinco y once horas post-fertilización.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL**

Evaluar el etilenglicol y la leche en polvo descremada como crioprotectores en la crioconservación de semen de Bocachico *Prochilodus magdalenae*, con el fin de obtener información relevante que permita estandarizar los protocolos de inseminación artificial para esta especie.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

Determinar la calidad del semen de Bocachico *Prochilodus magdalenae* crioconservado con Etilenglicol y leche en polvo descremada, mediante la movilidad total, velocidades espermáticas y tiempo de activación.

Evaluar el desempeño reproductivo de *P. magdalenae*, mediante la estimación de tasas de fertilidad y de eclosión, utilizando semen crioconservado con etilenglicol y leche en polvo descremada.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba (CINPIC), ubicado en el municipio de Montería, departamento de Córdoba, cuyas coordenadas geográficas son 8° 48' Latitud Norte y 75° 52' Longitud Oeste, con una altitud de 15 metros sobre el nivel del mar, humedad relativa del 80%, precipitación promedio anual de 1100 mm y una temperatura promedio anual de 28.5°C.



**Figura 2.** Instituto de Investigación Piscícola de Universidad de Córdoba. (CINPIC, 2019).

### 4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

**4.2.1 Selección de reproductores.** Se utilizaron machos ( $n = 23$ ) y hembras ( $n = 8$ ) de dos a tres años de edad, mantenidos bajo condiciones de cautiverio en estanques en tierra, a una densidad de 0.5 Kg/m<sup>2</sup>. Los machos, con peso promedio de  $0.205 \pm 0.021$  Kg y longitud total promedio de  $25.4 \pm 0.5$  cm, se seleccionaron en época de espermiación; es decir, cuando mediante leve presión sobre la cavidad celómica en sentido cráneo-caudal liberaron líquido seminal; mientras que las hembras, con peso promedio de  $0.231 \pm 0.034$  Kg y longitud total promedio de 27.8

± 0.2 cm, se seleccionaron durante la época de maduración final del ovocito; lo cual fue verificado observando la posición de la vesícula germinal en una biopsia ovárica (Atencio-García et al., 2013). Todos los ejemplares fueron trasladados a tanques circulares de 6 m<sup>3</sup> de volumen total, con el propósito de adaptarlos a las condiciones experimentales, reducir el estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente.

**4.2.2 Inducción al desove.** Para la ovulación de las hembras e incrementar el volumen seminal de los machos, se utilizó extracto pituitario de carpa (EPC, Argent Chem Lab, Redmond, WA, EUA), a razón de 6 mg/Kg de peso vivo. A las hembras se les aplicaron dos dosis: la primera del 10% del valor total de la dosis y 12 horas después el 90% restante; mientras que a los machos se les aplicó una dosis única del 80% de la dosis total (Atencio-García et al., 2013).

### **4.3 OBTENCIÓN DE SEMEN**

El semen se obtuvo seis horas post-inducción. Antes de colectar el semen se realizó una suave presión sobre la papila urogenital y se secó con papel absorbente, con el objetivo de eliminar restos de agua, orina o heces. El semen se colectó mediante masaje abdominal en sentido cráneo-caudal y se depositó directamente en viales tipo Ependorff de 2 mL, estériles y secos, evitando en todo momento la contaminación por orina y otros fluidos (sangre, bilis y heces) que podrían afectar la calidad seminal (Dreanno et al., 1997; Atencio-García et al., 2014).

### **4.4 TRATAMIENTOS Y CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN**

La crioconservación se efectuó solamente en aquellas muestras que presentaron una movilidad total superior a 80%. Se utilizó etilenglicol (EG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a tres porcentajes de inclusión: 6% (EG6), 8% (EG8) y 10% (EG10) y leche en polvo descremada liofilizada (LP) (Ramírez-Merlano et al., 2011; Atencio-García et al., 2014) como crioprotector externo a tres porcentajes de inclusión: 3% (LP3), 5% (LP5) y 7% (LP7); para un total de nueve tratamientos cada

uno con tres réplicas; además se evaluó semen fresco como tratamiento control (tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental para evaluación del etilenglicol (EG) y leche en polvo (LP) en la crioconservación de semen de Bocachico *Prochilodus magdalenae*.

Etilenglicol (EG)	Leche en polvo (LP)		
	3%	5%	7%
6%	EG6+LP3	EG6+LP5	EG6+LP7
8%	EG8x LP3	EG8 x LP5	EG8 x LP7
10%	EG10 x LP3	EG10 x LP5	EG10 x LP7
Control	Semen fresco		

Como diluyente se utilizó una solución de glucosa al 6% (Protokimica, Colombia) en agua destilada (p:v, 0.33 M) previamente calentada a 60°C; posteriormente se adicionó el volumen de EG a diferentes porcentajes inclusión (6, 8, 10%), seguido de las cantidades de LP (3, 5 y 7%), finalmente se utilizó agua destilada para completar el volumen requerido de diluyente. El semen fue diluido en proporción 1:3 (semen:diluyente) (Velasco-Santamaría et al., 2006; Atencio-García et al., 2014) y envasado en pajillas de 0.5 mL.

**4.4.1 Congelación y descongelación del semen.** Se preparó un *pool* de semen colectado de 12 machos previamente seleccionados por los porcentajes de movilidad de sus espermatozoides y por presentar similitud en sus movilidades y tiempo de activación. El semen seleccionado fue empacado en pajillas de 0.5 mL (Minitub, Abfüll-und Labortechnik GmbH & Co, Inglaterra), diluido en la solución crioprotectora en proporción 1:3 a temperatura de 28±1°C (Velasco-Santamaría et al., 2006; Atencio-García et al., 2014). Las pajillas fueron selladas con polivinilo e introducidas en un termo seco de vapores de nitrógeno de 4 L (MVE, SC 4/2v, USA) durante 30 minutos para su congelación. Como referencia para la tasa de refrigeración – congelación, se consideró la utilizada por Atencio-García et al. (2013) durante la crioconservación de semen de *P. magdalenae* con diferentes concentraciones de Dimetilacetamida (DMA), esto fue de 27.3 °C/min desde 28 a -20 °C, de 29.9 °C/min desde -20 a -100 °C y 5.5°C/min desde -100 a -196 °C.

Posteriormente, las pajillas fueron trasladadas de manera inmediata a un termo de almacenamiento de 34 L (MVE, XC 34/18, Alemania) hasta su evaluación.

Las pajillas fueron descongeladas por inmersión directa en baño de agua a 35°C durante 60 segundos, con la ayuda de un baño María serológico programable (Mermert, WNB 7, Alemania).

#### **4.5 CALIDAD SEMINAL**

En el semen fresco fue evaluado volumen, color, tiempo de activación, movilidad total y concentración espermática. En el semen descongelado se evaluó movilidad total, tipos de movilidad y velocidad espermática, de acuerdo con metodología propuesta por Atencio-García et al. (2014).

**4.5.1 Volumen y color.** El volumen seminal se expresó en mL, considerando esta variable para calcular el número total de espermatozoides por muestra y por individuo, se midió en viales aforados y permitió calcular la cantidad de diluyente a preparar. El color del semen se evaluó con el círculo cromático de ROSE y sirvió para evidenciar la posible presencia de sustancias contaminantes como heces, orina o sangre (Reza & Salas, 2010; Atencio-García et al., 2014).

**4.5.2 Movilidad total, velocidad y progresividad espermática.** La movilidad total y tipos de movilidad se estimaron con el software SCA (Microptic SL, España) y un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, Eclipse 50i, Japón) con objetivo 10x; para lo cual 0.25 µl de semen se colocaron en una Cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) y se activaron con 75 µl de agua destilada (dilución 1:300) (Atencio-García et al., 2013; Atencio-García et al., 2017; Montes, 2018).

Se consideró como movilidad rápida (tipo a) al porcentaje de espermatozoide con velocidades mayores a 100 µm/seg, media (tipo b) a los espermatozoides con velocidades menores de 100 µm/seg pero mayor de 50 µm/seg, lenta al porcentaje

de espermatozoides con velocidades menores de 50  $\mu\text{m}/\text{seg}$  (Atencio-García et al., 2013; Atencio-García et al., 2014).

El software SCA también estimó la velocidad curvilínea (VCL); la cual se definió como la distancia recorrida en función del tiempo ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) en la trayectoria real del espermatozoides entre dos puntos, mientras que la velocidad lineal (VSL) se consideró como una trayectoria lineal del espermatozoide entre el primer y el último punto (Atencio-García et al., 2013; Atencio-García et al., 2014; Montes, 2018).

**4.5.3 Tiempo de activación.** En una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) se colocaron 0,25  $\mu\text{l}$  de semen y 75  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada (dilución 1:300) para activarlo; el tiempo de activación se analizó desde el instante en que se adicionó la solución activadora (agua bidestilada) hasta que alrededor de 90% de los espermatozoides dejó de moverse, la medida de tiempo fue dada en segundos (Martínez, 2010; Atencio-García et al., 2014; Atencio-García et al., 2017).

**4.5.4 Concentración espermática.** Fue determinado el número de células espermáticas por unidad de volumen expresado en millones por  $\mu\text{L}$  ( $10^6$  spz/ $\mu\text{L}$ ). En un Eppendorf de 2 mL se diluyó 1  $\mu\text{L}$  de semen en 699  $\mu\text{L}$  de glucosa 6% (dilución 1:700), la mezcla se homogenizó durante cinco segundos en un vortex a 1200 rpm (Velp Scientifica, Zxclasic, China); luego se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la dilución y se colocaron en la cámara Makler para la determinación de la concentración mediante el SCA (Microptic SL, España). Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener un valor promedio de la concentración espermática de la muestra de semen analizado.

## **4.6 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO**

Para la evaluación del porcentaje de fertilidad y eclosión de una hembra por cada ensayo, se tomaron entre 0.5 y 1 gramo de ovocitos los cuales fueron inseminados con semen fresco a dosis de 160.000 spz/ovocito y con semen crioconservado 320.000 spz/ovocito de acuerdo con lo sugerido por Atencio-García et al. (2015). Previamente se estimó el número de ovocitos por gramo y los volúmenes seminales se adicionaron con una micropipeta (Transferpette®, CE704174, Alemania). Una



vez adicionado el volumen seminal (fresco y crioconservado) se agregaron 10 mL de agua destilada a temperatura ambiente (28°C) para la activación del semen durante un minuto; luego se aumentó el volumen del agua a 50 mL para la hidratación de los ovocitos; finalmente se depositaron en incubadoras experimentales de flujo ascendente de 2 L de capacidad conectadas a un sistema cerrado de recirculación de agua.

**4.6.1 Fertilidad.** Se evaluó a las seis horas post-fertilización (HPF), cuando los huevos se encontraban al final de la gastrulación (cierre del blastoporo); con la ayuda de una pipeta de vidrio de 0.5 cm de diámetro se tomó una muestra al azar de mínimo 50 embriones y se estimó la tasa de fertilización como el porcentaje de embriones viables sobre el número total de ovocitos analizados. Los embriones viables fueron aquellos que se observaron translúcidos y de apariencia normal; mientras que los inviábiles se observaron opacos y/o blanquecinos al ser observados en un estereoscopio de luz (Leica, Wild MZ8, Alemania). Este conteo se realizó tres veces en cada unidad experimental y luego se estimó un valor promedio para cada unidad.

La tasa de fertilidad se estimó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de fertilización (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de embriones viables}}{\text{N}^\circ \text{ de embriones analizados}} \times 100$$

**4.6.2 Eclosión.** A las 11 HPF, cuando los embriones se encontraban en fase de faringulación, fue evaluado el porcentaje de eclosión, tomando una muestra al azar de mínimo 50 embriones (por tres veces), considerando como viables los embriones translucidos y con movimiento e inviábiles aquellos opacos y/o blanquecinos. La tasa de eclosión se estimó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de eclosión(\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de embriones viables}}{\text{N}^\circ \text{ de embriones analizados}} \times 100$$

## 4.7 CALIDAD DEL AGUA

Las características del agua que se utilizó en el sistema de incubación se mantuvo en los rangos adecuado para la especie (Atencio, 2001; Montes, 2018) con valores promedios de oxígeno disuelto ( $5.9\pm 0.6$  mg/L), temperatura ( $26.9\pm 0.7^{\circ}\text{C}$ ), pH ( $7.5\pm 0.8$ ), dureza total ( $160.4\pm 17.7$  mg/L  $\text{CaCO}_3$ ), alcalinidad total ( $161.6\pm 29.7$  mg/L  $\text{CaCO}_3$ ) y amonio total ( $0.09\pm 0.004$  mg/L).

#### **4.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Los procedimientos empleados en la manipulación de los animales, se realizaron utilizando como referencia las normas y procedimientos para el uso de animales en laboratorio, señaladas por el *Committe on Care and Use of Laboratory Animal Resources* (Janet-Garber, National Research Council, USA 2010).

#### **4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los datos obtenidos se presentaron como media $\pm$ desviación estándar. Este experimento se llevó a cabo utilizando un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x3, es decir dos factores (nivel de inclusión de EG y nivel de inclusión de LP), cada uno con tres niveles, todos los datos previamente transformados (arcsen) fueron sometidos a pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y de homogeneidad de varianza (Test de Bartlett), cumplidos estos supuestos se realizó un análisis de varianza (ANAVA) y finalmente para identificar diferencias entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey; en todos los casos fue considerado como nivel de significancia  $p < 0.05$ . Además, mediante el análisis factorial fue determinado el efecto de cada uno de los factores de manera independiente y su interacción sobre cada una de las variables evaluadas. Los análisis se realizaron con ayuda del Software estadístico R, versión R Studio 3.0.1.

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 5.1 EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO

La tabla 3 presenta las características generales que se consideraron para la evaluación de la calidad seminal de la muestra que conformó el *pool* (semen fresco). Las características evaluadas son similares a las descritas en estudios previos para ésta especie (Atencio-García et al., 2013; Atencio-García et al., 2014; Atencio-García et al., 2015; Montes, 2018).

**Tabla 3.** Características generales de los productos sexuales frescos de machos y hembras de Bocachico *Prochilodus magdalenae*. Valores mostrados como media $\pm$  SD

Características	Machos	Hembras
Número de individuos	23	8
Ovocitos por gramo	-	1288 $\pm$ 182
Color (semen-ovocitos)	Blanco	Gris
Volumen seminal (mL)	2.3 $\pm$ 0.4	-
Concentración espermática ( $10^6$ /mL)	18838.8 $\pm$ 7271.4	-
Movilidad total (%)	94.5 $\pm$ 3.4	-
Tiempo de activación (s)	28.5 $\pm$ 1.5	-

Las características del semen fresco del presente estudio, sugieren una buena calidad del semen que se utilizó para crioconservación al compararse con los datos reportados por Montes (2018), quién realizó un estudio que evaluó la calidad de semen de bocachico, en cautiverio, durante todos los meses del año y sugirió que la mejor calidad seminal se registra entre marzo y agosto; ya que en estos meses registra los mayores volúmenes seminales (0.7-0.9 mL), concentración ( $19831.4 \times 10^6$  -  $52623.4 \times 10^6$  spz/mL), movilidad total (90.0-92.4%) y tiempos de activación (38.7-38.9 s).

Atencio-García et al., 2013. Reportaron para el semen fresco de bocachico, movilidad total superior a 90%, volumen seminal de  $1.3 \pm 0.4$  mL, concentración espermática de  $18524.0 \times 10^6 \pm 3452.4 \times 10^6$  spz/mL; valores que concuerdan con lo obtenido en la presente investigación.

## 5.2 EVALUACIÓN DEL SEMEN CRIOCONSERVADO-DESCONGELADO

**5.2.1 Efecto de factores y su interacción.** La tabla 4 registra el efecto de cada factor y su interacción. El porcentaje de inclusión de EG (factor A), en el rango evaluado (6-10%), no afectó significativamente ( $p>0.05$ ) ninguna de las variables de calidad seminal analizadas con excepción de la tasa de eclosión ( $p<0.05$ ). Mientras que la LP (factor B) tiene efectos significativos ( $p<0.05$ ) sobre el porcentaje de espermatozoides estáticos y altamente significativo ( $p<0.01$ ) sobre el desempeño reproductivo (tasa de fertilización y eclosión). De igual forma la interacción de los factores solo afectó significativamente ( $p<0.05$ ) el porcentaje de espermatozoides estático. Los resultados sugieren que la LP es un factor crítico en la capacidad fecundante del semen descongelado de bocachico.

**Tabla 4.** Efecto de EG (factor A) y la LP (factor B) y su interacción sobre la calidad seminal de espermatozoides de *P. magdaleneae*. VCL Velocidad curvilínea, VSL Velocidad lineal, Mt, movilidad total; Pt, progresividad total; \*, significativa; \*\*\*, altamente significativa; -, no significativa.

	FACTOR A (% de inclusión de EG)	FACTOR B (% de inclusión de LP)	INTERACCIÓN AxB
Mt	-	-	-
Rápidos	-	-	-
Medios	-	-	-
Lentos	-	-	-
Estáticos	-	*	*
VCL	-	-	-
VSL	-	-	-
Pt	-	-	-
Fertilidad	-	***	-
Eclosión	*	***	-

Herrera-Cruz et al. (2019) evaluaron los efectos de tres crioprotectores (DMSO, DMA y EG) a dos porcentajes de inclusión (5 y 10%) en la criopreservación de semen de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*; como parte de sus resultados reportan que el semen ve afectada su movilidad total por la interacción del crioprotector utilizado y su porcentaje de inclusión.

### **5.3 CALIDAD DEL SEMEN CRIOCONSERVADO -DESCONGELADO**

Moore & Akhondi (1996) al igual que Atencio-García et al. (2013) coinciden en afirmar que las variables más utilizadas para medir la calidad espermática son la movilidad, velocidad y progresividad. Martínez & Pardo (2010) aseguraron que los efectos de la crioconservación sobre la calidad y el desempeño espermático podrían atribuirse a daños en el genoma, que impiden la replicación y la transcripción de genes mitocondriales o nucleares, impidiendo a su vez la síntesis de proteínas claves en la producción energética afectando la movilidad; Los daños también se encuentran en el proteoma lo que se traduce en la interrupción de la cascada de fosforilación y activación enzimática, lo que afecta no sólo la movilidad del espermatozoide sino también su capacidad fertilizante.

En la tabla 5 se presentan las variables de calidad seminal evaluadas durante la crioconservación de *Prochilodus magdalenae* sometido a tres porcentajes de inclusión de etilenglicol como crioprotector y leche en polvo como diluyente.

Tabla 5. Calidad del semen descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* criopreservado con EG y LP. Letras diferentes en una misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). EG, etilenglicol; LP, leche en polvo; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal, Pt progresividad total. Valores mostrados como media  $\pm$  SD

Parámetro	Tratamientos								
	EG6xLP3	EG6xLP5	EG6xLP7	EG8xLP3	EG8xLP5	EG8xLP7	EG10xLP3	EG10xLP5	EG10xLP7
Mt (%)	28.0 $\pm$ 5.4 <sup>ab</sup>	31.9 $\pm$ 9.6 <sup>ab</sup>	31.1 $\pm$ 10.5 <sup>ab</sup>	27.8 $\pm$ 4.8 <sup>ab</sup>	28.7 $\pm$ 15.7 <sup>ab</sup>	34.3 $\pm$ 18.1 <sup>ab</sup>	22.0 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	24.6 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	38.4 $\pm$ 18.4 <sup>a</sup>
Rápidos	1.2 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	0.9 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	0.7 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	0.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	3.8 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>
Medios	3.3 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	6.0 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 3.0 <sup>ab</sup>	3.4 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	3.2 $\pm$ 4.1 <sup>ab</sup>	5.3 $\pm$ 6.6 <sup>ab</sup>	1.1 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	1.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	5.6 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>
Lentos	23.5 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup>	25.0 $\pm$ 5.5 <sup>ab</sup>	26.7 $\pm$ 8.8 <sup>ab</sup>	23.9 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>	24.9 $\pm$ 11.4 <sup>ab</sup>	25.0 $\pm$ 5.4 <sup>ab</sup>	22.3 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	22.4 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	31.5 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>
Estáticos	72.0 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	68.1 $\pm$ 9.6 <sup>ab</sup>	69.0 $\pm$ 10.5 <sup>a</sup>	72.3 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	71.3 $\pm$ 15.7 <sup>a</sup>	45.6 $\pm$ 25.9 <sup>c</sup>	74.5 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	49.2 $\pm$ 29.1 <sup>bc</sup>	61.7 $\pm$ 18.4 <sup>abc</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	29.1 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	31.3 $\pm$ 7.4 <sup>ab</sup>	28.5 $\pm$ 6.1 <sup>ab</sup>	26.7 $\pm$ 3.0 <sup>ab</sup>	26.3 $\pm$ 6.0 <sup>ab</sup>	35.9 $\pm$ 23.9 <sup>a</sup>	23.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	21.7 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	26.6 $\pm$ 6.2 <sup>ab</sup>
VSL ( $\mu$ m/s)	9.5 $\pm$ 2.2 <sup>abcd</sup>	12.9 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	9.2 $\pm$ 3.6 <sup>abcd</sup>	6.3 $\pm$ 1.1 <sup>bcd</sup>	8.1 $\pm$ 5.0 <sup>abcd</sup>	10.7 $\pm$ 7.3 <sup>ab</sup>	5.0 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	5.3 $\pm$ 2.1 <sup>cd</sup>	10.6 $\pm$ 6.3 <sup>abc</sup>
Pt (%)	3.0 $\pm$ 1.5 <sup>ab</sup>	4.8 $\pm$ 4.4 <sup>ab</sup>	2.7 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	1.3 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	2.7 $\pm$ 3.9 <sup>ab</sup>	5.9 $\pm$ 10.4 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	4.8 $\pm$ 5.0 <sup>ab</sup>

**5.3.1 Movilidad total (Mt).** La Mt del semen descongelado de bocachico se muestra en la tabla 5. El mayor valor de Mt se obtuvo cuando se criopreservó con EG10xLP7 ( $38.4 \pm 18.4\%$ ) sin observarse diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con los tratamientos que utilizaron EG al 6 y 8% a cualquier porcentaje de inclusión de la LP (3-7%) que oscilaron entre  $27.8 \pm 4.8\%$  (EG8xLP3) y  $34.3 \pm 18.1\%$  (EG8xLP7). La menor Mt se registró en los tratamientos EG10xLP3 ( $22.0 \pm 2.0\%$ ) y EG10xLP5 ( $24.6 \pm 3.4\%$ ) sin observarse diferencia entre ellos. El semen fresco registró valores de Mt de  $94.5 \pm 3.4\%$ , es decir, esta variable disminuyó entre 59.4 y 76.7% con respecto al semen descongelado.

Es necesario que durante el proceso de crioconservación se utilicen diluyentes que reduzcan el efecto por presión osmótica e influyan mínimamente en la movilidad y calidad seminal. En este estudio, el uso de glucosa al 6% como diluyente, se considera isoosmótico, ya que según lo reportado por Martínez et al. (2011) y Atencio-García et al. (2013) la osmolaridad del semen de bocachico oscila entre 250 y 300 mOsm/kg, y la glucosa a 6% registró una osmolaridad cercana a los 360 mOsm/kg, indicando que es un diluyente adecuado para semen de bocachico.

Atencio-García et al. (2013) utilizando DMA al 8 y 10% en criopreservación de semen de bocachico, reportaron Mt postdescongelada de  $31.0 \pm 8.6$  y  $30.9 \pm 1.0\%$  respectivamente, valores similares a las mayores movilidades obtenidas en el presente estudio. Sin embargo, Arroyo & Vergara (2010) obtuvieron Mt muy por encima ( $76.8 \pm 5.9\%$ ) a la obtenida en el presente estudio, cuando preservaron semen de bocachico con DMSO 10%.

Cabrita et al. (2014) argumentaron que por efecto de la crioconservación los daños en el ADN afectan principalmente los procesos de fertilidad, eclosión y desarrollo de la progenie, los daños ocasionados a nivel de mitocondria tiene efecto directo sobre la movilidad del espermatozoide y los daños generados a la integridad de la membrana pueden afectar los procesos de fertilidad y la movilidad espermática. Fraser & Strzezek (2007) afirman que más allá de los daños de fragmentación ocasionados al ADN nuclear, la disminución en la movilidad debe asociarse más con daños en la mitocondria que con cualquier otro lugar de la célula, reafirmando

la condición de este organelo como núcleo energético del espermatozoide (Martínez & Pardo, 2010).

Morris et al. (2012) enfatizaron en que es importante tener claro que no siempre altos porcentajes de movilidad, garantizan la viabilidad del espermatozoide durante el proceso de reproducción, resaltan además que los daños en los espermatozoides poco se encuentran ligados a formación de cristales de hielo en su interior.

El EG ha sido utilizado como crioprotector en otras especies de peces como *Sorubim cuspicaudus* en porcentajes de inclusión entre 6 y 10% y se ha reportado Mt inferiores a 30% (Espinosa 2013); mientras que Atencio-García et al. (2014) afirma que los mejores valores de Mt en esta especie se obtienen cuando se utiliza EG 5% ( $36.9 \pm 9.1\%$ ); observando una relación inversa entre la Mt y los porcentajes de inclusión de EG. Herrera-Cruz et al. (2018) registraron valores de Mt ( $22.2 \pm 7.1\%$ ) cuando criopreservaron semen de bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum*.

**5.3.2 Progresividad total (Pt).** La Pt del semen descongelado de bocachico se muestra en la tabla 5. La mayor Pt se obtuvo cuando se criopreservó con EG8xLP7 ( $5.9 \pm 10.4\%$ ), la cual no mostró diferencia con el resto de tratamientos ( $p > 0.05$ ), excepto con el semen criopreservado con EG10xLP3 ( $0.7 \pm 0.5\%$ ) ( $p < 0.05$ ); es decir, el tratamiento con mayor inclusión del crioprotector interno muestra mejores indicadores en combinación con los mayores porcentajes de crioprotector externo.

Los mejores resultados de Pt del presente estudio, superan a los reportados por Atencio-García et al. (2013) ( $1.4 \pm 0.2\%$ ) utilizando DMA 12% para crioconservar semen de esta misma especie; no obstante, el mejor valor reportado es 4.9 veces menor que el reporte de Arroyo & Vergara (2010) ( $29.0 \pm 4.5\%$ ) utilizando DMSO 10%. Por otro lado, Pineda-Santis et al. (2015) evaluaron tres crioprotectores (DMSO 5%, DMF 5% y EG 5%) para crioconservar el semen de *Brycon henni* y encontraron mejores resultados de Pt ( $15.6 \pm 7.8\%$ ) cuando utilizaron EG 5%.



**5.3.3 Tipos de movilidades.** En la tabla 5 se registran los porcentajes de los espermatozoides rápidos, medios, lentos y estáticos de los diferentes tratamientos. El mayor porcentaje de espermatozoides rápidos (movilidad tipo a) se observó en el semen criopreservado con EG8xLP7 ( $3.8\pm 8.3\%$ ), el cual no fue diferente al resto de tratamientos, excepto cuando el semen fue criopreservado con EG10xLP3 ( $0.4\pm 0.2\%$ ). El menor porcentaje de espermatozoide estáticos se registró en el semen criopreservado con EG8xLP7 ( $45.6\pm 25.9\%$ ) y los mayores porcentajes oscilaron entre  $74.5\pm 6.7\%$  (EG10xLP3) y EG10xLP5 ( $49.2\pm 29.1\%$ ) sin observarse diferencia significativa entre estos valores ( $p > 0.05$ ).

Para bocachico se han registrado porcentajes de movilidades rápidas mayores a la obtenidas en el presente estudio como Martínez & Pardo (2013) que reportó  $10.1\pm 1.1\%$  de espermatozoides rápidos en semen criopreservado con DMSO 10% y Atencio-García et al. (2013) registró  $8.6\pm 1.0\%$  con semen criopreservado con DMA al 10%.

Los resultados del presente estudio, sugieren que el proceso de crioconservación y descongelación ocasionó una disminución de la movilidad total así como la reducción de los espermatozoides rápidos y medios con incrementos en los registros de espermatozoides estáticos; no obstante, la presencia de espermatozoides rápidos, medios y lentos en el semen crioconservado indica que existió la capacidad para fertilizar, aun cuando fuera notorio el efecto de la crioconservación en la calidad seminal.

Atencio-García et al. (2017) repartaron la crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* utilizando DMSO como crioprotector, en su resultados encontraron que en todos los porcentajes de inclusión del crioprotector el proceso de crioconservación y descongelación causó una reducción de la movilidad total, de las velocidades espermáticas, progresividad total e incrementó el porcentaje de espermatozoides inmóviles o estáticos en el semen descongelado con valores de  $69.4\pm 7.9\%$ . Herrera-Cruz et al. (2018a) obtuvieron resultados de la criopreservación de Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, utilizando DMSO, DMA y EG a dos porcentajes de inclusión (5 y 10%), que les permitieron concluir que el semen

precongelado desde que entra en contacto con la solución crioprotectora sufre daños que ocasionan reducción de la movilidad total, disminución de los espermatozoides medios (50-100  $\mu\text{m/s}$ ), incrementos de los estáticos y disminución de las velocidades espermáticas.

Atencio-García et al. (2014) evaluaron diferentes porcentajes de inclusión de EG como crioprotector de semen de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus*, dentro de sus resultados resaltan una marcada predominancia en el semen crioconservado (> 60%) de espermatozoides estáticos con valores de  $81.1 \pm 0.8\%$ , superiores a los reportados en el presente estudio. Atencio-García et al. (2015) realizaron la reproducción artificial de bocachico utilizando semen crioconservado con solución de 5.5% glucosa, 12% yema de huevo y 10% DMSO, en sus resultados reportan  $10.2 \pm 1.2\%$  de espermatozoides rápidos y  $47.8 \pm 10.4\%$  de estáticos y lentos.

Ha sido demostrado que durante todo proceso de crioconservación se generan daños en los espermatozoides a nivel mitocondrial y flagelar, pero no siempre estos daños pueden ser asociados a menores tasas de fertilización a menores porcentajes de espermatozoides móviles ya sean rápidos, medios o lentos. A nivel de laboratorio y campo las reproducciones artificiales utilizando semen crioconservado muestran que la probabilidad de que el espermatozoide encuentre el micrópilo disminuye toda vez que su capacidad móvil se reduce

**5.3.4 Velocidades espermáticas.** Los resultados del presente estudio para las velocidades curvilíneas (VCL) y lineales (VSL) se observan en la tabla 5; los valores de VCL oscilaron entre  $35.9 \pm 23.9 \mu\text{m/s}$  (EG8+LP7) y  $21.7 \pm 2.8 \mu\text{m/s}$  (EG10+LP5), presentándose diferencia significativa entre estos valores ( $p < 0.05$ ). Al igual que en la PT, los resultados no definen una tendencia clara que permita inferir alguna influencia del porcentaje del crioprotector o el diluyente sobre la VCL.

Los registros de velocidades espermáticas luego de la descongelación en semen de peces Characiformes son escasos; específicamente para bocachico, el primer reporte fue realizado por Martínez & Pardo (2013), quienes al evaluar diferentes

tasas de congelación y descongelación en semen crioconservado reportaron VCL máximas de  $51.4 \pm 4.7 \mu\text{m/s}$  superiores a los reportados en este estudio; valores superiores también se observaron cuando se evaluó el efecto de DMA durante la crioconservación de semen de esta misma especie  $63.2 \pm 11.6 \mu\text{m/s}$  (Atencio-García et al., 2013). Herrera-Cruz et al. (2018) reportaron para semen crioconservado de *Pseudoplatystoma magdaleniatum* VCL de  $29.8 \pm 7 \mu\text{m/s}$ , valores inferiores a los hallados en el presente estudio.

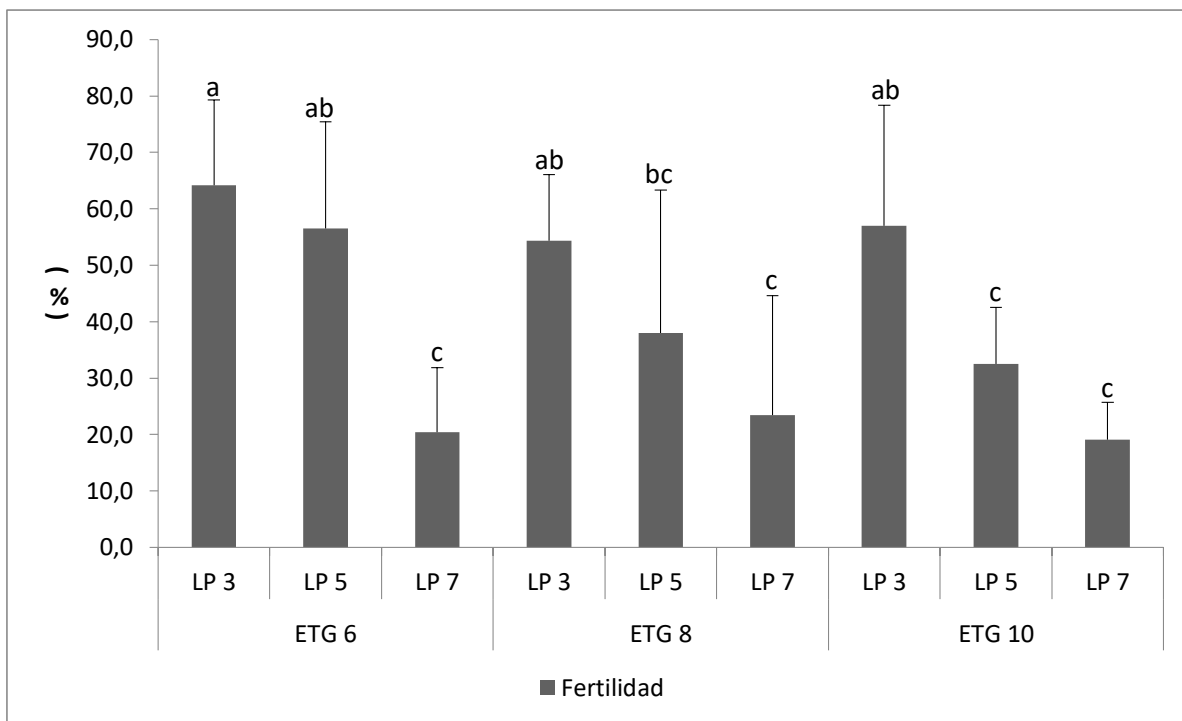
De manera general, se describe que la mejor VSL fue  $12.9 \pm 6.7 \mu\text{m/s}$  (EG6 + LP5) mientras que el menor valor fue  $5.0 \pm 1.1 \mu\text{m/s}$ , registrado en el tratamiento EG10+LP3, se observó diferencia estadística entre todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Otros reportes luego del proceso de descongelación de semen Bocachico, utilizando diferentes protocolos, registran valores que oscilan de  $36.4 \pm 5.0 \mu\text{m/s}$  (Atencio-García et al., 2013) hasta menores de  $35 \mu\text{m/s}$  (Martínez et al., 2013), resultados muy superiores a los hallados en esta investigación. Estudios realizados en peces silúridos como *Pseudoplatystoma magdaleniatum* por autores como Herrera-Cruz et al. (2018) y Ramírez-Merlano et al. (2011) con *Pseudoplatystoma metaense* reportan valores de VSL de  $8.6 \pm 7.5 \mu\text{m/s}$  y menores de  $10 \mu\text{m/s}$ , respectivamente; resultados inferiores a los reportados para Bocachico y a los hallados en el desarrollo de este estudio.

Martínez et al. (2010) afirmaron que incluso cuando la eficacia de un determinado crioprotector es conocida para una especie, la variación en su concentración podría tener efectos negativos que pueden afectar las velocidades espermáticas, lo que pudo ocurrir en el desarrollo de esta investigación, de allí las diferencias evidentes cuando se compara con resultados entre la misma especie pero con otro crioprotector.

## **5.4 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE SEMEN CRIOCONSERVADO**

**5.4.1 Fertilidad.** Los porcentajes de fertilización hallados en el presente estudio se muestran en la figura 3.



**Figura 3.** Porcentajes de fertilización de semen criopreservado-descongelado con EG y LP a tres porcentajes de inclusión. Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Valores mostrados como media  $\pm$  SD. N=12

Se observa a diferencia de los resultados descritos anteriormente, una tendencia clara indicando que a medida que aumenta el porcentaje de inclusión del crioprotector externo (LP) en la solución crioprotectora, decrece el porcentaje de fertilidad. La mayor fertilidad fue de  $64.2 \pm 15.1\%$  se encontró en el semen criopreservado EG6xLP3, lo que equivale al tratamiento con menor inclusión de crioprotectores; mientras que la menor tasa de fertilización fue de  $19.1 \pm 6.6\%$  en EG10xLP7, es decir, el tratamiento con mayor inclusión de crioprotectores; con estos resultados se podría inferir que la diferencia entre los porcentajes de inclusión de los crioprotectores internos y externos tienen una influencia directa sobre los porcentajes de fertilidad, confirmando así lo discutido con anterioridad en la tabla 5 de factores evaluados y sus interacciones. Los resultados entre los tratamientos evaluados presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que concentraciones mayores a 6% de EG con porcentajes de inclusión de LP mayores a 5% pueden tener un efecto negativo para el espermatozoide de bocachico; causándole una disminución de su calidad y

afectando su capacidad fertilizante; esto coincide con lo afirmado por Cruz-Casallas et al. (2006) quienes luego de evaluar DMSO como crioprotector de espermatozoides de *Brycon amazonicus*, concluyeron que mayores concentraciones de los crioprotectores resultan más tóxicos para las células espermáticas. Es importante señalar que ya Chao (1991) planteaba la necesidad de considerar los efectos tóxicos de los crioprotectores y diluyentes sobre los espermatozoides y determinar cuál de estos era el más adecuado para cada especie y la concentración a utilizar.

Díaz et al. (2019) señalaron que la disminución de la movilidad y las tasas de fertilización del semen crioconservado se relacionan con los cambios que sufre el espermatozoide durante el almacenamiento, asociado con envejecimiento de los procesos celulares, alteraciones morfológicas como espermatozoides con una ruptura de la membrana plasmática de la cabeza, debilitamiento de la pieza intermedia, desprendimiento del flagelo y la mitocondria (Ulloa-Rodríguez et al., 2018; Contreras et al., 2017).

Atencio-García et al. (2013) reportaron para semen de Bocachico crioconservado con DMA 8% movilidades bajas (menores a 40%) pero porcentajes de fertilidad considerados buenos (60.4%), Navarro et al. (2004) en semen crioconservado de *Piaractus brachypomus* utilizó EG 5% reportando movilidades de 37% con fertilidades de 38% y propilenglicol 5% registrando mayores movilidades (64%) pero fertilidades casi nulas (2%). Otros reportes de porcentajes de fertilización con semen crioconservado bajo diferentes protocolos registran valores de  $60.4 \pm 8.4\%$  (DMA 8%) (Atencio-García et al., 2013) y  $48.1 \pm 15.5\%$  (EG 5%) (Atencio-García et al., 2014).

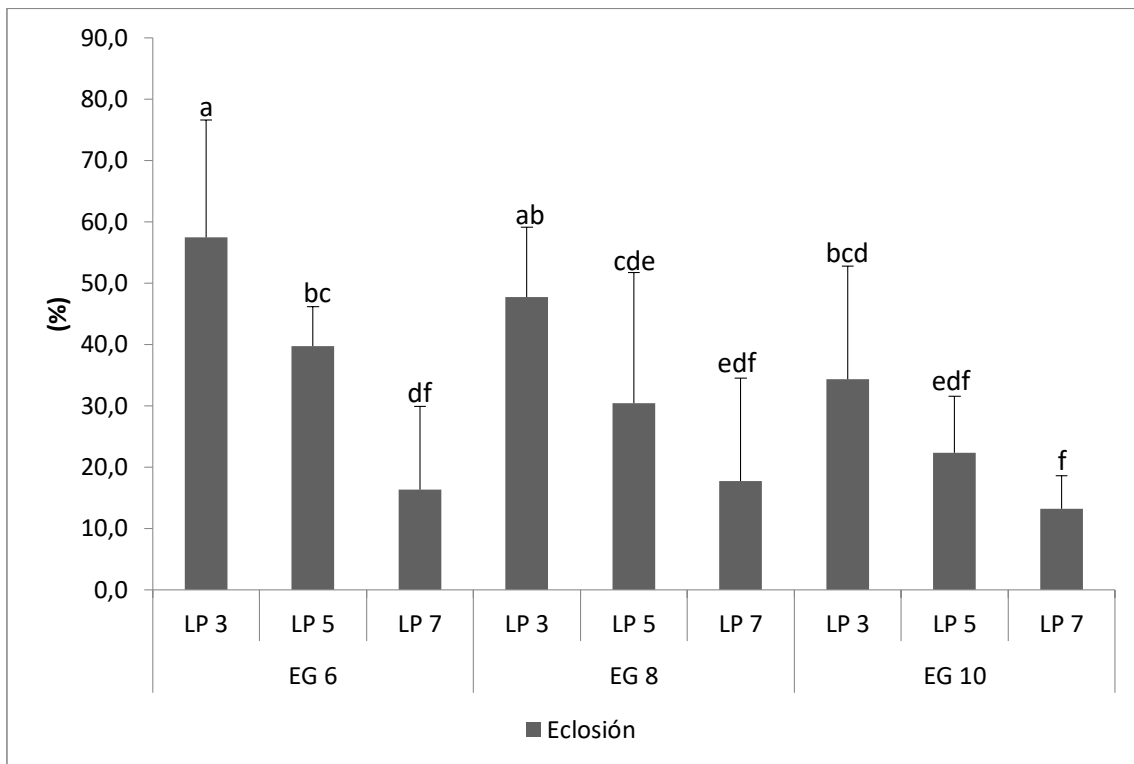
Para explicar la fertilidad que se obtuvo aun con bajos porcentajes de movilidad, nos remitimos a lo reportado por Martínez (2010) al señalar que el proceso de difusión lateral de moléculas (lípidos y proteínas), podría permitir la estabilización transitoria de la membrana plasmática durante el proceso de crioconservación, en el cual la distribución homogénea de partículas y la relación de fosfolípidos y

proteínas hacen posible la reversión exitosa de la célula espermática para conservar su capacidad fecundante. No obstante, este mismo autor es enfático en afirmar que la fertilidad exige del espermatozoide más que una buena movilidad o una variable en particular, demanda el bienestar integral del espermatozoide o por lo menos en la mayor parte de sus variables. En ese orden de ideas, se conoce que los procesos de crioconservación causan daños de diferentes índoles en el espermatozoide: DNA, mitocondrias, flagelos, entre otros (Cabrita 2014), lo que permite inferir que porcentajes relativamente altos de movilidad total no necesariamente se ven reflejados en altas tasas de fertilidad.

Ramírez-Merlano et al. (2011) exponen una situación interesante, al utilizar semen crioconservado de *Pseudoplatystoma metaense* con movilidad total de 0% y obtener fertilizaciones del 10%; la explicación para ello se encontró en que parte de esos espermatozoides inmóviles conservan de forma intacta la estructura cromosómica la cual está contenida en el núcleo de la cabeza, lo que permite la fecundación efectiva (Andrade et al., 2001; Grassioto et al., 2001). Además autores como Rana et al. (1990) señalan que esto puede suceder porque algunos factores de los ovocitos pueden activar a los espermatozoides inmóviles, esto es respaldado por Iwamatsu (2000) y Babin et al. (2007) que afirman que sumado a factores ambientales, la presencia de esos agentes liberados por los ovocitos como pequeñas moléculas polipéptidos sintetizados en el folículo de la célula y acumuladas en el corion, pueden producir hiperactividad de la movilidad espermática en algunas especies de peces.

**5.4.2 Eclosión.** En el presente estudio los diferentes porcentajes de eclosión se muestran en la figura 4; para la eclosión se encontraron tendencias similares a las de la fertilidad, indicando que a medida que aumenta el porcentaje de inclusión del crioprotector externo (Leche en Polvo: LP) dentro de la solución crioprotectora, decrece el porcentaje de eclosión. Se presentó diferencia estadística entre los resultados de los tratamientos ( $p < 0.05$ ), siendo la mayor tasa de eclosión  $57.5 \pm 19.1\%$  y se encontró en el tratamiento que contenía EG al 6% + LP al 3%, lo que equivale al tratamiento con menor inclusión de crioprotectores interno y externo, la

menor tasa de eclosión fue de  $13.2 \pm 5.3\%$  en el tratamiento de EG10 + LP7, es decir, el tratamiento con mayor inclusión de crioprotectores; con estos resultados también se podría inferir que la diferencia entre los porcentajes de inclusión tanto del crioprotector como del diluyente, tiene una influencia directa sobre los porcentajes de eclosión, confirmando así lo discutido con anterioridad en la tabla 4 de factores evaluados y sus interacciones.



**Figura 4.** Porcentajes de eclosión encontrados en el presente estudio. Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Valores mostrados como media  $\pm$  SD. N=12

Los porcentajes de fertilidad alcanzados por el semen crioconservado, se relacionan estrechamente con la calidad seminal y se estima que puede representar mejor los efectos de la crioconservación, de allí que pocos autores decidan presentar sus resultados de crioconservación basados en la tasa de eclosión, supervivencia larval o en la relación espermatozoide / ovocito (Atencio-García et al., 2015).

Los pocos trabajos realizados con esta especie, donde se ha evaluado el desempeño reproductivo con semen crioconservado reportan eclosiones menores a las encontradas en este trabajo, tal es el caso de Atencio-García et al. (2015) y

Atencio-García et al. (2013) donde se han reportado eclosiones del  $48.6 \pm 4.2$  % y  $<50\%$ , respectivamente.

En el estudio de Atencio-García et al. (2014) la mayor eclosión ( $38.6 \pm 13.9\%$ ) se registró con EG 5%, estos autores sugieren que el uso de EG en porcentajes de inclusión mayores a 5% disminuye la calidad y capacidad fertilizante y de eclosión en semen de Bagre blanco *Sorubim cuspiacudus* , además de que podrían ejercer un efecto negativo sobre el espermatozoide en los distintos pasos del proceso de crioconservación es decir, durante la exposición a la solución crioprotectora y después de la descongelación del semen, causando pérdidas bruscas de movilidad y capacidad fertilizante en el espermatozoide.



## 6. CONCLUSIONES

El proceso de crioconservación y descongelación ocasionó una disminución de la movilidad total así como la reducción de los espermatozoides rápidos y medios con incrementos en los registros de espermatozoides estáticos; no obstante, la presencia de espermatozoides rápidos, medios y lentos en el semen crioconservado indica que existió la capacidad para fertilizar, aun cuando fuera notorio el efecto de la crioconservación en la calidad seminal.

Concentraciones de LP mayores a 3% pueden tener efecto negativo sobre el espermatozoide de *Prochilodus magdalenae*, causándole disminución de su capacidad fertilizante.

Los resultados del presente estudio permiten sugerir que la solución crioprotectora compuesta por ETG 6%, glucosa al 6% y leche en polvo descremada al 3% es una alternativa viable para la crioconservación de semen de bocachico.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Akhter S., Ansari M., Andrabi S., Rakha B., Ullah N., Khalid M. 2012. Soya-lecithin in Extender Improves the Freezability and Fertility of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*. 2012; 47: 815 – 819. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01973.x

Akter S., Hassan M., Nahiduzzaman., Reza M. 2014. Growth and survival of olive barb, *Puntius sarana* (Hamilton 1822) larvae produced with cryopreserved versus fresh sperm. *Aquaculture Research*. 2014; 1 : 6 10.1111- 12484. DOI: 10.1111/are.12484

Albarracín J. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled Straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro [Tesis Doctoral], Facultad de Veterinaria, Doctorado en Medicina y Cirugía animales, Universidad Autónoma de Barcelona, España. 2005; 127p.

Andrade R, Bazzoli N, Merino M. Situación del repoblamiento de cuerpos de agua continentales en Colombia. Instituto Colombiano de Desarrollo Rural, Bogotá. 2011

Althouse G, Pierdon M, Lu K. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*. 2008; 70: 1317–1323. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.010

Andrade R., Bazzoli N., Rizzo E., Sato Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue & Cell*. 2001; 33 : 524 - 532. DOI: 10.1054/tice.2001.0206

Arias-Rodríguez L. Inactivación genética de esperma e inducción de ginogénesis y de triploidía en el botete diana *Sphoeroides annulatus*, (Jenyns, 1842). [Tesis de

maestría]. Centro de Investigación para la Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), Unidad Mazatlán, Sinaloa, México. 2001.

Arrebola F. Macho cabrío. Manejo y datos específicos. In: Ferre M., Ramos A., Lacasta L. 2012. Gestión integral del macho: en las explotaciones de ovino y caprino. España. Ice salud & Vet. 2012; 150 – 166.

Atencio V. Producción de alevinos de especies nativas. Rev. MVZ Córdoba 2001; 6(1):9-14. DOI:10.21897/rmvz.1060

Atencio-García V., Pertúz V., Kerguelén E. Rescate de larvas de peces reofilicos en la desembocadura del rio Sinú como estrategia para diversificar las especies del programa de repoblamiento. Universidad de Córdoba/Empresa Urrá SA-ESP, Montería, Colombia. 2010.

Atencio-García V., Pereza E., Espinosa J., Pardo S. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Rev MVZ Córdoba. 2013; 45: 151-158. DOI: 10.4067/S0301-732X2013000200006

Atencio-García V.. Producción de alevinos de especies nativas: con énfasis en Brycónidos. Memorias. XIV Congreso colombiano y IV latinoamericano de estudiantes de Ciencias Biológicas. ANEC, Santa Marta. 2014

Atencio-García V., Espinosa-Araujo J., Martínez J., Pardo-Carrasco S. Insemination of bocachico fish (*Prochilodus magdalenae*) with fresh or cryopreserved semen: effect of spermatozoa/oocyte ratio. Rev Colombiana de Ciencia Pecuaria. 2015; 28:347-355. DOI: 10.17533/udea.rccp.v28n4a07

Atencio-García V., Dorado-Longas M., Montes-Petro C., Prieto-Guevara M., Espinosa-Araujo J. Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei*, con dimetilsulfoxido. Rev. Colomb. Biotecnol. 2017; 19: 81 – 88. DOI:10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.59987.

Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP). Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia. 2013. [https://www.academia.edu/15490623/Diagnostico\\_del\\_estado\\_de\\_la\\_Acuicultura\\_en\\_Colombia](https://www.academia.edu/15490623/Diagnostico_del_estado_de_la_Acuicultura_en_Colombia)

Ávila-Portillo L., Madero J., López C., León M., Acosta L., Gómez C., Delgado L., Gómez C., Lozano J., Reguero M. Fundamentos de criopreservación. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2006; 57 (4).

Ayazo-Genes J., Pertuz-Buelvas V., Espinosa-Araújo J., Jiménez-Velásquez C., Atencio-García V., Prieto-Guevara. Desempeño de bocachico *Prochilodus magdalenae* en sistemas intensivos de producción con tecnología biofloc. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. 2018; 16 (1) : 1 -11. DOI:10.18684/bsaa.v16n1.629

Babiak I., Glogowski J., Luczynski M., Luczynski M., Demianowicz W. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of Northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. Theriogenology. 1999; 52: 473-479. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00144-2

Babin P., Cerdà J., Lubzens E. (eds) The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer, Dordrecht. 2007.

Balamurugan R., Munuswamy N. Crioconservación de esperma en salmonete gris *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). Anim Reprod Sci. 2017; 185: 205-213. DOI: 10.1016 / j.anireprosci.2017.08.022.

Ball B., Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potencial. *J Androl.* 2001; 22: 1061-1069. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x

Bart A., Wolfe D., Dunham R. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. *Trans Am Fish Soc.* 1998; 127: 819-824. DOI: 10.1577/1548-8659(1998)127<0819:COBCSA>2.0.CO;2

Bergeron A., Manjunath P. New Insights Towards Understanding The Mechanisms Of Sperm Protection By Egg Yolk And Milk. *Mol Reprod Dev.* 2006; 73 (10): 1338-44. DOI: 10.1002/mrd.20565

Bobé J., Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Endocrinolgy.* 2009; 165 (3): 535- 548. DOI: 10.1016/j.ygcn.2009.02.011

Boiso I., Marti M., Santalo J., Ponsa M., Barri P., Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod.* 2002; 17 (7): 1885-1891. DOI: 10.1093/humrep/17.7.1885

Cabrita E., Robles V., Herráez P. Sperm quality assessment. En: Cabrita E., Robles V., Herráez P., Editors. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species.* Taylor y Francis Group, CRC Press. 2009; p. 93-147.

Cabrita E., Sarasquete C., Martínez-Páramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cerezales S., Herráez M. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J Appl Ichthyol.* 2010; 26: 623–635.

Cabrita E., Martínez-Páramo S., Gavaia P., Riesco M., Valcarce D., Sarasquete C., Herráez M., Robles V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*. 2014; 432: 389–401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>

Carneiro P., Azevedo J., Maria A. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *Cryo Letters*. 2012; 33: 385-393.

Carolsfeld J., Godinho H., Zaniboni-Filho E., Harvey B. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biology*. 2003; 63: 472-489. DOI: 10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x

CCI (Corporación Colombia Internacional). Informe de Pesca y Acuicultura Colombia 2008. CCI/MADR, Bogotá.

CCI (Corporación Colombia Internacional). Informe de Pesca y Acuicultura Colombia 2010. CCI/MADR, Bogotá.

Chao N., Liao I. Cryopreservation on finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*. 2001; 197: 161-189. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00586-5

Chao N. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extension efforts. Academia Sinica, Monograph. *Bull Ins Zool*. 1991; 16: 263-283.

Choez K., Ruíz L., Sandoval R., Evangelista S., Santiani A. Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28 (3) : 619 – 628; <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>

Choez K. Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. [Tesis de Maestría] Facultad de Medicina Veterinaria, Maestría en Ciencia Animal, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. 2016.

Ciereszko A., Dabrowski K. Estimation of Sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectriphotometric technique. *Aquaculture*. 1993; 109: 367-373. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90175-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90175-X)

Ciereszko A., Dabrowski K., Lin F., Christ A., Toth G. Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved Muskellunge spermatozoa. *Trans Am Fish Soc.* 1999; 128: 542-548.

Ciereszko A., Wolfe T., Dabrowskia K. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquat. Toxicol.* 2005; 73: 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.003>.

Contreras P., Ulloa-Rodríguez P., Merino O., Valdebenito I., Figueroa E., Farías J., Risopatrón J. Effect of short-term storage on sperm function in Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) sperm. *Aquaculture*. 2017; 481: 58-63. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.08.022

Costa da silva S., Senhorini J., De Castro D., Bashiyo-Silva C., Zacheo G., Verissimo-Silveira S., Ninhaus-Silveira A. Improved solution for vitrification of *Prochilodus lineatus* embryos based on the reduction in risk factors: Toxicity, osmotic responses and ice-nucleation. *Rev. Aquaculture Research*. 2018; 49: 793–800. <https://doi.org/10.1111/are.13510>

Cruz-Casallas P., Medina-Robles V., Velasco-Santamaría Y. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú. *Rev. Col Cienc Pecu.* 2006; 19(2): 146-51.

Cruz-Casallas P., Pardo-carrasco S., Lombo-castellanos P., Lombo-Rodríguez D., Pardo-Mariño J. Cryopreservation of Yamú Brycon Siebenthalae Milt. *World Aquaculture Society.* 2004.; 35(4): 529-535. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00120.x>

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

Cuevas-Uribe R., Leibo S., Daly J., Tiersch T. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology.* 2011; 63: 186–197. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.06.004

Cuevas-Uribe R., Chesney E., Daly J., Tiersch T. Vitrification of sperm from marine fishes: effect on motility and membrane integrity. *Aquaculture Research.* 2013; 1-15. DOI: 10.1111/are.12337

Díaz R., Lee-Estevez M., Quiñones J., Dumorné K., Short S., Ulloa-Rodríguez P., Valdebenito I., Sepúlveda N., Farias J. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm morphology and membrane lipid composition related to cold storage and cryopreservation. *Animal Reproduction Science.* 2019 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.004>

Dietrich G., Nynca J., Szczepkowski M., Dobosz S., Szczepkowska B., Ciereszko A. The effect of cryopreservation of semen from whitefish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability. *Aquaculture.* 2016; 464: 60–64.



Dreanno C., Suquet M., Quemener L., Cosson J., Fierville F. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*. 1997; 48: 589-603. DOI: 10.1016/s0093-691x(97)00276-8

Drokin S., Stein H., Govorukha T. Ultrastructure of carp *Cyprinus carpio* spermatozoa after cooling, dilution and freeze-thawing. *Cryo Letters*. 2003; 24 (1): 49 - 55.

Dumorné K., Figueroa E., Cosson J., Lee-Estevez M., Ulloa-Rodríguez P., Valdebenito I., Farías J. Protein phosphorylation and ions effects on salmonid sperm motility activation. *Rev. Aquaculture*. 2017; 1 - 11. <https://doi.org/10.1111/raq.12198>

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

Fabbrocini A. Cryopreservation of Seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*. 1999; 40:46-53.

Fabbrocini A., Lavadera S., Sansone G. Cryopreservation of Seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*. 2000; 40: 46-53. DOI: 10.1006/cryo.1999.2220

FAO (Food and Agricultural Organization). El Estado de la Seguridad Alimentaria y la Nutrición en el mundo 2017. 144 p. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/al7695s.pdf>

Fernández A., Gonzalvo M., Clavero A., Ruíz A., Zamora S., Roldán M., Rabelo B., Ramírez J., Yoldi A., Castilla J. Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. Artículo III. 2009; 14 : 17 – 25.

Figueroa E., Valdebenito I., Merino O., Ubilla A., Risopatrón J., Farias J. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *J. Fish Biol.* 2016; 89: 1537-1550. DOI: 10.1111/jfb.13052

Figueroa E., Lee-Estevez M., Valdebenito I., Watanabe I., Oliveira R., Romero J., Castillo R., Farias J. 2019. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. *Aquaculture*; <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.004>

Fogli da Silveira W., Kavamoto E., Cestarolli M., Godinho H., Ramos S., Silveira A. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu. *Inst Pesca.* 1990; 17, 1-13.

Fornari D., Ribeiro R., Streit-Jr D., Godoy L., Neves P., Oliveira D., Sirol R. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored. *Zygote.* 2011; 22: 58–63. DOI: 10.1017/S0967199411000517

Fraser L., Strzezek J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezingthawing. *Anim Reprod Sci.* 2007; 99: 317- 329. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.06.003

Gallardo J. 2007. Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal. *Rev Invest Clin*; 59 (19) ; 42-47.

Gardner D., Weissman A., Howles C., Shoham Z. 2001. Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. London, UK: Martin Dunitz Ltd (eds).

Gheller S., Corcini C., De Brito C., Acosta I., Geó C. Tavares S., Soares A., Silva D, Pires A., Varela J. Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian

cattfish *Leiarius marmoratus*. *Cryobiology*. 2019; doi:  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.001>.

Glogowsky J., Ciereszko A., Dabrowsky K. Cryopreservation of muskellunge and yellow perch semen. *N Am J Aquacult*. 1999; 61 : 258 - 262. doi.org/10.1577/1548-8454(1999)061<0258:COMAYP>2.0.CO;2

González J., Losada E., Cruz-Casallas N., Cruz-Casallas P., Medina V. Efecto de la sustancia crioprotectora y nivel de glucosa sobre la viabilidad de embriones de cachama blanca *Piaractus brachypomus* conservados a -14 °C. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2011; 24: 384. doi.org/10.4067/S0301-732X2016000100009

Grassiotto Q., Negräu J., Carvalho E., Foresti F. Ultraestructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) *J Fish Biol*. 2001; 59: 1494-1502. doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00214.x

Guthrie H., Liu J., Critser J. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectans on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*. 2002; 67: 1811-1816. DOI: 10.1095 / biolreprod67.6.1811

Hafez E. 2002. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez E., Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 Ed. México. Mc Graw Hill. p 441-452.

Hayashi H., Yamamoto K., Yonekawa H., Morisawa M. Involvement of tyrosine protein kinase in the initiation of flagellar movement in rainbow trout spermatozoa. *J Biol Chem*. 1987; 262: 16692- 16698.

He S., Woods L. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone*

*saxatilis*) sperm. Cryobiology. 2004; 48: 254–262.  
Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.01.009

Herrera-Cruz E., Aristizábal-Regino J., Estrada A., Yepes-Blandón J., Espinosa J., Atencio-García V. Criopreservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*) con tres diferentes crioprotectores. Meeting Abstract Lacqua. 2018; Doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.77847

Herrera-Cruz E., Aristizábal-Regino J., Estrada A., Yepes-Blandón J., Espinosa J., Atencio-García V. Efectos de tres crioprotectores en la fase de precongelación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*) Meeting Abstract Lacqua. 2018b;

Hu J., Li Q., Zan L., Jiang Z., An J., Wang L., Jia Y. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extender on bull spermatozoa following freezing-thawing. Anim Reprod Sci. 2010; 117: 11-17. Doi: 10.1016 / j.anireprosci.2009.04.001.

Iwamatsu T. Fertilization in fishes. In: Tarin J, Cano A (eds). Fertilization in Protozoa and Metazoa Animals. Springer, Berlin, Germany. 2000; 90-145.

Jaramillo-Villa U., Maldonado-Ocampo J., Escobar F. Altitudinal variation in fish assemblage diversity in streams of the central Andes of Colombia. Journal of Fish Biology. 2010; 76: 2401-2417. Doi: 10.1111 / j.1095-8649.2010.02629.x.

Jiang Z., Li Q., Hu J., Li W., Zhao H., Zhang S. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. Cryobiology. 2007; 54: 301 – 304. DOI: 10.1016 / j.cryobiol.2007.03.001

Judycka S., Zarski D., Dietrich M., Palinska-Zarska K., Karol H., Ciereszko A. Protocolo de crioconservación estandarizado del semen de la perca europea (*Perca*

*fluviatilis*) permite obtener altas tasas de fertilización con el uso de semen congelado / descongelado. *Acuicultura*. 2019; 498: 208-216.

Kato K., Murata O., Yamamoto S., Miyashita S., Kumai H.. Viability, growth and external morphology of meiotic- and mitoticgynogenetic diploids red sea bream. *J Appl Ichthyol*. 2001; 17 (3): 97-103.

Kopeika E., Kopeika J., Zhang T. Cryopreservation of fish sperm. *Methods Mol Biol*. 2007; 368: 203–17. DOI: 10.1007 / 978-1-59745-362-2\_14

Kuleshova L., MacFarlane D., Trouson A., Shaw J. Sugars exert a major influence on the vitrification proprieties of ethylene glycol-besed solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*. 1999; 38: 119-130. Doi.org/10.1006/cryo.1999.2153

Kumar S., Betsy J. Influence of egg yolk on the quality of cryopreserved spermatozoa of common carp, *Cyprinus carpio*, *Journal of Applied. Aquaculture*. 2015; 27 (1): 40-49; DOI: 10.1080/10454438.2014.965398.

Lazo M., Tiznado-Hernández K., Vargas-Arispuro M., Martínez-Téllez I, Islas-Osuna M., Hernández M, Martínez-Montero M., Rivera M. Efect of cryoprotectants on the morphology and electrolyte leakage on axillary buds of cryopreserved grapevine cv. 'Flame Seedless'. *Investigación y Ciencia*. 2017; 1665-4412, 25 : 36-44.

Liebermann J., Tucker M. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potencial after vitrification. *Reproduction*. 2002; 124 (4): 483-489. DOI: 10.1530 / reprod / 124.4.483

Liebermann J., Nawroth F., Isachenko V., Isachenko E., Rahimi G., Tucker M. Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod*. 2002a; 67 (6): 1671-1680. DOI: 10.1095 / biolreprod.102.006833

Linhart O., Cosson J., Mims S., Shelton W., Rodina M. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reprod.* 2002; 124 : 713 - 719.

López-Hernández J., Osorio-Pérez A., Jiménez-Félix S., Páramo-Delgadillo S., Márquez-Couturier G., Yasui G., Arias-Rodríguez L. Artículo de Revisión: La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Rev. Mar. Cost.* ESSN 1659-407X. 2018; Vol. 10 (1) : 67-96. DOI: 10.15359/revmar10-1.5

Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R. Cryopreservation induces and apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 2004; 71: 28-37. DOI: 10.1095 / biolreprod.103.024281

Martínez J., Pardo S. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana.* 2010; 15 (2): 3-23.

Martínez G., Atencio-García V., Pardo-Carrasco S. Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Rev. MVZ Córdoba.* 2011; 16 (2): 2554 – 2563. Doi.org/10.21897/rmvz.1020

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

Martínez J., Pardo S.. Efecto de la congelación y descongelación sobre movilidad espermática en Bocachico (*Prochilodus magdalenae*). *Rev.MVZ Córdoba.* 2013; 18 (1), 3295-3303.

Martínez-Páramo S., Horváth Á., Labbe C., Zhang T., Robles V., Herraes P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T., Cabrita E. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*. 2017; 472: 156 – 177. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.05.042

Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim*. 2001; 36: 49-55. DOI: 10.1046 / j.1439-0531.2001.00248.x

Mazur P., Leibo S., Seidel G. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biology of Reproduction*. 2008; 78: 2–12. DOI: 10.1095 / biolreprod.107.064113

Medina-Robles V, Guaje-Ramírez D, Marin-Cossio L, Sandoval-Vargas L, Cruz-Casallas P. Crioconservación seminal de *Colossoma macropomum* como estrategia de producción y conservación en la Orinoquia Colombiana. *ORINOQUIA*. 2019; 23 (1): 15-24. <http://dx.doi.org/10.22579/20112629.537>

Mira-López T, Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y, Cruz-Casallas P. Valores morfométricos en larvas de Yamú *Brycon amazonicus* (pisces: characidae) obtenidas con semen fresco y crioconservado. *Actual Biol*. 2007; 29 (87): 209-219. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-2007000200005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-2007000200005)

Mojica J., Pinzón S. Ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus 1766). [Trabajo de grado], Facultad de Ciencias Agrarias y Recursos Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia; 42 p. 2002.

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

Montes C. 2018. Evaluación del desempeño reproductivo del Bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en cautiverio mediante predictores tempranos de calidad espermática y ovocitaria. [Tesis de Maestría], Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería, Maestría en Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia; 90p.

Moore H., M Akhondi. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight line speed measured by continuous computer-aided sperm analysis. *J Androl.* 1996; 17: 50-60.

Morris G., Acton E., Murray J., Fonseca F. 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*; 64 (2): 71-80. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.12.002.

Moskovtsev S., Lulat A., Librach C. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification vs. slow freezing: Canadian experience. In: Katkov II , editor. Current frontiers in cryobiology. Croatia: InTech. 2012; 77-101. DOI: 10.5772 / 35485

Muchlisin Z. Review: current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas.* 2005; 6 (1): 12-15. DOI: 10.13057/biodiv/d060114

Nahiduzzaman M., Hassan M., Kumar P., Hossain A., Reza M., Tiersch T. Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. *Animal Reproduction Science.* 2012; 136 : 133 – 138. DOI: 10.1016 / j.anireprosci.2012.10.023

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



Nizio A., Marques A., Venancio R., Pinheiro J., Falanghe P., Costa H. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaquí Fish semen (*Colossoma macropomum*). *Cryobiology*. 2015; 70: 109-114.

Nynca J., Dietrich G., Grudniewska J., Dobosz S., Liszewska., Krzys M., Rózyński R., Cierieszko A. 2015. Efficient method for cryopreservation of European huchen (*Hucho hucho* L.) and grayling (*Thymallus thymallus* L.) semen. *Aquaculture*; 435 : 146 – 151. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.03.

Pardo-Carrasco S., Salas J., Reza L., Espinosa-Araújo J., Atencio-García V. 2015. Criopreservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*) con dimetilacetamida como crioprotector. *Rev CES Med Zootec*; 10 (2): 122-131.

Paredes E., Mazur P. 2018. Roles of intracellular ice formation, vitrification of cell water, and recrystallization of intracellular ice on the survival of mouse embryos and oocytes. *Reproduction. Fertility and Development*. <https://doi.org/10.1071/RD16021>.

Pegg D. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010; 60: S36–S44. Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003

Pineda-Santis H., Gómez-Oquendo J., Montoya-Páez J., Toro-Rendón V., Acevedo-Villa O., Restrepo-Betancur G. Crioconservación de semen y calidad espermática en sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae) Orinoquia. 2015; 19 (2): 176-182.

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

Ramírez-Merlano J., Medina-Robles V., Cruz-Casallas P. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo

diferentes protocolos de congelación. Arch Med Vet. 2011; 43: 135-144.  
Doi.org/10.4067/S0301-732X2011000200006

Ramirez-Merlano J, Velasco-Santamaria Y, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). Aquaculture Research, 2011; (42):738 - 745  
doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02835.x

Rana K., Muiruri R., McAndrew B., Gilmore A. The influence of diluents, equilibration time and pre-freezing storage time on the viability of cryopreservation *Oreochromis niloticus* (L.) spermatozoa. Aquacult and Fish Manag. 1990; 21: 25-30. DOI: 10.1111/j.1365-2109.1990.tb00379.x

Reza L., Salas J. Evaluación de la calidad seminal de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* criopreservado con dimetilacetamida. [Trabajo de pregrado]. Montería (Col): Universidad de Córdoba. 2010.

Rodríguez C. 2009. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). [Tesis de Magister], Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 72 p.

Rurangwa E., Kime D., Ollevier F., Nash J. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Rev Aquaculture. 2004; 234: 1-28.  
Doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006

Salmito-Vanderley C., Pinheiro J., Almeida P., Lopes J., Leite L. Metodologías para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes characiformes. Acta.Vet. Brasílica. 2014; 8 : 343 – 350. DOI: 10.21708 / avb.2014.8.0.3951

SEPEC. Boletín estadístico. 2016. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP) Universidad del Magdalena.

Sztejn J. Principios de Criobiología. Genetic Engineering and Research Support. 2013; 7 (13).

Tabares C., Tarazona A., Olivera M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. Rev Col Cienc Pec. 2005; 18 : 2.

Tiersch T., Yang J., Jenkins A., Dong Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. Eds Roldan, E.R.S. & M. Gomendio. Spermatology. Society of Reproduction and Fertility. 2007; 65: 493-508.

Trindade C., Dahl C., Nobre A., Vianna M., Lorandi S., Esquivel J., Esquivel J., Varela A. Amides as cryoprotectants for the freezing of *Bryconorbignyanus* sperm. Aquaculture. 2019; 18: 1-28. DOI: 10.1016 / j.aquaculture.2019.03.015

Ulloa-Rodríguez P., Contreras P., Dumorné K., Lee-Estevez M., Díaz R., Figueroa E., Valdebenito I., Risopatrón J., Farías J. Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) spermatozoa quality after storage at 4 °C in Cortland medium. Anim. Reprod. Sci. 2018; 197: 117-125. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.08.019

Velasco-Santamaría Y., Medina-Robles V., Cruz-Casallas E. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture. 2006; 256: 267-271. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.039

Viveiros A., Godinho H. sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. Fish physiologic iochem. 2009; 35 (1): 137-150. DOI: 10.1007 / s10695-008-9240-3

Viveiros A., So N., Komen J. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology*. 2000; 54: 1395-1408. Doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00462-3

Whitaker M., Swann K. Lighting the fuse at fertilization. *Development*. 1993; 117: 1-12.

Woods E., Benson J., Agca Y., Critser J. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004; 48: 146-156. Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002

WWF (World Wildlife Fund). 2017. Colombia Viva: Un país megadiverso de cara al future. Informe 2017. p 22.

Xin M., Momin M., Dzyuba B., Cuevas-Urbe R., Shaliutina-Kolesova A., Linhart O. Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. *REV Theriogenology*. 2017; 16-22. DOI: 10.1016 / j.theriogenology.2017.04.043

Yao Z., Crima L., Richardsonb G., Emerson C. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*. 2000; 181: 361-375. Doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00240-9

Yildiz C., Bozkurt Y., Yavas I. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*. 2013; 67: 91–94. DOI: 10.1016 / j.cryobiol.2013.05.008

Zaniboni-Filho E., Nuñez A., Reynalte-Tataje D., Serafini R. Water pH and *Prochilodus lineatus* larvae survival. *Fish Physiol Biochem*. 2009; 35: 151-155. DOI: 10.1007 / s10695-008-9235-0

Zilli L., Schiavone R., Zonno V., Storelli C., Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. J. Cryobiology. 2003; 47: 227- 235. Doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.002Obtenga