

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DMSO Y GLUCOSA SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA Y EL MATERIAL GENÉTICO EN SEMEN
CRIOCONSERVADO DE BOCACHICO *Prochilodus magdalenae*.**

JOSE GREGORIO MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS - BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN**

2010

1

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DMSO Y GLUCOSA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y EL MATERIAL GENÉTICO EN SEMEN CRIOCONSERVADO DE BOCACHICO *Prochilodus magdalenae*.

JOSE GREGORIO MARTÍNEZ

Proyecto de grado

Director (a):

Sandra C. Pardo Carrasco, PhD.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS - BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN**

2010

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

*Dedicado a Jehová Dios, a mi madre Leticia, a mi hermana
Alexandra por inculcarme el amor a la academia, a mis
hermanitas Johanna y Caridad, a mis sobrinos Juan, Maria
Ángel, Melissa y Maria José; pero sobretodo a mi hermosa,
comprensiva e incondicional novia, Frika.*

*Jodos fueron el motor de mi lucha y la luz al final del túnel,
gracias por su apoyo, amor y comprensión. A todos gracias por
creer en mi.*

AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias a mi tutora Sandra C. Pardo, por confiar en mi y darme la oportunidad de trabajar a su lado, aún cuando no me conocía.

Gracias a mis asesores: Víctor Atencio García (Director del Centro de Investigación Piscícola – UNICORDOBA) y Ariel Tarazona (Profesor Universidad Nacional de Colombia – UNALMED), por apoyar con su conocimiento y tiempo al desarrollo de este experimento.

Doy las gracias a Liliana Cardona, Jonathan Vergara, Víctor Arroyo y en general a todos aquellos que colaboraron incondicionalmente en la ejecución de mi proyecto, sin su ayuda esto tal vez no hubiese sido posible.

Al profesor Guillermo Henao y Mauricio Medina, por su compromiso en la evaluación y corrección de este trabajo. Sus contribuciones enriquecieron este proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABLAS.....	17
RESUMEN	19
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 GENERAL.....	25
2.2 ESPECÍFICOS.....	25
2.2.1 Objetivo 1.....	25
2.2.2 Objetivo 2.....	25
2.2.3 Objetivo 3.....	25
2.2.4 Objetivo 4.....	25
2.2.5 Objetivo 5.....	25
3. MARCO TEÓRICO.....	26
3.1 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE PECES.....	26
3.1.1 Osmolaridad.....	26
3.1.2 Congelación.....	29
3.1.3 Crioprotectores.....	31
3.1.4 Integridad de ADN y genotoxicidad.....	33
3.1.5 Integridad de membrana.....	34
3.1.6 Sistemas de empaqueo de semen.....	37

4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	39
4.1 CONTEXTUALIZACIÓN DE HIPÓTESIS.....	39
4.1.1 Hipótesis nula 1.....	39
4.1.2 Hipótesis nula 2.....	39
4.1.3 Hipótesis nula 3.....	40
4.1.4 Hipótesis nula 4.....	40
2.1.5 hipótesis nula 5.....	40
4.2 LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	40
4.3 MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
4.4 PROTOCOLOS DE CRIOCONSERVACIÓN.....	41
4.4.1 Selección de machos para obtención de semen.....	41
4.4.2 Obtención de semen.....	42
4.4.3 Evaluación de semen precongelación.....	42
4.4.4 Congelación del semen.....	48
4.4.5 Descongelación de semen.....	52
4.4.6 Pruebas posdescongelación.....	52
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	55
6. RESULTADOS.....	56
6.1 RESULTADOS GENERALES.....	56
6.2 OBJETIVO 1.....	60
6.2.1 Cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos.....	60
6.2.2 Movilidad rápida (Ma).....	61

6.2.3 Movilidad media (Mb).....	64
6.2.4 Movilidad lenta (Mc).....	66
6.2.5 Inmovilidad (Md).....	68
6.2.6 Movilidad total (MT).....	70
6.2.7 Velocidad Curvilínea (VCL) y Lineal (VSL).....	72
6.2.8 Tiempo de Activación (TiAc).....	77
6.3 OBJETIVO 2.....	79
6.3.1 Cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos.....	79
6.3.2 Fragmentación de ADN (d-ADN).....	80
6.3.3 Daño en membrana (d-Me).....	83
6.4 OBJETIVO 3.....	91
6.4.1 Cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos.....	91
6.4.2 Tasa de Fertilización (TF).....	92
6.4.3 Tasa de Eclosión (TE).....	94
6.5 OBJETIVO 4.....	97
6.5.1 Cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos.....	97
6.5.2 Tasa de malformación larval (Tmal).....	98
6.6 OBJETIVO 5.....	101
6.6.1 Correlación de daño en ADN y movilidad espermática.....	101
6.6.2 Correlación de daños en ADN y malformación larval.....	103
6.6.3 Correlación daños en ADN y tasa de Fertilización y Eclosión.....	104

6.6.4 Correlación daños en ADN y daños en membrana.....	105
6.6.5 Correlación movilidad espermática y tasa de fertilización.....	106
6.6.6 Correlación daños en membrana y movilidad espermática.....	109
6.6.7 Correlación daños en membrana y tasa de fertilización.....	110
7 DISCUSIÓN.....	111
7.1 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA.....	111
7.2 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS SOBRELA DAÑOS DE ADN Y MEMBRANA ESPERMÁTICA.....	122
7.3 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA FERTILIZACIÓN Y ECLOSIÓN.....	128
7.4 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA MALFORMACIÓN LARVAL.....	132
8 CONCLUSIÓN.....	134
BIBLIOGRAFÍA.....	137

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efectos de la velocidad de congelación sobre la deshidratación y/o la formación de hielo al interior de la célula.....27
- Figura 2. Porcentajes de espermatozoides con movilidad rápida (Ma) en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* mezclado con el diluyente en sus diferentes tratamientos (n=3), los cuales estuvieron basados en la interacción de tres concentraciones de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%) y tres concentraciones de Dimetilsulfóxido (5%, 10%, 15%). Variable medida a los 15 minutos pos-mezcla, sin congelamiento y dejado al ambiente (28 °C).....58
- Figura 3. Porcentajes de movilidad total (MT) de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* mezclado con el diluyente en sus diferentes tratamientos (n=3), basados en tres concentraciones de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%) y tres concentraciones de Dimetilsulfóxido (5%, 10%, 15%) estimadas a los 15 minutos pos-mezcla, sin congelamiento y dejado al ambiente (28 °C).....59
- Figura 4. Registro de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* siendo analizados en su movilidad por el software Sperm Class Analyzer (SCA).
.....61
- Figura 5. Porcentajes de espermatozoides con movilidad rápida (Ma) estimado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos (n=3) para determinar el efecto de la interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....62
- Figura 6. Porcentajes de espermatozoides con movilidad rápida (Ma) estimado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....63
- Figura 7. Porcentajes de espermatozoides con movilidad media (Mb) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos (n=3) para determinar el efecto de la interacción del

arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....64

Figura 8. Porcentajes de espermatozoides con movilidad media (Mb) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....65

Figura 9. Porcentajes de espermatozoides con movilidad lenta (Mc) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial (n=3): concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....66

Figura 10. Porcentajes de espermatozoides con movilidad lenta (Mc) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....67

Figura 11. Porcentajes de espermatozoides inmóviles (Md) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial (n=3): concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....68

Figura 12. Porcentajes de espermatozoides inmóviles (Md) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....69

Figura 13. Porcentajes de movilidad total (MT) en espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....70

Figura 14. Porcentajes de movilidad total (MT) en espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple

entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y la concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....71

Figura 15. Registro de espermatozoide de bocachico *Prochilodus magdalenae* siendo analizado en su Velocidad Curvilínea (VCL) y en Línea Recta (VSL) por el software Sperm Class Analyzer (SCA).....72

Figura 16. Velocidad Curvilínea (VCL) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....73

Figura 17. Velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....74

Figura 18. Velocidad en línea recta (VSL en $\mu\text{m}/\text{segundos}$) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....75

Figura 19. Velocidad en línea recta (VSL) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....76

Figura 20. Tiempos de activación (TiAc) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p>0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.....77

Figura 21. Tiempos de activación (TiAc) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo

factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	78
Figura 22. Longitud total del halo de dispersión de la cromatina en espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> sometidos a prueba de fragmentación de ADN, 100X.....	80
Figura 23. Porcentajes de espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> posdescongelación con daño en ADN (d-ADN). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	80
Figura 24. Espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> sometidos a prueba de fragmentación de ADN posdescongelación, 40x. Tratamiento de interacción 15% DMSO y 5.5% glucosa.....	81
Figura 25. Porcentajes de espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> posdescongelación y fresco con daño en ADN (d-ADN). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	82
Figura 26. Porcentaje de espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> posdescongelación con daño en membrana (d-Me) (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	83
Figura 27. Porcentaje de espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> posdescongelación y fresco con daño en membrana (d-Me) (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	83
Figura 28. Espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> sometidos a prueba de integridad de membrana de eosina-nigrosina, 40X.....	84
Figura 29. Fotografías de microscopía electrónica de barrido en espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> posdescongelación, correspondientes al tratamiento 15% de DMSO y 6.5 de glucosa.....	85

Figura 30. Microfotografía electrónica de barrido en espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i>	86
Figura 31. Microfotografía electrónica de barrido para la caracterización morfológica de espermatozoide de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> proveniente de semen fresco pre congelación (10.000X).....	88
Figura 32. Ovocitos de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> fertilizados con semen criopreservado (5 horas posfertilización – fin del cierre del blastoporo).....	92
Figura 33. Tasa de fertilización (TF) evaluada en bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> (4 horas posfertilización – final del cierre del blastoporo) (n=3). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen criopreservado proveniente de los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	92
Figura 34. Tasa de fertilización (TF) evaluada en bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> (4 horas posfertilización – final del cierre del blastoporo) (n=3). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen fresco (TC) y ovocitos fertilizados con semen criopreservado sometido a los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y osmolaridad del diluyente basado en glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	93
Figura 35. Larvas y embriones de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> provenientes de semen criopreservado (10 horas posfertilización) en el momento preciso de medición de la tasa de eclosión.....	94
Figura 36. Tasa de eclosión (TE) evaluada en bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> (10 horas posfertilización) (n=3). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen criopreservado proveniente de los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	95
Figura 37. Tasa de Eclosión (TE) evaluada en bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> (10 horas posfertilización) (n=3). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen fresco (TC) y con semen sometido a los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	95
Figura 38. a y b corresponden a larvas de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> proveniente de semen criopreservado. a: Larva normal (línea recta) y con malformación (línea curva) en la zona caudal, provenientes del tratamiento de	

interacción 5% de DMSO y 6.5% de glucosa; b: Larva malformada proveniente del tratamiento de interacción 10% DMSO y 6.5% glucosa.....98

Figura 39. Porcentaje de larvas malformadas (Tmal) provenientes de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* crioconservados (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....99

Figura 40. Porcentaje de larvas malformadas (Tmal) provenientes de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* crioconservados (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....99

Figura 41. Malformación en larvas de bocachico *Prochilodus magdalenae*.....100

Figura 42. Correlación existente entre el porcentaje de espermatozoides con movilidad media (Mb) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=27), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.....102

Figura 43. Correlación existente entre la velocidad curvilínea (VSL) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=27), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.102

Figura 44. Correlación existente entre el porcentaje de malformación larval (T-mal) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=18), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.....103

Figura 45. Correlación existente entre el porcentaje de espermatozoides con daño en membrana (d-Me) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=27). Confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.....105

Figura 46. Correlación existente entre la tasa de fertilización y el porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida (Ma), evaluada en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=25), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.....107

Figura 47. Correlación existente entre la tasa de fertilización y la movilidad total (%), evaluada en semen crioconservado de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> (n=26), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.....	107
Figura 48. Comparación del porcentaje de espermatozoides muertos (d-Me) y el Porcentaje de células espermáticas Inmóviles de bocachico por cada uno de los 9 tratamientos de interacción DMSO – GLUCOSA posdescongelación (Eje x)....	108
Figura 49. Correlación entre el porcentaje de células con daño en membrana (d-Me) y la tasa de Fertilización espermática (TF) evaluada en semen crioconservado de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> (n=27), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.....	110
Figura 50. Hipótesis de daño celular provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (5%) y la concentración de la glucosa (5.5%, 6% y 6.5%) en el diluyente.....	113
Figura 51. Hipótesis de daño celular provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (10%) y la concentración de la glucosa (5.5%, 6% y 6.5%) en el diluyente.....	114
Figura 52. Hipótesis de daño celular provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (15%) y la concentración de la glucosa (5.5%, 6% y 6.5%) en el diluyente.....	115
Figura 53. Modelo de comportamiento general para las variables Ma, Mb, VCL y VSL en células espermáticas de <i>Prochilodus magdalenae</i> posdescongelación, provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (5%, 10%, 15%) y la concentración de glucosa (5.5%, 6% y 6.5%).....	118
Figura 54. Observación de los niveles del crioprotector (5%, 10%, 15%) bajo los 3 niveles de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%) (n=3). Porcentaje de espermatozoides de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> posdescongelación con daño en membrana. Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y Concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%).....	125

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de DMSO que garantizan la movilidad espermática en diferentes especies.....	32
Tabla 2a. Arreglo factorial 3 ² de la interacción entre el factor A=DMSO (dimetilsulfóxido) y el factor B=Glucosa.....	50
Tabla 2b. Cantidades de mezcla (semen + diluyente) y distribución del semen por macho (n=3) utilizado en el proceso de crioconservación entre los diferentes tratamientos de interacción generados por la concentración de DMSO (a1, a2 y a3) y la concentración de glucosa (b1, b2 y b3).....	51
Tabla 3. Características generales del material biológico utilizado para el experimento de crioconservación y pruebas de fertilización. Valores expresados como el promedio ± desviación estándar.....	56
Tabla 4. Valores promedio ± desviación estándar de algunos parámetros de calidad de agua en la incubación y manejo de la larva de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> obtenidos con semen crioconservado y fresco.....	57
Tabla 5. Pruebas de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos para todas las variables móviles.....	60
Tabla 6. Pruebas de homogeneidad de Varianzas y Normalidad de los datos para las variables Daños del ADN (d-ADN) y Daños de membrana (d-Me).....	79
Tabla 7. Variables morfométricas de espermatozoides de peces marinos o dulceacuícolas.....	89
Tabla 8. Pruebas de homogeneidad de Varianzas y Normalidad de los datos para las variables tasa de fertilización (TF) y tasa de eclosión (TE).....	91
Tabla 9. Pruebas de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos para la variable Tasa de malformación larval (Tmal).....	97
Tabla 10. Correlaciones entre los daños en ADN y algunas variables de movilidad espermática evaluadas en semen crioconservado de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> . En todos los casos la confianza fue del 95% y nivel de significancia de 0.05.....	101

Tabla 11. Correlaciones entre el porcentaje de espermatozoides con daños en ADN, la tasa de fertilización y la tasa de eclosión, evaluadas en semen crioconservado de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> . En todos los casos la confianza fue del 95% y nivel de significancia de 0.05.....	104
Tabla 12. Correlaciones entre las variables de movilidad espermática y la tasa de fertilización, evaluadas en semen crioconservado de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> . En todos los casos la confianza fue del 95% y nivel de significancia de 0.05.....	106
Tabla 13. Correlaciones entre el porcentaje de espermatozoides con daños en Membrana (d-Me) y algunas variables de movilidad espermática en semen crioconservado de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> . Confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.....	109
Tabla 14. Resumen general de las conclusiones expuestas acerca del experimento de crioconservación espermático en <i>Prochilodus magdalenae</i> . Distribución de las variables respuesta del experimento entre los tratamientos que garantizaron sus mejores valores a favor del bienestar espermático posdescongelación.....	136

RESUMEN

La utilización de diluyentes para la crioconservación seminal en células espermáticas de peces, deben poseer ciertos componentes que procuren, por una parte, generar una adecuada presión osmótica externa (crioprotector externo), y en segundo lugar, una sustitución parcial del agua interna (crioprotector interno), tal que facilite la deshidratación celular, inhibiendo la formación de cristales de hielo intracelularmente, debido a la presencia excesiva de agua. Esto con el fin de garantizar el mejoramiento de variables de viabilidad espermáticas siempre afectadas negativamente por el criodaño.

De este modo, se evaluó el efecto de la interacción entre la concentración de glucosa (5.5%, 6% y 6.5%) como inmovilizador espermático - crioprotector externo, y la concentración de DMSO (dimetilsulfóxido) (5%, 10% y 15%) – crioprotector interno, sobre la calidad espermática y el material genético en *Prochilodus magdalenae*. Para ello, se determinó el porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida (Ma), media (Mb), lenta (Mc), inmóviles (Md) y movilidad total (MT); además de los daños en membrana (d-Me), daños en ADN (d-ADN), la capacidad fertilizante (TF), tasa de eclosión (TE) y tasa de malformación larval (T-mal); siempre en semen posdescongelación comparado con semen fresco.

Se obtuvo que la mayor capacidad móvil espermática posdescongelación, integridad del ADN, tasa de fertilización y eclosión, pueden obtenerse con tratamientos como DMSO al 10% o al 5%, interactuando respectivamente con 6% y 5.5% de glucosa ($p > 0.05$). Por otra parte, los daños en membrana pueden reducirse al máximo con tratamientos como DMSO al 10% interactuando con glucosa al 5.5% o al 6% ($p > 0.05$). Mientras tanto, el porcentaje de larvas malformadas puede ser reducido a valores similares al grupo control, cuando la concentración de DMSO se mantiene en 10% o 5%, siempre que interactúen con glucosa al 6% ($p > 0.05$).

Palabras clave: Crioconservación espermática, *Prochilodus magdalenae*, calidad espermática, daños en ADN, movilidad, membrana, capacidad fertilizante, eclosión, malformación.

**EFFECT OF DMSO AND GLUCOSE CONCENTRATION ON SPERM QUALITY
AND GENETIC MATERIAL IN CRYOPRESERVED SPERM OF BOCACHICO
Prochilodus magdalenae.**

The use of seminal extenders for cryopreservation of fish sperm cells, must have certain components that seek, first, generate adequate external osmotic pressure (external cryoprotectant), and second, a partial replacement of domestic water (internal cryoprotectant), that facilitates cellular dehydration, inhibiting the formation of intracellular ice crystals, due to the excessive presence of water. This is to ensure the improvement of sperm viability variables always negatively affected by the cryo-damage.

Thus, we evaluated the effect of the interaction between the concentration of glucose (5.5%, 6% and 6.5%) spermatic immobilizer - external cryoprotectant, and the concentration of DMSO (dimethyl sulfoxide) (5%, 10% and 15%) - internal cryoprotectant, on sperm quality and the genetic material in *Prochilodus magdalenae*. To this end, we determined the percentage of sperm with rapid motility (Ma), medium (Mb), slow (Mc), static (Md) and total motility (MT), in addition to membrane damage (d-Me), DNA damage (d-DNA), fertilizing capacity (TF), hatching rate (TE) and larval malformation rate (T-mal); always on postthawed sperm compared with fresh sperm.

It was found that the highest capacity of sperm motility posthaw, DNA integrity, fertilization and hatching rate, can be obtained with treatments such as DMSO 10% or 5%, interacting respectively with 6% and 5.5% glucose ($p > 0.05$). Moreover, membrane damage can be minimized with treatments such as DMSO to 10% interacting with glucose to 5.5% or 6% ($p > 0.05$). Meanwhile, the percentage of malformed larvae can be reduced to values similar to the control group, if the concentration of DMSO is maintained at 10% or 5%, provided that interact with glucose 6% ($p > 0.05$).

Keywords: Sperm cryopreservation, *Prochilodus magdalenae*, sperm quality, DNA damage, motility, membrane, fertilizing capacity, hatching, larval malformation.

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DMSO Y GLUCOSA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y EL MATERIAL GENÉTICO EN SEMEN CRIOCONSERVADO DE BOCACHICO *Prochilodus magdalenae*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción global de los sistemas productivos terrestres está centrada en un reducido número de especies; mientras que la acuicultura mundial consiste en el cultivo de alrededor de 210 diferentes especies de animales y plantas, incluyendo 131 especies de peces (FAO, 2003). Esta característica de la industria acuícola, ha sido desarrollada en aquellos países que ocupan los primeros lugares en volúmenes de producción y competitividad internacional. Sin embargo, en Colombia, la acuicultura continental depende del cultivo de sólo cuatro especies ícticas: tilapia roja *Oreochromis sp*, tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*, cachama blanca *Piaractus brachypomus* y trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Negret, 2005), las cuales aportan el 96,3 % del total de la producción nacional; mientras que el 3.7% restante es aportado por especies nativas como bocachico *Prochilodus magdalenae*, Brycónidos (*Brycon amazonicus*, *Brycon sinuensis*) y bagres (*Pseudoplatystoma fasciatum*, *Sorubim cuspicaudus*) (Espinal *et al.*, 2005); las cuales presentan limitaciones en sus tecnologías, en particular en la producción de semilla (alevinos) y por tanto no se pueden ofrecer como alternativas seguras de cultivo.

A pesar que la piscicultura continental colombiana es la actividad económica pecuaria de mayor crecimiento en los últimos años, alcanzando actualmente una producción anual aproximada de 35000 toneladas, su baja diversificación determina el bajo perfil de competitividad mostrado por la cadena piscícola, reduciendo la posibilidad de acceder los mercados nacionales e internacionales, los cuales registran un crecimiento continuo, debido a que el consumo local e internacional de bienes derivados de la piscicultura ha venido creciendo significativamente durante los últimos años (Espinal *et al.*, 2005).

Con excepción de la cachama blanca, ninguna otra especie nativa es cultivada a escala comercial en Colombia. Por lo tanto, la mayoría de la carne de pescado que se consume en el país proviene de la actividad pesquera. Los volúmenes de captura han disminuido ostensiblemente por la utilización de artes de pesca

inadecuadas, deterioro del hábitat de las especies y la pesca excesiva. Para el año 1994, la tasa de captura por año ascendía al orden de las 6.057,81 toneladas, en le 2001 alcanza un pico de 12.681.82 toneladas, posiblemente por el aumento de la presión de pesca y mejoramiento de las artes de pesca. Finalmente para el 2006 no contamos más de 2.857 toneladas anuales (INCODER-CCI, 2009), lo que demuestra el deterioro del recurso, por lo que investigaciones encaminadas a la puesta en marcha de un paquete tecnológico de producción de su carne es necesario. En virtud de las ventajas que presenta el bocachico como la aceptación de su carne, la posibilidad de reproducción artificial y resistencia al manejo; se constituyen en una buena alternativa para diversificar la oferta de especies para la acuicultura nacional.

El éxito de la piscicultura como una bio-industria depende en gran parte del desarrollo de tecnologías confiables que garanticen la constancia de la producción de alevinos (Atencio-García, 2001). Sin embargo, para el bocachico, la producción de alevinos se ve reducida a dos periodos de lluvias en el año y depende de la sincronía de maduración entre machos y hembras (ocasionalmente poseen asincronía en la producción de gametos), lo que impide la constancia de la oferta de alevinos y por lo tanto baja producción de su carne, quedándose lejos de convertirse en una bio-industria competitiva.

En este sentido, la crioconservación de semen bocachico traería beneficios a las actividades de reproducción en acuicultura, pues aumentaría la posibilidad de reproducción por fuera de la estación reproductiva (subsannando la asincronía en la maduración gonadal), facilitaría el movimiento e intercambio de material genético entre productores, mejoraría la eficiencia en la utilización de los parentales y contribuiría a la disminución de la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores en procura de nuevos sementales (Medina Robles *et al.*, 2005).

No obstante el desarrollo de modelos de crioconservación de semen en diversas especies de peces tropicales con algunas semejanzas biológicas para el bocachico, los protocolos y la complejidad de los mismos no aplican de forma generalizada para el resto de las especies, incluyendo al bocachico, el cual denota características especiales y su protocolo es aun inexplorado, de ahí la necesidad de contribuir al desarrollo de alguno.

Muchas propuestas y proyectos han sido formuladas basados en la crioconservación de semen como herramienta para diversos fines, entre las cuales, el establecimiento de Bancos de Recursos Genéticos (BRG) ha sido la

más relevante (Medina *et al.*, 2006), la posibilidad del establecimiento de Bancos de Recursos Genéticos (BRG) para la conservación de las especies salvajes y de interés zootécnico (Watson y Holt, 2001); los bancos de esperma y embriones congelados para el mantenimiento de los genotipos, que aunque inmediatamente no sean usados, se convierten potencialmente en recursos valiosos para el futuro (Wildt *et al.*, 1997). La crioconservación es una herramienta importante para el almacenamiento de gametos por tiempo indefinido, especialmente de especies con hábitat y poblaciones amenazadas (Cruz-Casallas, *et al.*, 2006), como en el caso del bocachico (Mojica *et al.*, 2002). Sin embargo, estas investigaciones se han limitado al desarrollo de técnicas (recetas) para preservar semen, midiendo el éxito, eficiencia, o calidad del mismo por medio de la evaluación de efectos sobre la movilidad masal, individual, o tasa de fertilización, pero que a la postre (aunque se comporten con buenos índices) para determinar la calidad de semen, resulta erróneo en algunos casos; pues aunque se halle una buena movilidad masal espermática, no puede garantizarse el éxito, ni la calidad e integridad genética del gameto y por ende del nuevo individuo que formará. Así, es necesario el análisis de otros biomarcadores de calidad espermática pre y post-congelación que integren las ya conocidas con otras de tipo molecular, de modo que se puedan buscar explicaciones más puntuales y finas de las implicaciones de la crioconservación sobre la calidad espermática, la singamia, desarrollo embrionario y características larvales.

Reportes no cuantitativos de Ramírez-Merlano *et al.* (2005), muestran que larvas originadas de semen crioconservado de *Piaractus brachypomus*, pueden presentar malformaciones congénitas que inviabilizan su sobrevivencia (aún cuando las características de movilidad espermática son buenas), se presenta en mayor medida que en larvas provenientes de semen fresco. Iguales resultados se presentan para *Clarias gariepinus* (Hórvath *et al.*, 2000), esto de acuerdo a Miskolczi *et al.*, 2005, posiblemente provocado por factores como el daño estructural de organelas por cristales de hielo y/o genotoxicidad del crioprotector (daño de la doble hélice del DNA), trayendo consigo resultados tales como organismos haploides, triploides y tetraploides, finalmente inviábiles para efectos de producción acuícola.

La investigación de procesos y métodos de crioconservación de semen en este caso, no sólo implicará el estudio de variables de calidad espermática tradicionales y medianamente concluyentes (movilidad, fertilización, activación) en cuanto a predicción de la viabilidad larval que tendrá una célula espermática criopreservada, sino también otras que permitan establecer relaciones entre

gametos e individuos futuros; hacer un seguimiento más profundo de las repercusiones y efectos de las variables implicadas en la crioconservación sobre la calidad espermática (crioprotectores, sus concentraciones, osmolaridad del diluyente y relación con procesos osmóticos celulares y su incidencia en los daños provocados por el hielo durante la congelación, entre otros); implicaciones en la ultraestructura subcelular como la integridad de membrana, en el grado de fragmentación del material genético nuclear (ADN) y la expresión fenotípica de dicho ADN en el nuevo organismo (malformaciones). Establecer relaciones entre estas variables, permitirá desarrollar herramientas nuevas de identificación y predicción de calidad espermática, garantizando desde el espermatozoide la calidad de una nueva larva.

Es así, como contribuir al desarrollo de un protocolo de crioconservación viable para bocachico, será un avance biotecnológico que permitirá no sólo solucionar problemas reproductivos y ecológicos de esta especie en el país, sino también el potenciamiento de esta bio-industria acuícola creciente, además de permitir elucidar los mecanismos y factores que están afectando al espermatozoide a nivel celular y molecular en los procesos de crioconservación y que están impidiendo su viabilidad post-descongelación, aspecto de básica importancia para el éxito del espermatozoide en su tarea reproductiva y fertilizante.

2. OBJETIVOS

2.1 General:

Contribuir al desarrollo de un protocolo de crioconservación para semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*, mediante la evaluación de diferentes concentraciones para el DMSO y la glucosa, como posibles factores determinantes de la calidad espermática y del material genético.

2.2 Específicos:

2.2.1 Evaluar el efecto de la concentración de dimetilsulfóxido y la concentración de glucosa sobre la capacidad móvil espermática posdescongelación.

2.2.2 Determinar el efecto genotóxico y citotóxico de la interacción concentración de glucosa y la concentración de dimetilsulfóxido sobre los daños en ADN y membrana citoplasmática.

2.2.3 Establecer el efecto de la concentración de glucosa y la concentración del crioprotector sobre la proporción de larvas malformadas.

2.2.4 Evaluar la eficiencia de los protocolos de crioconservación en términos de tasa de fertilización y de eclosión.

2.2.5 Determinar la existencia de correlaciones de covariación entre la movilidad espermática, daños en ADN, daños en membrana citoplasmática, su capacidad fertilizante y la eclosión.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Crioconservación de semen de peces

En Colombia las investigaciones en crioconservación de semen son recientes y se han observado progresos parciales que deben ser probados a escala comercial. A la fecha son muy pocos los productores de alevinos que usan semen crioconservado, la gran mayoría mantiene los reproductores en cautiverio o usualmente los capturan del medio ambiente (Velasco-Santamaria *et al.*, 2006).

Durante los últimos años han sido propuestos protocolos para algunas especies como trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Wheeler y Thorgaard, 1991), yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) (Richardson *et al.*, 1999), seabream (*Sparus aurata*) (Fabbrocini *et al.*, 2000), peces ciprínidos (Lahnsteiner *et al.*, 2000), carpa común (*Cyprinus carpio*) (Linhart *et al.*, 2000; Horváth *et al.*, 2003), catfish (Bart *et al.*, 1998; Viveiros *et al.*, 2000), peces carácidos brasileiros (Carolsfeld *et al.*, 2003), y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (Navarro *et al.*, 2004). Se puede concluir: a) que los resultados no son óptimos pero progresan hacia el mejoramiento de los procesos, y b) que para cada especie deben probarse y ajustarse los protocolos. Sin embargo, en Colombia, la crioconservación se ha logrado estandarizar exitosamente para yamú (*B. amazonicus*) (Cruz-Casallas *et al.*, 2006), lo que permite inferir que es posible adaptar y estandarizar protocolos para especies nativas.

En la crioconservación de semen existen tres factores importantes hacia los que apunta la investigación: los diluyentes, los crioprotectores y la osmolaridad.

3.1.1 Osmolaridad.

La osmolaridad se define como la concentración de solutos totales en una solución, que tienen la propiedad de ejercer una presión dentro del seno de dicha disolución. Esta propiedad de los solutos está estrechamente relacionada con lo que se denomina presión osmótica, la cual está involucrada en la regulación del flujo de agua a través de una membrana, fenómeno llamado **ósmosis**. De este modo, cuando la concentración de solutos (mOsm/kg de agua) es menor en el medio donde se encuentra inmersa una célula que en su propio citosol (hiposmótica), esta tiende a hincharse, extrayendo agua del medio; no en tanto, cuando la célula se encuentra inmersa en una solución concentrada (hiperosmótica), sufre encogimiento de su membrana por la salida de agua

(Bolsover *et al.*, 2004). En ambos caso el flujo o eflujo de agua celular, se da hasta regular la osmolaridad.

En este sentido, en cuanto a la deshidratación de células espermáticas, si esta es excesiva, la osmolaridad intracelular podría llegar a ser muy alta, intoxicando la célula, o la deshidratación podría impedir a la membrana plasmática recuperar su forma en el proceso de descongelación (Mazur, 1980), lo cual impediría el desarrollo de las señales transduccionales mediadas por canales iónicos ubicados en la membrana y que dan lugar a la activación espermática. Por el contrario, la no pérdida de agua para alcanzar el potencial de equilibrio por parte de la célula, desencadenaría el congelamiento intracelular (Mazur, 1980., Viveiros *et al.*, 2001., Watson, 2000) que finalmente pudiera redundar en daños mecánicos a la ultraestructura, proteoma, genoma o a su conjunto.

Por su parte Pegg (2007) menciona que los eventos osmóticos que dan lugar a la pérdida de agua durante la congelación son muy importantes para el éxito de la crioconservación (Figura 1).

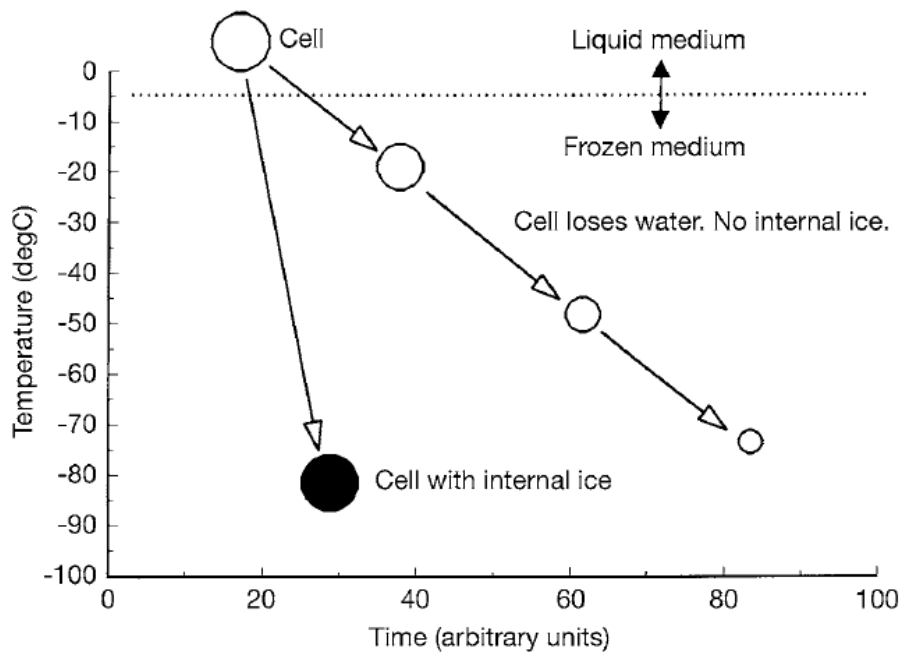


Figura 1. Efectos de la velocidad de congelación sobre la deshidratación y/o la formación de hielo al interior de la célula.

Su tesis se basa en dos procesos: i) la no pérdida de agua durante el proceso de congelación, debido a la velocidad de enfriamiento rápida, termina con la formación de cristales de hielo intracelular que afectan negativamente la

ultraestructura celular y su viabilidad en procesos como la movilidad y la velocidad. ii) la pérdida de agua es un evento necesario durante el proceso de crioconservación, y es dependiente de una velocidad de enfriamiento lenta de la célula, lo que disminuye la formación y asociación de núcleos y por tanto de cristales de hielo que afecten negativamente la célula y la puedan hacer inviable. Ambos efectos provocados por estos eventos de la teoría fueron probados y demostrados en células espermáticas de bocachico (Martínez *et al.* 2009a). Las Investigaciones de crioconservación de semen relacionadas con la evaluación de niveles de osmolaridad extracelular del diluyente como factor de hidratación o deshidratación celular para preparar al espermatozoide para la congelación, no han sido reportadas ampliamente en la literatura nacional o internacional. Sin embargo, en los experimentos de crioconservación de semen en peces de agua dulce, se hace necesaria la regulación de la osmolaridad externa de la célula, medio en el que permanecerán congeladas las células espermáticas; esto es para muchos autores, garantizar un medio isotónico (Liang-Jiang *et al.*, 2007) que impida la activación (movilidad) espermática por choque hiposmótico con el medio extracelular (Tabares *et al.*, 2005). Así, la no regulación de la osmolaridad extracelular, impediría la crioconservación y la garantía de viabilidad fertilizante del espermatozoide al final del proceso de congelación; pues una vez activado, la movilidad durará poco tiempo (Tabares *et al.*, 2005). Al observar la teoría de Pegg (2007), donde destaca la importancia de la pérdida de agua intracelular, surge el interrogante de qué puede ser más favorable para la célula espermática para lograr una eficiente deshidratación, ¿Que la presión osmótica extracelular sea isotónica? o ¿hipertónica?.

La utilización de diluyentes que faciliten la deshidratación celular (ligeramente hipertónicos) o que la impidan o controlen (ligeramente hipotónicos), son herramientas que permitirían el manejo de la formación de cristales intracelularmente, con el fin de garantizar el mejoramiento de algunas variables de viabilidad espermáticas afectadas negativamente por el criodaño.

En el análisis de semen crioconservado de *Thunnus orientalis* pos-descongelación, osmolaridades extracelulares altas (275–290 mOsm/kg) de diluyentes basados en NaCl (1%) dieron como resultado altas tasas de movilidad espermática. Por el contrario, osmolaridades bajas (55–65 mOsm/kg) de diluyentes basados en glucosa (1%) produjeron bajas tasas de movilidad espermática o nulas (Hwang-Gwo *et al.*, 2005). Esto sugeriría que la inadecuada deshidratación celular desencadena un cuadro de daño intracelular que da lugar a bajos índices de viabilidad espermática, en este caso, la movilidad total. A pesar

de estos resultados, ningún autor hace mención de la relación existente (en términos de tasa de movilidad espermática) entre la utilización de distintos niveles de osmolaridad

en los diluyentes y el grado de deshidratación celular, la formación de cristales o el deterioro de organelas y efectos sobre membrana de forma positiva o negativa.

No obstante la investigación directa de esta propiedad de los diluyentes en la crioconservación de semen; la utilización de crioprotectores extracelulares como glicina en asocio con crioprotectores intracelulares como DMSO, han permitido establecer una acción de la primera como un factor de deshidratación en células espermáticas de jabalí, facilitando la entrada del DMSO como sustituyente del agua intracelular, utilizando mecanismos osmóticos aún no elucidados por los autores, obteniéndose resultados como el mejoramiento de la tasa y capacidad de fertilización espermática comparada con aquellas células sin glicina como crioprotector extracelular (Liang *et al.*, 2007).

3.1.2 Congelación.

El proceso de crioconservación de semen involucra diferentes cambios intracelulares que pueden originar una disminución en la sobrevivencia espermática. El control de la velocidad de cambio de la temperatura, la osmolaridad y la formación de cristales de hielo en el medio intra y extracelular son los aspectos más relevantes para optimizar la viabilidad celular (Medina-Robles *et al.*, 2004).

Durante el proceso de enfriamiento y congelación, el espermatozoide está sujeto a cambios físicos y químicos de los medios intra y extracelular. Uno de estos cambios toma lugar intracelularmente cuando el agua en fase líquida pasa a sólida en forma de cristales; los cuales pueden dañar mecánicamente la membrana y los componentes internos de la célula. La aparición espontánea del primer núcleo de hielo o nucleación, ocurre cuando la solución llega a temperaturas entre -5 y -15 °C (Viveiros; *et al.*, 2001, Zachariassen, 2000). Este núcleo, de forma hexagonal, adhiere moléculas de agua por medio de interacciones electrostáticas promoviendo la formación de núcleos de mayor tamaño, y a medida que avanza la formación de cristales de hielo se libera energía calorífica (calor latente) (Viveiros, *et al.*, 2001), lo que produce un pico transitorio de ascenso en la temperatura que puede ser letal para la célula.

La congelación del medio externo conlleva a un aumento progresivo de la concentración de solutos en los canales residuales (intersticios) no congelados, haciéndolo hiperosmótico con respecto a la célula. Esto induce la salida del agua de la célula y su congelamiento externo, concentrando solutos intracelulares (Mazur., 1980). Si la deshidratación celular es excesiva, la osmolaridad puede ser muy alta, intoxicando la célula, o la deshidratación puede no permitir a la membrana plasmática recuperar su forma en el proceso de descongelación (Mazur, 1980). No sólo la recuperación de la forma de la membrana dependerá del grado de deshidratación celular en los procesos descongelación, sino también la reorganización y redistribución de proteínas de membrana (muchas de ellas canales iónicos) que participan en los procesos de activación espermática y por tanto en los procesos de movilidad y fertilización (Drokin *et al.*, 1998).

La velocidad de enfriamiento juega un papel importante en este sentido. Si la congelación es suficientemente lenta el equilibrio es alcanzado a través del eflujo de agua, pero si la congelación es muy rápida, la célula no puede perder agua lo suficientemente rápido para alcanzar el potencial de equilibrio, congelándose intracelularmente (Mazur, 1980; Viveiros, *et al.*, 2001; Watson, 2000). La congelación intracelular es letal para la célula dependiendo particularmente del tamaño y de la cantidad de cristales de hielo formados en el citoplasma. Normalmente, altas velocidades de enfriamiento producen cristales intracelulares pequeños que pueden llegar a ser inocuos, pero estos pueden unirse y crecer durante la descongelación por medio de un proceso denominado recristalización (Holt, 2000; Mazur, 1980) especialmente cuando estas velocidades de descongelación son lentas, dando tiempo suficiente para que este evento físico ocurra, sin embargo, los procesos de recristalización pueden suceder aún durante la congelación, favorecidos por las regiones no congeladas que permiten interactuar a los cristales de hielo ya formados.

El tamaño de los cristales de hielo formados durante la congelación está directamente relacionado con la velocidad de enfriamiento y el grado de hidratación intracelular.

Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de crioconservación, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular durante el periodo de almacenamiento. Estas sustancias cumplen funciones como proteger al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura (Medina-Robles *et al.*, 2004). El principio de los crioprotectores internos consiste

en que estos desplazan parte del agua intracelular, lo que impide el daño de la membrana por aumento del volumen de agua al congelarse y la formación de cristales, que podrían causar rompimiento de las organelas y destrucción total celular. Además de esto, su bajo punto de congelación permite mantener un ambiente acuoso intracelular, impidiendo la formación de estructuras sólidas cristalizadas que redundan en daño de membranas y disminución de la viabilidad celular (Superenfriamiento).

3.1.3 Crioprotectores.

La acción de los crioprotectores puede ser clasificada en dos grupos según la permeabilidad de la membrana a la sustancia. En el primer grupo se encuentran las sustancias que poseen bajos pesos moleculares (Mizukami *et al.*, 1999) y que, por lo tanto, penetran al citoplasma (Holt, 2000), tales como glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2- propanodiol, butanediol, acetamida y dimetil sulfóxido (DMSO). El segundo grupo reúne aquellas sustancias que no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular como el polivinil alcohol (PVA), hialuronato de sodio y la albúmina (Mizukami *et al.*, 1999).

No entanto, las concentraciones de estas sustancias pueden generar toxicidad celular. Los ensayos preliminares con *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pinzón-Arciniegas *et al.*, 2005), indicaron que concentraciones de DMSO iguales o superiores al 10%, pueden reducir considerablemente la viabilidad de los espermatozoides de bagre rayado, siendo necesario evaluar otras sustancias para identificar aquellas que registren menor toxicidad para las células espermáticas de estas especies.

Así mismo, en estudios realizados en *Morone saxatilis*, se demostró que concentraciones de 7.5% de DMSO resultaban en altas tasas ($p < 0.05$) de movilidad espermática, porcentaje de fertilización ($54 \pm 5.6\%$) y protección a la ultraestructura (membrana citoplasmática) en comparación con aquellas células en donde la concentración de DMSO era baja (2.5%) (He y Woods, 2004). No obstante, cuando los niveles de DMSO se elevan a una concentración de 15%, provocan daños en la membrana en cerca del 61% de las células espermáticas y de un 23% en membrana nuclear (Taddei *et al.*, 2001).

En experimentos de crioconservación de semen de *Clarias gariepinus*, el uso de DMSO y dimetilacetamida (DMA) en concentraciones del 10%, se recomiendan como igualmente adecuados en su efecto sobre la eficiencia en la criopreservación del esperma. Sin embargo, en cuanto a movilidad masal, resulta más efectivo el DMSO ($44 \pm 9.7\%$) comparado con la DMA ($22.6 \pm 18.1\%$). Por el

contrario, se observan elevadas tasas de fertilización ovocitaria utilizando DMA ($86.8\pm 3.1\%$) cuando se compara con DMSO ($67.1\pm 11.9\%$) (Horváth y Urbányi, 2000).

En general el DMSO ha sido mostrado como uno de los más efectivos crioprotectores para espermatozoides de muchas especies de peces (tabla 1) cuando se compara con otros como: metanol, dimetil-acetamida, glicerol, etilenglicol y propilenglicol (Kerby, 1983; He y Woods, 2003). Sin embargo, para *Pelteobagrus fulvidraco*, el DMSO junto con el glicerol como protectores espermáticos, resultaron ser superados en efectividad por el metanol, en términos de movilidad (65%), fertilización (90%) y tasa de eclosión (88%) (Pan *et al.*, 2008).

Tabla 1. Concentraciones de DMSO que garantizan la movilidad espermática en diferentes especies (Martínez y Pardo, 2010a).

Espece	Concentración de DMSO (%)	Referencia
<i>Micropogonias undulatus</i>	15	Gwo <i>et al.</i> (1991)
<i>Lates calcarifer</i>	5	Leung (1987)
<i>Mycteroperca bonaci</i>	20	Gwo (1993)
<i>Epinephelus tauvina</i>	10	Withler y Lim (1982)
<i>Zoarces americanus</i>	20	Yao <i>et al.</i> (1995)
<i>Clupea payáis</i>	15	Pillai <i>et al.</i> (1994)
<i>Sparus aurata</i>	10	Maisse <i>et al.</i> (1998)
<i>Psetta máxima</i>	10	Dreanno <i>et al.</i> (1997)
<i>Brycon amazonicus</i>	10	Cruz-Casallas <i>et al.</i> (2004)
<i>Esox masquinongy</i>	10	Ciereszko (1999)
<i>Salminus brasiliensis</i>	-	Viveiros <i>et al.</i> (2008a)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	10	
<i>Brycon orbignyanus</i>	10	Carolsfeld <i>et al.</i> (2003)
<i>Salminus maxillosus</i>	10	
<i>Leporinus elongatus</i>	10	

No obstante, se ha encontrado que la eficiencia protectora del glicerol en *Sparus aurata*, comparada con etilenglicol, propilenglicol y DMSO, es significativamente menor en términos de movilidad masal espermática (Fabroccini *et al.*, 1999); no en tanto, en procesos de crioconservación de semen de *Pelteobagrus fulvidraco*, iguala su eficiencia con el DMSO, resultando en tasas de movilidad similares en post-descongelación cuando su concentración es de 12.5%.

Estos resultados sugieren que aunque los crioprotectores protegen las células espermáticas durante el proceso de congelación y descongelación, la extensión del daño puede variar de acuerdo a la concentración, a las especies y al tipo de crioprotector y a su toxicidad (Pan *et al.*, 2008). La efectividad de cada crioprotector como DMSO, glicerol y otros varía en diferentes peces y demás animales (Velasco-Santamaría *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003; Horváth *et al.*, 2003). Por lo que se hace necesaria la adaptación y desarrollo de protocolos y concentraciones específicas de los crioprotectores para cada especie pez, en este caso para el bocachico.

Por otra parte, la yema de huevo ha sido usada con éxito en diluyentes en alianza con crioprotectores extracelulares para espermatozoides crioconservados (peces y mamíferos) contra el choque térmico durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Aboagla y Teerada, 2004; Cruz-Casallas, 2005; Watson, 1981). Un efecto de sinergia entre la yema y algunos crioprotectores como el glicerol han proporcionado altas tasas de sobrevivencia post-descongelación en células espermáticas (Pace y Graham, 1974). Una explicación a este evento, es su composición química en términos de colesterol, ácidos grasos, lipoproteínas y fosfolípidos, los cuales influyen en la protección del semen crioconservado (Bathgat, 2006). Aún así, se ha detectado que la eficiencia de la congelación de células espermáticas, se debe en gran parte a la acción protectora de la yema, debido a su contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL), por sus siglas en inglés (Moussa *et al.*, 2002), obteniéndose resultados exitosos en la significativa minimización de los daños en la integridad del DNA, utilizando concentraciones del 9% de LDL en el diluyente, en asocio con el glicerol como crioprotector (Jiang *et al.*, 2007).

3.1.4 Integridad de ADN y genotoxicidad.

Además del estudio de los efectos sobre las membranas plasmática, nuclear y sobre las mitocondrias, el daño producido por la crioconservación en el material genómico debe empezar a ser considerado para encontrar posibles correlaciones entre el desarrollo de los primeros estados embrionarios, las tasas de fertilidad, la sobrevivencia y el desempeño larval. La técnica de electroforesis alcalina en gel de células individuales, ha sido utilizada en espermatozoides de *O. mykiss* sometidos a congelación para determinar la fragmentación del ADN. En estos estudios, el porcentaje de núcleos espermáticos crioconservados con ADN alterado, estuvo relacionado inversamente con la tasa de fertilización; sin embargo, a esta alteración no puede atribuírsele absolutamente la disminución en la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Labbé *et al.*, 2001).

El incremento en la proporción de células con ADN alterado después de la crioconservación, puede llegar a ser más bajo que el incremento en la proporción de espermatozoides reportados con daño en membrana y daño en mitocondria (Ogier de Baulny *et al.*, 1997). El daño entonces en el ADN podría ser solamente un componente menor del daño causado a las células por crioconservación (Labbé *et al.*, 2001). Aunque son variados los efectos del proceso de crioconservación sobre la célula espermática, éstos no pueden ser considerados como únicos e independientes y, en una mayor proporción, la combinación de ellos implica un aumento o disminución de la capacidad fertilizante del espermatozoide.

Sin embargo, en estudios de crioconservación de semen de *Dicentrarchus labrax*, se ha logrado evidenciar efectos tóxicos significativos ($p < 0.01$) de crioprotectores como DMSO (10%) que inducen el daño en DNA nuclear en un $38.2 \pm 11.1\%$ del DNA espermático (Zilli *et al.*, 2003). Sin embargo, recientemente se ha encontrado daños atribuibles a los crioprotectores (DMSO al 7%) en un orden del 53.48% del DNA espermático para trucha arcoíris *Oncorhynchus mikiss* (Cabrita *et al.*, 2005). A su vez, en la crioconservación de semen de bagre africano *Clarias gariepinus* con DMSO y etanol, se muestran efectos aún más graves: entre los cuales se evidencia destrucción del material genético nuclear espermático, dando como resultado larvas haploides (Miskolczi *et al.*, 2005). Así mismo, cuando se usó glicerol como crioprotector en semen de la misma especie, en concentraciones crecientes (de 5% a 11%), se observó un incremento proporcional en el porcentaje de larvas malformadas, estableciéndose diferencias significativas comparadas con larvas provenientes de semen fresco (control) y concluyendo que el aumento de la concentración incrementa la malformación (Horváth y Urbányi, 2000).

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de determinar efectos que van más allá de la viabilidad espermática y su sensibilidad en torno a la crioconservación, como también aquellos que se relacionan con el efecto en la calidad genética y su expresión fenotípica, que en última instancia influye en el éxito económico de una producción acuícola.

3.1.5 Integridad de membrana.

La membrana plasmática desarrolla una función fundamental en la respuesta del espermatozoide al entorno, las características propias de la membrana del espermatozoide le confieren la capacidad dinámica para regular diferentes actividades celulares y rutas de señalización que pueden conducir entre otros a la activación de la movilidad espermática. Es por esto que la integridad de la

membrana es un requerimiento absoluto para las funciones que cumple, consecuentemente su pérdida resultará en muerte celular (Márián *et al.*, 1993).

La composición y organización lateral de la membrana plasmática regula la afinidad por factores de adhesión, controla la permeabilidad de solutos hidrofílicos y dirige eventos de fusión y señalización celular (Frits y Baren, 2000). Las propiedades de la membrana están dadas por la proporción lipídica: 70% de fosfolípidos; 25% de lípidos neutros (especialmente colesterol) y 5% glicolípidos (Eddy y O'Brien, 1994) y por su organización asimétrica en los diferentes dominios de membrana que le dan una fluidez especial (Frits y Baren, 2000). Los fosfolípidos hacen parte del 65-70% del total de la membrana, los cuales le pueden conferir fluidez, pero también mayor inestabilidad, que es contrarrestada por las cantidades variables de colesterol (Holt, 2000).

Es posible que el estrés térmico sobre la membrana plasmática durante el enfriamiento resulte en la transición de la fase líquida a una fase de gel en los fosfolípidos de membrana. Como resultado de esta transición, las proteínas integrales de membrana pueden ser excluidas de dominios de lípidos de fase de gel y son agrupadas, algunas veces de forma irreversible. La actividad de muchas enzimas asociadas a membrana se reduce, así como la tasa de difusión de proteínas por lateralización dentro del plano de la bicapa, reduciendo de este modo la eficiencia de los procesos relacionados con difusión (Labbé *et al.*, 1997). De este modo y considerando la función de la membrana como componente de la ruta en la señalización celular para la activación, se podría inferir que un daño provocado por la congelación (agrupamiento de las proteínas integrales y reducción de la difusión), desencadenarían efectos sobre la eficiencia en los procesos de fecundación, movilidad, entre otros; haciendo inviable al espermatozoide y obligando a buscar el mejoramiento de los procesos de crioconservación.

Durante la exposición al frío se ha observado reducción en la proporción de ácidos grasos saturados e incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados. Cuando aumenta la temperatura, la relación de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina y los contenidos de colesterol se correlacionan positivamente; estos cambios originan una reorganización de la membrana, lo que ayuda a la célula a sobrevivir a las nuevas temperaturas (Labbé y Maisse, 1996). En estudios con trucha arco iris mantenidas en agua a 18 °C y transferidas a 13 °C, luego de 42 días, se observó una mejor resistencia a la crioconservación, los espermatozoides mantuvieron bajos contenidos de colesterol en la membrana

plasmática, esta baja cantidad de colesterol se correlacionó con una mejor capacidad de fertilización de los espermatozoides después de la crioconservación, de igual forma se estableció una correlación negativa significativa entre el porcentaje de fertilización después de la crioconservación y la correspondiente relación molar colesterol/fosfolípidos (Labbé y Maisse, 1996).

Experimentaciones utilizando microscopía electrónica de criofractura en espermatozoides de *O. mykiss* y *Salmo trutta*, mostraron en espermatozoides no sometidos a congelación, una distribución homogénea de partículas sobre la superficie protoplásmica, en algunos casos agregaciones de partículas en la región del cuello y una banda longitudinal consistente de partículas en la cola. A diferencia de lo anterior, en espermatozoides sometidos a congelación, se observaron partículas que fueron agrupadas dentro de clusters o grupos en la superficie protoplásmica. La crioconservación induce una fase de transición en los lípidos de la membrana citoplasmática de la célula y se da una redistribución espacial de sus componentes, por el proceso de separación lateral de lípidos y la agregación de proteínas de membrana (Drokin *et al.*, 1998).

Los cambios que ocurren en la membrana plasmática de espermatozoides de *Oncorhynchus mykiss*, pueden afectar probablemente su integridad fisiológica después de la descongelación, aunque esto puede ser reversible. La extensión del daño en la membrana y la probabilidad de su recuperación después del descongelamiento, pueden depender de la distancia recorrida por las partículas desde su sitio fisiológico normal hasta el lugar de formación de los grupos (Drokin *et al.*, 1998).

El daño en áreas de la superficie celular, donde no se forman grupos, aparentemente es debido a una pobre diferenciación de la membrana, en la cual no ocurre el proceso de difusión lateral de moléculas, conllevando a su deformación y daño celular, comparado con los espermatozoides con alta diferenciación de membrana que sí permiten la formación de grupos (Drokin *et al.*, 1998). Con lo anterior se podría pensar que el proceso de difusión lateral de moléculas (lípidos y proteínas), permite una estabilización transitoria de la membrana plasmática durante el proceso de crioconservación, donde 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 fertilizadora.

Entre los métodos más usados para investigar y determinar los daños ultraestructurales, especialmente membrana plasmática, en células espermáticas, ha sido la microscopía electrónica de barrido (**scanning**), la cual ha proporcionado información detallada de la estructura subcelular y entonces ha ayudado a elucidar los cambios morfológicos que acontecen en los procesos de crioconservación (Gwo y Arnold, 1992; Lahnsteiner *et al.*, 1992 y 1996; Taddei *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2000).

Por otra parte, no sólo la congelación como tal es responsable de los diferentes daños en membrana, incluso se pueden prevenir o incrementar por el crioprotector. Recientemente y utilizando microscopía electrónica de barrido, relaciones inversas entre concentración de crioprotector y daños en la ultraestructura de membrana plasmática en espermatozoides de *Morone saxatilis* han sido detectadas. Cuando las concentraciones de DMSO aumentan desde 2.5% hasta 10%, la frecuencia de aparición de daños (fracturas) en membrana disminuye drásticamente, resultando esta última, como la concentración más eficiente en la protección de la integridad de membrana citosólica para la especie (He y Woods, 2004).

3.1.6 Sistemas de empaqueo de semen.

Con relación a los sistemas o volúmenes de empaque, se ha crioconservado semen de peces con éxito en pajillas de 0.25 o 0.5 ml, los cuales resultan prácticas para ensayos a nivel de laboratorio y para fertilizar pequeñas cantidades de oocitos (Lahnsteiner *et al.*, 1995, 1996; Carolsfeld *et al.*, 2003; Cruz-Casallas *et al.*, 2004; Viveiros *et al.*, 2008b). Protocolos de crioconservación de semen en macrotubos (5.0 mL), también han sido probados para algunas especies de peces de agua dulce, tales como *Oncorhynchus mykiss* (Wheeler y Thorgaard, 1991; Steinberg *et al.*, 1995; Conget *et al.*, 1996; Lahnsteiner *et al.*, 1997), *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* (Lahnsteiner *et al.*, 1997); *Polyodon spathula* (Brown y Mims, 1999), *Silurus glanis* (Bart *et al.*, 1998) y especies marinas tales como *Dicentrarchus labrax* (Fauvel *et al.*, 1998) y *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999).

Finalmente cabe señalar que entre los caraciformes del Caribe húmedo colombiano se destaca el bocachico (*Prochilodus magdalenae*), uno de los principales peces reofílicos de las cuencas de los ríos Sinú, San Jorge y Magdalena, con signos de declinación en sus capturas y tallas en el Sinú y Magdalena, por lo que recientemente ha sido declarada como especie en peligro de extinción (Mojica *et al.*, 2002). Presenta potencialidad para la piscicultura por su

importancia comercial, calidad de su carne, buena adaptación al cautiverio y resistencia a la manipulación.

Estas características lo perfilan como una especie para diversificar y generar competitividad en la piscicultura continental colombiana. Sin embargo, no se ha podido ofrecer como una alternativa segura de cultivo por la carencia de tecnologías estables en la producción continua de alevinos. El mayor problema para disponibilizar la oferta de alevinos de esta especie durante todo el año es la reproducción en cautiverio por fuera de su temporada reproductiva; de ahí que los estudios enfocados a la crioconservación de material seminal aporten a la solución de este problema.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Contextualización de hipótesis

La concentración de glucosa en el ambiente extracelular, en este caso generado por sus diferentes concentraciones, influirán en los procesos osmóticos celulares, desencadenando la salida o entrada de agua en las cantidades correctas, para permitir los procesos de pérdida de agua durante la congelación y la recuperación de la membrana y su reorganización de lípidos y proteínas (canales iónicos que participan en la activación espermática) durante la descongelación, impedir la formación de cristales de hielo intracelular debido a excesos de agua provocados por una inadecuada deshidratación o impedir la intoxicación espermática por deshidratación excesiva del citosol. La concentración de glucosa extracelular, permitirá que se provoque un eflujo de líquido intracelular, pero a la vez obligará a la entrada del crioprotector como principal componente de bajo peso molecular del líquido extracelular; garantizando la protección estructural y ultraestructural interna; mejorando la viabilidad y calidad seminal después del proceso de crioconservación.

Así mismo, la variación de la concentración de DMSO afectará los procesos de su difusión por membrana (citoplasmática y nuclear) hacia el interior celular, repercutiendo en la integridad tanto de la ultraestructura interna y externa como del material genético, contribuyendo a variaciones de aquellos daños provocados por la acción del choque térmico por frío, mediante el desplazamiento y reemplazo parcial del agua interna y la interacción química con estas estructuras celulares, causando menores o mayores efectos tóxicos de fractura, tanto de la bicapa fosfolipídica como de la estructura doble hélice del ADN, deteriorando la viabilidad de las células espermáticas, y que se expresará en el fenotipo de las larvas.

4.1.1 Hipótesis nula 1. La concentración del crioprotector y la concentración de glucosa, o sus interacciones, no difieren significativamente en su efecto sobre la movilidad y tiempo de activación en células espermáticas crioconservadas de bocachico.

4.1.2 Hipótesis nula 2. La concentración del DMSO y glucosa, o sus interacciones, no afectan significativamente variables de viabilidad espermática como integridad de ADN y de membrana citoplasmática de células espermáticas de bocachico sometidas a crioconservación.

4.1.3 Hipótesis nula 3. La concentración del crioprotector o su interacción con la concentración de glucosa, no poseen efectos genotóxicos significativos sobre las células espermáticas de bocachico que se expresen en su fenotipo larval causando malformación.

4.1.4 Hipótesis nula 4. La interacción entre la concentración del crioprotector y la concentración de glucosa, como variantes de los distintos protocolos de crioconservación para semen de bocachico, no influyen en la tasa de fertilización ovocitaria o en la eclosión larval.

4.1.5 Hipótesis nula 5. No existe una correlación significativa de covariación entre la movilidad espermática, los daños en ADN, daños en membrana citoplasmática, fertilización y eclosión, variables generadas por el semen posdescongelación de bocachico proveniente de los tratamientos de interacción entre la concentración de DMSO y glucosa.

4.2 Lugar de desarrollo de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba CINPIC. El CINPIC se localiza en el municipio de Montería (Córdoba), con coordenadas geográficas de 8° 48' de Latitud Norte y 75° 22' de Longitud Oeste, con una altura de 15 metros sobre el nivel del mar y valores anuales promedios de temperatura de 27.5° C, humedad relativa del 85% y precipitación promedio anual de 1100 mm que se distribuye asimétricamente en dos períodos, uno lluviosos, durante el cual cae alrededor del 85% del total de la precipitación anual, y uno seco comprendido entre los meses de diciembre a marzo.

4.3 Material biológico

Para la congelación fueron utilizados 3 machos, y para las pruebas de fertilización espermática posdescongelación fue utilizada 1 hembra adulta de bocachico *Prochilodus magdalenae*, adaptados y mantenidos bajo condiciones de cautiverio en el CINPIC (Centro de Investigaciones Piscícolas Universidad de Córdoba).

Antes del inicio de los experimentos, los ejemplares seleccionados fueron pescados y trasladados a piletas circulares de manejo (6 m³), donde permanecieron durante 24 horas, con el propósito de habituarlos a las condiciones

experimentales, reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente y administrar los tratamientos de inducción de la maduración final de las gónadas para propiciar el desove y la espermiación. Todos los animales fueron identificados individualmente mediante marcas de corte en la región de la aleta dorsal, ventral y caudal; registrando sus longitudes totales y el peso corporal. Estos tres machos finalmente seleccionados, provinieron de una preselección de entre 8 individuos (véase numeral 4.4.1).

Por otra parte, 10 días antes del experimento de crioconservación, 4 machos espermiantes fueron capturados y sometidos a equivalentes condiciones, con el ánimo de ser determinada la osmolaridad del plasma seminal (mOsm/kg). Ésta fue estimada mediante el uso de osmómetro (Fiske 210, Fiske associates, Norwood, Massachusetts, USA) directamente en plasma seminal de cada macho, luego de ser obtenido por centrifugación del semen durante 5 minutos a 14000 gravedades.

4.4 Protocolos de crioconservación

El protocolo de congelación para semen descrito en los siguientes numerales, es utilizado de forma exitosa en *Brycon amazonicus*, (Cruz-Casallas *et al.*, 2006), carácido colombiano con características de maduración y reproducción similares al bocachico *Prochilodus magdalenae*. A su vez, se realizaron algunas modificaciones y adaptaciones de acuerdo a Martínez *et al.*, (2009a, b, c). Este fue usado, con modificaciones (punto central del experimento) en concentraciones del crioprotector, concentración glucosa; a fin de detectar las concentraciones y efectos adecuados para el semen en estudio.

4.4.1 Selección de machos para obtención de semen. Para la obtención del semen fueron seleccionados 8 individuos a partir de dos años de edad durante la época reproductiva de la especie, la cual va desde abril hasta octubre (Atencio-García, 2001). Los animales fueron revisados periódicamente con el fin de identificar aquellos que presentaran semen en la papila urogenital después de un suave masaje abdominal en sentido cráneo-caudal. Los animales preseleccionados (8) fueron llevados a piletas de manejo, donde se identificaron por medio de marcas en aleta caudal, ventral y dorsal o la combinación de estas. Posteriormente se determinó su peso corporal y la longitud total (Cruz-Casallas *et al.*, 2006).

Se seleccionaron animales que a una leve presión abdominal liberaron semen en cualquier cantidad desde la papila urogenital, que luego fueron sometidos al tratamiento hormonal para la maduración final de las gónadas y la espermiación, utilizando una única inyección intramuscular de Extracto Pituitario de Carpa (EPC), equivalente a 4.5 mg/kg de peso corporal (Atencio-García, 2001).

4.4.2 Obtención del semen. El semen se obtuvo 6 horas después de la inyección de EPC. Los 8 reproductores fueron previamente tranquilizados por inmersión en una solución de 2-fenoxietanol (300 ppm, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) hasta evidenciar la pérdida del eje de nado de los individuos. Se realizó una suave presión sobre la papila urogenital, con el objetivo de eliminar restos de agua, orina o heces. El semen fue obtenido mediante masaje abdominal en sentido cráneo-caudal, colectándolo directamente y por cada individuo en un tubo Eppendorf plástico de 1.5 mL, aforado, estéril y seco.

4.4.3 Evaluación del semen precongelación. Inmediatamente después de colectada la muestra, se realizó la evaluación seminal, con el fin de conocer la calidad del semen precongelación, lo cual sirvió como referencia para evaluar el resultado del proceso y verificar el criterio de selección de calidad del semen que iría a congelación. Este procedimiento constó de una evaluación macroscópica y microscópica y se realizó dentro de los 30 minutos siguientes a la obtención de la muestra.

4.4.3.1 Evaluación macroscópica. Se determinó el volumen seminal (mL) en los 8 machos inducidos, siendo éste el primer criterio de selección del semen que iría a congelación, el cual consistió en que cada uno de los tres machos elegidos para la crioconservación, deberían superar un volumen seminal de 0.9 mL, además de no mostrar evidencia de posible presencia de sustancias contaminantes, lo cual permitió desechar algunas muestras y permitir seguir el proceso hacia el congelamiento de aquellas muestras elegidas.

4.4.3.2 Evaluación microscópica.

4.4.3.2.1 Movilidad total (MT) y rápida (Ma). La movilidad total consistió en la evaluación global de la movilidad de los espermatozoides en las muestras, su medición se calculó en porcentaje y el procedimiento de su medición, junto con la movilidad rápida, se realizó objetivamente para cada uno de los tres machos (n=3)

finalmente seleccionados (que superaron 0.9 mL de volumen seminal), una vez las muestras fueron recién extraídas de cada pez. Como criterio final de selección de las muestras a congelar, se eligieron aquellas que superaron el 80% de movilidad total y el 75% de movilidad rápida (Ma), este último criterio considerando que esta variable es la más estrechamente correlacionada con la fertilización en esta especie (Martínez *et al.*, 2009a). Ambas variables fueron medidas a través del software Sperm Class Analyzer (**SCA**) (Microptic SL, SCA VET 01, España).

Para realizar la evaluación de la movilidad total y rápida, se tomaron 0.25 μ L de semen de cada uno de los eyaculados de los diferentes machos seleccionados en forma separada, se procedió a ubicarla sobre cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) para inmediatamente después adicionarse 75 μ L de agua destilada como solución activadora de la movilidad, de manera que la dilución final fue de 1:301 semen:solución activadora. La muestra así activa se observó con microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse 50i, Japón, objetivo de 10X) e inmediatamente analizado mediante el **SCA**.

Una vez verificado el cumplimiento de los criterios de selección del semen para ser llevado a fase de congelación, se procedió a la estimación de las demás variables microscópicas y simultáneamente se procedió a someter a congelación el semen de los tres machos, distribuyéndolos entre los tratamientos establecidos, cada uno como réplica de los tratamientos.

4.4.3.2 Movilidad rápida (Ma), media (Mb), lenta (Mc), Inmóviles (Md): Sus determinaciones fueron asistidas a través del software **Sperm Class Analyzer** el cual permitió, por medio del análisis de imágenes, la obtención del cálculo objetivo del porcentaje de células clasificadas en estos tipos de movilidades de acuerdo a la velocidad de desplazamiento en las muestras seminales provenientes de cada uno de los tres machos analizados y que cumplieron con los criterios para la congelación seminal.

Para tal fin, 0.25 μ L de semen obtenido de cada uno de los tres (n=3) machos, fue depositado sobre la cámara de Makler. Una vez allí, se adicionaron 75 μ L de agua destilada como solución activadora de la movilidad de los espermatozoides y se procedió a medir las diferentes variables. Para ello fue activado el programa, de modo que analizó la movilidad de cada muestra. Estos valores, correspondientes a cada réplica, fueron utilizados como datos del grupo control (precongelación). Tanto la suspensión de espermatozoides, cámara Makler y solución activadora se

mantuvieron a la misma temperatura evitando choques térmicos que pudieran afectar la movilidad espermática.

4.4.3.2.3 Velocidad en Línea recta (VSL) y Velocidad curvilínea (VCL): Ambas variables se midieron bajo el mismo procedimiento utilizado para las variables del numeral anterior. La VSL describe la velocidad con que se desplaza un espermatozoide considerando sólo el punto de partida y el punto de llegada, trazándose una línea recta entre estos dos puntos, considerándose esta distancia en línea recta como el espacio recorrido por el espermatozoide ($\mu\text{m}/\text{seg}$). Por el contrario, la velocidad curvilínea sí considera el recorrido real del espermatozoide sin importar la linealidad que describe su curso ni el trazo recto entre los dos puntos ($\mu\text{m}/\text{seg}$). Ambas permiten inferir la rapidez con que se desplaza un espermatozoide para alcanzar un ovocito, refleja su vigor, capacidad móvil y por tanto su calidad.

4.4.3.2.4 Concentración espermática: determina el número de células espermáticas por unidad de volumen, expresándose en millones de espermatozoides por μl . Se determinó con el objetivo de que al momento de realizar el proceso de seminación artificial de ovocitos (posdescongelación) que permitió determinar la capacidad fertilizante de los espermatozoides provenientes de cada tratamiento, fuera posible determinar de forma correcta la dosis seminante o relación semen:ovocito, es decir, número de espermatozoides que debieron ser adicionados para fertilizar cada óvulo disponible (Véase en **Uso de semen crioconservado en fertilización**). Para este fin, se tomó una muestra de $0.5 \mu\text{L}$ de semen proveniente de cada uno de los tres machos seleccionados, utilizando micropipeta de precisión (BOECO, Alemania), y se procedió a diluirlas en agua destilada en proporción 1:1500 semen:agua destilada. Una vez el semen diluido, se tomó $10 \mu\text{L}$ de esta solución y se ubicó en la cámara Makler, donde se efectuó la evaluación de la concentración de los espermatozoides. Este proceso fue realizado por microscopía de contraste de fase (Nikon, Eclipse 50i, Japón) y el software **SCA**, asistido por computador, siguiendo el protocolo establecido por Martínez *et al.*, 2009b. Se realizaron tres mediciones y no se permitió una diferencia mayor al 10% entre las lecturas; en tal caso se repitió el proceso.

4.4.3.2.5 Tiempo de activación: Fue evaluado con ayuda de portaobjetos; sobre el cual se colocó $1 \mu\text{L}$ de semen, ubicando la muestra bajo el plano focal del microscopio de luz (10X) (Carl Zeiss, Axioestar, Germany) con cámara fotográfica digital incorporada (Canon Power Shot G5, Japan), la cual permitió exportar las imágenes de movilidad en tiempo real hacia una pantalla que garantizó una mayor

visualización del tiempo de inicio y terminación de la activación de los espermatozoides.

La movilidad espermática fue activada con 10 μ l de agua destilada, a la vez que se calculó y registró esta variable en segundos hasta que la movilidad de los espermatozoides era sólo vibratoria y no implicaba desplazamiento alguno.

4.4.3.2.6 Integridad de ADN: Fue evaluado el daño en ADN en células espermáticas pre-congelación como patrón de comparación con el mismo semen posdescongelación, para determinar posibles efectos provocados por la crioconservación y su correlación con otras variables. Técnica asistida el Kit Hallomax®, LABORATORIOS INDAS y basada en el test de dispersión de la cromatina (SCD: Sperm Chromatin Dispersion; Fernández *et. al.*, 2003).

El fundamento de la técnica residió en la respuesta diferencial que ofrecieron los núcleos de los espermatozoides con ADN fragmentado frente a los que conservaron su ADN intacto. La desnaturalización controlada del ADN seguida de la extracción de las proteínas nucleares, dió lugar a núcleos parcialmente desproteinizados donde los bucles de ADN se expandieron formando halos de dispersión de la cromatina. Sin embargo, los núcleos de espermatozoides cuyo ADN se encontró intacto no desarrollaron halo de dispersión o este fue mínimo.

El primer procedimiento fue la inclusión de las muestras de semen, provenientes de los diferentes tratamientos o fresco, en microgel de agarosa, para lo cual se diluyeron las muestras de semen en medio PBS para obtener una concentración de 5×10^3 espermatozoides/ μ l para todas las muestras, utilizando espermatozoides frescos (precongelación) o congelados en nitrógeno líquido, esto con el fin de tener un stock que permita partir de una concentración homogénea y conocida para el inicio de la inclusión de los espermatozoides en el gel para dar empezar el proceso de visualización de la fragmentación. Por otra parte, se introdujo el tubo Eppendorf con agarosa de bajo punto de fusión (Kit Hallomax®, LABORATORIOS INDAS, España) en un flotador, dejándolo al nivel de la tapa, y se dejó flotando 5 minutos en agua a 90-100°C (Baño Serológico, Memmert®) hasta que la agarosa se disolvió.

Posteriormente se transfirieron los tubos eppendorf con el flotador a un baño termostático a una temperatura aproximada de 28 °C, a la que se encuentra el agua del bocachico en estado natural, y se dejó 5 minutos hasta equilibrar la temperatura; se añadieron 60 μ l desde los stocks de semen de concentración

conocida hacia igual número de tubos eppendorf que contenían la agarosa y se resuspendió. Al tiempo, portaobjetos (Kit Hallomax®, LABORATORIOS INDAS, España) pre-tratados se colocaron en refrigeración, a 4°C. Una vez enfriados los portaobjetos, se depositaron las suspensiones celulares (semen+agarosa), en su totalidad, de los tubos eppendorf sobre los portaobjetos, y se puso un cubreobjetos de cristal, evitando formar burbujas de aire. Se depositó una gota de 20 microlitros, para un cubreobjetos de 22x22mm. A lo largo de todo el proceso, los portaobjetos se mantuvieron en posición horizontal. Se Introdujo la bandeja con los portaobjetos, en una nevera a 4°C y se dejaron gelificar las muestras durante 5 minutos.

Para el procesado de la muestra, se preparó la solución lisis y desnaturalización mientras se gelificaron las muestras. Para ello, se depositó el contenido del tubo de solución desnaturalizante (Kit Hallomax®, LABORATORIOS INDAS, España) en una caja de incubación de cristal de manera que se pudieran sumergir los portaobjetos. Se retiraron los cubreobjetos, deslizándolos con suavidad sin dañar los geles y se introdujeron inmediatamente los portaobjetos, en posición horizontal, en la solución de lisis y desnaturalización y se dejaron incubando durante 5 minutos, a temperatura ambiente (22 °C). Posteriormente se levantaron los portaobjetos, se sujetaron en horizontal, y se depositaron durante 3 minutos en otra caja de cristal conteniendo abundante agua destilada para lavar la solución desnaturalizante. Posteriormente se introdujeron los portaobjetos, en horizontal, en una caja con etanol 70% (2 minutos), luego en etanol 90% (2 minutos), y finalmente en etanol 100% (2 minutos). Finalmente se dejaron secar al aire.

Posteriormente, se utilizó una tinción fluorescente de Ioduro de Propidio (IP) sobre las muestras, a una concentración de 250 µg de IP/mL de PBS durante 1 minuto, y luego se retiró el exceso por lavado con 1000 µL de agua destilada. Los electrones se excitaron y emitieron luz roja a 630 nm de longitud de onda. Se observó en microscopio de Fluorescencia (Carl Zeiss, Axioestar, Germany). Fotos digitalizadas fueron obtenidas para tener registro de las células y sus halos de dispersión (cámara Nikon).

La clasificación de los núcleos se hizo por medio de análisis visual directo.

El núcleo masivamente desproteinizado del espermatozoide, se compone de dos partes: silueta del núcleo del espermatozoide, denominada core (núcleo), en posición central, y un halo periférico de dispersión de la cromatina/ADN. Se

estudió número de entre 300 y 400 espermatozoides por cada una de las muestras frescas o congeladas, adoptando los siguientes criterios:

Espermatozoides con ADN fragmentado:

- Espermatozoides con halo grande: espermatozoides cuyo grosor del halo es igual o mayor a la longitud del diámetro menor del centro.
- Espermatozoides con halo mediano: el grosor del halo está comprendido entre: mayor que 1/3 del diámetro menor del centro y menor que el diámetro menor del centro.

Espermatozoides con ADN NO fragmentado:

- Espermatozoides con halo pequeño: el grosor del halo es igual o menor que 1/3 del diámetro menor del centro, pudiendo ser de forma irregular o prácticamente inapreciable.
- Espermatozoides sin halo.
- Espermatozoides sin halo y degradados: aquellos que sin mostrar halo, presentan el centro fragmentado en gránulos o muestran una tinción muy débil.

Interpretación de los resultados:

Los resultados se expresaron en porcentajes de espermatozoides con daños en DNA (d-ADN).

4.4.3.2.7 Integridad de membrana. Por otra parte, una prueba de daño en membrana citoplasmática de espermatozoides fue realizada; por medio de tinción (Eosina al 5% y Nigrosina al 10% como colorante de contraste). El principio se basó en que los espermatozoides muertos o con membrana deteriorada fueron permeables a los colorantes y por tanto aparecieron coloreados en el micropreparado. El procedimiento se realizó tomando 0.5 μ L de semen fresco pre-congelación (control) de cada uno de los tres machos y 0.5 μ L de semen por réplica de tratamientos posdescongelación, para estudiar 200 espermatozoides por lámina de réplica. La técnica consistió en mezclar 0.5 μ L de semen con 150 μ L de la solución de colorantes (Eosina + Nigrosina) en un tubo Eppendorf, posteriormente se tomó una alícuota de 2 μ L del preparado y se depositó sobre una lámina portaobjetos, se realizó un extendido y se dejó secar al ambiente para luego ser fotografiadas las láminas en microscopio óptico a 20X y 40X con cámara adaptada, posterior a lo cual se procedió a analizar las imágenes. Este resultado se determinó en porcentaje de células con daño en membrana (d-Me).

A su vez se verificó y caracterizó el daño con Microscopía electrónica de barrido, la cual permitió el registro visual de la ultraestructura externa y de los cambios (daños) ocasionados en membrana citosólica por la crioconservación. Para la fijación de las células se siguió la metodología desarrollada por Lahnsteiner y Patzner, 1991; utilizando 1 muestras de semen para cada una de las 3 repeticiones en cada tratamiento y en fresco (precongelación), realizándose de la siguiente manera:

Semen pre-congelación (control) y posdescongelación (9 tratamientos), fue mezclado con solución fijadora (semen:fijador = 1:2 v/v), la cual consistió en 10% de paraformaldehído, 5% de glutaraldehído y 2% de tetróxido de osmio en agua destilada. Después de fijar las muestras sobre hielo durante 15 minutos, las muestras de semen fueron lavadas 1 vez con agua destilada (500µL) por centrifugación (Sigma Lab, 1-4, Alemania) a 3000 g durante 5 minutos y después deshidratadas con una serie de diferentes concentraciones de etanol 250 µL (70%, 90%, 100%) también por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos para cada concentración. Posteriormente, se procedió a secar las muestras al aire libre, subsecuentemente se cubrieron con un baño de oro-paladio para hacerlas más conductivas al haz de electrones en la columna del microscopio. Las células fueron observadas y fotografiadas con microscopio electrónico de barrido: Amray 1820D (Amray Inc., Bedford, MA, USA) en una amplificación óptica de entre 5,000x y 20,000x. Los resultados de este análisis no fueron paramétricos o no paramétricos, sólo con fines de caracterización y verificación.

4.4.4 Congelación del semen. El semen de muestras provenientes de los tres machos de calidad espermática similar (volumen > 0.9 mL, movilidad rápida superior a 75% y movilidad total superior a 80%, color: libre de impurezas) fueron utilizados para este proceso en forma separada, cada uno constituyéndose en una réplica de todos los tratamientos. En ningún caso hubo pool.

4.4.4.1 Preparación del diluyente. El diluyente descrito por la literatura para el caraciforme yamú *Brycon amazonicus*, es una solución en agua destilada estéril de 5.5% (p:v) de glucosa, 12% (v:v) de yema de huevo de gallina y 10% (v:v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Sin embargo, para este experimento, el diluyente fue: Glucosa en agua destilada estéril en concentraciones de (5.5%, 6% y 6.5% (p:v)) para garantizar tres niveles osmóticos extracelulares de hidratación o deshidratación y detectar el adecuado,

12% de yema de huevo de gallina y (5%,10% y 15% (v:v)) de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector interno.

Las concentraciones de glucosa fueron seleccionadas con base en un estudio previo aún no publicado (Martínez y Pardo, 2009c), en el cual se determinó que:

- a. Una solución de agua destilada con concentración de glucosa 6% (p:v) (360 mOsm/kg), producía una inmovilidad espermática en semen fresco de 93% en promedio, y 7% de espermatozoides lentos, cuya movilidad era posible de reactivar.
- b. Una solución de agua destilada con concentración de glucosa 5% (p:v) (310 mOsm/kg), producía una inmovilidad espermática en semen fresco de 6.8% en promedio, y 82% de espermatozoides lentos (próximos a la inmovilidad), cuya movilidad era posible de reactivar.
- c. Una solución de agua destilada con concentración de glucosa 7% (p:v) (410 mOsm/kg), producía una inmovilidad espermática en semen fresco de 93% en promedio, y 7% de espermatozoides lentos, sin embargo, esta movilidad no fue posible de reactivar.

Considerando lo anterior, para este experimento se decidió utilizar concentraciones de glucosa cercanas a 6% (p:v) tales como 5.5% (p:v) (335 mOsm/kg) y 6.5% (p:v) (385 mOsm/kg), incluyendo a 6% (360 mOsm/kg), concentraciones que al mismo tiempo pudieran generar algún tipo de cambio osmótico extracelular.

De este modo se obtuvieron 9 tratamientos de interacción (cada uno con 3 réplicas, 1 réplica por macho) entre las 3 concentraciones de glucosa y las 3 concentraciones del crioprotector, como se muestra en la tabla 2a:

Tabla 2a. Arreglo factorial 3² de la interacción entre el factor A=DMSO (dimetilsulfóxido) y el factor B=Glucosa, cada factor en 3 niveles: a1, a2, a3 y b1, b2, b3; respectivamente para cada factor.

		FACTOR (Intracelular) A= DMSO			
		NIVEL	a1=5%	a2=10%	a3=15%
FACTOR (Extracelular) B= Glucosa	b1=5.5%	a1*b1	a2*b1	a3*b1	
	b2=6%	a1*b2	a2*b2	a3*b2	
	b3=6.5%	a1*b3	a2*b3	a3*b3	

4.4.4.2 Empacado y congelación. El semen de cada macho y el diluyente, se mezclaron a temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) en dilución 1:4 (Cruz-Casallas *et al.*, 2004) en un tubo eppendorf, agregando 100 μL de semen + 300 μL del diluyente, para un total de 400 μL de mezcla. Inmediatamente después se empacó en pajillas de 0.5 ml (Minitub, Abfüll - und Labortechnik GmbH & Co., KG), 1 por macho/tratamiento (tabla 2b), las cuales se sellaron en sus extremos con alcohol polivinilo y agua. Para la congelación, las pajillas fueron colocadas en posición vertical en un soporte construido en aluminio, diseñado según la longitud de las pajillas y la altura del termo de congelación. Una vez dispuestas las pajillas en el soporte, se introdujeron en un termo seco de vapores de nitrógeno líquido (MVE 4/2V, AL, USA) durante 30 minutos, el cual permitió una tasa de enfriamiento rápida (Medina-Robles *et al.*, 2007). Alcanzado dicho tiempo, las pajillas se trasladaron rápidamente a un termo de almacenamiento (MVE 24/2V, AL, USA), sumergiéndolas directamente en el nitrógeno líquido (-196°C).

TTO

Tabla 2b. Cantidades de mezcla (semen + diluyente) y distribución del semen por macho (n=3) utilizado en el proceso de crioconservación entre los diferentes tratamientos de interacción generados por la concentración de DMSO (a1, a2 y a3) y la concentración de glucosa (b1, b2 y b3).

	a1*b1	a1*b2	a1*b3	a2*b1	a2*b2	a2*b3	a3*b1	a3*b2	a3*b3
♂ 1	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D
♂ 2	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D
♂ 3	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D	100 µL S 300 µL D

♂: Machos cuyo semen fue utilizado en el proceso de crioconservación en forma individual, constituyéndose por separado en bloque o réplica de cada tratamiento.

a1: DMSO 5%, a2: DMSO 10%, a3: DMSO 15%. b1: glucosa 5.5%, b2: glucosa 6%, b3: glucosa 6.5%.

S: Semen, D: Diluyente.

4.4.5 Descongelación del semen. Las pajillas fueron descongeladas (Luego de 5 días) para ser analizadas y de esta forma determinar cuál de los tratamientos utilizados para la crioconservación era el más adecuado. Las pajillas congeladas y conservadas en nitrógeno líquido, se descongelaron por inmersión directa en baño serológico (Mettler®) a 60 °C por 8 segundos, una descongelación rápida que permite mejores resultados en cuanto a movilidad para esta especie (Martínez *et al.*, 2009a). El tiempo máximo entre el retiro del termo y la inmersión en agua fue de 3 segundos. Esta velocidad evita de esta forma procesos de recristalización celular, que pueden generar daño en la membrana plasmática y muerte espermática (Holt, 2000). Una vez el semen fue descongelado, las pajillas fueron abiertas en uno de sus extremos y el semen vertido en igual número de tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.

4.4.6 Pruebas Posdescongelación. Se realizaron pruebas de movilidad y tiempos de activación espermática, daños en membrana, daños en DNA (igual que en Pre-congelación), pruebas de fertilización ovocitaria y eclosión, determinación de la proporción de larvas malformadas, como se muestra a continuación.

4.4.6.1 Uso de semen crioconservado en fertilización. Para la obtención de los ovocitos (pruebas de fertilización) y semen de la especie (grupo control), fue utilizado el protocolo de inducción hormonal de maduración final y espermiación descrito por (Atencio-García, 2001) para bocachico *Prochilodus magdalenae*, con algunas modificaciones. Fueron seleccionados otros tres machos (n=3) bajo los mismos criterios fijados para el semen que se utilizó en la crioconservación, cuyo semen fresco resultó como control de la prueba de fertilización (1 macho por réplica). Para ello, se indujeron hormonalmente los tres machos a razón de 4.5 mg de EPC/Kg de su peso corporal, mientras que en la única hembra (cuyos huevos se distribuirían entre todos los tratamientos), se utilizó una cantidad de 5 mg de EPC/Kg del peso corporal aplicada en dos dosis. Así, la primera dosis fue de 0.5 mg de EPC/kg de peso corporal, y 12 horas después, la segunda dosis de 4.5 mg/kg de peso corporal aplicada simultáneamente con la única dosis de los machos del grupo control. El semen fue obtenido 5 horas después de la única dosis hormonal suministrada, al tiempo que la obtención de ovocitos (5 horas después de la segunda dosis), a una temperatura del agua de 28 °C. Los ovocitos fueron obtenidos por extrusión en seco y sobre vasija plástica (de una sola hembra) y cubriendo inmediatamente con plástico para evitar contaminación y sequedad del líquido ovariano. Inmediatamente después, estos fueron pesados en balanza analítica para determinar su correcta distribución entre las diferentes unidades experimentales (incubadoras de 2 Litros) correspondientes a 9

tratamientos (para semen proveniente de la crioconservación) y 1 control (para semen fresco), cada uno con 3 réplicas, para un total de 30 unidades experimentales. Una vez obtenidos los ovocitos y el semen fresco, se procedió a descongelar el semen crioconservado y se realizó la fertilización artificial en proporción de 100.000 mil espermatozoides por ovocito, valor que se basó en el trabajo realizado para *Brycon Amazonicus* por Velasco-Santamaría *et al.*(2004), en el cual se alcanzaron las mayores tasas de fertilización para este caraciforme utilizando semen crioconservado en proporciones semen:ovocito de 75.000:1 hasta 150.000:1. El número de espermatozoides a adicionar se calculó con base en la concentración espermática de los tratamientos establecida por el SCA. De este modo, para la fertilización se establecieron 2 gramos de ovocitos (1750 ovocitos/gramo), de la misma hembra, para cada réplica en cada uno de los tratamientos con semen crioconservado o fresco. La fertilización de los ovocitos se estandarizó y realizó en frascos plásticos transparentes de tapa rosca (1 frasco por replica de cada tratamiento) con capacidad de albergue de no menos que 20 mL, ideal para permitir el pesaje de la cantidad correcta de ovocitos, su transporte hacia el sitio de fertilización y manipulación.

Una vez pesados los 2 gramos de ovocitos en cada frasco (Balanza analítica PRECISA, IPG5, Suiza), se procedió a la fertilización de los huevos, por mezcla de gametos y posterior adición de 1 mL de agua destilada como activador de la movilidad espermática. Fueron agitados los frascos por no menos de 50 segundos, se procedió a adicionar 18 mL de agua para garantizar la correcta hidratación de los huevos. Seguidamente, fueron depositados en incubadoras de 2 Litros, de flujo ascendente (distribuidas aleatoriamente), elaboradas en fibra de vidrio (una incubadora para cada réplica).

Para la incubación de los huevos, fue utilizado un sistema de recirculación de agua bajo techo, el cual constó de un filtro de carbón activado y filtro de radiación ultravioleta, lo cual permitió mantener una calidad de agua homogénea para todos los tratamientos. La temperatura, oxígeno, amonio, pH y alcalinidad, fueron monitoreados desde y durante la incubación cada tres horas, hasta las 5 horas posteriores a la eclosión de las larvas (momento de medición de la malformación larval), para un total de 6 mediciones durante el proceso de permanencia en el sistema. El oxígeno disuelto y la temperatura se midieron con un oxímetro digital (YSI, 95, USA), el pH con un potenciómetro digital (LF WTW modelo 320, precisión ± 0.01), la dureza y alcalinidad se midieron por colorimetría mediante kit de Merck® (modelo KGaA con una precisión de 1.0 mg/L CaCO₃) y el amonio con

un titulador HACH (Digital Titrator, modelo16900, USA). Los valores fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar.

4.4.6.1.1 Tasa de fertilización. 5 Horas Post Fertilización (HPF) se realizó la evaluación de esta tasa (cierre del blastoporo), tomando tres alícuotas (submuestras) que representaban tres lecturas por réplica, tomando submuestras de 80 a 100 huevos para cada lectura. Los huevos se depositaban en cajas de petri donde se realizaban las lecturas, las cuales se calcularon en porcentaje, de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Número de huevos traslúcidos}}{\text{Número de huevos totales alícuota}} \times 100$$

El promedio de las tres lecturas se tomó como único dato de tasa de fertilización de cada réplica en todos los tratamientos, y fue expresado en porcentaje.

4.4.6.1.2 Tasa de eclosión. Así mismo, 10 HPF se evaluó esta variable, tomando también 3 alícuotas al azar (submuestras), de 80 a 100 unidades, entre huevos no eclosionados y larvas. Este procedimiento se realizó para cada réplica en cada tratamiento y se calculó en porcentaje, de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Número de larvas} - \text{alícuota}}{\text{Número de unidades (huevos + larvas) totales} - \text{alícuota}} \times 100$$

4.4.6.2 Proporción de larvas malformadas. Se determinó de acuerdo a las metodologías descritas por Miskolczi *et al.*, 2005, calculándose en porcentaje de individuos deformes de cada total de réplica en todos los tratamientos, del siguiente modo:

$$\frac{\text{Número de larvas deformes} - \text{Réplica}}{\text{Número de larvas totales} - \text{Réplica}} \times 100$$

Los resultados fueron expresados en porcentaje de larvas malformadas. Para todas las observaciones se utilizó estereoscopio Carl Zeiss, AxionVision, Germany con cámara digital adaptada Canon Power Shot G5, Japan, comparando el uso de semen crioconservado con semen fresco en ovocitos de la misma hembra. Así, para esta prueba se utilizó una muestra $n= 30$ o más larvas escogidas al azar,

aquellas réplicas que presentaron un número de larvas inferiores a 30 no fueron tenidas en cuenta para el análisis estadístico.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un diseño de bloques al azar, con un arreglo factorial simétrico, en donde el primer factor era la concentración de glucosa en tres niveles (5.5%, 6% y 6.5%) y el segundo factor fue el crioprotector en tres niveles (concentraciones de 5%, 10% y 15%), esto con el fin de evaluar los efectos de las interacciones o efectos simples de estos dos factores sobre las variables espermáticas planteadas. Los bloques se constituyeron en tres machos diferentes, cuyo semen se distribuyó entre todos los tratamientos de interacción, constituyéndose cada macho en una réplica o bloque dentro de cada tratamiento, esto con el ánimo de bloquear el efecto genético del macho en el comportamiento de las variables y garantizar que el único efecto fuese el generado por los tratamientos. Las variables correspondientes a la calidad seminal, integridades, longitudes, pesos, ente otras, fueron descritas inicialmente a través de estadística descriptiva y posteriormente analizadas utilizando pruebas paramétricas, en todos los casos las variables fueron expresadas como el promedio \pm desviación estándar. Los efectos de la glucosa y crioprotector sobre la movilidad y tiempo de activación, el efecto del crioprotector sobre daño en DNA y membrana espermática, el efecto del crioprotector y la glucosa sobre proporción de larvas malformadas y los resultados de eficiencia de los protocolos de crioconservación, en términos de tasas de fertilización y tasas de eclosión, se les realizó un análisis de varianza ANOVA, seguido de una prueba de Tukey para determinar entre cuáles tratamientos de interacción se establecieron diferencias. Previo a cualquier análisis estadístico de los resultados, fueron realizadas pruebas de Brown y Forsythe para determinar la homogeneidad de varianza y de Kolmogorov-Smirnov para Normalidad de los datos obtenidos, con el ánimo de verificar el cumplimiento de estos dos supuestos sin los cuales no se podría proceder al análisis de varianza. En ningún caso los resultados en porcentajes fueron sometidos a transformaciones para ser normalizados. En todos los casos, $p < 0,05$ fue utilizado como criterio estadístico para revelar diferencias significativas. Todos los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS versión 9.0, mediante rutina de programación exclusiva para arreglos factoriales.

6. RESULTADOS

6.1 Resultados Generales

- La osmolaridad del plasma seminal obtenida para la especie fue de 347 ± 9.1 mOsm/kg ($n=4$).
- De otro modo, una vez seleccionados los machos y la hembra para los procesos de extracción de gametos para crioconservación y pruebas de fertilización (posdescongelación), se midieron variables morfométricas, de movilidad espermática (criterios de selección precongelación), concentración celular, entre otras que se presentan a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Características generales del material biológico utilizado para el experimento de crioconservación y pruebas de fertilización. Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

	<i>n</i>	<i>Peso</i> (g)	<i>Longitud</i> <i>Total</i> (cm)	CRITERIOS PARA CONGELACIÓN*		<i>Concentración</i> <i>gamética</i>	<i>Cantidad</i> <i>gamética</i> <i>Obtenida</i>
				<i>Movilidad</i> <i>rápida</i> (%)	<i>Movilidad</i> <i>Total</i> (%)		
♂**	3	254 \pm 7.5	28.23 \pm 0.25	78.67 \pm 2.51	99.83 \pm 0.15	17371.6 \pm 434 (Millones de Sptz/mL)	1.05 \pm 0.1 mL
♂***	3	244 \pm 29.4	28.10 \pm 0.53	83 \pm 4.22	98.60 \pm 0.75	17277.7 \pm 415 (Millones de Sptz/mL)	0.4 \pm 0.1 mL
♀***	1	360	32.5	-	-	1750 huevos/g	72 g

*Los criterios de selección para el semen ser llevado a congelación se definieron como movilidad rápida (Ma) >75% y Movilidad Total >80%. Fuente: Martínez *et al.*, 2009a.

** Machos utilizados para el proceso de crioconservación espermática.

***Especímenes utilizados para las pruebas de fertilización posdescongelación. Machos del grupo control y hembra cuyos huevos fueron distribuidos entre los tratamientos para ser fertilizados.

Sptz: Espermatozoides.

- La calidad fisicoquímica del agua fue determinada conforme lo establecido en el numeral 4.4.6.1, obteniéndose una calidad aceptable para la incubación de ovocitos de la especie (tabla 4).

Tabla 4. Valores promedio \pm desviación estándar de algunos parámetros de calidad de agua en la incubación y manejo de la larva de bocachico *Prochilodus magdalenae* obtenidos con semen crioconservado y fresco.

<i>Variable fisicoquímica estimada</i>	<i>Valor promedio \pm d.e. de las cinco primeras mediciones*</i>	<i>Valor estimado de la sexta medición**</i>
Temperatura (°C)	27.9 \pm 0.53	27.0
Oxígeno (mg/L)	4.1 \pm 0.30	3.7
pH	8.0 \pm 0.43	6.9
Dureza (mg/L CaCO ₃)	95.0 \pm 0.40	87.0
Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)	48.0 \pm 0.20	39
Amonio (mg/L)	0.001 \pm 0.0001	0.1

*Estimadas en el agua de incubación (salida del sistema) a las 0 horas posfertilización (HPF), 3, 7, y 10 HPF (momento de la eclosión) y 3 horas poseclosión (HPE).

**Estimada a las 7 HPE.

De otra parte, la congelación del semen se realizó 7 minutos después de haberse efectuado la mezcla con el diluyente de acuerdo a la metodología trazada en el numeral 4.4.4.

Considerando que algunos investigadores relacionados con la crioconservación espermática en peces hipotetizan acerca de que el tiempo durante el cual los espermatozoides permanecen en contacto con el crioprotector y el diluyente desde su adición hasta justo antes de la congelación, incide o puede afectar negativamente la calidad espermática, y que por tanto se convierte en un error adicional al que se debe generar sólo por los tratamientos durante la congelación, se realizó una prueba de comparación entre el semen fresco a los 0 minutos (antes de la mezcla) y el semen ya mezclado con el crioprotector a los 15 minutos, de modo que se pudiera rechazar la hipótesis y probar que el procedimiento empleado garantizó que el semen congelado no tenía ninguna modificación generada por el tiempo de exposición al crioprotector y el diluyente antes de la congelación, que afectara su viabilidad, y que no era estadísticamente diferente del semen fresco, tal y como se pretendía desde el principio.

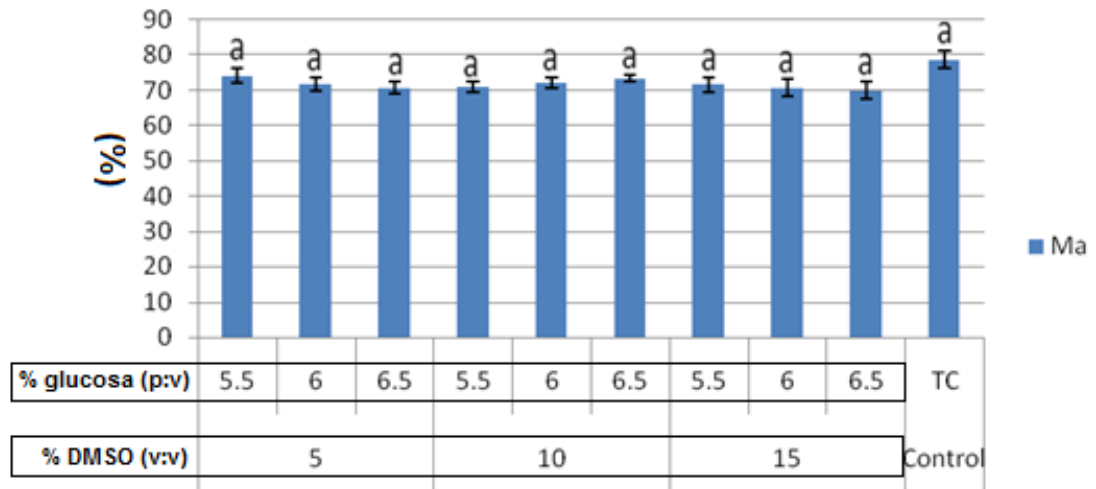


Figura 2. Porcentajes de espermatozoides con movilidad rápida (Ma) en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* mezclado con el diluyente en sus diferentes tratamientos (n=3), los cuales estuvieron basados en la interacción de tres concentraciones de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%) y tres concentraciones de Dimetilsulfóxido (5%, 10%, 15%). Variable medida a los 15 minutos posmezcla, sin congelamiento y dejado al ambiente (28 °C). El TC corresponde a la movilidad rápida del grupo control, el cual es el mismo semen fresco utilizado para los diferentes tratamientos estimada a los cero (0) minutos, es decir, justo antes de la mezcla con el diluyente. Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

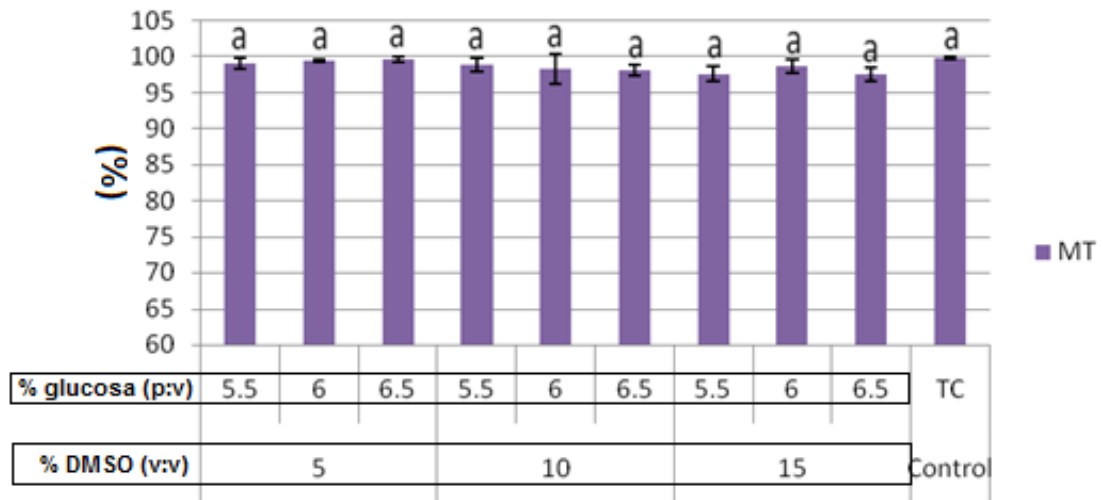


Figura 3. Porcentajes de movilidad total (MT) de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* mezclado con el diluyente en sus diferentes tratamientos (n=3), basados en tres concentraciones de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%) y tres concentraciones de Dimetilsulfóxido (5%, 10%, 15%) estimadas a los 15 minutos pos-mezcla, sin congelamiento y dejado al ambiente (28 °C). El TC corresponde a la movilidad total del grupo control, el cual es el mismo semen fresco utilizado para los diferentes tratamientos, pero medido a los cero (0) minutos, es decir, justo antes de la mezcla con el diluyente. Para todos los tratamientos. Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales (p>0.05). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Considerando que la movilidad rápida (Ma) junto con la movilidad total (MT) se han convertido en algunos de los más prácticos indicadores de calidad espermática, se ha decidido su utilización para determinar el efecto del tiempo de exposición del semen al diluyente antes de la congelación (7 minutos) sobre la viabilidad espermática, demostrando que no se incurre en errores metodológicos que adicionan más error experimental que aquel otorgado por los tratamientos en la congelación. Así pues, es claro al observar las figuras 2 y 3 que el análisis comparativo de los tratamientos, a los 15 minutos pos-mezcla con el diluyente, con respecto del semen fresco antes de la adición o mezcla (Ma=78.66 \pm 2.51% y Movilidad Total= 99.83 \pm 0.15%), muestra que este tiempo de exposición del semen no afecta significativamente la calidad del mismo en términos de estas variables móviles y que por tanto las características permanecen intactas aun habido pasado este tiempo de exposición. Esto permite inferir, que considerando que la congelación de los diferentes tratamientos se realizó justo a los 7 minutos pos-mezcla con el diluyente, y que los datos muestran que aun a los 15 minutos de exposición las variables permanecen viables, el tiempo de exposición de 7 minutos no afectó la viabilidad móvil de los espermatozoides. De modo que la metodología fue correcta.

6.2 OBJETIVO 1.

Evaluar el efecto de la concentración de dimetilsulfóxido y la concentración de glucosa, sobre la capacidad móvil espermática posdescongelación.

6.2.1 Cumplimiento de los supuestos de Homogeneidad de Varianzas y Normalidad de los datos.

Tabla 5. Pruebas de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos para todas las variables móviles.

<i>Variables</i>	<i>Test de Homogeneidad de Varianza</i>	<i>Test de Normalidad de los datos</i>
Ma	p=0.2311	
Mb	p=0.7903	
Mc	p=0.4842	
Md	p=0.5214	p=0.0510
MT	p=0.5163	
VCL	p=0.4383	
VSL	p=0.6921	
TiAc	p=0.2829	

- **Ma:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida, **Mb:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad media, **Mc:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad lenta, **Md:** Porcentaje de espermatozoides Inmóviles, **MT:** Movilidad total (%), **VCL:** Velocidad curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **VSL:** Velocidad lineal ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **Ti-Ac:** Tiempo de activación (seg.).

En el test de Brown y Forsythe, que evalúa la homogeneidad de varianzas, la hipótesis nula consiste en que la varianza de réplicas dentro de tratamientos es homogénea, mientras que la hipótesis alternativa es que al menos 1 varianza no lo es. Obsérvese en la tabla 5 que en todos los casos el valor “p” no es significativo, es decir, $p > 0.05$ para todas las variables respuesta, de modo que la hipótesis nula no se rechaza y podemos decir que existe homogeneidad entre las varianzas, cumpliéndose con el primer supuesto para incurrir en un análisis de varianza.

Por otra parte, con respecto al test de Kolmogorov-Smirnov, que evalúa la normalidad de los datos para las variables en cuestión, la hipótesis nula consiste en que las muestras han sido extraídas de una población cuya distribución es de probabilidad normal. En la tabla 5 se observa que para todos los datos, p es mayor de 0.05, por lo cual no se rechaza la hipótesis nula y se puede decir que los datos sí poseen una distribución normal, con lo que se cumple el segundo y último

supuesto que permite a los datos el sometimiento a un análisis de varianza para detectar los efectos de los tratamientos dentro del experimento efectuado.

6.2.2 Movilidad rápida (Ma) o porcentaje de rápidos.

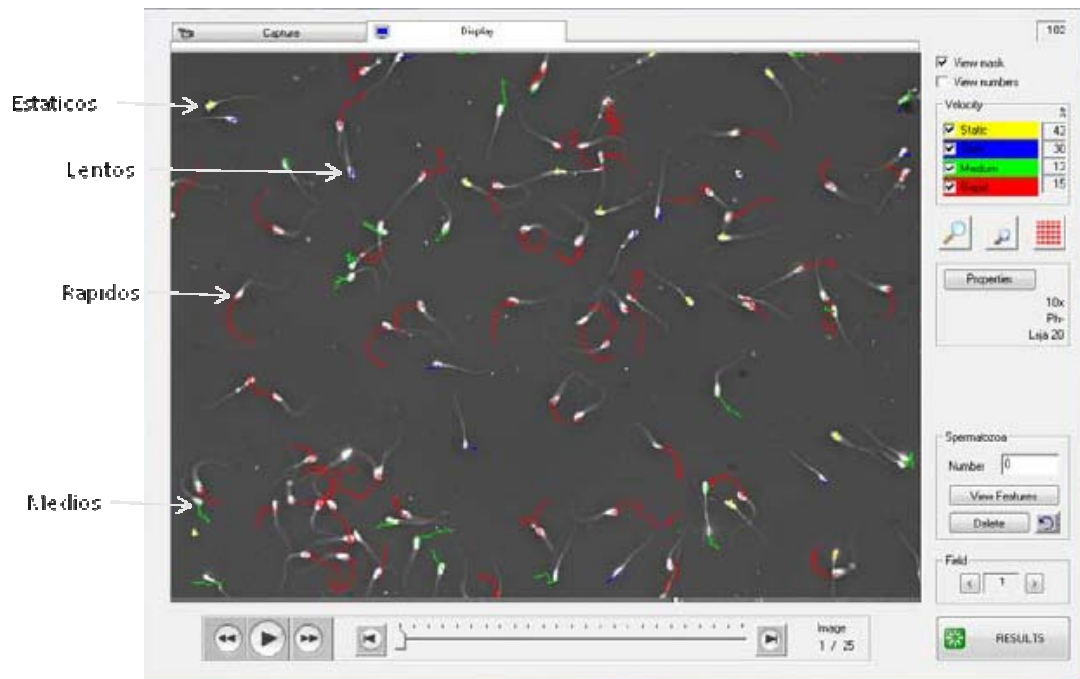


Figura 4. Registro de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* siendo analizados en su movilidad por el software Sperm Class Analyzer (SCA).

Una vez obtenidas las muestras de semen tanto antes de la congelación (fresco) como posdescongelación, se realizaron mediciones de la movilidad rápida (Ma), media (Mb), lenta (Mc), inmóviles (Md), movilidad total (MT), Velocidad Curvilínea (VCL) y Velocidad en línea recta (VSL). Todas estas variables fueron medidas a través del software SCA, excepto para el tiempo de activación, cuya metodología se estableció en el numeral 4.4.3.2.5. Con respecto a los tipos de movilidad, el software analizó simultáneamente todas estas variables, clasificando a los espermatozoides de acuerdo a la velocidad con que se desplazaron, de tal modo que para los espermatozoides rápidos (Ma) se coloreaba su trayectoria, en 1 segundo, de color rojo. Para espermatozoides medios (Mb), su trayectoria era resaltada de color verde, mientras que para aquellos clasificados como lentos (Mc), su recorrido era de color azul. Finalmente, los espermatozoides que el programa consideró como estáticos (Md), su trayectoria fue coloreada de amarillo, tal y como se observa en la figura 4.

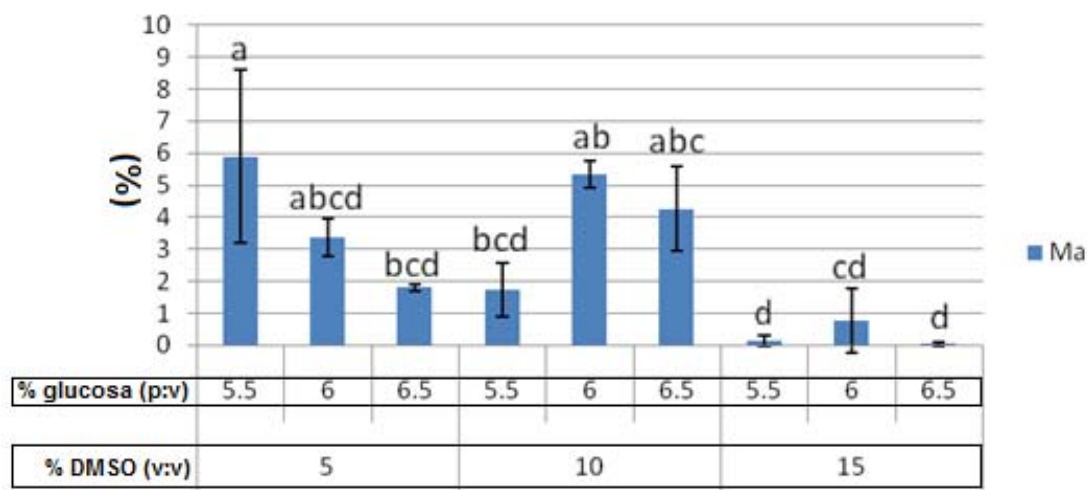


Figura 5. Porcentajes de espermatozoides con movilidad rápida (Ma) estimado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos (n=3) para determinar el efecto de la interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

La Movilidad rápida (Ma) posdescongelación varió de acuerdo a los tratamientos establecidos para las células espermáticas (Figura 5), encontrándose que para esta variable la interacción de la concentración del crioprotector con la concentración de glucosa era significativa ($p < 0.05$) y que por tanto era posible decir que para causar el efecto de disminución o mantenimiento de los porcentajes de movilidad rápida en dichas células después de la congelación, el efecto depende de la presencia conjunta de ambos factores y que no es un efecto simple de cada uno de ellos.

Cuando la concentración de DMSO alcanza valores máximos como un 15%, se observa una caída drástica de la fracción de espermatozoides con movilidad rápida ($0.13 \pm 0.06\%$, $0.76 \pm 0.1\%$, $0.03 \pm 0.06\%$ de izquierda a derecha) sin depender incluso del efecto que pudo generar la concentración de glucosa, sin embargo, se muestra una leve recuperación sólo cuando la concentración de glucosa es 6%. Por el contrario, cuando la concentración de DMSO fue la mínima usada, es decir, del 5%, se logró el máximo valor promedio en cuanto al porcentaje de espermatozoide con movilidad rápida ($5.9 \pm 2.6\%$) cuando ésta concentración del crioprotector interactuó con el mínimo valor de concentración de glucosa (5.5%); no obstante, conforme el DMSO al 5% interactúa con valores altos de glucosa (6% y 6.5%), también disminuye progresivamente el porcentaje de Ma hasta un valor mínimo de $1.8 \pm 0.1\%$.

Por otra parte, cuando la concentración del crioprotector se incrementó a 10%, la fracción de espermatozoides rápidos también se incrementó conforme la concentración de glucosa aumentó de 5.5% hasta 6%, alcanzando en este último, un pico máximo ($5.33 \pm 0.4\%$), el cual fue estadísticamente igual ($p > 0.05$) al alcanzado por el tratamiento de interacción DMSO %5 – GLUCOSA 5.5%. Sin embargo, la Ma nuevamente cae a $4.27 \pm 1.33\%$ cuando la concentración de glucosa alcanzó su máximo de 6.5%, aunque estadísticamente igual ($p > 0.05$) al anterior tratamiento.

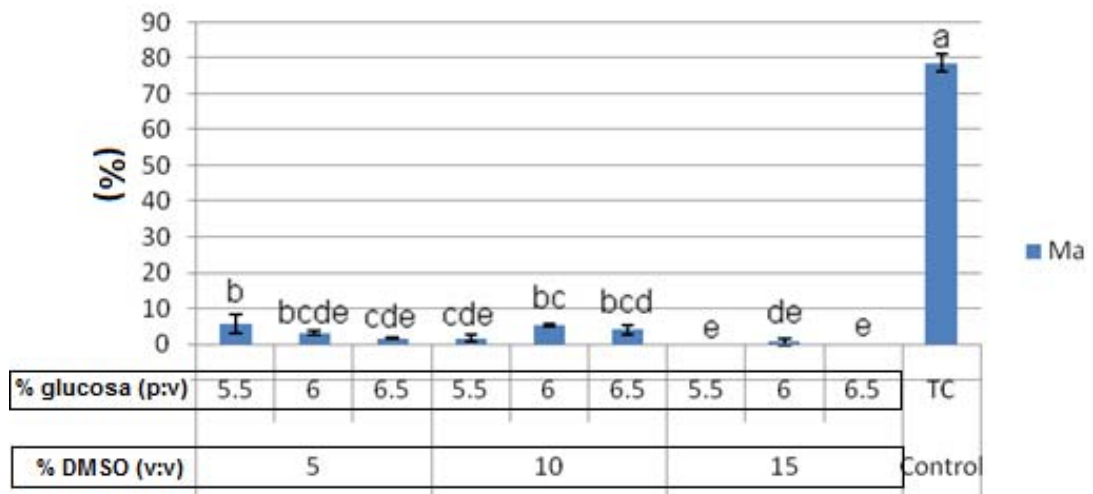


Figura 6. Porcentajes de espermatozoides con movilidad rápida (Ma) estimado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco ($n=3$). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Cuando se comparó la Ma del semen precongelación ($78.67 \pm 2.51\%$) contra el semen sometido a los diferentes tratamientos de interacción posdescongelación, se observó una disminución de espermatozoides con Ma entre 92.44% y 99.97% en los diferentes tratamientos, los cuales pasarían a desplazarse con otro tipo de movilidad, o inmobilizados de algún modo. De cualquier manera, es evidente la existencia de diferencia estadística ($p < 0.05$) entre el grupo control (TC) y los tratamientos de interacción.

6.2.3 Movilidad media (Mb) o porcentaje de Medios.

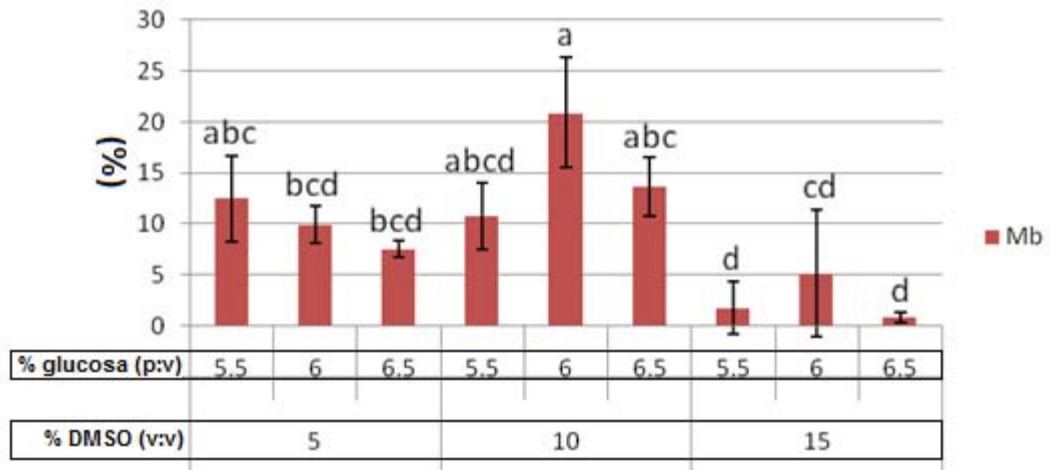


Figura 7. Porcentajes de espermatozoides con movilidad media (Mb) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos (n=3) para determinar el efecto de la interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Para la movilidad media (Mb), se encontró que tanto la concentración del crioprotector ($p < 0.0001$) como la concentración de glucosa ($p < 0.05$) pudieron haber originado las variaciones de Mb, sin depender uno del otro para lograr tal efecto observado.

Los más altos valores promedios de Mb en células espermáticas de *P. magdalenae* posdescongelación, se registraron bajo el tratamiento DMSO 10% - 6% glucosa ($20.9 \pm 5.41\%$), difiriendo significativamente ($p < 0.05$) sólo de aquellos tratamientos bajo la concentración de DMSO al 15%, y de aquellos bajo la concentración de DMSO 5% interactuando con glucosa 6% y 6.5%.

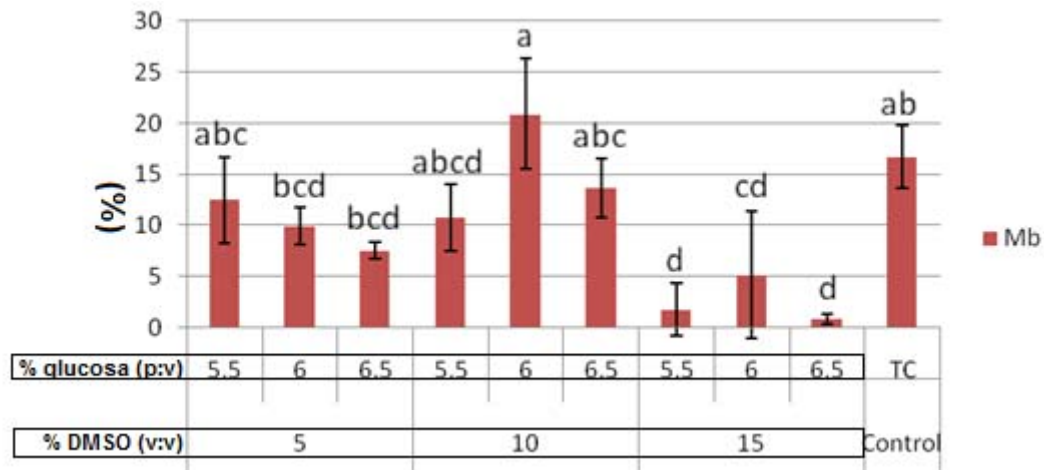


Figura 8. Porcentajes de espermatozoides con movilidad media (Mb) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Con respecto a la Mb en el tratamiento control ($16.7 \pm 3.05\%$), este es estadísticamente diferente sólo del grupo de espermatozoides que fueron sometidos a 15% de DMSO, mientras que no difiere significativamente de los grupos de tratamientos bajo las concentraciones al 5% y 10% de DMSO ($p > 0.05$).

6.2.4 Movilidad lenta (Mc) o porcentaje de Lentos.

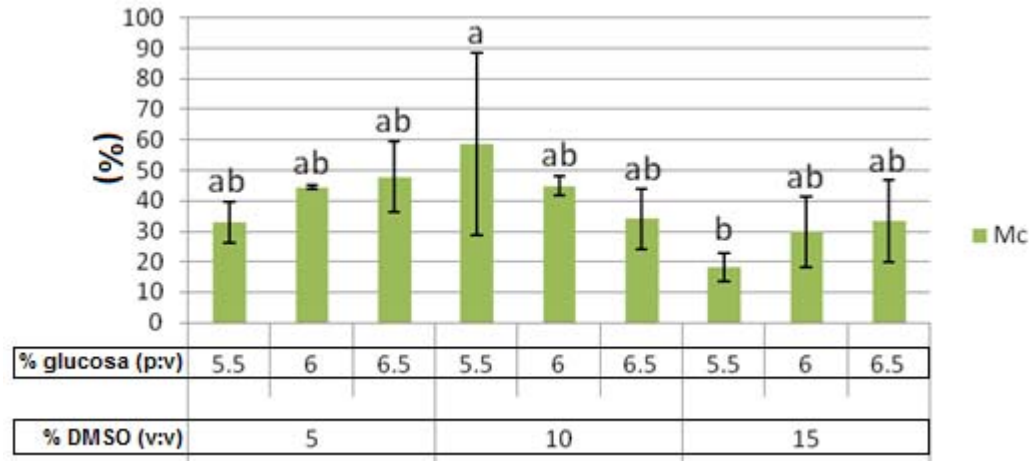


Figura 9. Porcentajes de espermatozoides con movilidad lenta (Mc) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial (n=3): concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Con respecto a la Mc, se encontró que sólo la concentración del crioprotector ($p < 0.05$) origina de forma significativa el incremento o disminución de Mc, mientras que la concentración de glucosa no tuvo efecto significativo sobre esta variable ($p > 0.05$).

Mc es una variable cuyo incremento no es deseable dentro del proceso de crioconservación espermática, pero su disminución también puede indicar que sus espermatozoides lentos están convirtiéndose en inmóviles. Sólo puede analizarse este fenómeno, cuando se observa el grupo control.

El mayor porcentaje de espermatozoides lentos se registró para el tratamiento DMSO 10% - 5.5% glucosa ($58.5 \pm 29.96\%$) sin ser significativamente diferente del resto de tratamientos ($p > 0.05$), excepto con el tratamiento DMSO 15% - 5.5% glucosa ($33.96 \pm 9.70\%$), el más bajo.

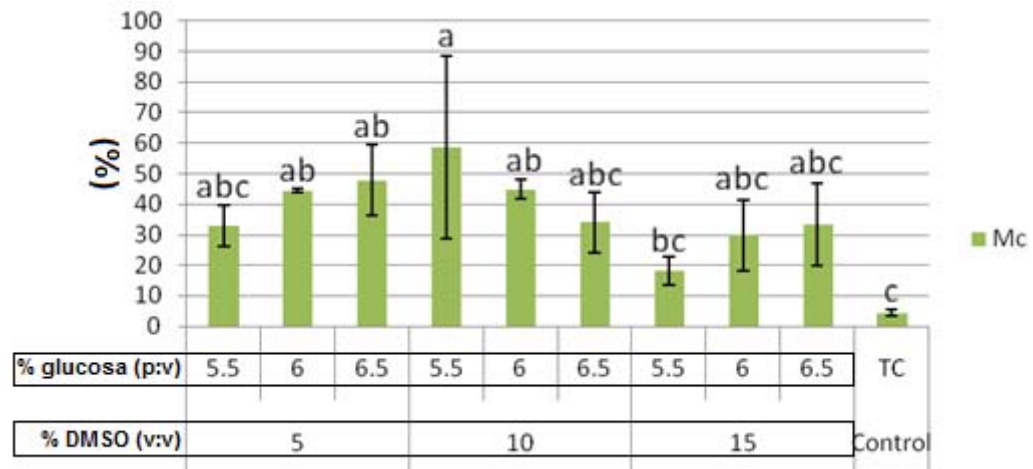


Figura 10. Porcentajes de espermatozoides con movilidad lenta (Mc) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) pre congelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Cuando se compara la Mc del semen pre congelación ($4.40 \pm 0.95\%$) contra el semen sometido a los diferentes tratamientos de interacción posdescongelación, pudo observarse que tratamientos como DMSO 5% - 5.5% glucosa, DMSO 10% - 6.5% glucosa y todos los que se encuentran bajo la concentración DMSO 15%, son estadísticamente iguales al grupo control ($p > 0.05$). El restante de los tratamientos difirieron estadísticamente del semen fresco ($p < 0.05$).

6.2.5 Porcentaje de Inmóviles (Md).

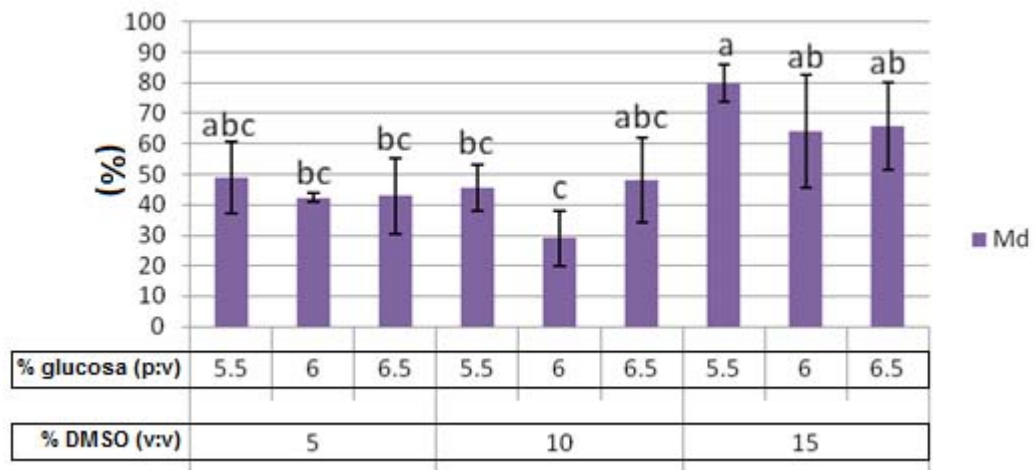


Figura 11. Porcentajes de espermatozoides inmóviles (Md) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación. Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial (n=3): concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

La Md posdescongelación para células espermáticas de *P. magdalenae*, depende o se origina en forma significativa ($p < 0.0001$) por efecto de la concentración del crioprotector y no por la concentración de glucosa, es decir, hay un efecto simple sólo de uno de los factores y no una interacción para originar tal efecto de inmovilización espermática posdescongelación.

El menor porcentaje de inmovilidad se determinó en espermatozoides posdescongelación que fueron sometidos al tratamiento DMSO 10% - 6% glucosa ($29 \pm 9.02\%$), siendo solo significativamente diferente de aquellos espermatozoides sometidos a los tratamientos bajo DMSO al 15% ($p < 0.05$).

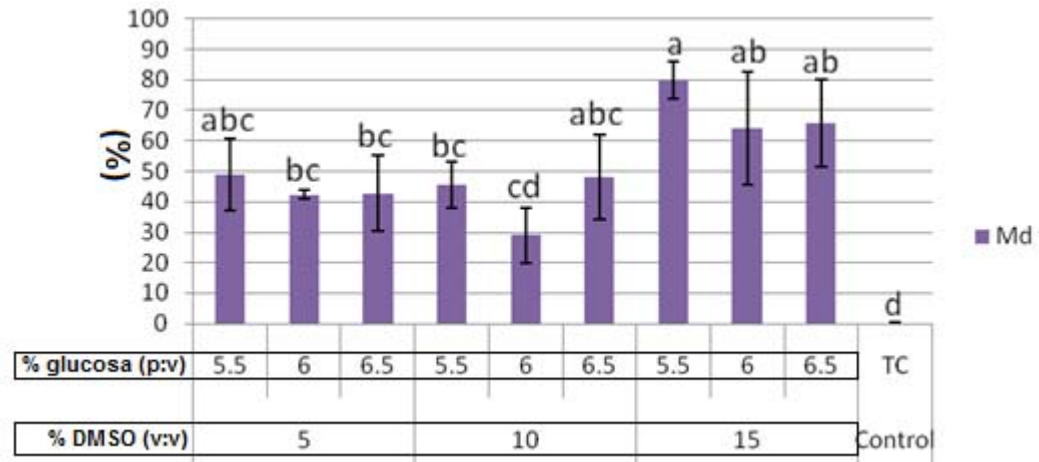


Figura 12. Porcentajes de espermatozoides inmóviles (Md) evaluado en semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Cuando se comparó los porcentajes de inmovilidad (Md) de espermatozoides posdescongelados con el porcentaje de inmóviles presentes en el semen fresco ($0.13 \pm 0.11\%$), se encontró que el único tratamiento capaz de mantener estos valores mínimos de inmovilidad al mismo nivel que el semen fresco, fue el tratamiento DMSO 10% - 6% glucosa, el cual no difirió estadísticamente del control ($p > 0.05$).

6.2.6 Movilidad Total (MT).

Es considerada también por algunos autores como la movilidad masal. Esta variable es también detectada simultáneamente con los tipos de movilidad y velocidades (VCL y VSL) por el software SCA.

La MT es detectada como la sumatoria de los porcentajes de espermatozoides clasificados como a, b y c, es decir, $MT = Ma + Mb + Mc$. Así mismo, podríamos decir que se limita a detectar en cualquier muestra, aquellos espermatozoides móviles y desechar a los inmóviles sin importar la rapidez con que se desplacen.

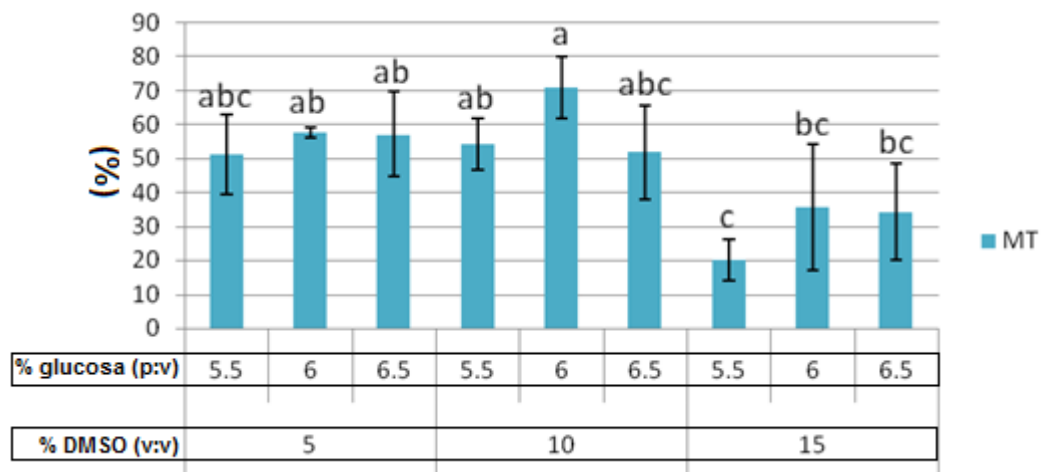


Figura 13. Porcentajes de movilidad total (MT) en espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

La movilidad total (MT) posdescongelación para células espermáticas de *P. magdalenae*, dependió en forma significativa ($p < 0.0001$) únicamente del efecto de la concentración del crioprotector y no de la concentración de glucosa, es decir, hay un efecto simple sólo de uno de los factores y no una interacción de ambos para originar la variación o mantenimiento de la movilidad total espermática.

Por otra parte, se halló que el más alto porcentaje de MT fue alcanzado por el tratamiento DMSO 10% - 6% glucosa ($71 \pm 9.02\%$), sin ser significativamente diferente de los tratamientos bajo las concentraciones de DMSO al 5% y los restantes bajo DMSO 10% ($p > 0.05$). No obstante, sólo difirió estadísticamente ($p < 0.05$) de los tratamientos bajo la concentración DMSO al 15%, donde el

tratamiento con 5.5% glucosa alcanzó el menor porcentaje de movilidad total posdescongelación ($20.13 \pm 6.03\%$).

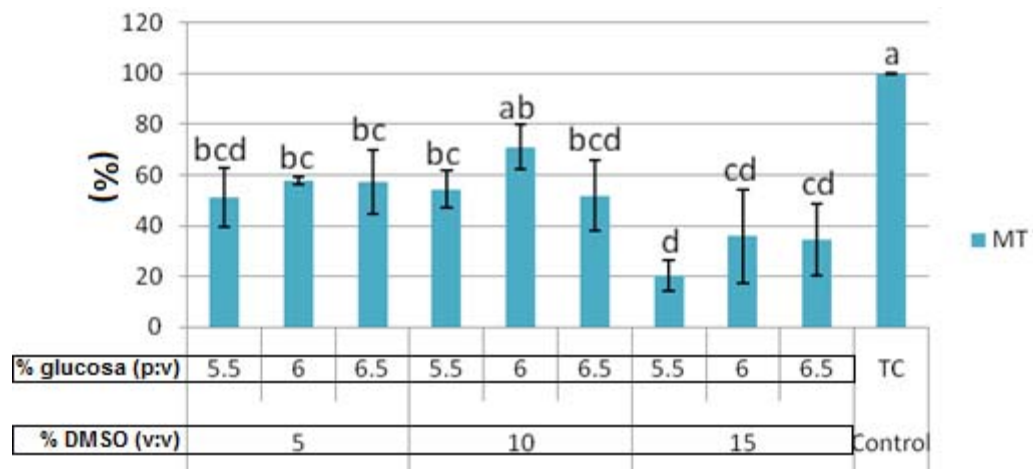


Figura 14. Porcentajes de movilidad total (MT) en espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y la concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

De igual forma, cuando se comparó la movilidad total (MT) del semen fresco (TC) ($99.86 \pm 0.11\%$) con el conjunto de tratamientos congelados, se encontró que sólo el tratamiento DMSO 10% - 6% glucosa, alcanzó valores de movilidad total ($71 \pm 9.02\%$) estadísticamente iguales ($p > 0.05$) al tratamiento control. Por el contrario, el restante de tratamientos, fueron significativamente diferentes del grupo control.

6.2.7 Velocidad Curvilínea (VCL) y en Línea Recta (VSL).

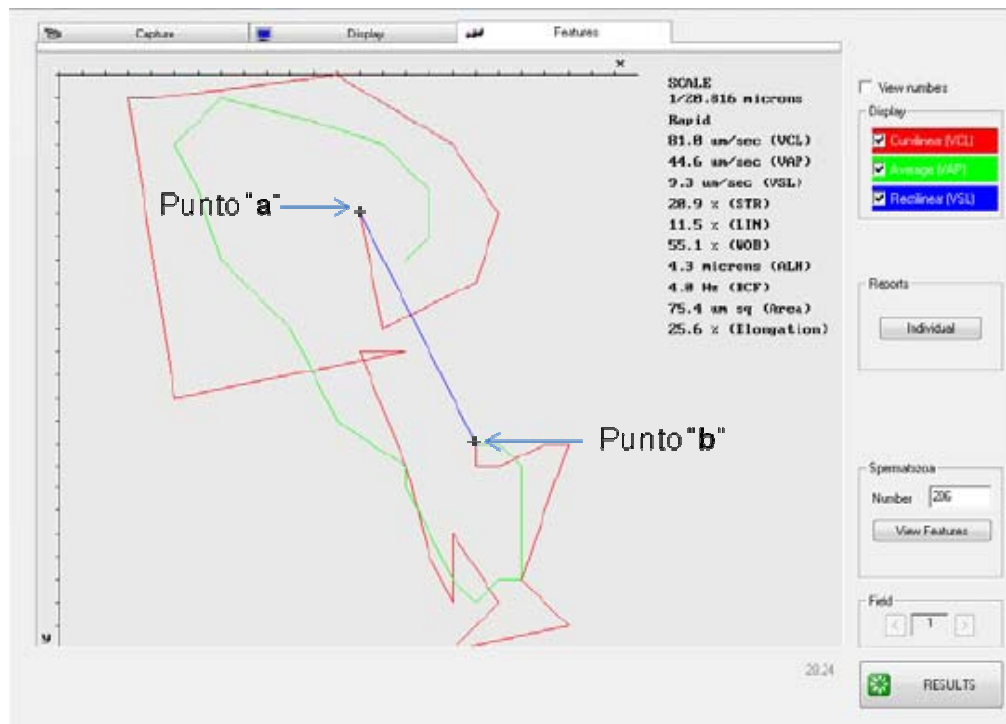


Figura 15. Registro de espermatozoide de bocachico *Prochilodus magdalenae* siendo analizado en su Velocidad Curvilínea (VCL) y en Línea Recta (VSL) por el software Sperm Class Analyzer (SCA).

Con respecto a la velocidad curvilínea y en línea recta, fueron medidas igualmente por el software SCA, analizando simultáneamente todas las trayectorias efectuadas por los espermatozoides de la muestra. El cálculo de las velocidades por parte del software consiste en que este traza y mide, en color rojo, la trayectoria real que asume un espermatozoide en 1 segundos, definiendo un punto de partida y un punto de llegada para el mismo (Punto a y Punto b en la figura 15, respectivamente). Por otra parte, el software determina el desplazamiento total del espermatozoide, sólo midiendo la distancia entre el punto de partida “a” y el punto de llegada “b” sin importarle el recorrido que haya hecho el mismo para su llegada. Esta distancia entre los dos puntos describe siempre una línea recta, la cual es trazada por el SCA en color azul, como se observa en la figura 15, y es considerada también en 1 segundos. Esta Velocidad se define como velocidad en línea recta (VSL) y al igual que la VCL, se define en micrómetros/segundos ($\mu\text{m}/\text{seg}$).

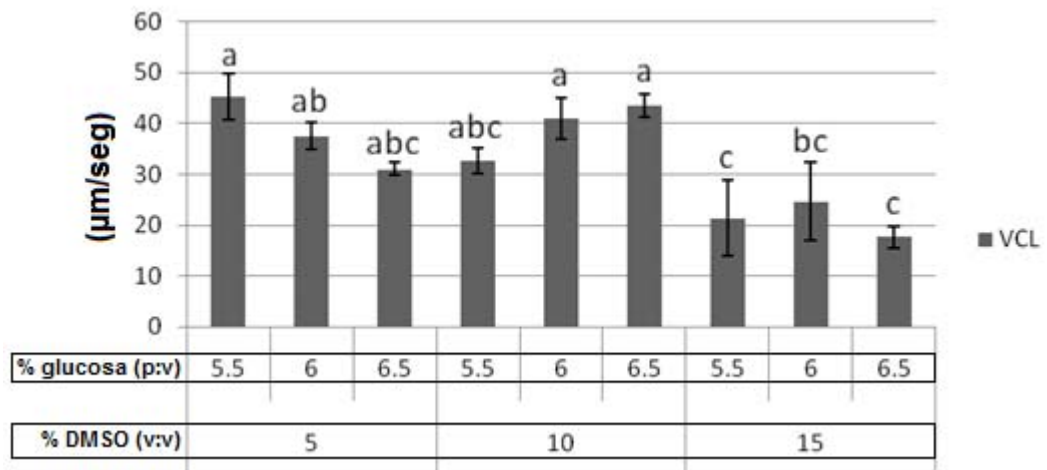


Figura 16. Velocidad Curvilínea (VCL) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

La velocidad curvilínea (VCL) posdescongelación varió de acuerdo a los tratamientos establecidos para las células espermáticas (Figura 16), encontrándose que para esta variable la interacción de la concentración del crioprotector con la concentración de glucosa afectó de forma significativa ($p < 0.05$) dicha variación y que por tanto es posible decir que para causar el efecto de disminución o mantenimiento de la VCL en dichas células después de la congelación, el efecto depende de la presencia conjunta de ambos factores y que no es un efecto simple de cada uno de ellos.

A su vez se encontró que no existió diferencia estadística entre los tratamientos correspondientes a los grupos DMSO al 5% y 10%, es decir, estadísticamente fueron iguales ($p > 0.05$). No obstante, en cuanto a valores de velocidad, el tratamiento DMSO 5% - 5.5% glucosa presenta los más altos ($45.3 \pm 4.51 \mu\text{m/seg}$), seguidos de DMSO 10%, tanto bajo la concentración de glucosa 6% ($41.06 \pm 4.05 \mu\text{m/seg}$) como 6.5% ($43.43 \pm 2.25 \mu\text{m/seg}$). Por su parte, el grupo de espermatozoides bajo los tratamientos de DMSO 15%, fueron los menos veloces posdescongelación, alcanzando valores de hasta $17.6 \pm 2.12 \mu\text{m/seg}$.

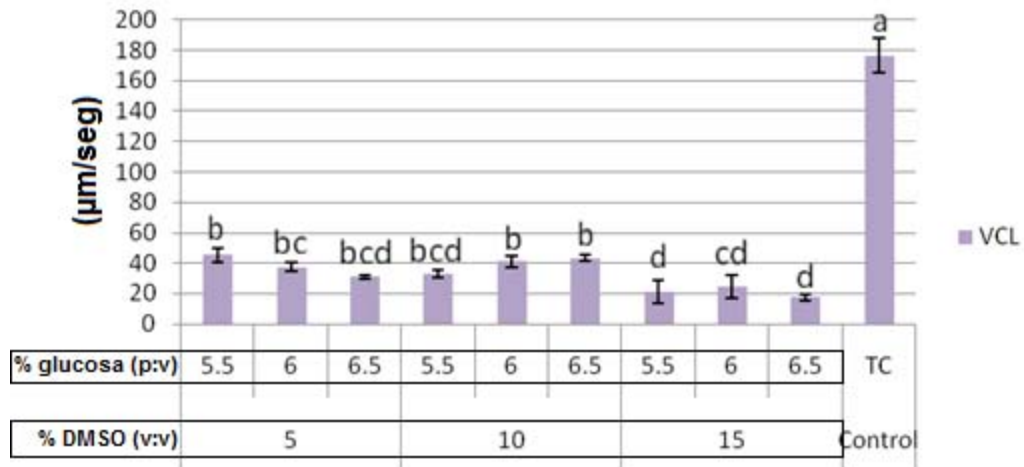


Figura 17. Velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) pre congelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

De otro modo, en el grupo control, es decir, en el semen fresco pre congelación, se determinó una VCL de $176.6 \pm 11.51 \mu\text{m/seg}$, la cual fue significativamente diferente de todos los tratamientos posdescongelación sin excepción ($p < 0.05$), así la velocidad espermática posdescongelación sólo alcanzó a ser (como máximo) casi una cuarta parte de lo que fue en semen fresco.

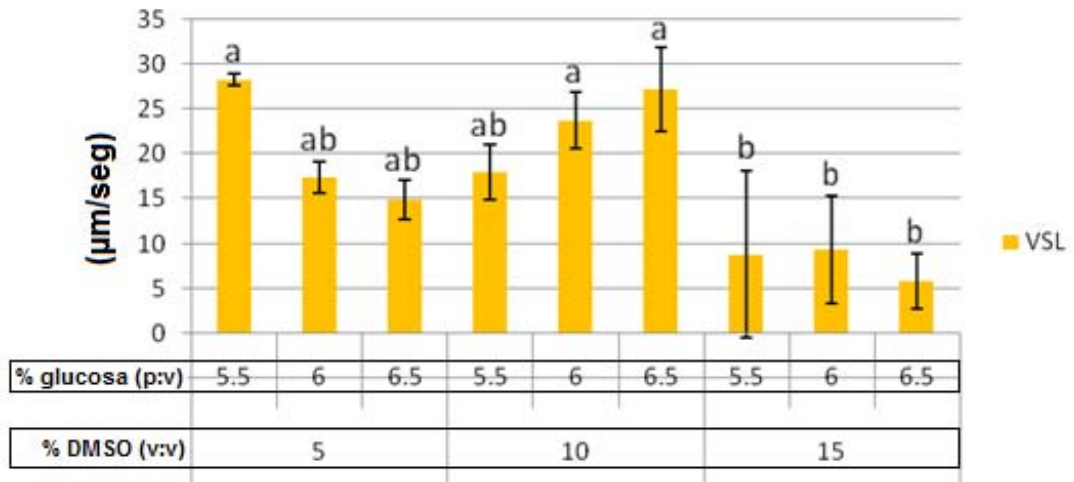


Figura 18. Velocidad en línea recta (VSL en $\mu\text{m}/\text{seg}$) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación ($n=3$). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p>0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Al igual que en la VCL, en la velocidad en línea recta (VSL) se encontró que la interacción de la concentración del crioprotector con la concentración de glucosa afectaba de forma significativa ($p<0.05$) el comportamiento de esta variables, y que para causar la disminución o mantenimiento de la VSL en dichas células después de la congelación, el efecto depende de la presencia conjunta de ambos factores y que no es un efecto simple de cada uno de ellos.

Igualmente, no se encontró diferencia estadística entre los tratamientos correspondientes a los grupos DMSO al 5% y 10% ($p>0.05$). Sin embargo, es de señalar que el tratamiento DMSO 5% - 5.5% glucosa presentó las más altas velocidades lineales ($28.26\pm 0.64 \mu\text{m}/\text{seg}$), seguidos de aquellos tratamientos bajo la concentración DMSO 10%, tanto bajo la concentración de glucosa 6% ($23.76\pm 3.13 \mu\text{m}/\text{seg}$) como 6.5% ($27.16\pm 4.67 \mu\text{m}/\text{seg}$). Por su parte, el grupo de espermatozoides bajo los tratamientos de DMSO 15%, son los menos veloces linealmente después de la congelación, alcanzando valores de hasta $5.83\pm 3.026 \mu\text{m}/\text{seg}$.

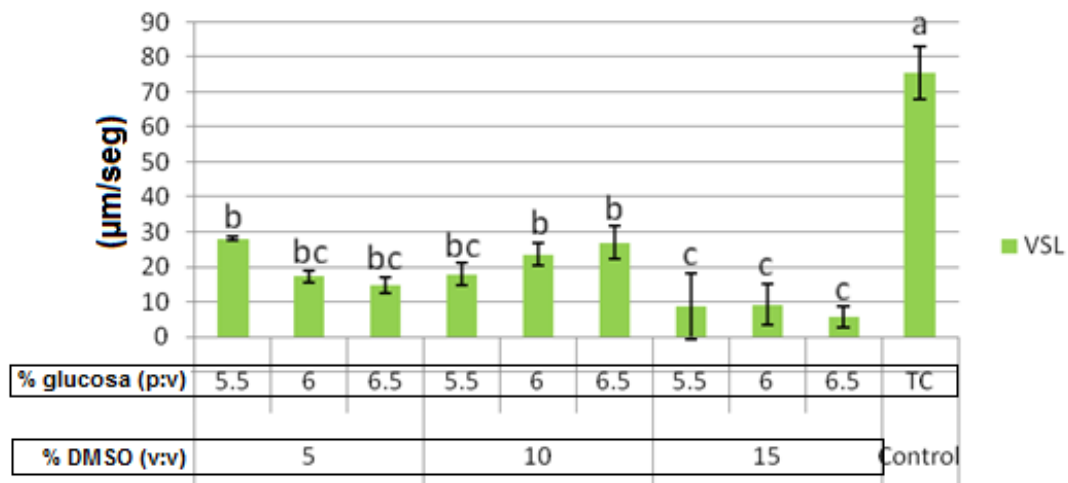


Figura 19. Velocidad en línea recta (VSL) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Cuando se intentó comparar la VSL en espermatozoides posdescongelación contra la VSL en espermatozoides precongelación (TC) ($75.53 \pm 7.68 \mu\text{m/seg}$), se halló que todos los primeros eran estadística y significativamente diferentes del semen fresco ($p < 0.05$), llegando a disminuir hasta en un 60% con respecto al semen fresco (en el mejor de los casos) debido a la congelación.

6.2.8 Tiempo de Activación espermático (TiAc).

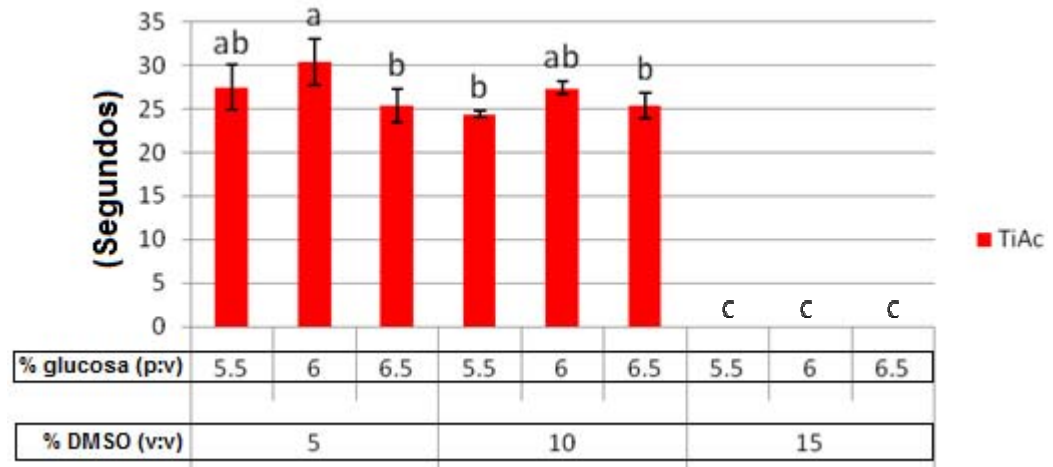


Figura 20. Tiempos de activación (TiAc) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

En cuanto al tiempo de duración de la movilidad espermática posdescongelación, se determinó que fue afectado significativamente tanto por la concentración del crioprotector ($p < 0.0001$) como por la concentración de glucosa ($p < 0.05$) ambos de forma separada, sin que la interacción conjunta entre ambos factores haya sido necesaria o afectara tal variación. En otras palabras, Ti-Ac puede adquirir las mismas variaciones observadas en la figura, tanto con la sola presencia de la concentración del crioprotector (manteniéndose estable la concentración de glucosa) como también con la sola presencia del factor concentración de glucosa (manteniéndose estable la concentración del crioprotector).

Se encontró a su vez, que los espermatozoides con mayor tiempo de activación correspondieron a los tratamientos DMSO 5% y DMSO 10%, siempre que la concentración de la glucosa fue 6% en ambos (30.38 ± 2.63 segundos y 27.38 ± 0.74 segundos, respectivamente), no en tanto, éstos no difirieron estadísticamente de tratamientos como DMSO 5%-5.5% glucosa. Por el contrario, los menores tiempos de activación fueron registrados en todos los tratamientos bajo la concentración DMSO 15%, no siendo posible observar tiempo de activación espermático alguno bajo el microscopio (o segundos). Así, estos tratamientos difirieron significativamente de todos aquellos bajo las concentraciones de DMSO 5% y 10%.

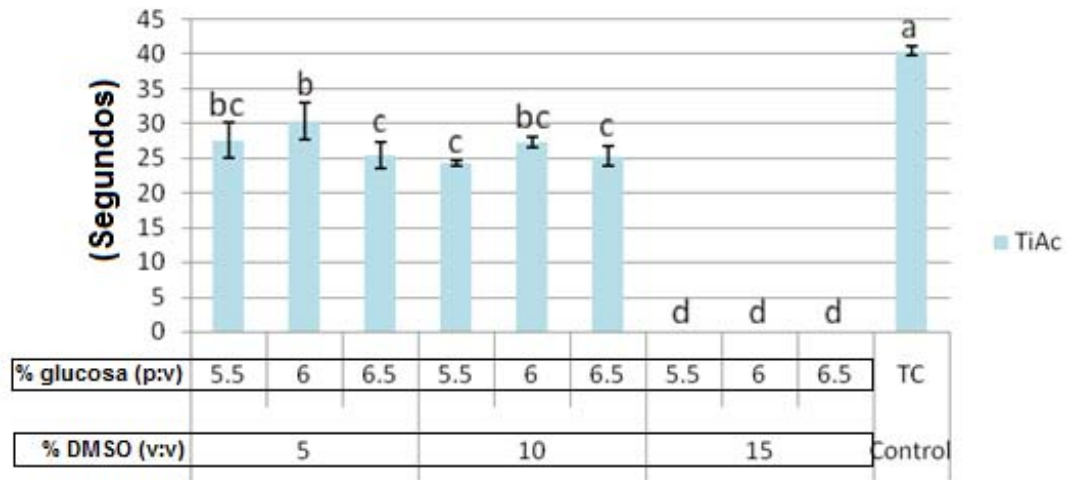


Figura 21. Tiempos de activación (TiAc) de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

En general, cuando se comparó el tiempo de activación (TiAc) de espermatozoides posdescongelación con el mismo semen antes de la congelación (40.46 ± 0.66 segundos), se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos de tratamientos, llegándose a observar diferencias entre tiempos de activación del control y algunos tratamientos de entre 10 y hasta ~40 segundos.

6.3 OBJETIVO 2.

Determinar el efecto genotóxico y citotóxico de la interacción entre concentración de glucosa y la concentración de dimetilsulfóxido sobre los daños de ADN y membrana citoplasmática.

6.3.1 Cumplimiento de los supuestos de Homogeneidad de Varianzas y Normalidad de los datos.

Tabla 6. Pruebas de homogeneidad de Varianzas y Normalidad de los datos para las variables Daños del ADN (d-ADN) y Daños de membrana (d-Me).

<i>Variables</i>	<i>Test de Homogeneidad de Varianza</i>	<i>Test de Normalidad de los datos</i>
d-ADN	p=0.8850	p=0.0510
d-Me	p=0.7030	

En el test de Brown y Forsythe, que evalúa la homogeneidad de varianzas, la hipótesis nula consiste en que la varianza de réplicas dentro de tratamientos es homogénea, mientras que la hipótesis alternativa es que al menos 1 varianza no lo es. Obsérvese en la tabla 6 que en todos los casos el valor “p” no es significativo, es decir, $p > 0.05$ para todas las variables respuesta, de modo que la hipótesis nula no se rechaza y podemos decir que existe homogeneidad entre las varianzas, cumpliéndose con el primer supuesto para incurrir en un análisis de varianza.

Por otra parte, con respecto al test de Kolmogorov-Smirnov, que evalúa la normalidad de los datos para las variables en cuestión, la hipótesis nula consiste en que las muestras han sido extraídas de una población cuya distribución es de probabilidad normal. En la tabla 5 se observa que para todos los datos, p es mayor de 0.05, por lo cual no se rechaza la hipótesis nula y se puede decir que los datos sí poseen una distribución normal, con lo que se cumple el segundo y último supuesto que permite a los datos el sometimiento a un análisis de varianza para detectar los efectos de los tratamientos dentro del experimento efectuado.

6.3.2 Fragmentación de ADN (d-ADN).

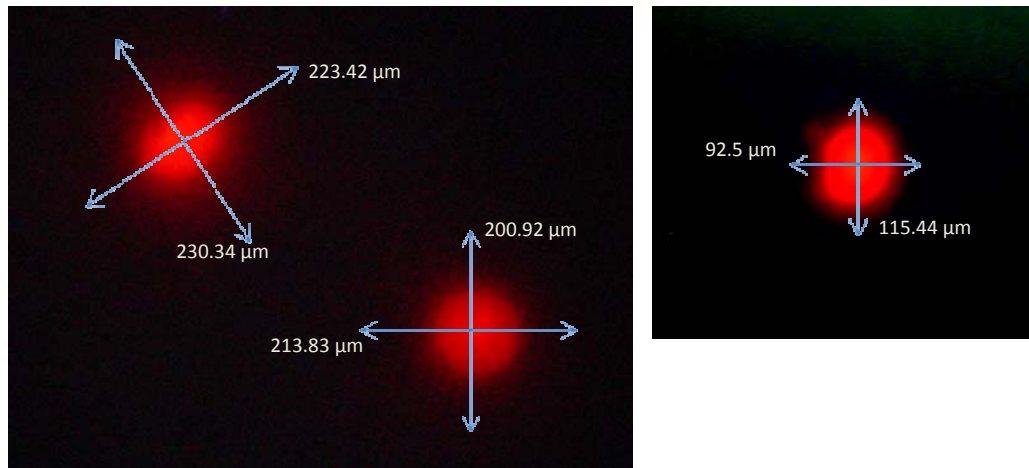


Figura 22. Longitud total del halo de dispersión de la cromatina en espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* sometidos a prueba de fragmentación de ADN, 100X. A la izquierda, control positivo inducido con peróxido de hidrógeno al 4%; a la derecha, control negativo obtenido de semen fresco precongelación.

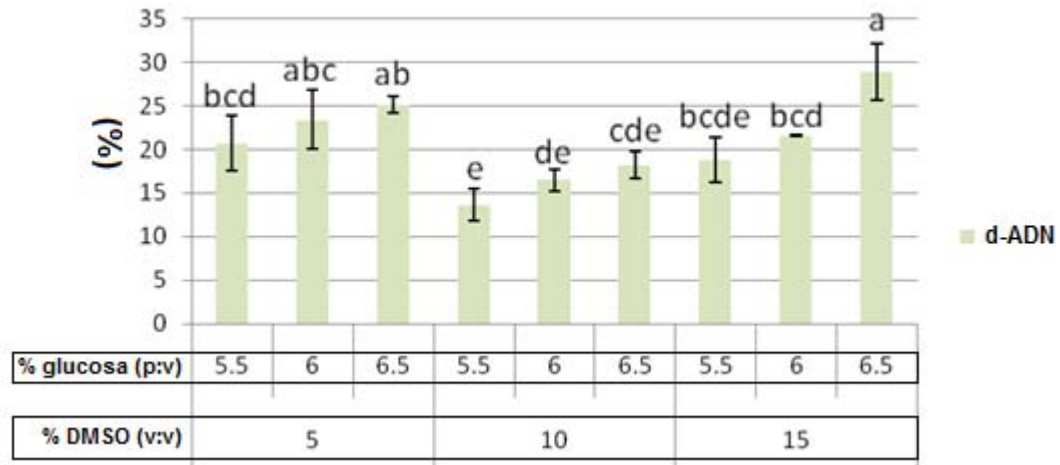


Figura 23. Porcentajes de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación con daño en ADN (d-ADN). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Con respecto a los daños en ADN espermático posdescongelación, se determinó que esta variable fue afectada tanto por la concentración del crioprotector ($p < 0.0001$) como por la concentración de glucosa ($p < 0.0001$) ambos de forma altamente significativa y de modo separado, sin que la interacción conjunta entre ambos factores haya sido necesaria o afectara tal variación. En otras palabras, el daño en ADN puede adquirir iguales variaciones observadas en la figura, tanto con la sola presencia de la concentración del crioprotector (manteniéndose estable la concentración de glucosa) como también con la sola presencia del factor concentración de glucosa (manteniéndose estable la concentración del crioprotector). No hay dependencia entre ambos para influir en la fragmentación del ADN espermático.

Del mismo modo, se determinó que los mayores porcentajes de células con ADN fragmentado, se hallaban en espermatozoides provenientes de 3 tratamientos: DMSO 5% tanto 6% glucosa como 6.5% glucosa ($23.40 \pm 3.36\%$ y $25.10 \pm 0.93\%$, respectivamente), además de DMSO 15% - 6.5% glucosa ($28.91 \pm 3.25\%$), entre los cuales no existían diferencias significativas ($p > 0.05$). Por otro lado, el valor más bajo registrado para la fragmentación de ADN espermático fue para el tratamiento DMSO 10% - 5.5% glucosa ($13.62 \pm 1.6\%$), siendo sólo significativamente diferente de los 3 tratamientos bajo DMSO 5% y de tratamientos como DMSO 15% - 6% glucosa y 6.5% glucosa ($p < 0.05$).

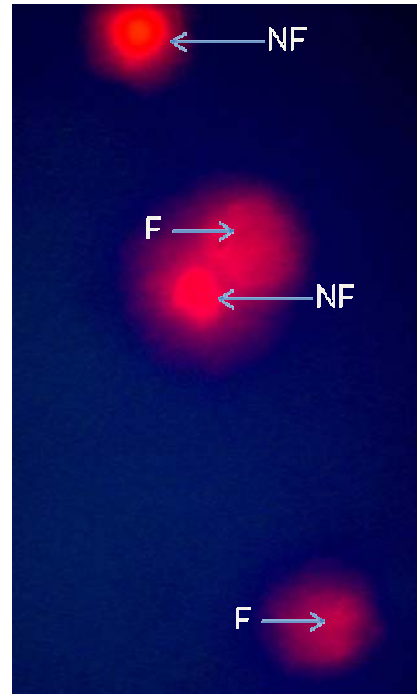


Figura 24. Espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* sometidos a prueba de fragmentación de ADN posdescongelación, 40X. Tratamiento de interacción 15% DMSO y 5.5% glucosa. F: Espermatozoide con ADN fragmentado, NF: Espermatozoides con ADN no fragmentado.

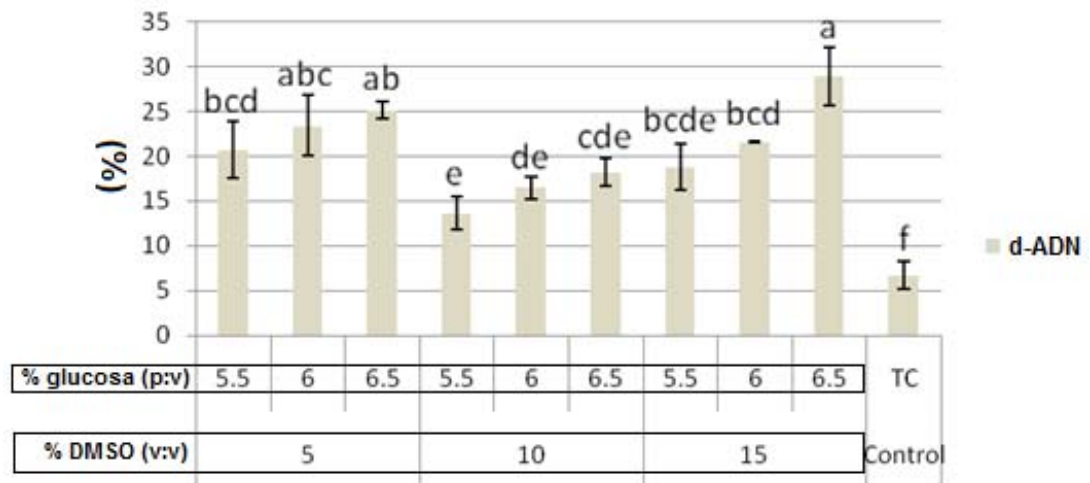


Figura 25. Porcentajes de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco con daño en ADN (d-ADN). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Con respecto al grupo control o semen precongelación ($6.71 \pm 1.54\%$), ningún tratamiento posdescongelación fue similar, ni estadísticamente ($p < 0.05$) o matemáticamente, pues como ya se mencionó, el tratamiento que menos fragmentación de ADN arrojó fue DMSO 10% - 5.5% glucosa, con un porcentaje de $13.62 \pm 1.8\%$.

6.3.3 Daño de Membrana (d-Me).

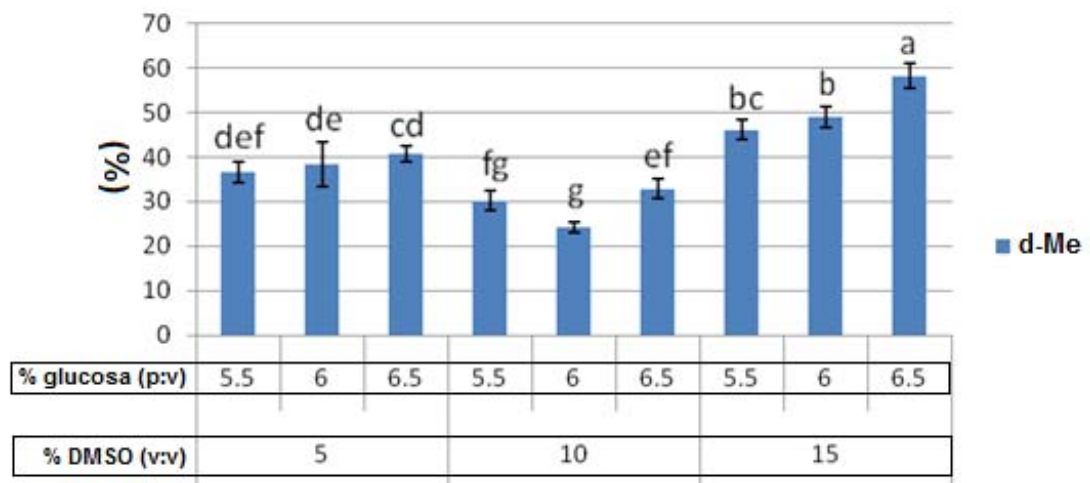


Figura 26. Porcentaje de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación con daño en membrana (d-Me) (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son iguales ($p>0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

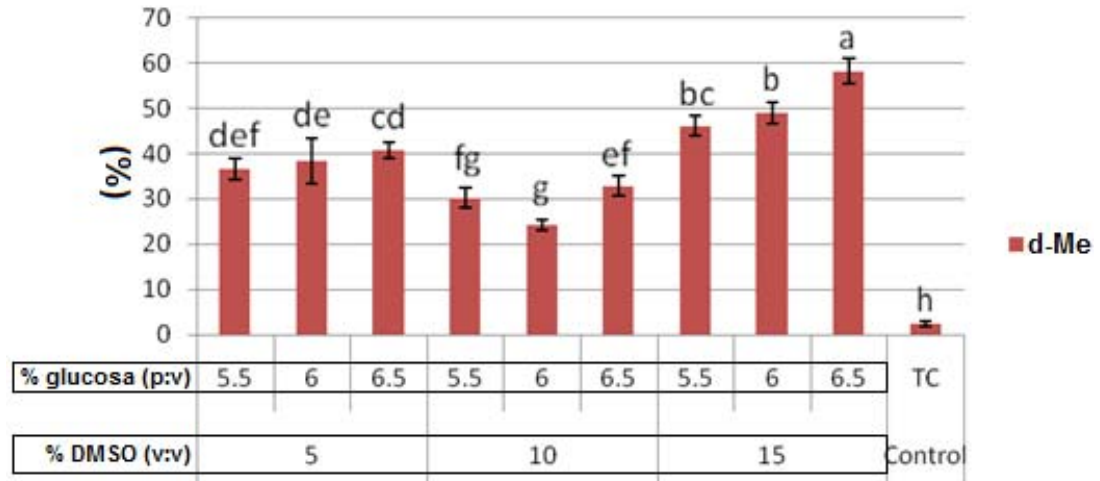


Figura 27. Porcentaje de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación y fresco con daño en membrana (d-Me) (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) precongelación y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son iguales ($p>0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Los daños en membrana (d-Me) tuvieron variaciones dependientes de los diferentes tratamientos. De este modo, se encontró que para esta variable, la interacción de la concentración del crioprotector con la concentración de glucosa, afectaba de forma significativa ($p < 0.05$) el porcentaje de aparición de ese daño en células espermáticas congeladas. Así, se determinó que el efecto de la concentración del crioprotector sobre los daños en membrana depende de la variación de la concentración de glucosa, por tanto es necesaria la presencia conjunta de ambos factores para observar tanto porcentajes bajos como altos de daños en membrana presentada en la Figura 26.

A su vez, se encontró que los menores daños a la membrana se generaron en los tratamientos DMSO 10% - 6% glucosa ($24.27 \pm 1.1\%$), seguido de DMSO 10% - 5.5% glucosa ($30.22 \pm 2.15\%$), sin haber diferencia estadística significativa entre ellos ($p > 0.05$). Sin embargo, grandes porcentaje de células con daño en membrana, se observaron en tratamientos como DMSO 15% - 6.5% glucosa ($58.33 \pm 2.81\%$), el cual fue significativamente diferente de todos los demás tratamientos ($p < 0.05$) sin excepción.

Con relación a la comparación múltiple de los tratamientos congelados con el grupo control (TC) (Figura 27), se determinó que ninguno de estos tratamientos posdescongelación mostró ser estadísticamente igual al semen fresco precongelación, donde los daños en membrana sólo alcanzaron un $2.34 \pm 0.5\%$ ($p < 0.05$), aunque algunos tratamientos mostraron gran protección a la membrana, produciéndose daños en membrana mínimamente en el $24.27 \pm 1.1\%$ de las células (DMSO 10% - 6% glucosa). Sin embargo, esto no fue suficiente para llegar a alcanzar la igualdad estadística con el semen fresco.

a.



b.



Figura 28. Espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* sometidos a prueba de Integridad de membrana de Eosina-Nigrosina, 40X. **a.** Espermatozoides del control positivo para daño en membrana inducido con Tritón X-100. **b.** Espermatozoides del control negativo o fresco (precongelación), sin daños aparentes en membrana.

6.3.3.1 Microscopía electrónica de Barrido

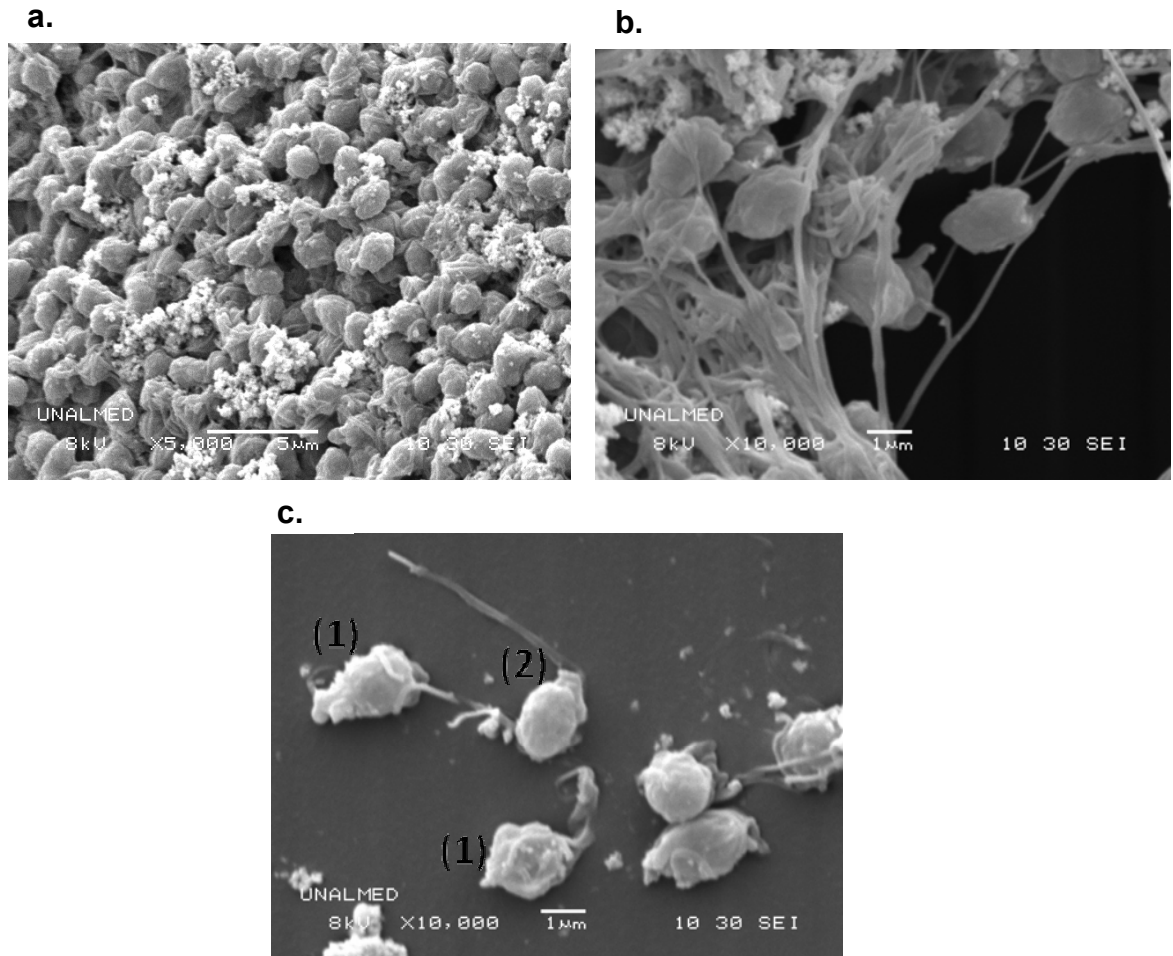


Figura 29. Fotografías de microscopía electrónica de barrido en espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación, correspondientes al tratamiento 15% de DMSO y 6.5 de glucosa. **a y b** corresponden a aglutinamientos de espermatozoides en la misma muestra. **c.** corresponde a espermatozoides con graves daños en membrana y cola (1) e intactos (2).

Las microfotografías de microscopía electrónica de barrido para verificar visualmente los daños en membrana (ya determinados con la prueba de Eosina-Nigrosina) o agrupamiento de proteínas para correlacionar este fenómeno con la inhibición de proteínas que participan en la activación espermática, no pudieron ser observadas claramente. En la imagen a y b de la Figura 29, se observan aglutinamientos de células espermáticas de *Prochilodus magdalenae*, los cuales impidieron la correcta visualización de los espermatozoides en todos los tratamientos de interacción posdescongelación. La unión de colas y cabezas fue el

principal impedimento para el logro del objetivo. Sin embargo, en la imagen c de la misma figura, se detalla claramente el efecto individual sobre las células espermáticas del tratamiento y la congelación. Malformación en membrana, hendiduras y averías en cola o pieza media son algunos de los daños registrados más comunes en esta muestra, como también la presencia de espermatozoides sin daño aparente, aspecto que se relaciona con los resultados hallados en prueba Eosina-Nigrosina. No en tanto, los aglutinamientos fueron frecuentes en los demás tratamientos de inferior concentración del crioprotector y sin excepción, además con mayor grado de unión e invisibilidad total para discriminar partes u otro particular en los espermatozoides, tal como se observa en la imagen a de la Figura 30.

Aunque en espermatozoides del grupo control (imagen b de la Figura 30) los daños en membrana no son tan evidentes como en el semen proveniente de tratamientos de congelación, los aglutinamientos también son persistentes, impidiendo igualmente la individualización de los espermatozoides para el registro fotográfico por el microscopio electrónico.

Es posible que parte de este fenómeno de aglutinación se deba a la presencia del tetróxido de osmio, el cual pudo no ser el más adecuado de los fijadores para esta especie de pez. En el proceso de secado luego de la adición de los diferentes concentraciones de etanol (70%, 90% y 100%), las muestras se observaban totalmente ennegrecidas (efectos del tetraóxido de osmio) y solidificadas en forma de cúmulos, los cuales a la hora de la fijación en el paso por el microscopio de barrido, impedía la correcta visualización. Adicionalmente, es posible que la presencia de un componente extra como la yema de huevo, azúcares, entre otras no incluidas en el protocolo original (Lahnsteiner y Patzner, 1991), pudo causar una especie de emulsificación de las células, acentuando el fenómeno en las muestras seminales. Si bien en muestras de semen fresco (sin diluyente), este evento de emulsificación no ocurrió, sí se presentó una leve aglutinación (Véase Figura 30).

Efectos como estos no son reportados por otros autores en células espermáticas de especies de

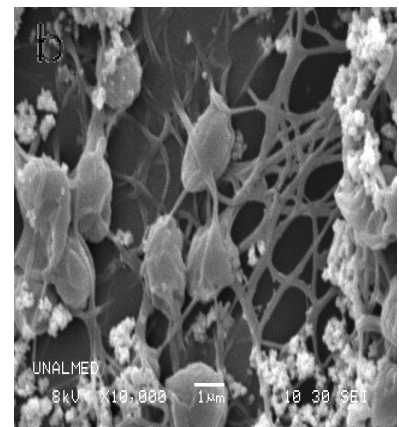
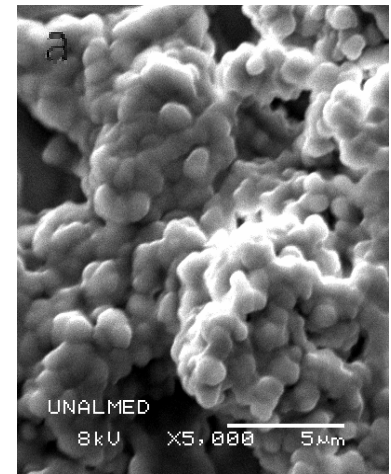


Figura 30. Microfotografía electrónica de barrido en espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae*. **a:** tratamiento 10% de DMSO y 6.5% de glucosa. **b:** semen fresco precongelación.

peces, posiblemente por no incluir dentro de sus protocolos muestras provenientes de la crioconservación basados en este tipo de diluyentes como la yema de huevo. Aunque se estandarizó el protocolo de fijación y deshidratación de las muestras seminales para esta especie, es recomendable la exclusión del tetraóxido de osmio por su alta toxicidad, costo y posibles efectos inversos en la fijación celular para microscopía de barrido. Por tanto es recomendable probar sólo la deshidratación de las muestras a base de glutaraldehído y paraformaldehído de modo que se garantice su visualización individual.

Daños en la ultraestructura espermática de peces causados por factores asociados a la crioconservación, como aquellos observados en la Figura 29C para bocachico, han sido evidenciados también en peces de agua dulce y marinos. He y Woods (2004), registraron daños a nivel de membrana semejantes a los observados en bocachico a través de microscopía electrónica de barrido, en este caso se trató de la especie *Morone saxatilis*, en donde descubrieron que la formación de erupciones en membrana eran más evidentes y dependientes de la concentración de DMSO desde 2.5%, 5% y hasta 10%. Sin embargo, no en todos los casos en donde la concentración del DMSO fue alta, los daños fueron mayores, es decir, era probable el hallazgo de células con membrana aparentemente viable a pesar de la elevada concentración del crioprotector, tal como se observa dentro del tratamiento registrado. Si bien estas malformaciones a nivel de membrana pueden ser clasificadas como erupciones, es también posible considerarlas como hendiduras producto no de la sola erosión tóxica del crioprotector sino posiblemente de la deshidratación que pueda provocarse por la presencia del mismo al interior celular (desplazamiento de agua) en combinación con la alta presión osmótica extracelular (glucosa) a la que fueron sometidas las células. Yao *et. al.*, 2000, también mediante fotografías con microscopio electrónico de barrido, logró identificar este fenómeno de deshidratación ocasionado en espermatozoides de *Macrozoarces americanus* sometidos a crioconservación con DMSO al 20% y más, evidenciándose procesos de malformación y deshidratación en la membrana, específicamente en la pieza media y cabeza. Esto puede deberse en primera instancia a que el crioprotector inicialmente entra hasta el interior de la célula desplazando parte del agua interna (Mizukami *et. al.*, 1999), la cual ha de ser proporcional a la cantidad del crioprotector o sustancia entrante, de manera que a mayor concentración de DMSO, mayor será también el desplazamiento de agua, pudiendo ocasionar un desbalance osmótico que le impida a la célula una recuperación apropiada del agua durante la descongelación (Mazur, 1980) produciendo lo que se evidencia en algunos espermatozoides de la Figura 29C.

Mediante registro fotográfico de microscopía electrónica de barrido, se logró la caracterización morfométrica de células espermáticas de bocachico *Prochilodus magdalenae*.

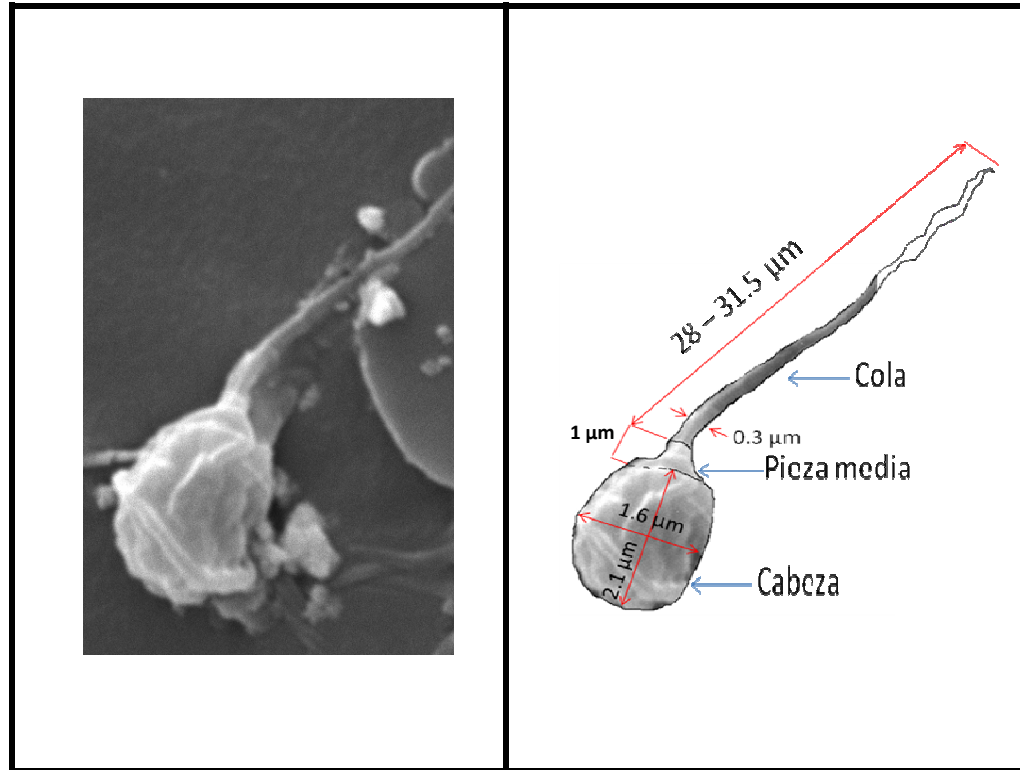


Figura 31. Microfotografía electrónica de barrido para la caracterización morfométrica de espermatozoide de bocachico *Prochilodus magdalenae* proveniente de semen fresco precongelación (10.000X).

En la Figura 31 se observa un espermatozoide proveniente de semen fresco precongelación a una magnificación de 10.000X, cuya cabeza posee una longitud de 2.1 μm y un ancho de 1.6 μm , en ella no hay presencia de acrosoma como en mamíferos o algunos peces marinos. En cuanto a la pieza media, esta posee una longitud de 0.8 hasta 1 μm y 0.38 μm de ancho. A diferencia de piezas medias en mamíferos u otros peces, esta no posee un tamaño muy prolongado y se sitúa más hacia la cabeza que hacia la cola. Esto se observa igualmente con la pieza media en espermatozoides de *Salvelinus fontinalis*, teleosteo de agua dulce (Lahnsteiner y Patzner, 1991).

Por otra parte, con relación al flagelo, este presenta forma engrosada en la base (0.3 μm) y disminución progresiva hacia la zona apical de la misma, podría decirse que su forma es cónica. Su longitud es aproximadamente de 13 a 15 veces la

longitud de la cabeza, es decir, entre 28 μm y 31.5 μm dependiendo del espermatozoide.

Tabla 7. Variables morfométricas de espermatozoides de peces marinos o dulceacuícolas. LC: Longitud de la cabeza, AC: Ancho de la cabeza, LF: Longitud del flagelo, APM: Ancho de la pieza media, LPM: Longitud de la pieza media. Para todos los casos las medidas son determinadas en μm .

<i>Especie</i>	<i>LC</i>	<i>AC</i>	<i>LF</i>	<i>APM</i>	<i>LPM</i>	<i>Fuente</i>
<i>Brycon amazonicus</i>	1.96	1.89	31.9	0.49	-	Cruz-Casallas <i>et al.</i> , 2005
<i>Merluccius merluccius</i>	3.75*	1.75	30	-	-	Medina <i>et al.</i> , 2003
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2.93	2.33	34.16	-	-	Tuset <i>et al.</i> , 2008
<i>Thunnus thynnus</i>	1.9	1.8	-	-	-	Abascal <i>et al.</i> , 2002
<i>Labeo victorinus</i>	1.64	-	-	-	-	Rutaisire <i>et al.</i> , 2006
<i>Acipenser persicus</i>	8-10	1.7-2.1	53-56	-	-	Barandaran-Noveiri <i>et al.</i> , 2006
<i>Salmo salar</i>	3.7-5	-	32.3-39.5	-	-	Gage <i>et al.</i> , 2002
<i>Serrasalmus maculatus</i>	-	1.9	-	-	3	
<i>Metynniss mola</i>	-	1.9	-	-	2	
<i>Mylassoma duriventre</i>	-	1.9	-	-	1.4	Gusmao-Pompiani <i>et al.</i> , 2009
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	1.8	1.4	-	-	1.8	
<i>Esox lucius</i>	-	1.32	32.5	-	1.1	Alavi <i>et al.</i> , 2009
<i>Mystus nemurus</i>	1.99	1.73	6.1	0.98	1.49	Muchlisin y Siti-Azizah, 2009

*Longitud de la cabeza incluyendo la pieza media.

Con respecto a variables morfométricas en células de otras especies (tabla 7), los espermatozoides de *Prochilodus magdalenae* poseen una longitud de la cabeza (LC) hasta 4 veces menor que *Acipenser persicus*, 2 veces menor que *Salmo salar*, y en general menor por algunas micras que espermatozoides de *Merluccius merluccius* y *Oncorhynchus mykiss*. A su vez, es mayor que la LC registrada para *Piaractus mesopotamicus* y *Labeo victorinus*. Con respecto al ancho de la cabeza (AC), las células de *P. magdalenae* son menores en 0.29 μm que en *B. amazonicus*, 0.3 μm que en *S. maculatus*, 0.41 μm que en *A. persicus* y 0.73 μm que en *O. mykiss*, no en tanto el AC para bocachico es mayor en 0.28 μm que las observadas en *Esox lucius*. Por otra parte, la longitud del flagelo en bocachico es

levemente menor comparada con especies como *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* y *Esox lucius*; pero ampliamente superado por especies como *Acipenser persicus*, el cual posee hasta casi el doble de la longitud flagelar que la hallada en *P. magdalenae*. Sin embargo, es sorprendente observar que es hasta 5 veces mayor que el flagelo de especies como *Mystus nemurus*.

El Ancho de la pieza media es una variable morfométrica muy poco registrada para las especies, sin embargo este parámetro es variable entre peces, alcanzando por ejemplo en *Mystus nemurus* hasta 0.98 μm , lo que es casi 3 veces más de lo que mide el ancho de la pieza media en *P. magdalenae*. Igualmente que con el ancho, la información relacionada con la Longitud de la pieza media en espermatozoides es aun más exigua, no en tanto se sabe por ejemplo que ciertos espermatozoides de algunas especies superan a *P. magdalenae* con respecto a esta variable. Así por ejemplo, en *Mylossoma duriventre*, *Piaractus mesopotamicus*, *Metynnis mola* y *Serrasalmus maculatus* la longitud de la pieza media es respectivamente 40%, 80%, 100% y 200% más grande que en bocachico.

Finalmente, las especies con mayor similitud morfométrica con *P. magdalenae*, en cuanto a Longitud de la cabeza, son *B. amazonicus*, *Mystus nemurus* y *Thunnus thynnus*, sin variaciones superiores a 0.2 μm , en cuanto al Ancho de la Cabeza: *Piaractus mesopotamicus*, *Acipenser persicus*, *Merluccius merluccius* y *Thunnus thynnus*, sin variaciones superiores a 0.2 μm , en cuanto a la Longitud del flagelo: *B. amazonicus* y *Merluccius merluccius*, sin variaciones superiores a 0.4 μm , en cuanto al Ancho de la pieza media: *B. amazonicus*, sin variaciones superiores a 0.11 μm y finalmente en cuanto a la Longitud de la pieza media: *Esox lucius*, sin variaciones superiores a 0.1 μm .

Las características morfométricas descritas para *P. magdalenae* son propias de la mayoría de los caraciformes de fertilización externa: un acuaesperma, ausencia de acrosoma, cabeza esférica, pieza media de variables dimensiones y un largo flagelo, ya planteadas por otros autores (Jamieson, 1991; Mattei, 1991).

Es importante destacar que parte de estas similitudes halladas entre *P. magdalenae* y algunas especies de agua dulce como *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon amazonicus* y *Esox lucius*, no son simples coincidencias, sino el resultado de un posible origen filogenético común. Así, en el trabajo realizado por Quaggio-Grassiotto *et al.* (2003) sobre la comparación de variables ultraestructurales de espermatozoides de 6 especies de carácidos suramericanos, concluyeron altas similitudes entre éstas, considerándolas incluso herramientas importantes de clasificación filogenética.

6.4 OBJETIVO 3.

Evaluar la eficiencia de los protocolos de crioconservación en términos de tasa de fertilización y de eclosión.

6.4.1 Cumplimiento de los supuestos de Homogeneidad de Varianzas y Normalidad de los datos.

Tabla 8. Pruebas de homogeneidad de Varianzas y Normalidad de los datos para las variables tasa de fertilización (TF) y tasa de eclosión (TE).

<i>Variables</i>	<i>Test de Homogeneidad de Varianza</i>	<i>Test de Normalidad de los datos</i>
TF	p=0.7229	
TE	p=0.4242	p=0.0510

En el test de Brown y Forsythe, que evalúa la homogeneidad de varianzas, la hipótesis nula consistió en que la varianza de réplicas dentro de tratamientos es homogénea, mientras que la hipótesis alternativa es que al menos 1 varianza no lo era. Obsérvese en la tabla 8 que en todos los casos $p > 0.05$ para las variables respuesta, de modo que la hipótesis nula no se rechaza y podemos decir que existe homogeneidad entre las varianzas, cumpliéndose con el primer supuesto para incurrir en un análisis de varianza.

Por otra parte, con respecto al test de Kolmogorov-Smirnov, que evalúa la normalidad de los datos para las variables en cuestión, la hipótesis nula consistió en que las muestras han sido extraídas de una población cuya distribución es de probabilidad normal. En la tabla 8 se observa que para todos los datos, $p > 0.05$, por lo cual no se rechaza la hipótesis nula y se puede decir que los datos sí poseen una distribución normal, con lo que se cumple el segundo y último supuesto que permite a los datos el sometimiento a un análisis de varianza para detectar los efectos de los tratamientos dentro del experimento efectuado.

6.4.2 Tasa de fertilización (TF).

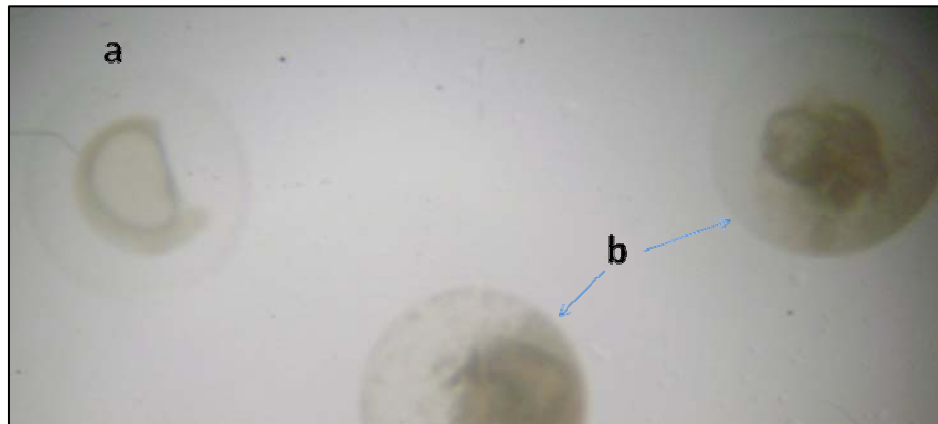


Figura 32. Ovocitos de bocachico *Prochilodus magdalenae* fertilizados con semen crioconservado (5 horas posfertilización – fin del cierre del blastoporo). **a**: Corresponde a un ovocito fertilizado y en este caso un embrión viable. **b**: Corresponde a ovocitos no fertilizados o a embriones inviables.

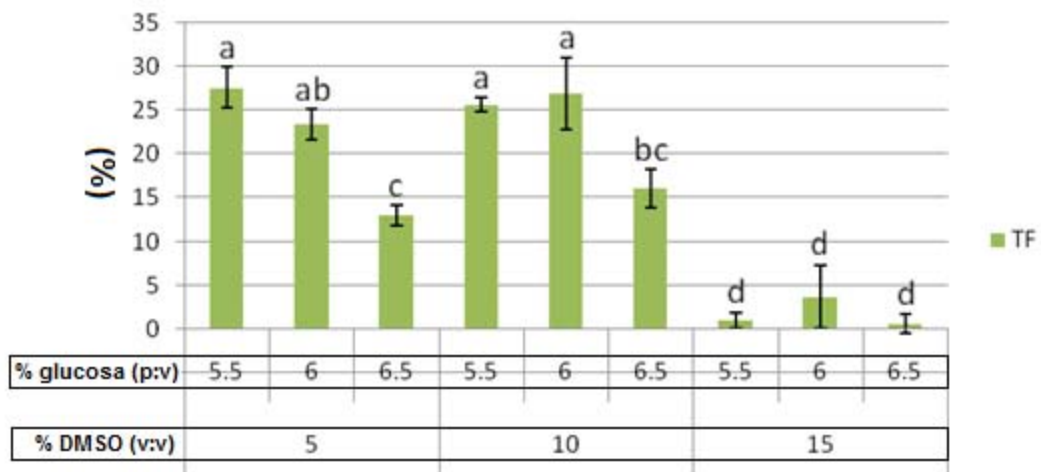


Figura 33. Tasa de fertilización (TF) evaluada en bocachico *Prochilodus magdalenae* (4 horas posfertilización – final del cierre del blastoporo) (n=3). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen crioconservado proveniente de los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

En cuanto a la tasa de fertilización (TF), se encontró que la interacción de la concentración del crioprotector con la concentración de la glucosa afectaba de forma significativa ($p < 0.01$) el comportamiento de esta variable, así el efecto de la concentración del crioprotector sobre la tasa de fertilización depende de la variación que se presenta en la concentración de glucosa.

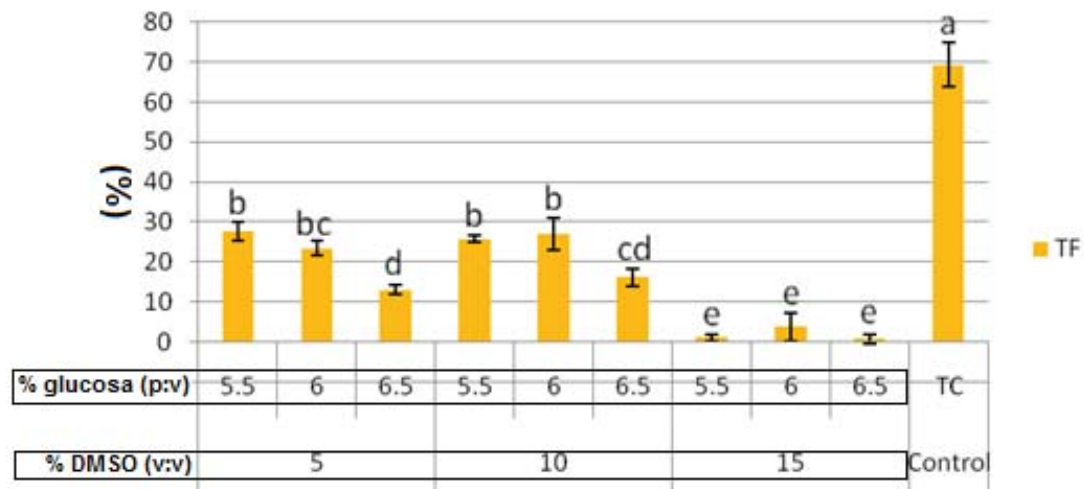


Figura 34. Tasa de fertilización (TF) evaluada en bocachico *Prochilodus magdalenae* (4 horas posfertilización – final del cierre del blastoporo) ($n=3$). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen fresco (TC) y ovocitos fertilizados con semen criopreservado sometido a los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y osmolaridad del diluyente basado en glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Igualmente, se estableció que los mayores porcentajes de fertilización (ver figura 33), se alcanzaron por parte de tratamientos como DMSO 5% cuando la concentración de glucosa era 5.5% y 6% ($27.57 \pm 2.35\%$ y $23.41 \pm 1.76\%$), y en los tratamientos DMSO 10% siempre que la concentración de glucosa era también 5.5% y 6% ($25.66 \pm 0.33\%$ y $26.88 \pm 4.10\%$); sin hallarse diferencias estadísticas significativas entre estos cuatro tratamientos ($p > 0.05$). Por el contrario, tratamientos con la concentración DMSO 15%, presentaron los más bajos porcentajes de fertilización ($0.99 \pm 0.87\%$, $3.63 \pm 3.57\%$ y $0.61 \pm 1.06\%$), siendo estadísticamente iguales entre ellos ($p > 0.05$), pero significativamente diferentes del resto de tratamientos ($p < 0.05$), es decir, diferentes tanto de aquellos con la concentración DMSO 5% como bajo la concentración DMSO 10%.

De otro modo, puede decirse que la tasa de fertilización (TF) correspondiente al semen fresco pre congelación (TC) ($69.3 \pm 5.15\%$), fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que las tasas de fertilización correspondientes a todos los tratamientos

de crioconservación. Hallándose que los porcentajes más altos de fertilización alcanzados cuando se utilizó semen crioconservado bajo estos tratamientos, llegaron a ser menos de la mitad de lo que se logra con semen fresco (véase Figura 34).

6.4.3 Tasa de Eclosión (TE).

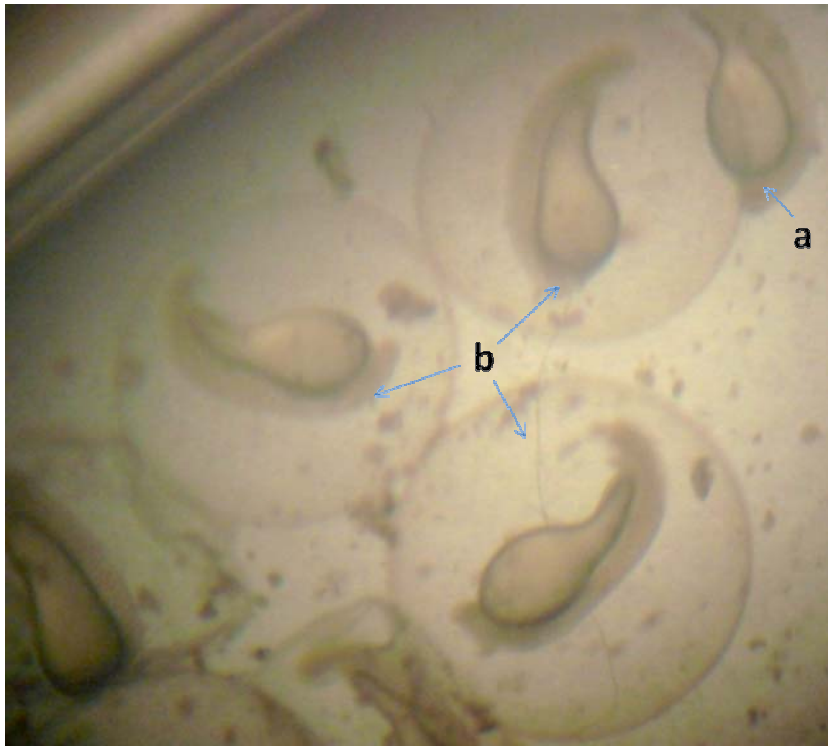


Figura 35. Larvas y embriones de bocachico *Prochilodus magdalenae* provenientes de semen crioconservado (10 horas posfertilización) en el momento preciso de medición de la tasa de eclosión. **a:** Corresponde a una larva recién eclosionada. **b:** Corresponde a embriones a punto de eclosionar.

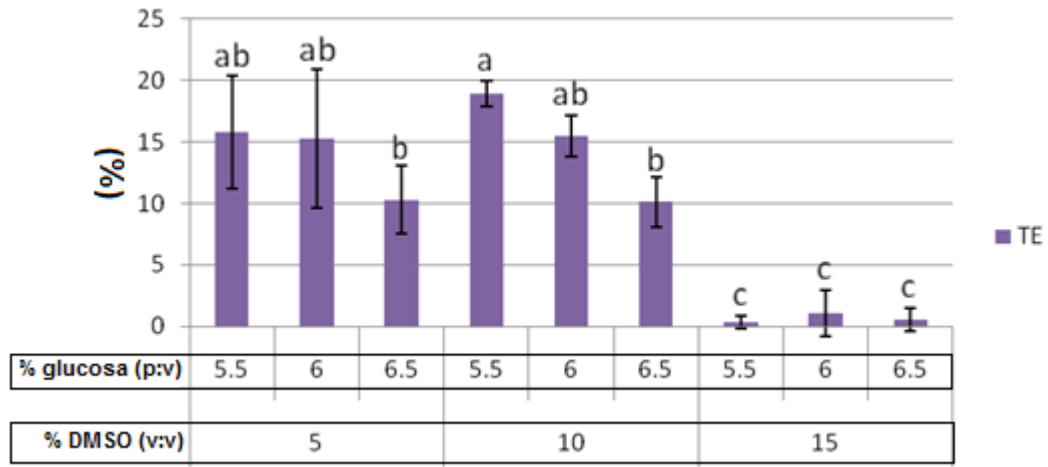


Figura 36. Tasa de eclosión (TE) evaluada en bocachico *Prochilodus magdalenae* (10 horas posfertilización) (n=3). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen criopreservado proveniente de los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p>0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

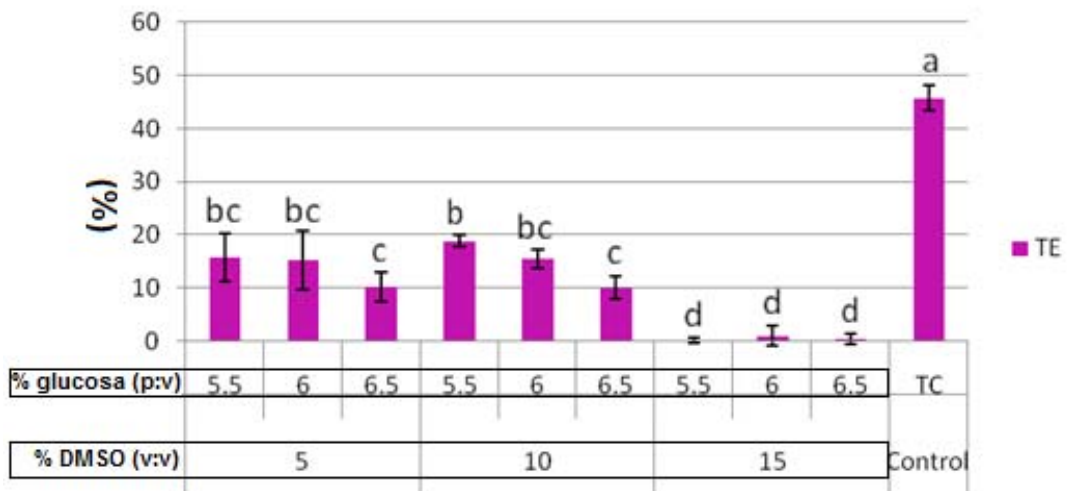


Figura 37. Tasa de Eclosión (TE) evaluada en bocachico *Prochilodus magdalenae* (10 horas posfertilización) (n=3). Comparación múltiple entre ovocitos fertilizados con semen fresco (TC) y con semen sometido a los tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p>0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Con respecto a la tasa de eclosión (TE), se determinó que esta variable fue afectada tanto por el efecto simple e independiente de la concentración del DMSO ($p < 0.0001$) como por el efecto simple e independiente de la concentración de glucosa ($p < 0.05$), ambos de forma significativa y de modo separado, sin que la interacción conjunta entre ambos factores haya sido necesaria o afectara tal variación. Así, podría decirse que el efecto que la concentración del DMSO puede causar sobre la tasa de eclosión, no depende de la variación de la concentración de glucosa y viceversa.

Se encontró igualmente, que los mayores porcentajes de eclosión (ver Figura 36) fueron obtenidos por tratamientos como DMSO 5% y DMSO 10% siempre que la concentración de glucosa fue 5.5% y 6% ($15.76 \pm 4.61\%$, $15.25 \pm 5.59\%$, $18.93 \pm 1.04\%$ y $15.48 \pm 1.7\%$, respectivamente), sin hallarse diferencias estadísticas significativas entre estos cuatro tratamientos ($p > 0.05$). Contrario a ello, tratamientos como aquellos bajo la concentración DMSO 15%, presentaron los más bajos porcentajes de eclosión ($0.3 \pm 0.51\%$, $1.07 \pm 1.86\%$ y $0.55 \pm 0.95\%$, respectivamente para 5.5%, 6% y 6.5% de glucosa), siendo estadísticamente iguales entre ellos ($p > 0.05$), pero significativamente diferentes del resto de tratamientos ($p < 0.05$), es decir, diferentes tanto de aquellos bajo la concentración DMSO 5% como bajo la concentración DMSO 10%.

Así mismo, cuando se compararon las tasas de eclosión obtenidas con semen fresco (TC) y las obtenidas con semen congelado bajo los diferentes tratamientos (véase Figura 37), se encontró que la TE correspondiente al semen fresco (TC) ($45.81 \pm 2.42\%$), fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que las tasas de eclosión de todos los tratamientos de crioconservación. Los porcentajes más altos de eclosión alcanzados con semen crioconservado, llegaron a ser algo menos que la mitad de lo que se alcanzó con semen fresco.

6.5 OBJETIVO 4.

Establecer el efecto de la concentración de glucosa y la concentración del crioprotector sobre la proporción de larvas malformadas (Tmal).

6.5.1 Cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianzas y Normalidad de los datos.

Tabla 9. Pruebas de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos para la variable Tasa de malformación larval (Tmal).

<i>Variables</i>	<i>Test de Homogeneidad de Varianza</i>	<i>Test de Normalidad de los datos</i>
Tmal	p=0.4127	p=0.0510

En el test de Brown y Forsythe, que evalúa la homogeneidad de varianzas, la hipótesis nula consiste en que la varianza de réplicas dentro de tratamientos es homogénea, mientras que la hipótesis alternativa es que al menos 1 varianza no lo es. Obsérvese en la tabla 9 que en todos los casos el valor $p > 0.05$ para la variable respuesta, de modo que la hipótesis nula no se rechaza y podemos decir que existe homogeneidad entre las varianzas, cumpliéndose con el primer supuesto para incurrir en un análisis de varianza.

Por otra parte, con respecto al test de Kolmogorov-Smirnov, que evalúa la normalidad de los datos para las variables en cuestión, la hipótesis nula consiste en que las muestras han sido extraídas de una población cuya distribución es de probabilidad normal. En la tabla 9 se observa que para todos los datos, $p > 0.05$, por lo cual no se rechaza la hipótesis nula y se puede decir que los datos sí poseen una distribución normal, con lo que se cumple el segundo y último supuesto que permite a los datos el sometimiento a un análisis de varianza para detectar los efectos de los tratamientos dentro del experimento efectuado.

6.5.2 Tasa de malformación (Tmal).

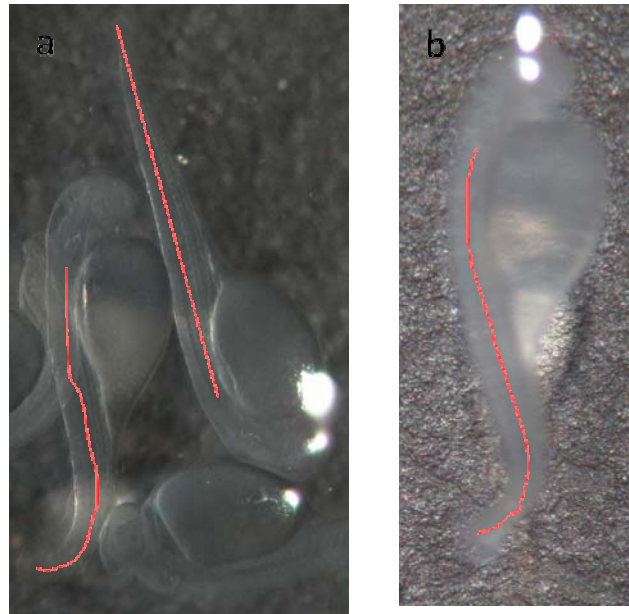


Figura 38. **a y b** corresponden a larvas de bocachico *Prochilodus magdalenae* proveniente de semen crioconservado. **a**: Larva normal (línea recta) y con malformación (línea curva) en la zona caudal, provenientes del tratamiento de interacción 5% de DMSO y 6.5% de glucosa; **b**: Larva malformada proveniente del tratamiento de interacción 10% DMSO y 6.5% glucosa.

La tasa de malformación se determinó conforme se estableció en el numeral 4.4.6.2 de esta investigación. Con respecto a ello cabe señalar, que aunque para los tratamientos bajo la concentración DMSO 15% se registraron tasas de fertilización y eclosión, la medición de esta variable no fue posible para este grupo de tratamientos, debido al número reducido de larvas, las cuales ya eran menores de $n=30$. Debido a esto, los datos no fueron tenidos en cuenta para el análisis estadístico o comparación múltiple con otros similares como se observará en la Figura 39 y Figura 40.

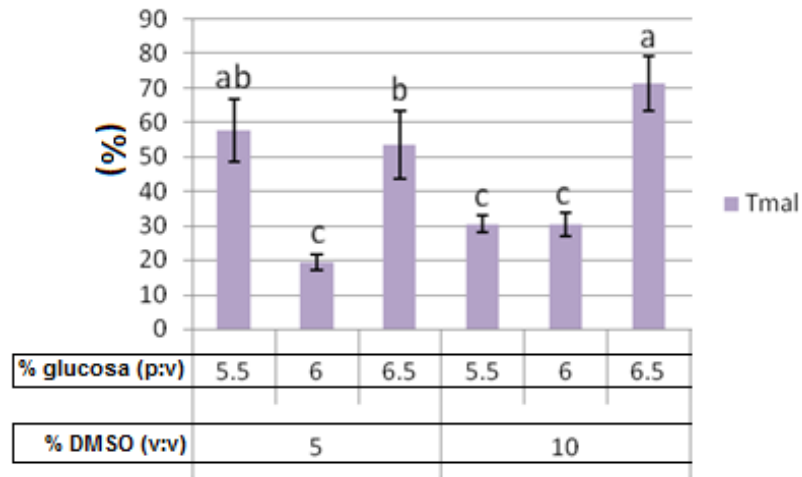


Figura 39. Porcentaje de larvas malformadas (Tmal) provenientes de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* crioconservados (n=3). Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

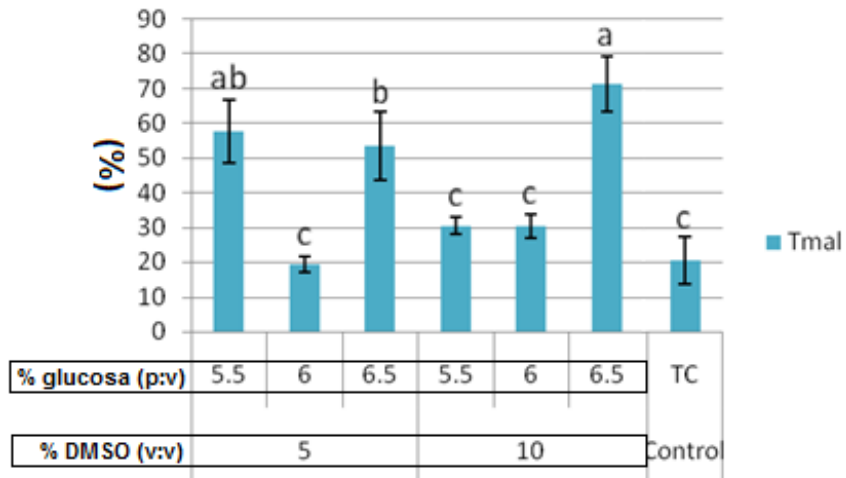


Figura 40. Porcentaje de larvas malformadas (Tmal) provenientes de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* crioconservados (n=3). Comparación múltiple entre semen fresco (TC) y tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%) y concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

La tasa de malformación larval (Tmal) tuvo variaciones que fueron dependientes de los diferentes tratamientos. Así, se determinó que para esta variable, la interacción de la concentración del crioprotector con la concentración de glucosa, afectó de forma altamente significativa ($p < 0.0001$) el porcentaje de aparición de malformación en larvas provenientes de células espermáticas congeladas. Así, se determinó que el efecto de la concentración del crioprotector sobre la malformación larval depende de a su vez de la variación de la concentración de glucosa, por tanto, la presencia conjunta de ambos factores es precisa para observar la presencia o no de malformación en larvas, como se presenta en la figura 39.

De otra forma, se halló que los tratamientos con mayor tasa de malformación de larvas de *P. magdalenae*, se dieron en aquellos provenientes de semen crioconservado con DMSO 10% - 6.5% glucosa ($71.26 \pm 1.93\%$) y DMSO 5% - 5.5% glucosa ($57.54 \pm 9.04\%$), sin encontrarse diferencias significativas entre ambos ($p > 0.05$). Así mismo, se estableció que los menores valores de malformación se daban cuando el semen posdescongelación provenía de tratamientos como DMSO 5% - 6% glucosa ($19.38 \pm 1.38\%$) y DMSO 6% - 5.5% glucosa o 6% glucosa ($30.56 \pm 1.57\%$, $30.36 \pm 1.29\%$, respectivamente para estos dos últimos tratamientos), sin establecerse diferencia significativa entre los tres ($p > 0.05$).

Igualmente se encontró que la malformación larval en tratamientos como DMSO 5% - 6% glucosa, DMSO 6% - 5.5% glucosa y DMSO 6% - 6% glucosa, era estadísticamente igual ($p > 0.05$) que en el grupo control (TC), donde los valores de malformación llegaron a $19.66 \pm 1.6\%$ (Figura 40).

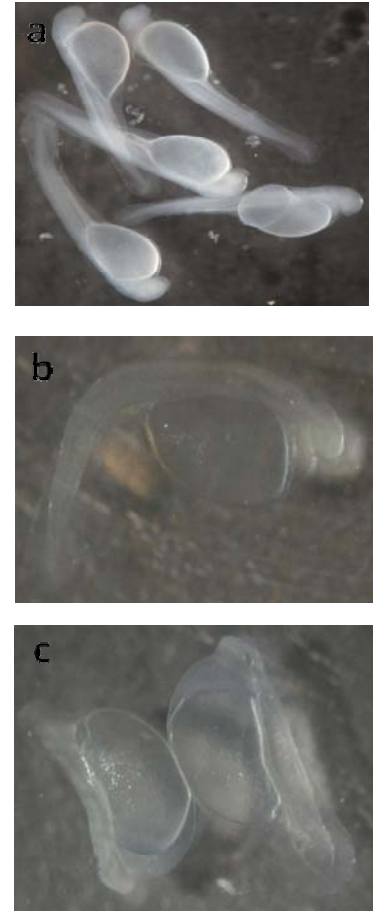


Figura 41. Malformación en larvas de bocachico *Prochilodus magdalenae*. **a:** Larvas normales provenientes de semen fresco. **b:** Larva con escoliosis proveniente de semen crioconservado y presente ocasionalmente en réplicas del fresco. **c:** Larvas con problemas de desarrollo embrionario como malformación de cabeza y cola.

6.6 OBJETIVO 5.

Determinar la existencia de relación entre la movilidad espermática, el daño en ADN y membrana citosólica, capacidad fertilizante y la eclosión en semen posdescongelado.

6.6.1 Correlación entre daños en ADN y Movilidad.

Tabla 10. Correlaciones entre los daños en ADN y algunas variables de movilidad espermática evaluadas en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. En todos los casos la confianza fue del 95% y nivel de significancia de 0.05.

(X)	(Y)	(r)	P	N
d-ADN	Ma	-0.2661	0.1284	27
	Mb	-0.5700	0.0022	27
	Mc	-0.1121	0.2888	27
	Md	0.1853	0.1775	27
	MT	-0.1854	0.1772	27
	VCL	-0.3887	0.0226	27
	VSL	-0.5200	0.0036	27
	Ti-Ac	-0.3208	0.0514	27

- **Ma:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida, **Mb:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad media, **Mc:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad lenta, **Md:** Inmóviles (%), **MT:** Movilidad total (%), **VCL:** Velocidad curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **VSL:** Velocidad lineal ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **Ti-Ac:** Tiempo de activación (seg.), **d-ADN:** Porcentaje de espermatozoides con daño en ADN.
- (X): Variable independiente.
- (Y): Variable dependiente.
- (r): coeficiente de correlación de Pearson.
- P: Valor de P que determina la significancia de la correlación.
- n: Número de observaciones.

Los daños en ADN presentaron correlaciones negativas y medianamente aceptables y estadísticamente significativas ($p < 0.05$) solo con algunas variables de movilidad (tabla 10) como Mb ($r = -0.5700$) y VSL ($r = -0.5200$), sin embargo no se estableció correlación significativa ($p > 0.05$ y $r < 0.5$) con variables como Ma, Mc, Md, MT, VCL y Ti-Ac.

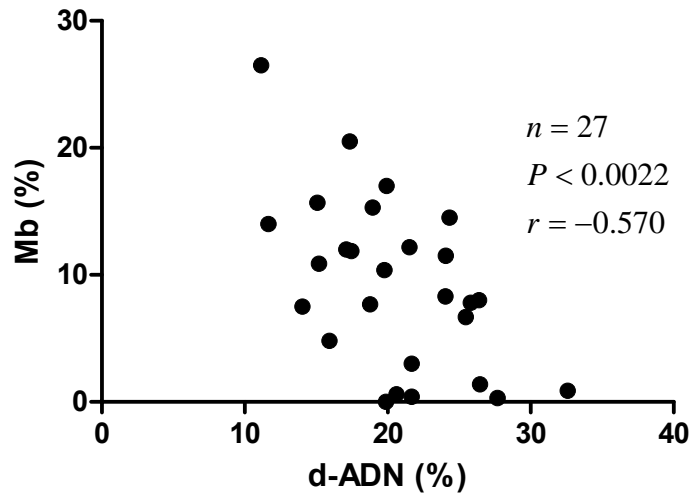


Figura 42. Correlación existente entre el porcentaje de espermatozoides con movilidad media (Mb) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* ($n=27$), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

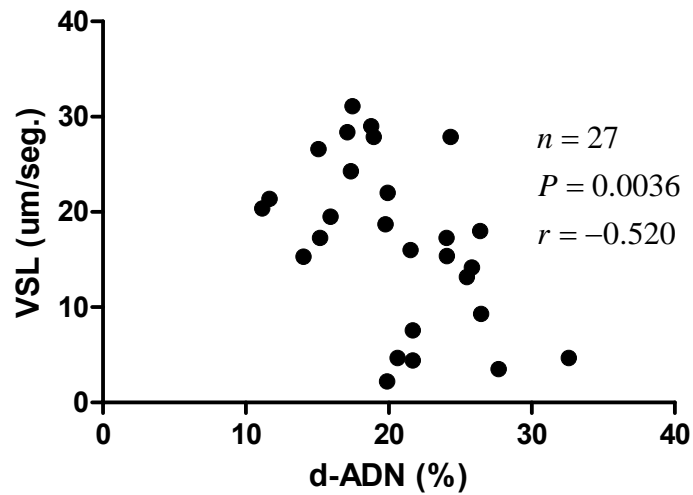


Figura 43. Correlación existente entre la velocidad curvilínea (VSL) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* ($n=27$), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

6.6.2 Correlación entre daños en ADN y Malformación larval.

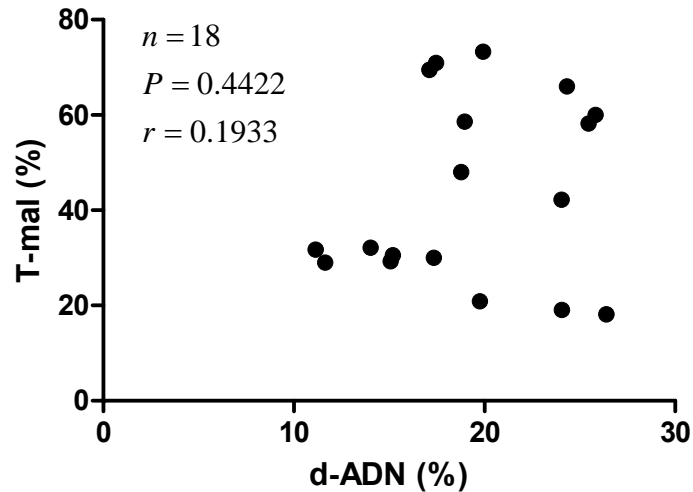


Figura 44. Correlación existente entre el porcentaje de malformación larval (T-mal) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=18), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

Para establecer la relación que pudiese tener los daños en a nivel de ADN y las malformaciones presentes en larvas, se estableció una correlación (Figura 44) para establecer el grado de la relación, encontrándose que no existe matemáticamente ningún indicio de relación entre estas variables, hallándose un coeficiente de correlación de Pearson de $r = 0.1933$ ($P = 0.4422$).

6.6.3 Correlación entre daños en ADN, fertilización y eclosión.

Tabla 11. Correlaciones entre el porcentaje de espermatozoides con daños en ADN, la tasa de fertilización y la tasa de eclosión, evaluadas en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. En todos los casos la confianza fue del 95% y nivel de significancia de 0.05.

(X)	(Y)	(r)	P	N
d-ADN	TF	-0.590	0.0085	27
	TE	-0.497	0.0070	27
TF	TE	0.9223	<0.0001	27

TF: Tasa de fertilización, **TE:** Tasa de eclosión, **d-ADN:** Porcentaje de espermatozoides con daños en ADN.

- (X): Variable independiente.
- (Y): Variable dependiente.
- (r): coeficiente de correlación de Pearson.
- P: Valor de P que determina la significancia de la correlación.
- n: Número de observaciones.

Los resultados de correlación entre el porcentaje de espermatozoides con daños en ADN (d-ADN) y la tasa de fertilización (TF), establecen la existencia de una relación aceptable ($r = -0.590$) y estadísticamente significativa ($P < 0.05$), no obstante, ésta correlación es negativa (Tabla 11), es decir, a un aumento del porcentaje de células con ADN fragmentado, hay una disminución de la TF. Sin embargo, este evento no ocurre cuando se intenta correlacionar el mismo daño en ADN con la tasa de eclosión, encontrándose un coeficiente de correlación $r = -0.497$).

Por otra parte, cuando se intentan relacionar la TF con la TE, se encuentra un coeficiente de correlación $r = 0.9223$, lo que demuestra una estrecha dependencia entre estas dos variables casi perfecta y altamente significativa ($P < 0.0001$). En este caso se diría que la relación es positiva. Así, a un incremento en la TF se ocasiona por tanto un aumento casi proporcional de los valores de eclosión larval.

6.6.4 Correlación entre daños en ADN y membrana.

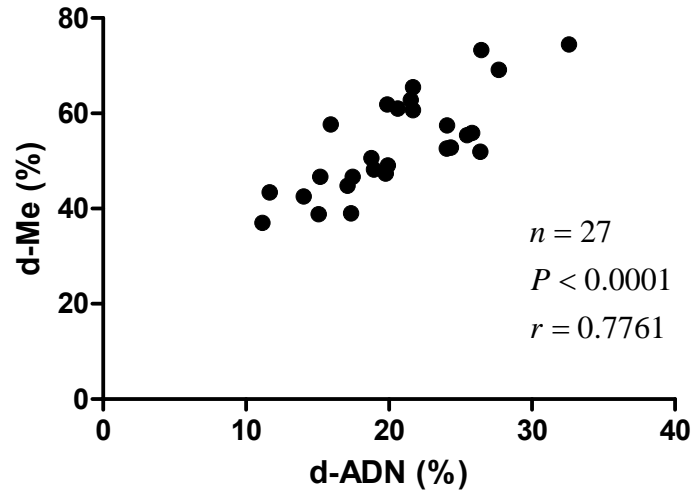


Figura 45. Correlación existente entre el porcentaje de espermatozoides con daño en membrana (d-Me) y el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) evaluado en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=27). Confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

En la Figura 45 se observa la existencia de una estrecha correlación entre el porcentaje de espermatozoides con daño en ADN (d-ADN) y el porcentaje de espermatozoides con daño en membrana (I-Me). Se determinó un coeficiente de correlación de Pearson de $r=0.7861$. La relación entre ambas variables es positiva, además altamente significativa $P<0.0001$, así, al parecer el incremento del porcentaje de daño en ADN se ve acompañado de la presencia y aumento de daños en la membrana plasmática de los espermatozoides. Esto es considerado cuando la muestra de semen sobre las que se miden estas variables es sometida a un mismo tratamiento de crioconservación.

6.6.5 Correlación entre movilidad espermática y capacidad fertilizante.

Tabla 12. Correlaciones entre las variables de movilidad espermática y la tasa de fertilización, evaluadas en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. En todos los casos la confianza fue del 95% y nivel de significancia de 0.05.

(X)	(Y)	R	P	n
Ma		0.8706	<0.0001	25
Mb		0.7925	<0.0001	27
Mc		0.4760	0.0121	27
Md	TF	-0.7681	<0.0001	26
MT		0.7688	<0.0001	26
VCL		0.8207	<0.0001	27
VSL		0.7633	<0.0001	27
Ti-Ac		0.8803	<0.0001	27

Ma: Porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida, **Mb:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad media, **Mc:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad lenta, **Md:** Inmóviles (%), **MT:** Movilidad total (%), **VCL:** Velocidad curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **VSL:** Velocidad lineal ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **Ti-Ac:** Tiempo de activación (seg.), **TF:** Tasa de Fertilización.

- (X): Variable independiente.
- (Y): Variable dependiente.
- (r): coeficiente de correlación de Pearson.
- P: Valor de P que determina la significancia de la correlación.
- n: Número de observaciones.

Se logró establecer la existencia de correlación entre variables de movilidad espermática y la capacidad fertilizante del mismo (tabla 12). Es el caso de la Ma ($r= -0.8706$), Mb ($r= 0.7925$), MT ($r=0.7688$), VCL ($r= 0.8207$), VSL ($r= 0.7633$) y Ti-Ac ($r= 0.8803$), con los cuales se estableció una correlación positiva y además altamente significativa ($P<0.0001$). Por el contrario, con variables como el porcentaje de Inmóviles (Md) se logra observar una correlación ($r= -0.7681$), sin embargo esta es negativa o inversa, así cuando se da un incremento en el porcentaje de Inmóviles, hay una disminución de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (TF). Del mismo modo, se observa que variables como la Mc no poseen correlación alguna con la tasa de fertilización.

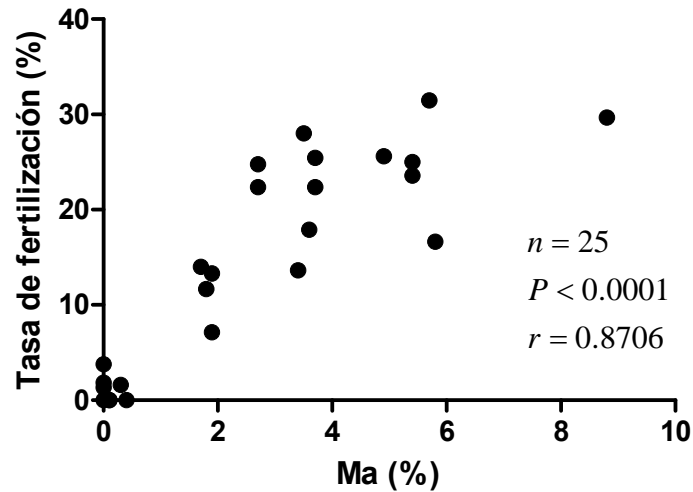


Figura 46. Correlación existente entre la tasa de fertilización y el porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida (Ma), evaluada en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=25), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

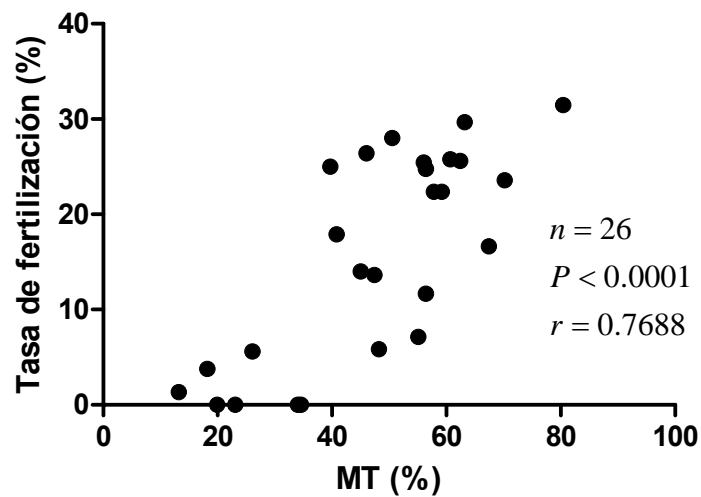


Figura 47. Correlación existente entre la tasa de fertilización y la movilidad total (%), evaluada en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=26), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

6.6.5.1 ¿Poseen o no capacidad fertilizante lo espermatozoides inmóviles?. ¿La pérdida de movilidad implica muerte celular?.

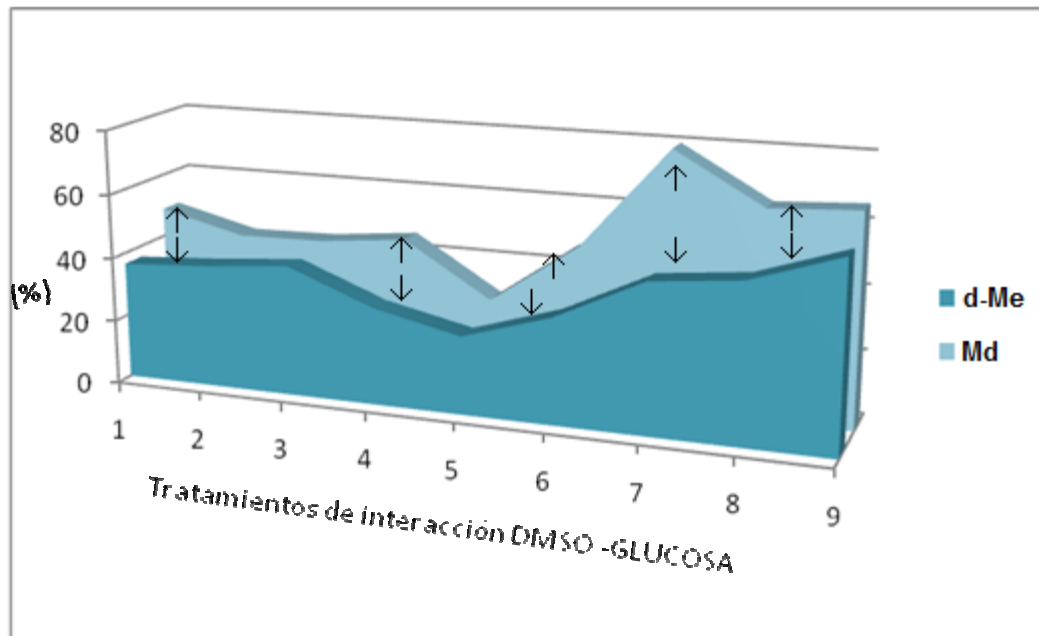


Figura 48. Comparación del porcentaje de espermatozoides muertos (d-Me) y el Porcentaje de células espermáticas Inmóviles de bocachico por cada uno de los 9 tratamientos de interacción DMSO – GLUCOSA posdescongelación (Eje x).

La Figura 48 muestra la relación existente entre el porcentaje de células espermáticas muertas (d-Me) y el porcentaje de Inmóviles (Md), observándose que espermatozoides inmovilizados son mayores que los muertos, por tanto no todos aquellos espermatozoides cuya movilidad ha sido inactivada han perdido su integridad vital o se encuentran muertos. Dicho porcentaje se encuentra dentro de la figura delimitado por las flechas de color negro. Sin embargo, existe cierta fracción de espermatozoides que han perdido su movilidad (Md) y que han muerto, lo que en general se presenta visiblemente en la gran mayoría de los inmovilizados.

6.6.6 Correlación entre daños en membrana y movilidad espermática.

Tabla 13. Correlaciones entre el porcentaje de espermatozoides con daños en Membrana (d-Me) y algunas variables de movilidad espermática en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

(X)	(Y)	R	P	n
d-Me	Ma	-0.7025	<0.0001	27
	Mb	-0.8129	<0.0001	27
	Mc	-0.3539	0.0701	27
	Md	0.6369	0.0004	27
	MT	-0.6369	0.0004	27
	VCL	-0.7609	<0.0001	27
	VSL	-0.7527	<0.0001	27
	Ti-Ac	-0.8084	<0.0001	27

- **Ma:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida, **Mb:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad media, **Mc:** Porcentaje de espermatozoides con movilidad lenta, **Md:** Inmóviles (%), **MT:** Movilidad total (%), **VCL:** Velocidad curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **VSL:** Velocidad lineal ($\mu\text{m}/\text{seg.}$), **Ti-Ac:** Tiempo de activación (seg.), **d-Me:** Daño en membrana.
- (X): Variable independiente.
- (Y): Variable dependiente.
- (r): coeficiente de correlación de Pearson.
- P: Valor de P que determina la significancia de la correlación.
- n: Número de observaciones.

Los resultados que se presentan en la tabla 13 evidencian la existencia de correlación entre los daños en membrana (d-Me) y variables como la Ma ($r = -0.7025$), Mb ($r = -0.8129$), MT ($r = -0.6369$), VCL ($r = -0.7609$), VSL ($r = -0.7527$), Ti-Ac ($r = -0.8084$), todas correlacionadas negativamente y de forma significativa ($P < 0.05$). Así también se presentan correlaciones positivas e igualmente importantes entre I-Me y Md ($r = 0.6369$) ($P < 0.05$). No en tanto, se observa la inexistencia de correlación entre la I-Me y la Mc, encontrándose un coeficiente de correlación de Pearson de $r = -0.3539$ ($P = 0.0701$).

6.6.7 Correlación entre daños en membrana y capacidad fertilizante.

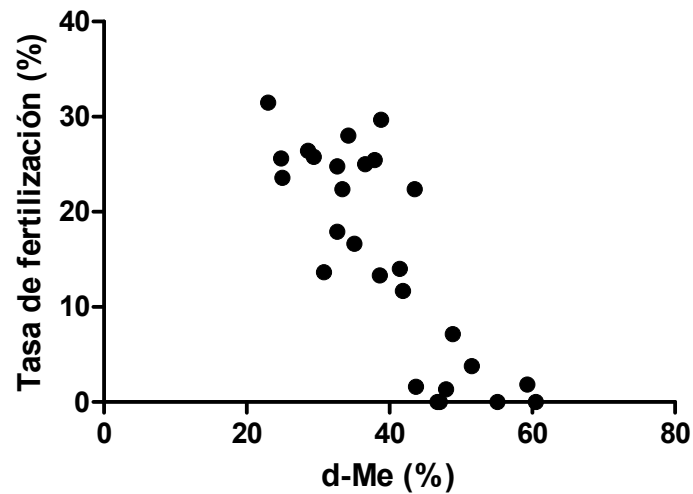


Figura 49. Correlación entre el porcentaje de células con daño en membrana (d-Me) y la tasa de Fertilización espermática (TF) evaluada en semen criopreservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* (n=27), confianza del 95% y nivel de significancia de 0.05.

La Figura 49 evidencia la estrecha relación existente entre los daños en membrana y la capacidad fertilizante del espermatozoide, presentándose un coeficiente de correlación ($r = -0.8289$) muy cercano a 1, lo que demuestra la dependencia de la tasa de fertilización (TF) por la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. A un mayor daño de la membrana hay una disminución sustancial de la tasa de fertilización, por lo que la relación entre ambas variables es denominada de negativa y además altamente significativa ($P < 0.0001$).

7. DISCUSIÓN

7.1 Efectos de los tratamientos sobre la movilidad espermática

En el conjunto de tratamientos bajo la concentración de DMSO 5%, se observa una disminución progresiva de la Movilidad rápida (Ma) desde 5.5% glucosa hasta 6.5%. Esto probablemente esté asociado a la fuerza osmótica que posea el crioprotector (la cual depende de su concentración, en este caso la más baja) en el seno del diluyente para difundir a través de membrana por gradiente de concentración, además de la disposición (contraída o distensionada) de permeabilidad de la bicapa fosfolipídica (dependiente de las concentraciones de la glucosa) para permitir o dificultar dicha entrada del crioprotector. Así, la mala conjugación de estos factores puede hacer insuficiente la protección de la célula espermática por parte del crioprotector (Muchlisin, 2004) (ver figura 46). Esto se evidencia cuando se presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos cuyas dos concentraciones de glucosa son extremas, es decir, entre 5.5% y 6.5% de glucosa (figura 5), ambas bajo la concentración de DMSO al 5%; mostrándonos el efecto lesivo para la célula al que puede llegar un medio hiperosmótico (6.5% glucosa=385 mOsm/kg) con respecto al plasma (349 ± 9.1 mOsm/kg) sin la adecuada concentración (fuerza osmótica) de un crioprotector (Daly *et al.*, 2008).

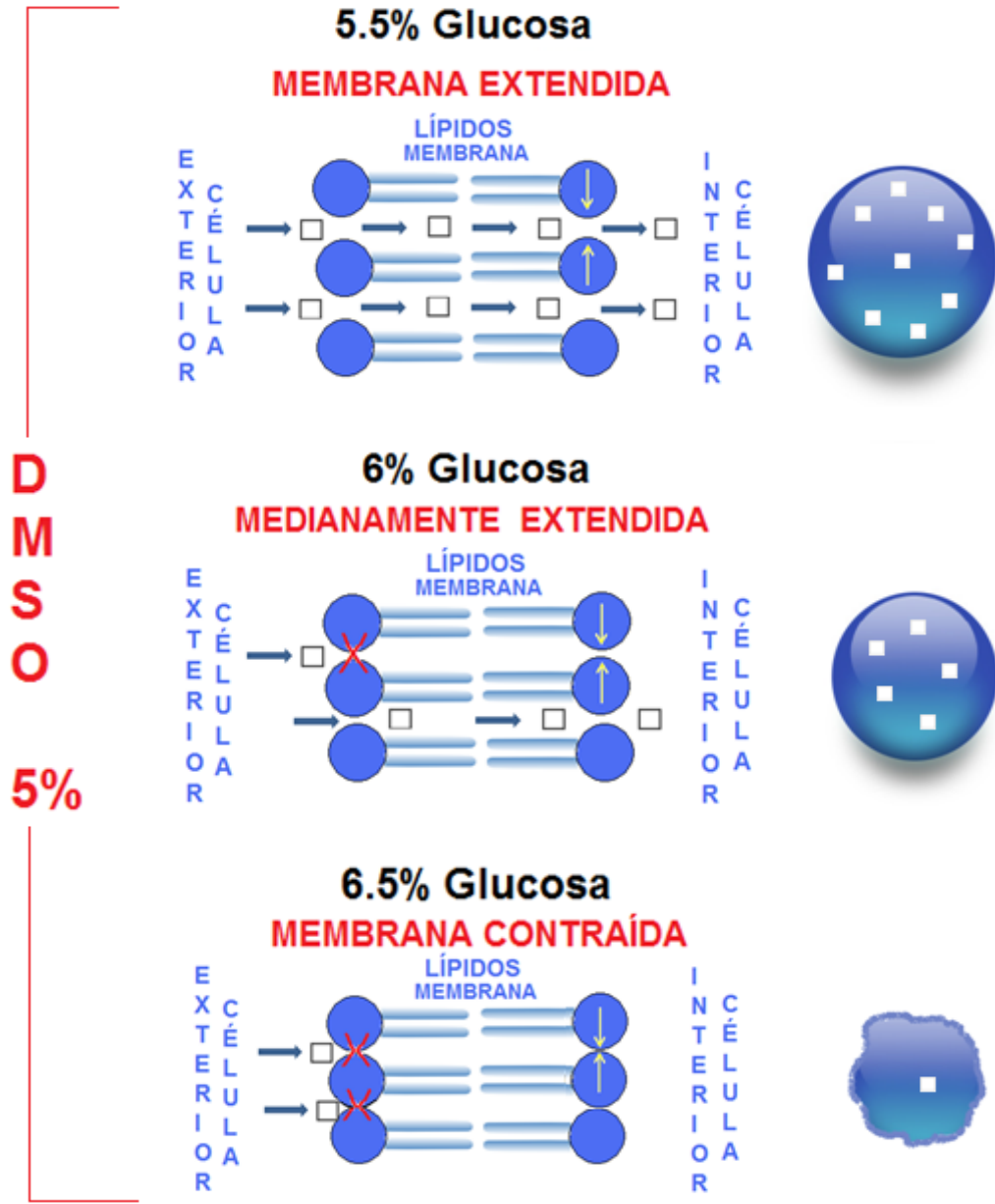
La entrada del crioprotector al interior de la célula es importante, sin embargo cuando éste no puede hacerlo en la cantidad adecuada, se causan graves efectos para la célula durante de la congelación (Taddei *et al.*, 2001; Viveiros *et al.*, 2001). De hecho, autores como Chao, (1991) reportan que muy pocos espermatozoides sobreviven en bajas temperaturas sin crioprotector, debido a la formación de cristales de hielo que causaron daño a la célula.

Hipotéticamente se puede pensar que la salida del agua a causa de la hiperosmolaridad generada por la glucosa, puede ser un evento que se lleve a cabo primero, y luego la entrada del crioprotector, el cual, como cualquier soluto, si no posee la fuerza osmótica necesaria que impulse su difusión, no conseguirá entrar (Bolsover, *et al.*, 2004), sumándose a su vez, la barrera que podría generar la contracción excesiva que sufre la membrana y por tanto entre lípidos, disminuyendo la porosidad y la permeabilidad de la misma, tal y como se menciona en la figura 50. Por el contrario, cuando la célula yace en un medio hiposmótico (5.5%), es posible que la membrana en cambio no esté contraída sino extendida, por tanto el grado de cohesión interlipídica sea menor, permitiendo el aumento de la permeabilidad de la membrana, con lo que se ve favorecida la entrada del crioprotector (DMSO 5%) aunque este no posea una fuerza osmótica apropiada para difundir; pero que se ve compensado por la mínima resistencia

interpuesta por la membrana espermática dado su grado de distensión. Esto entonces provoca una entrada del crioprotector en la cantidad correcta para proteger la célula en el proceso de congelación y descongelación (Muchlisin, 2005). Por otra parte, un medio casi isosmótico para la célula (DMSO 6%) puede mantener la membrana en su estado natural, por lo que su resistencia al paso del crioprotector tampoco ofrece gran oposición que anule la fuerza osmótica que permite la entrada del crioprotector al citosol para cumplir con su función, manteniendo (aunque en un grado menor que glucosa 5.5%) la protección del espermatozoide.

Por el contrario, cuando la concentración de DMSO es el doble (10%), comienza a verse un efecto de interacción más fuerte que en el anterior grupo de tratamientos (5% DMSO); no encontrándose diferencia estadística entre los tratamientos ($p > 0.05$), por lo que podría pensarse que la concentración de DMSO tuvo un mayor efecto en este caso, posiblemente el aumento de su concentración repercutió positivamente en el incremento de su fuerza osmótica para difundir a través de membrana, superando la barrera que pudiese imponer la osmolaridad del diluyente sobre la fluidez de la membrana, incluso cuando más contraída pudo haberse mantenido (6.5% glucosa). Sin embargo, el tratamiento DMSO 10% - 5.5% glucosa, si bien no es estadísticamente diferente ($p > 0.05$) de DMSO 10% - 6% glucosa y DMSO 10% - 6.5% glucosa, es matemáticamente más bajo que estos dos últimos. Es probable que la alta distensión de la membrana originada por la hiposmolaridad causase un efecto parecido a lo que sucedió en el tratamiento DMSO 5% - 5.5% glucosa, en donde se sugirió que la baja cohesión interlipídica permitía mayor permeabilidad de la membrana al crioprotector DMSO, con la diferencia que en este caso la fuerza osmótica originada por la concentración del crioprotector (10%) fue mayor (probablemente el doble), facilitando la entrada del mismo pero posiblemente de forma levemente excesiva, lo que a la postre pudo ocasionar un detrimento de los valores de M_a durante la congelación y descongelación (figura 51).

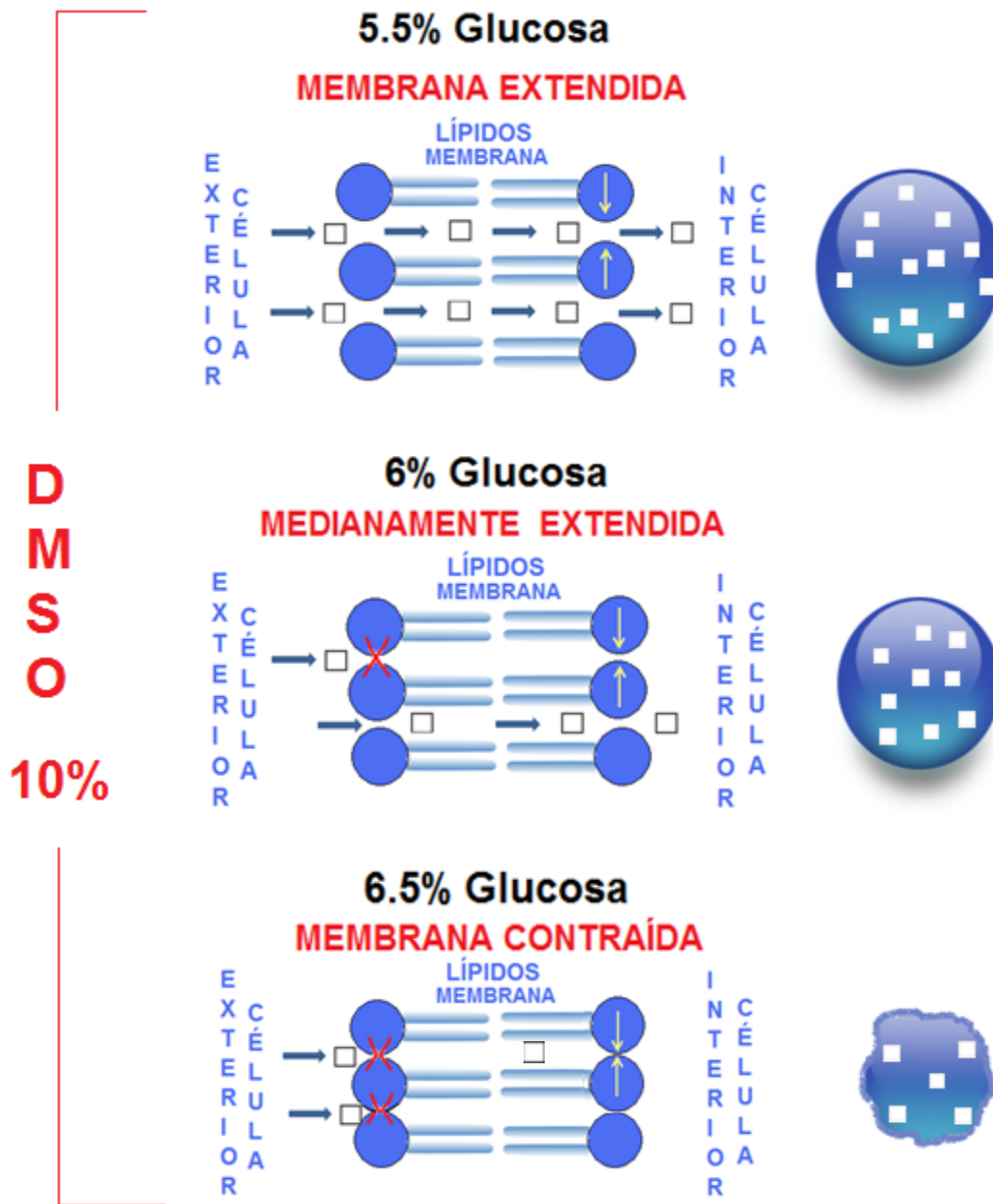
No obstante, cuando la concentración del crioprotector incrementó de 10% a 15%, la disminución de la M_a fue extrema y casi nula en general para todas las concentraciones de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). La misma hipótesis se sostiene en este caso, en donde al parecer dicho incremento de la concentración aumentó también la fuerza osmótica del crioprotector (el triple que grupo de tratamientos DMSO 5%), lo cual pudo haber facilitado un mayor la entrada del crioprotector en mayor flujo al interior de la célula, sin la menor oposición del grado de distensión de la bicapa originado por la concentración de glucosa. Es posible que en este caso la difusión a través de membrana sea obviamente excesiva para todos los tratamientos, causando toxicidad al espermatozoide en vez de protección durante la congelación (figura 52).



□ : Crioprotector.

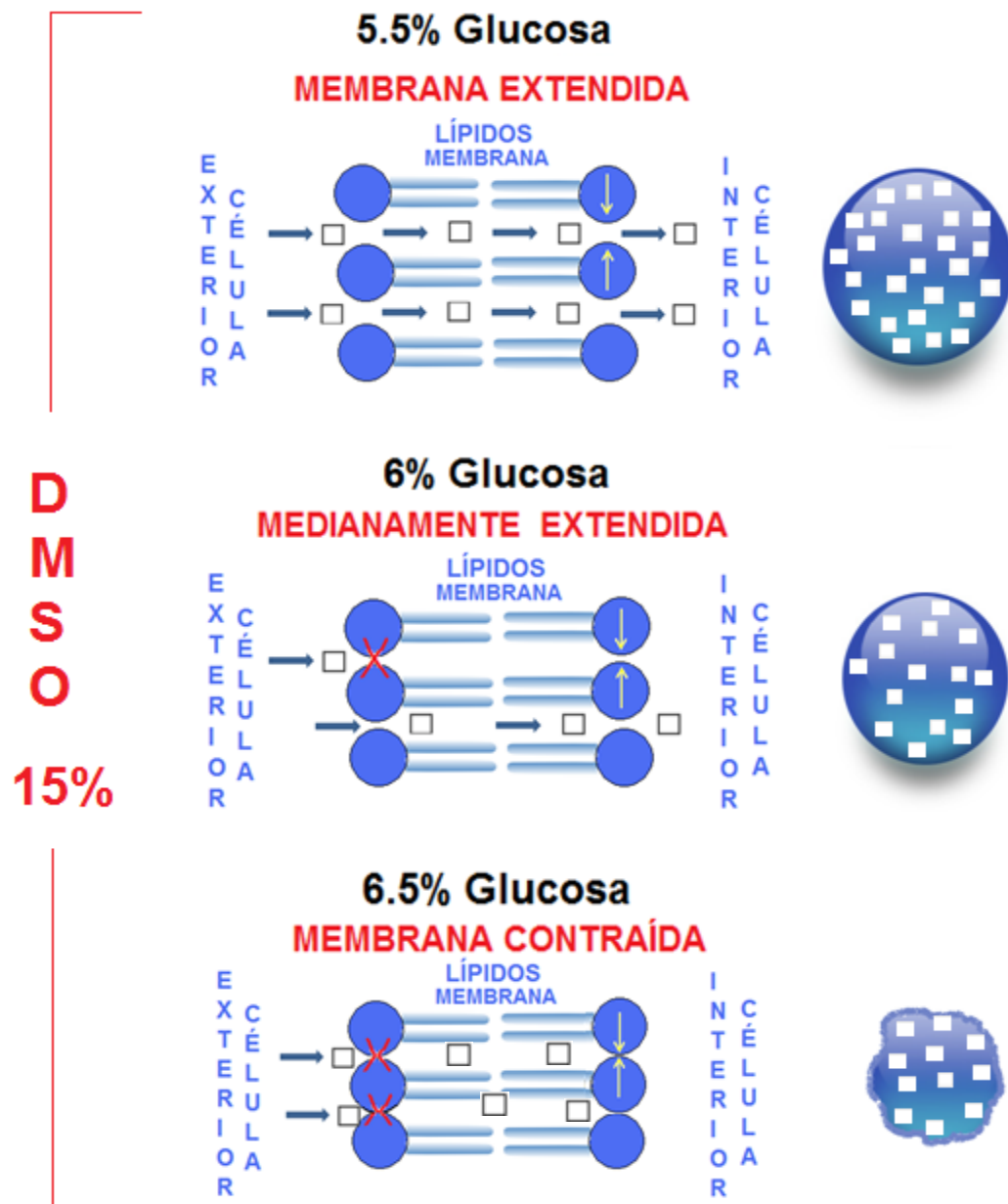
DMSO 5%: Dimetilsulfóxido a una concentración del 5%.

Figura 50. Hipótesis de daño celular provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (5%) y la concentración de la glucosa (5.5%. 6% y 6.5%) en el diluyente.



DMSO 5%: Dimetilsulfóxido a una concentración del 5%.

Figura 51. Hipótesis de daño celular provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (10%) y la concentración de la glucosa (5.5%, 6% y 6.5%) en el diluyente.



□ Crioprotector.

DMSO 5%: Dimetilsulfóxido a una concentración del 5%.

Figura 52. Hipótesis de daño celular provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (15%) y la concentración de la glucosa (5.5%, 6% y 6.5%) en el diluyente.

De forma similar se reportan estos eventos de disminución de la movilidad para otras especies. El DMSO se mostró tóxico a altas concentraciones en semen de *Lates calcarifer* en donde la movilidad posdescongelación se redujo cuando la concentración de DMSO fue mayor al 5% (Leung, 1987), evento que ocurrió igualmente en *Mycteroperca bonaci* cuando la concentración se incrementó 30% (Gwo, 1993). Casos similares de disminución de la movilidad espermática se han presentado en semen posdescongelación al utilizar este crioprotector en *Sparus aurata* (Cabrita *et al.*, 2005) y *Epinephilus marginatus* (Cabrita *et al.*, 2009), incluso en algunos caraciformes como *Prochilodus lineatus* (Viveiros *et al.*, 2009) y en *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas *et al.*, 2004) cuando la concentración DMSO también llegó a 15%. Es entonces claro hasta ahora decir que definitivamente los daños en la célula espermática que hacen sucumbir la calidad móvil del espermatozoide pueden ser originados por la toxicidad del crioprotector (por su exceso) o la no presencia de este (por defecto) en el interior de la célula, lo que desencadenó una vulnerabilidad ante los procesos de nucleación (Zachariassen, 2000).

El patrón de comportamiento que exhibe la Movilidad rápida (figura 53) en respuesta a los tratamientos de interacción entre la concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%) y la concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%), es el mismo que muestran otras variables móviles espermáticas bajo estos mismos tratamientos. Tales variables son: movilidad media (Mb), velocidad curvilínea (VCL) y velocidad en línea recta (VSL), en donde también los máximos valores reportados son en el primer tratamiento (DMSO 5% - 5.5% glucosa) y en los tratamientos cinco y seis: DMSO 10% - 6% glucosa, DMSO 10% - 6.5% glucosa; y los mínimos valores se reportan en los tratamientos bajo la concentración 15% DMSO. Es apenas lógico el comportamiento similar que muestran estas variables considerando la alta correlación positiva ($r > 0.9$) entre ellas (resultado no publicado en este trabajo). Esto se explica puesto que a mayor porcentaje de células espermáticas con movilidad rápida y movilidad media, mayor será la velocidad (VCL y VSL) con la que se están desplazando estos espermatozoides para poder clasificarse en este rango de movilidad.

Una característica importante de las células espermáticas de bocachico *P. magdalenae*, es que permanecen inmóviles en glucosa al 6% (Martínez *et al.*, 2009c), una solución ligeramente isosmótica con respecto a la osmolaridad del plasma seminal de la especie (347 ± 9.1 mOsm/kg).

En general, la movilidad total (MT) siempre mostró los máximos valores bajo el tratamiento DMSO 10% - 6% glucosa y DMSO 5% - 6% glucosa, sin haber diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$). Esto se corrobora i) con los porcentajes de espermatozoides Inmóviles (Md), los cuales alcanzan los menores valores en estos dos mismos tratamientos ($p > 0.05$) y ii) con el tiempo de activación (Ti-Ac), el cual tuvo también, al igual que la MT, los máximos valores en los tratamientos

DMSO 5% - 6% glucosa y DMSO 10% - 6% glucosa . Es posible pensar que bajo esta única concentración de glucosa, que además de conservar a la célula en un estado cercano al natural (estable), permite mantener los lípidos de membrana en un punto de cohesión neutro, garantizando la entrada del crioprotector en un rango que no le es tóxico y que además garantiza en gran medida la protección de la misma célula durante la congelación y la descongelación; permitiéndole recuperar sus funciones móviles en un mayor grado de lo que bajo otras osmolaridades. Resultados como estos, donde la isosmolaridad del diluyente con respecto al plasma poseen una mejor efectividad, también se encontraron en peces de agua dulce como *Machullochella pelli pelli* (Daly *et al.*, 2008), en el cual el diluyente isosmótico (300 mOsm/kg – Sorbitol en vez de glucosa) con respecto al plasma, otorgaba la mayor movilidad total (MT) posdescongelación, utilizando como crioprotector metanol al 10% (51.4% de MT), lo cual es menor que la encontrada en el presente trabajo para *P. magdalenae* (71±9.02%, sin diferencia estadística con respecto del semen fresco $p>0.05$). No en tanto, bajo el mismo experimento, aquellos tratamientos cuya osmolaridad era hipertónica (600 y 900 mOsm/kg), vieron siempre disminuida su movilidad total, sin importar incluso el tipo o la concentración de crioprotectores como Dimetilacetamida, DMSO, Glicerol o el mismo Metanol, quien había resultado efectivo en otras circunstancias de osmolaridad (isosmótica).

Diluyentes con osmolaridades extracelulares isosmóticas han sido utilizados con éxito también en especies como *Oncorhynchus gilae* (453 mOsm/kg – 9% DMSO - 23% de MT) (Fuller y Carmichael, 2007), *Brycon amazonicus* (320 mOsm/kg – 10% DMSO – 68% de MT) (Cruz-Casallas *et al.*, 2004), *Paralichthys orbignyanus* (335 mOsm/kg – 10% DMSO – 40% < MT<63%) (Ceccon-Lanes *et al.*, 2008).

Sin embargo, en algunas circunstancias no sólo basta con el aporte que pueda hacer la isosmolaridad extracelular a la estabilidad de la célula, como por ejemplo, cuando el crioprotector interno es excesivo. Algunos autores mencionan no sólo que el aumento de la concentración del crioprotector es causante del daño por toxicidad, sino que este también puede generar desplazamiento de agua interna, por lo que su exceso puede incrementar el daño espermático, resultando lesivo para la membrana por posible deshidratación excesiva, tal cual pudo ocurrir en los tratamientos bajo la concentración 15% DMSO (MT< 35%). Así, en experimentos de crioconservación espermática de especies de esturiones, Horváth *et al.* (2005) encontraron que el DMSO incrementaba la osmolaridad del diluyente, mientras que crioprotectores como el metanol no tenían ningún efecto significativo sobre esta. Del mismo modo, Ogier De Baulny *et al.* (1997) determinaron que tanto el DMSO como la Dimetilacetamida incrementaban la osmolaridad de los diluyentes.

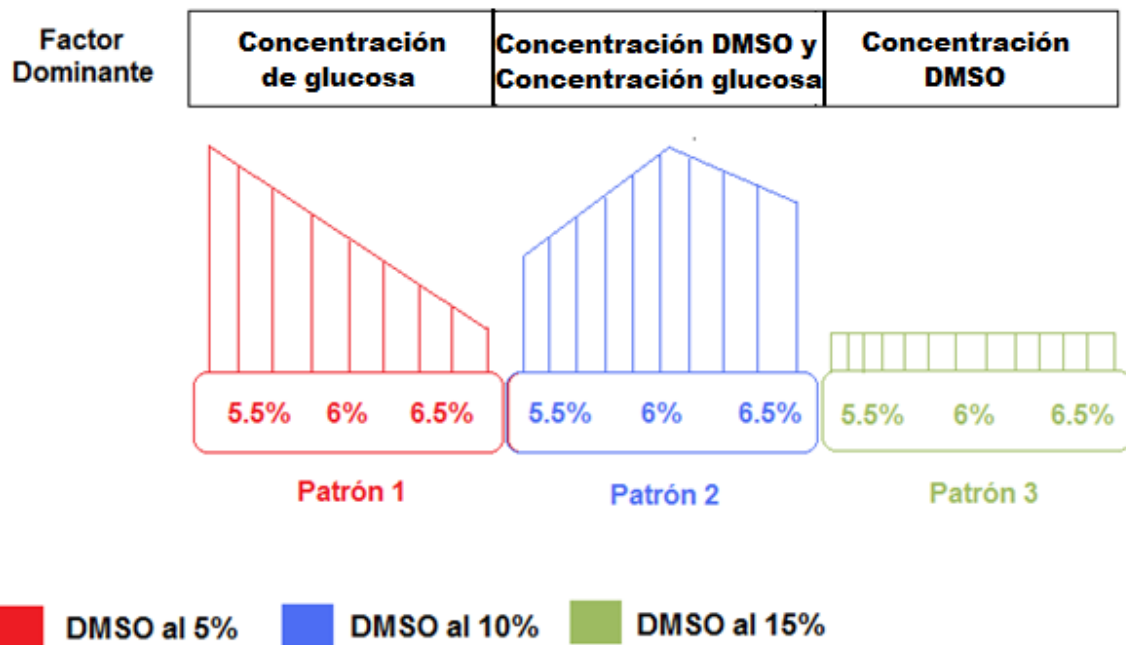


Figura 53. Modelo de comportamiento general para las variables Ma, Mb, VCL y VSL en células espermáticas de *Prochilodus magdalenae* posdescongelación, provocado por la interacción entre la concentración del crioprotector (5%, 10%, 15%) y la concentración de glucosa (5.5%, 6% y 6.5%).

Es claro que tanto la concentración del crioprotector como la concentración de glucosa afectan de forma simultánea o separada a la movilidad espermática, sin embargo el mecanismo celular por el cual se causa dicha disminución o nulidad no es claro. La movilidad ha sido considerada uno de los principales parámetros de calidad espermática (Rurangwa *et al.*, 2004), siendo un estimador de calidad integrador al combinar varios componentes celulares responsables de la activación y sostenibilidad del movimiento progresivo del espermatozoide (Bobe y Labbé, 2009). Cualquiera que sea el efecto de la crioconservación, el mecanismo por el cual se disminuye la capacidad móvil del espermatozoide puede estar relacionada con i) membrana citosólica ii) disponibilidad de ATP o iii) Integridad de ADN (Martínez y Pardo, 2010).

i) *Membrana citosólica*: La activación espermática en peces es variable, y puede depender de la presencia extracelular de iones como Na^+ , Ca^{2+} o K^+ (krasnai *et al.*, 2000; Alavi y Cosson, 2006), y en algunos casos, de los cambios en la osmolaridad extracelular no necesariamente por iones (Ciereszko *et al.*, 2000). Martínez *et al.* (2009c), determinaron que para bocachico *P. magdalenae* no era necesaria la presencia de iones en el medio extracelular para originar la activación

espermática, al encontrar que soluciones como agua desionizada (0 mOsm/kg) podían generar el inicio de la actividad móvil espermática. El modelo general de activación espermática para peces de agua dulce, menciona el fenómeno de choque hiposmótico, originado una vez la célula entra en contacto con el agua, lo cual obliga a la salida de iones desde la célula hacia el medio extracelular y entrada de otros cationes, además de agua, por medio de canales iónicos y posiblemente acuaporinas, respectivamente, lo cual en consecuencia genera una hiperpolarización de la membrana (Tanimoto *et al.*, 1994), generación de voltaje y finalmente, la síntesis de segundos mensajeros como el AMPc, acoplada a la activación de la enzima membranal: Adenilato Ciclasa (Morisawa e Ishida, 1987). Es notable entonces la importancia de la membrana plasmática en la ruta de activación de la movilidad espermática como portadora de las principales proteínas que dan inicio a las señales transduccionales en este proceso (canales iónicos y adenilato ciclasa). Así, posibles daños en la membrana provocados por la crioconservación (**véase Efectos de los tratamientos sobre los daños en ADN y membrana espermática**) pueden estar relacionados, en el caso de *P. magdalenae*, con disminuciones en la movilidad. La anterior hipótesis se corrobora cuando se evaluó la existencia de correlación entre el daño en Membrana (d-Me) y las variables móviles, encontrándose correlaciones de $r = -0.7025$ con la Ma, $r = -0.8129$ con la Mb, $r = 0.6369$ con la Md, $r = -0.6369$ con la MT, $r = -0.7609$ con la VCL, $r = -0.7527$ con la VSL y $r = -0.8084$ con el TiAc. No obstante, la disminución o incremento de la sostenibilidad de la activación espermática y en general de las características móviles podría estar relacionado con otro factor diferente a la membrana, posiblemente, la disponibilidad de ATP.

ii) *ATP*: De la disponibilidad de ATP depende la detención o prolongación de la movilidad espermática (Dreanno *et al.*, 1999), incluso en teleósteos la movilidad es interrumpida cuando la reserva de ATP se ha consumido entre un 50% y 80% (Billard *et al.*, 1995). Esto es así porque se constituye en la molécula energética por excelencia en eucariotas (Andersson *et al.*, 2002).

El inicio de la activación espermática en peces implica una constante fosforilación desde nucleótidos como el ATP (Hayashi *et al.*, 1987), incluso durante el mantenimiento de todo el proceso de movilidad, como en el caso de la fosforilación de la cadena ligera del brazo externo de la Dineína por parte de la PKA (Proteína Kinasa A) (Inaba, 2007), la cual ha sido activada por el AMPc. La Dineína se encuentra formando un complejo con cada uno de los pares de microtúbulos del axonema flagelar, cumpliendo actividades de trabajo, fuerza y deslizamiento sobre los microtúbulos para generar la movilidad, debiendo obtener la energía a partir de su propia capacidad hidrolítica del ATP durante este proceso, por lo que se le conoce a esta proteína como Dineína-ATPasa (Gibbons, 1989).

Algunas hipótesis plantean la posibilidad que los crioprotectores interactúen directamente con las reservas de ATP, inestabilizando la molécula energética y

disminuyendo su concentración en la célula. Así, He y Woods (2004) en *Morone saxatilis*, encontraron que el nivel de ATP precongelación disminuyó considerablemente cuando el DMSO entró en contacto con las células espermáticas, y que adicionalmente, el descenso en su concentración se vio aún más acentuado después de la congelación. De la misma forma Cabrita *et al.* (2005) en experimentos con *Sparus aurata*, determinaron una disminución de ATP del 53.6% en semen posdescongelación comparado con el semen fresco, resultado que se correlacionó con una marcada disminución de la capacidad móvil de los espermatozoides. Aunque en *P. magdalenae* no se midieron niveles de ATP intracelular, considerando la relación que se presenta entre ATP y capacidad móvil; es posible decir que los anteriores resultados concuerdan con lo observado en el presente experimento para *Prochilodus magdalenae* en relación a la variable Ti-Ac, en donde se encontró diferencias significativas entre el tiempo de activación (Ti-AC) del semen fresco precongelación (TC) y todos los tratamientos del semen congelado ($p < 0.05$), demostrando que la crioconservación, donde también se utilizó DMSO como crioprotector, puede hipotéticamente estar generando también una disminución de ATP y por tanto una disminución de los tiempos de activación de estos espermatozoides con respecto al semen fresco precongelación. También se observa el grado de toxicidad del crioprotector DMSO en los tratamientos donde su concentración alcanzó el 15%, generando movilidades de cero (0) segundos, siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) de los tratamientos en donde era menor su concentración.

iii) *Integridad de ADN*: Durante la crioconservación se pueden originar dos tipos de daños a la mitocondria que afectarían la movilidad: un daño directo que se ocasiona a su ADN y/o a su membrana, y uno indirecto provocado por la fragmentación del ADN nuclear, del que puede depender la mitocondria para abastecerse de algunas proteínas que no codifica su genoma (Kurland y Andersson, 2000).

Durante la crioconservación de semen en *Polyodon spathula* se originaron daños a nivel de ADN nuclear, provocando una marcada disminución de la movilidad espermática posdescongelación, aparentemente causados cuando la osmolaridad del diluyente y la concentración del crioprotector fueron inadecuados (Li *et al.*, 2008). En trabajos realizados por Irvine *et al.* (2000) se estableció que semen con alto grado de daño en ADN posee baja movilidad, mientras que Li *et al.* (2008) detectaron una marcada disminución de la velocidad. Es posible que el ADN del que se habla en estos casos sea nuclear, el cual desempeña funciones importantes en la codificación de proteínas necesarias para la mitocondria en la cadena respiratoria (Cooper, 1997), pues en las células animales la mitocondria sólo posee ADN que codifica, en su mayoría, para proteínas de la respiración aeróbica celular que da lugar a la producción de ATP. Estas son por ejemplo las citocromo oxidasa (b y c) y el complejo ATP-sintasa, entre otras proteínas de importancia (Andersson *et al.*, 2003), sin embargo la mitocondria depende del

ADN nuclear para la importación de otras proteínas que le permiten desempeñar su función energética, estas son, por mencionar algunas, la ADN polimerasa, que participa en la replicación del genoma mitocondrial, ARN polimerasa, que participa en la transcripción de genes, las enzimas del ciclo de Krebs, el ciclo de la úrea y gran cantidad de las proteínas de la membrana mitocondrial interna (Cooper, 1997). Considerando que el proceso de respiración espermática es importante durante la movilidad para llevar a cabo los procesos de fosforilación oxidativa (Kopeika *et al.*, 1997) que se dan en la mitocondria y que da lugar a la síntesis de ATP, puede suponerse que los daños que se ocasionan al ADN por la crioconservación, bien sea mitocondrial o especialmente el nuclear, podrían afectar la síntesis de proteínas involucradas en la producción energética celular, causando la disminución de la movilidad espermática y la velocidad. Durante la crioconservación de semen de lamprea, se demostró una disminución marcada de la movilidad espermática conforme aumentaba la fragmentación de su ADN cuando el semen era almacenado a bajas temperaturas (Ciereszko *et al.*, 2005).

Al igual que en los anteriores casos, en *P. magdalanae* se observaron algunas correlaciones inversas entre algunas variables móviles y los daños en ADN. Así por ejemplo, conforme se incrementaban los daños en ADN, se encontró que disminuían variables como VSL ($r = -0.5700$) y Mb ($r = -0.5200$).

Por otra parte, también se afirma por parte de otros autores que la crioconservación es responsable de la disminución de la actividad de proteínas como isocitrato deshidrogenasa, Malato deshidrogenasa Kinasa, r-lactato deshidrogenasa y ATPasa, al encontrarse en menor concentración en tratamientos posdescongelación que en semen fresco de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner *et al.*, 1996). Se sabe que todas estas proteínas están relacionadas con la cadena respiratoria espermática que da lugar a la producción de energía para el desarrollo de la movilidad espermática, por lo que su mengua pudiera relacionarse también con la disminución de la capacidad móvil del espermatozoide posdescongelación.

7.2 Efectos de los tratamientos sobre la Integridad de ADN y membrana espermática.

Nótese en la figura 23 (daños de ADN) que los tratamientos cuya fragmentación de ADN se presentó en mayor porcentaje de células, fueron DMSO 15% - 6.5% glucosa, DMSO 5% - 6.5% glucosa y DMSO 5% - 6% glucosa, incluso sin existir diferencias estadísticas entre ellos ($p > 0.05$), obteniéndose respectivamente, valores de $28.91 \pm 3.2\%$, $25.1 \pm 0.93\%$ y $23.4 \pm 3.36\%$.

Miskolczi *et al.* (2005) mencionan dos posibles factores por los cuales se puede generar el daño en ADN espermático durante la crioconservación: i) Daño directo al genoma del espermatozoide por especies de oxígeno reactivo liberadas desde las células muertas o dañadas durante la congelación o la descongelación (Labbé *et al.*, 2001); ii) Daño directo al genoma espermático por el posible desarrollo de hielo intracelular, el cual puede actuar de forma similar a la radiación gamma sobre la fragmentación del ADN.

Es posible que para los tratamientos DMSO 5% - 6% glucosa y DMSO 5% - 6.5% glucosa, la hipótesis anteriormente planteada (ver figura 50) sobre la interacción permeabilidad de membrana y fuerza osmótica del crioprotector para difundir, podría explicar el fenómeno de fragmentación genómica acentuada en estos casos. Así, es posible que en células de estos tratamientos la entrada del crioprotector fuera mínima al interior de la célula debido a dos factores: i) La alta osmolaridad del diluyente (6% y 6.5%) produjo en la membrana un alto grado de cohesión entre lípidos, al hacer perder parte del agua por deshidratación, oponiendo algo de resistencia al paso de sustancias como el crioprotector; ii) considerando que la fuerza osmótica de toda sustancia depende de su concentración en el seno de una solución (Bolsover *et al.*, 2004), la fuerza osmótica del DMSO al 5% no era, comparada con DMSO al 10% y 15%, lo suficientemente alta para difundir en gran cantidad al interior de la célula, sumado a ello la resistencia que ofrecía la membrana dado el grado de cohesión interlipídica bajo estas concentraciones de glucosa.

Dado el anterior análisis, es posible que los altos niveles de fragmentación se hayan generado debido a la desprotección que originó la baja presencia del crioprotector al interior de la célula. Protección ante la presunta formación de radicales libres de oxígeno (antioxidante) o protección contra la formación de cristales de hielo (disminución del punto de congelación). Y es que la presencia del crioprotector durante la crioconservación espermática es fundamental para inhibir la fragmentación del ADN. Así, cuando durante la crioconservación de células espermáticas de *Dicentrarchus labrax* se dejó de adicionar DMSO al 10%, el incremento de la fragmentación de ADN fue casi el doble con respecto a aquellos tratamientos donde sí fue adicionado DMSO (Zilli *et al.*, 2003). Christensen y Tiersch, (1997) además anota que cuando la crioconservación de

células espermáticas de *O. mykiss* fue realizada sólo con el diluyente y en ausencia del crioprotector el daño llega a casi el 99% de las células.

La exposición del ADN al estrés oxidativo origina más de 20 diferentes tipos de daños en las bases, produciendo bases nitrogenadas oxidadas y rompimiento de los anillos nitrogenados de las mismas (Slupphaug *et al.*, 2003). Las especies de oxígeno reactivo producidas de forma endógena o exógena, pueden atacar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos simultáneamente en la célula viva. Así, en el ADN nuclear y mitocondrial, 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), un nucleósido oxidado de ADN, es el metabolito más frecuentemente detectado y estudiado en las lesiones de ADN (Wu *et al.*, 2004). En espermatozoides humanos, se evaluó el efecto de la crioconservación sobre la fragmentación de ADN, encontrándose un incremento significativo en la concentración de 8-OHdG en semen posdescongelación comparado con el mismo semen previo a la congelación, lo cual se correlacionó significativamente con el aumento de la fragmentación del ADN (Thomson *et al.*, 2009).

Aunque en la crioconservación seminal de peces no ha sido medido este metabolito, Ciereszko *et al.*, (2005) demuestran que incluso la refrigeración a bajas temperaturas induce la fragmentación de ADN en espermatozoides de lamprea, y que a su vez dichos daños pueden ser originados por la oxidación del ADN. Resultados similares de fragmentación originada por oxidación de ácidos nucleicos se encontraron en espermatozoides de trucha arcoíris *O. mykiss* (Dietrich *et al.*, 2005).

Por otra parte y con relación a la presencia de una alta fragmentación en el tratamiento DMSO 15% - 6.5% glucosa, puede decirse (como se mostró antes en la figura 52) que la fuerza osmótica del crioprotector es mucho mayor que la resistencia que puede generar el encogimiento de la membrana originada por la alta concentración de la glucosa; de manera que su entrada a la célula espermática puede llegar a ser mayor que en el resto de casos donde es más baja su concentración, por lo que la intoxicación en este caso es mayor, además de la deshidratación que origina, dado el desplazamiento de agua al que puede someter a la célula en su ingreso, lo que pudo haber traído como resultado inviabilidad celular, inducción a procesos de muerte celular (apoptosis) y por consiguiente este grado máximo de daño al ADN. Esta aseveración se sustenta cuando se observa en este mismo tratamiento que variables como la Ma alcanzan valores sólo de 0.03% y que los daños en membrana (d-Me) ascienden a casi un 60% de las células espermáticas (en el presente trabajo). De hecho, autores como Khan *et al.*, (2009), encontraron que la apoptosis se incrementaba significativamente luego de la crioconservación, y que ésta variable se correlacionaba inversamente con la movilidad espermática y positivamente con los daños en membrana, ambos de forma significativa ($p < 0.05$) después de la crioconservación.

De este modo, es posible pensar que uno de los factores responsables del incremento del índice de daño en ADN puede ser la inducción a la apoptosis celular por parte del alto grado de toxicidad al que se somete a la célula en este tratamiento.

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por señales intra o extracelulares. Las primeras pueden ser originadas por estrés biológico, provocando una liberación de citocromo C desde la mitocondria. Entre las señales extracelulares se puede encontrar a las fisiológicas (hormonas), biológicas (virus, bacterias) **físicas (temperatura, radiación) y químicas (fármacos, tóxicos)** (Thompson *et al.*, 1995), estas dos últimas de nuestro interés en la presente investigación. Los principales cambios que se dan en la célula luego de recibir la señal de apoptosis son: contracción del citoplasma y tamaño celular, reducción del potencial transmembranal de la mitocondria, desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP (de ahí posiblemente la disminución de Ma) y el **incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno** (Kroemer *et al.*, 1997), como también la **activación de enzimas caspasas**, las cuales cumplen funciones como: inactivación de proteínas que participan en la reparación de ADN (Kothakota, 1997), destrucción de la lámina nuclear (Goulet *et al.*, 1998; Neamati *et al.*, 1995) y finalmente la activación de nucleasas llamadas CAD (Caspase Activated Dnase), Dnasas encargadas de fragmentar el ADN (Enari, 1998).

En trabajos realizados en la crioconservación de espermatozoides humanos, se determinó que el incremento de la concentración de caspasas positivas durante este evento, estaba estrechamente correlacionado con el incremento en la fragmentación de ADN, y que además, tanto los daños en ADN como la concentración de caspasas positivas eran mucho mayores en semen posdescongelación que en semen fresco ($p < 0.001$) (Thomson *et al.*, 2009).

La aparición de características apoptóticas han sido también evidenciadas durante la crioconservación de semen bovino (Martín *et al.*, 2007).

Y es que aunque la apoptosis no fue medida, se encontró que muchas de las características presentes en este proceso también se correlacionan en el presente trabajo. Así por ejemplo, con respecto a que la apoptosis disminuye la movilidad espermática pero incrementa los daños de membrana, al tiempo que incrementa la fragmentación, en este trabajo se encontró una alta correlación entre los daños en membrana y daños en ADN ($r = 0.7761$), lo que demuestra que el factor que los origina lo hace proporcionalmente a ambas variables (al ADN y a la membrana).

Así también durante la crioconservación en *Polyodon spathula*, se encontró al probarse tres valores de osmolaridad basados en sucrosa (50mM, 75mM y 100mM) en combinación con tres niveles de metanol, que el mayor índice de

fragmentación de ADN espermático se presentaba en los tratamientos donde la concentración del crioprotector era máxima o mínima, siempre que la concentración de la sucrosa fuera la máxima (Li *et al.*, 2008).

Independientemente del factor que pueda estar originando la fragmentación del ADN en células espermáticas de *P. magdalenae* en estos 3 tratamientos, es claro que también los está generando en los 6 restante (aunque en menor proporción) sin importar la concentración de glucosa o la concentración del crioprotector, generando daños de fragmentación en el material genético, esto considerando que al observar la proporción de células con ADN fragmentado en semen fresco precongelación se hallan valores del orden del $6.71 \pm 1.5\%$, siendo estadísticamente diferente de todos los grupos de tratamientos congelados ($p < 0.05$).

Por su parte los daños en membrana también corroboran la tesis al respecto de la interacción planteada entre la fuerza osmótica del crioprotector para difundir (dependiente de su concentración) y el grado de contracción membranal de la célula (concentración de la glucosa) el cual le permite la mayor o menor entrada al crioprotector (véase figura 50, 51 y 52)

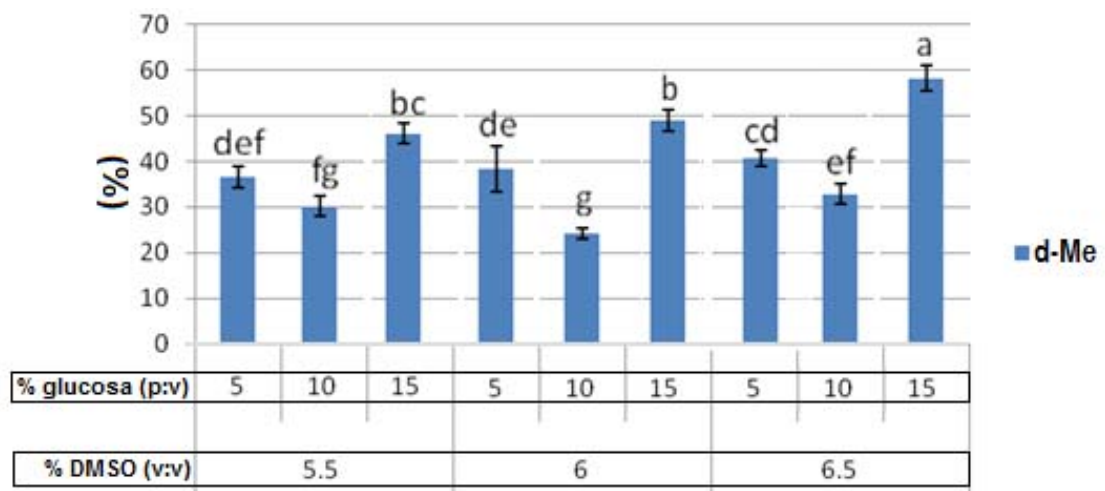


Figura 54. Observación de los niveles del crioprotector (5%, 10%, 15%) bajo los 3 niveles de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%) ($n=3$). Porcentaje de espermatozoides de bocachico *Prochilodus magdalenae* posdescongelación con daño en membrana. Comparación múltiple entre tratamientos de interacción del arreglo factorial: concentración del crioprotector DMSO (5%, 10%, 15%) y Concentración de glucosa (5.5%, 6%, 6.5%). Barras con letras comunes indican que son iguales ($p > 0.05$). Valores expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Así, en este caso podría decirse también que los daños en membrana se originarían debido a la excesiva (toxicidad) o baja (cristales de hielo) concentración del crioprotector al interior de la célula.

Con base en la figura 54, pueden realizarse tres razonamientos importantes: i) en todos los casos dentro de cada grupo de tratamientos bajo una misma concentración de glucosa, los menores valores de daño en membrana son ocasionados para DMSO al 10%, una concentración aparentemente adecuada para suministrar protección a la membrana de células espermáticas, ii) obsérvese en todos los casos dentro de cada grupo de tratamientos bajo una misma osmolaridad, que los daños en membrana muestran sus más altos valores cuando el crioprotector se halla en su máxima concentración (15%) o cuando se halla en su mínima concentración (5%). Con respecto a estos dos primeros resultados es posible pensar que cierto porcentaje de las células espermáticas de *P. magdalanae* posee un punto máximo de tolerancia al crioprotector, pero también un punto mínimo. Con relación a este último, es posible mencionar que la aparición de daño en membrana en un porcentaje idéntico de células bajo este grupo de tratamientos (DMSO 5% - 5.5% glucosa, DMSO 5% - 6% glucosa, DMSO 5% - 6.5% glucosa, sin diferencia entre ellos, $p > 0.05$) se deba en gran medida a que la concentración del crioprotector pudo haber sido deficiente, a pesar de conseguir entrar, para lograr proteger a este porcentaje de células ($36.57 \pm 2.29\%$, $38.28 \pm 5.07\%$, $40.66 \pm 1.75\%$) frente a la nucleación (Darin y White, 1977; Drokin *et al.*, 1998), es decir, en la disminución de puntos de congelación (Kopeika y Kopeika, 2008), permitiendo con mayor eficiencia la formación de hielo, causando daños a la membrana durante la congelación o la descongelación (Chao y Liao, 2001). Caso similar se detectó durante la crioconservación de *Morone saxatilis*, donde la mínima concentración de DMSO (2.5%) mostró por microscopía electrónica de barrido, grandes daños en la membrana plasmática, sugiriendo que los daños se debían a la baja o nula protección que recibió el esperma, asociándolo con la formación de cristales de hielo intracelular (He y Woods, 2004). Es de añadir que la tasa de congelación empleada en este proceso era rápida (**véase en el numeral 4.4.4.2 Empacado y congelación**) por lo que la posibilidad de pérdida de agua pudo haber sido lenta o casi nula (Pegg, 2007), de modo que la posibilidad de formación de hielo al interior de la célula era inminente y sólo contrarrestada por el crioprotector, el cual debió haber estado presente en concentraciones adecuadas para lograrlo.

Por otra parte y con relación al los tratamientos de DMSO 15%, cabe señalar que son estadísticamente mayores ($p < 0.05$) los daños membranales presentes en estos tratamientos que en otros niveles del crioprotector (DMSO 10% y 5%). Así mismo, cuando se probaron 3 niveles del crioprotector DMSO (2.5%, 5%, 10%, este último, máximo permisible para la especie) igualmente en *M. saxatilis*, se encontró que el mayor daño a la membrana plasmática se generaba cuando era utilizada la máxima concentración (DMSO 10%), siendo estadísticamente diferente

($p < 0.05$) de la concentración media (DMSO 5%, la de menor daño en membrana) (He y Woods, 2004).

Al respecto, Kopeika y Kopeika, (2008) señalan que la tasa de movimiento de agua a través de la membrana celular es proporcional a la diferencia en la concentración del soluto (DMSO y glucosa) en los dos lados de la membrana (Δ DMSO= 15%, Δ glucosa= 5.5%, 6%, 6.5%). A su vez añade que en el proceso de crioconservación, el agua abandona la célula, pero que en el proceso de descongelación es necesario que este proceso se revierta, es decir, el agua debe difundir de nuevo a través de la membrana y regresar al interior de la célula. De este modo, podría decirse que en los tratamientos DMSO al 15%, esta concentración era tan alta para la célula de *P. magdalenae* que posiblemente y debido a su gran fuerza osmótica, desplazó muy rápidamente y en gran medida el agua intracelular, difundiendo aceleradamente a través de membrana hacia el interior de la célula y reemplazándola. De igual manera, durante la descongelación el proceso volvió a ocurrir en las mismas proporciones, lo cual no pudo soportar la membrana, generándole daños de dos posibles formas: 1) Ruptura de la membrana durante la congelación o descongelación por los procesos de deshidratación o rehidratación, en los cuales la excesiva fricción del agua al transportarse a través de la bicapa sobrepasa la capacidad de difusión de la membrana (Muldrew y McGann, 1990), 2) Formación de poros en bicapas de palmitoil-fosfatidilcolina, provocadas por las moléculas de DMSO, introduciéndose inicialmente dentro de la bicapa y ocupando una posición justo por debajo de las cabezas de los grupos de lípidos, reduciendo el grosor de la bicapa y ejerciendo compresión sobre las cabezas de los lípidos, lo que reduce su área y disminuye la rigidez de la membrana, produciéndose entonces la formación del poro (Notman *et al.*, 2006).

Con esto también se explica por qué la concentración de glucosa afecta la membrana (véase mejor en Figura 26), incrementando los daños significativamente cuando ésta pasa de 6% (360 mOsm/kg) a una concentración más hiperosmótica (6.5% glucosa= 385 mOsm/kg) respecto al plasma seminal de la especie (347 ± 9.1 mOsm/kg).

Así, considerando lo dicho por Kopeika y Kopeika (2008), un incremento de la osmolaridad también pudo haber impulsado una mayor contracción membranal o una mayor deshidratación, lo cual pudo ocasionar, en ambos casos, lesiones de membrana.

Finalmente, considerando la correlación existente entre fragmentación de ADN y daños en membrana ($r = 0.7761$), la alta diferencia significativa del tratamiento DMSO 15% - 6.5% glucosa con respecto a los demás tratamientos ($p < 0.05$) y lo dicho sobre el alto grado de fragmentación de ADN que sufrió este mismo tratamiento; es posible entonces también afirmar (como ya se hizo) que en este

caso los altos porcentajes de daño en membrana, pueden atribuirse a los efectos secundarios de un proceso apoptótico, dada la severidad del daño, como se puede registrar en la figura 29 de este trabajo.

7.3 Efectos de los tratamientos sobre la Fertilización y la Eclosión.

La tasa de fertilización se comportó, en general, como se esperaba para esta especie (Martínez *et al.*, 2009a), en donde los porcentajes de fertilidad se correlacionaron con variables móviles, en este caso, variables como Ma, Mb, VCL, VSL, Ti-Ac y MT (véase tabla 12). Como se sabe, los más altos valores de fertilidad se obtuvieron bajo la concentración DMSO 5% y DMSO 10%, pero los más bajos o casi nulos, bajo la concentración DMSO 15%, mostrándose una vez más la toxicidad del crioprotector cuando se presenta en forma excesiva. Caso contrario ocurrió durante la crioconservación espermática de *B. amazonicus* (Cruz-Casallas *et al.*, 2004) bajo estas mismas tres concentraciones de DMSO, donde a pesar que DMSO 5% y DMSO 10% poseían los mayores valores en movilidad (34.6% y 68.8% en promedio) y ambos eran estadísticamente diferentes de DMSO 15%, no se reflejó precisamente lo mismo en la fertilización. Esto es, que DMSO 10% conservó una alta tasa de fertilización (52.6%) aún estadísticamente diferente del tratamiento DMSO 15%, no obstante, no ocurrió también en DMSO 5%, quien aunque ostentaba una diferencia estadística significativa en cuanto movilidad con DMSO 15%, no fue igual en la fertilización, donde la fertilidad fue tan baja en DMSO 5% (12.3%) como en DMSO 15% (10.4%).

Esta diferencia entre resultados de fertilización, puede deberse al grado de tolerancia espermático entre especies ante la crioconservación, afectando a *B. amazonicus* pero no a *P. magdalenae*, no necesariamente en la movilidad pero es posible que en otras variables no medidas en el estudio como daño en ADN, membrana u otra no perceptible a través de la movilidad. Al respecto, se ha dicho que la exención del daño puede variar de acuerdo a la concentración del crioprotector, a las especies y al tipo de crioprotector y a su toxicidad (Pan *et al.*, 2008), tal como se observó anteriormente entre *B. amazonicus* y *P. magdalenae* en relación a la tasa de fertilización. Sin embargo, se ha comprobado también que la cercanía filogenética en cuanto al orden caraciforme, les confiere una resistencia similar ante la crioconservación, como el grado de tolerancia del crioprotector y la concentración de glucosa (Caroslfeld *et al.*, 2003).

Así por ejemplo, autores como Navarro *et al.* (2004), encuentran que las mejores tasas de fertilización para semen crioconservado de *Piaractus brachypomus*, al igual que en bocachico, se hallan bajo tratamientos como DMSO 5% - 5.5% glucosa y DMSO 10% - 5.5% glucosa (25% y 36% en promedio, respectivamente), sin ser necesario realizar incluso la fertilización con semen crioconservado

proveniente del tratamiento DMSO 15% - 5.5% glucosa, al observarse que la movilidad espermática para este tratamiento era solo del 2% en promedio, previéndose que la tasa de fertilización en este caso alcanzaría valores cercanos a cero (0%).

Por otra parte, en cuanto a las correlaciones obtenidas entre fertilización y variables móviles, ADN, daño en membrana entre otras, aunque altas, no se dieron en cada tratamiento de forma sincrónica con relación al comportamiento de la fertilización, en otras palabras, un incremento de cierta variable no siempre implicaba el mismo efecto en la tasa de fertilización en ciertos tratamientos.

Así por ejemplo, valores de fertilización bajo algunos tratamientos no fueron lo esperado en cuanto a porcentaje, es el caso de algunas movilidades totales (MT) que llegaron a superar el 50% y en otros alcanzaban hasta en promedio 71% (DMSO 10% - 6% glucosa), este último, incluso sin diferencia estadística con el grupo control ($p > 0.05$). Con respecto a este resultado, es de señalar que es extraño el comportamiento que tuvo la tasa de fertilización en este tratamiento; pues considerando que entre estos tratamientos no había diferencia estadística significativa y que además la correlación entre TF y MT era alta ($r = 0.7688$), lo que se esperaba era una tasa de fertilización similar y estadísticamente igual al mismo control, sin embargo esto no ocurrió, presentándose diferencias estadísticas entre ambos y matemáticamente amplias (26.88% para el tratamiento y 69.3% para el control).

Frente a esto puede decirse que aunque la estadística plantee igualdad entre estos tratamientos en cuanto movilidad, pueden existir diferencias biológicas para la capacidad fertilizante de los espermatozoides entre un tratamiento y otro. Es posible también que existan atributos espermáticos diferentes entre estos tratamientos y que pueden llegar a marcar la diferencia a la hora de fertilizar el espermatozoide, por ejemplo en este caso, que los daños en ADN y membrana eran estadísticamente mayores en el tratamiento crioconservado que en el control. Con base en lo anterior, es de afirmarse que la fertilización exige del espermatozoide más que una buena movilidad o una variable en particular, así la tasa de fertilización se convierte en una variable que exige bienestar integral del espermatozoide o por lo menos en la mayor parte de sus variables.

Caso similar ocurre con variables como la VCL y VSL, donde los bajos rendimientos de velocidad en los tratamientos DMSO 15% - 6.5% glucosa y DMSO 5% - 6.5% glucosa ($p > 0.05$ entre ellos) se ven claramente reflejados en la fertilización, en donde también son estadísticamente iguales y de los más bajos. Sin embargo, es considerado un caso aparte que aunque tratamientos como DMSO 10% - 5.5% glucosa, con velocidades estadísticamente iguales al tratamiento DMSO 15% - 6.5% glucosa (las más bajas), termine reflejando una tasa de fertilización (situada como uno de los mejores porcentajes)

estadísticamente y matemáticamente mayor, incluso, a todos los tratamientos del grupo DMSO 15%.

No obstante, cuando se evalúan otras variables para encontrar respuesta a la diferencia reflejada en la capacidad fertilizante de estos tratamientos, se encuentra que el tratamiento DMSO 10% - 5.5% glucosa (el de mejor fertilidad) a pesar de poseer velocidades e, incluso, movilidad rápida estadísticamente igual al tratamiento DMSO 15% - 6.5% glucosa (el de menor fertilidad), posee ventajas en otras variables, como por ejemplo, un porcentaje de células con ADN más íntegro que DMSO 15% - 6.5% glucosa ($p < 0.05$), mejor tiempo de activación ($p < 0.05$) y un menor porcentaje de espermatozoide con daño en membrana ($p < 0.05$), lo que posiblemente le permitió compensar su baja velocidad y contribuir con una mayor tasa de fertilización ($p < 0.05$) que aquel tratamiento que no contaba con estos atributos.

Este tipo de fenómenos ocurren también en especies como *Machulochella pelli pelli* (Daly *et al.*, 2008), encontrándose que aunque espermatozoides crioconservados en Metanol 10% - Sorbitol tuvieron mejor movilidad e integridad de membrana que aquellos crioconservados en Metanol 10% - Tris Sucrosa Potasio, no hubo diferencias significativas en cuanto a tasas de eclosión o fertilización entre los dos tratamientos. De forma similar, en estudios previos realizados por Glogowski *et al.* (2002), se encontró que a pesar de las similitudes en la movilidad posdescongelación entre tratamientos de crioconservación, las tasas de eclosión variaron significativamente. De otra forma, Horváth *et al.* (2005), encontraron que DMSO 5% produjo la mejor movilidad posdescongelación, pero Metanol 5% produjo las mejores tasas de eclosión.

Otra de las posibles explicaciones al respecto de la baja fertilidad en los tratamientos de semen crioconservado, a pesar de la evidente capacidad móvil de espermatozoides en algunos tratamientos; es que este evento puede deberse a la exigua o nula información acerca de la correcta relación semen:ovocito para esta especie utilizando semen congelado. En este caso, se utilizó una relación de 100.000 espermatozoides:1 ovocito, tratando de adaptar el protocolo al ya estandarizado para el caraciforme *Brycon amazonicus* (Velasco-Santamaría *et al.*, 2004), donde se obtuvieron las mayores tasas de fertilización (aproximadamente entre 46% y 64%) con semen crioconservado (DMSO 10% - glucosa) en una relación semen:ovocito de entre 75.000:1 hasta 150.000:1 ($p > 0.05$). Para el caso de *P. magdalenae*, el valor máximo de fertilidad alcanzado bajo esta concentración, fue de $26.88 \pm 4.1\%$, es decir, cerca de la mitad que en *B. amazonicus* bajo las mismas condiciones de crioconservación. En *Prochilodus lineatus* (Viveiros *et al.*, 2008), la relación semen:ovocito utilizada para fertilizar con semen crioconservado (DMSO 10% - glucosa) era de 500.000 espermatozoides:1ovocito, para obtener tasas de fertilización de 65% en promedio, lo cual equivale a utilizar hasta 5 veces más la cantidad de semen que

en *P. magdalanae*, para alcanzar tasas de fertilización casi 2.5 veces mayor que la hallada en este trabajo para semen crioconservado (DMSO 10% - 6% glucosa). El exceso o el defecto de la relación semen:ovocito puede disminuir la tasa de fertilización (Velasco-Santamaría *et al.*, 2004) por lo que su relación debe ser determinada para efectos de alcanzar las mejores tasas de fertilización con el justo número espermático para la especie. Lahnsteiner *et al.* (2004) encuentran que a pesar de obtener porcentajes de movilidad y velocidad aceptables luego de la crioconservación espermática de *Acipenser ruthenus* L., no obtiene tasa de fertilización que los reflejen, tanto con semen proveniente de tratamiento (DMSO 10% - Isosmótico NaCl) como con semen fresco (6.9% y 33.9%, respectivamente). Esto lo atribuye al desconocimiento de la correcta proporción semen:ovocito, la cual según el autor, en adecuadas cantidades puede llegar a compensar la baja movilidad que genera la crioconservación.

Por otra parte, en cuanto a la tasa de eclosión, esta tuvo una gran correlación con la tasa de fertilización ($r= 0.9223$), lo cual evidencia un comportamiento casi similar y sincronizado entre estas variables. Esto se corrobora cuando se observa que al igual que en la fertilización, siempre los mayores valores de eclosión se produjeron por los grupos de tratamientos DMSO 5% y DMSO 10%, siendo estadísticamente diferentes de todos los tratamientos DMSO 15%. La similitud comportamental hallada en entre la fertilización y la eclosión alega una gran dependencia de estas variables dentro de este experimento. Por lo cual podría decirse que en este caso la eclosión dependerá siempre de la fertilización y por supuesto otros factores externos como la calidad del agua. Así, si se tiene éxito en estas dos variables mencionadas, se garantizaría que la obtención de larvas provenientes de semen crioconservado es segura y en las cantidades necesarias. No obstante, es necesario anotar aunque exitosa, la tasa de eclosión debe mejorarse, pues en promedio, entre los grupos DMSO 5% y DMSO 10%, del 100% de ovocitos fertilizados, sólo cerca del 55% lograron eclosionar, encontrándose en el mejor de los casos (DMSO 10% - 5.5% glucosa) que hasta un 72% de los huevos fertilizados eclosionen. Linhart *et al.* (2000), alcanzan valores de fertilización en semen crioconservado de *Cyprinus carpio* (DMSO 10%) cercanos a $56\pm 10\%$, y tasas de eclosión de $52\pm 9\%$, es decir, lograban la eclosión de cerca del 92% del total de los huevos fertilizados, lo que representa un reto para especies como *P. magdalanae*.

No sólo el rendimiento de la eclosión sobre la fertilización fue baja, sino las tasas de eclosión en sí, alcanzando valores máximos de 18.93% en promedio. Con ello se corrobora una vez más la necesidad de estandarizar los protocolos de fertilización utilizando semen crioconservado (medios o soluciones de fertilización, medios o soluciones activadoras, potenciadores de la movilidad espermática, incrementos en la relación semen:ovocito, entre otras), las cuales permitan incrementar a la postre estos porcentajes de eclosión, que si bien se constituyen

en la evidencia clara para demostrar por primera vez el éxito de la crioconservación en *P. magdalenae*, es necesario mejorarse.

7.3 Efectos de los tratamientos sobre la Malformación larval.

La malformación larval es una variable poco evaluada en los procesos de crioconservación, posiblemente por considerarse muchas veces una variable de poca relación con el proceso de congelación. Y es que la presencia de larvas malformadas se puede presentar tanto en tratamientos provenientes de semen fresco como de crioconservado, sin existir diferencias estadísticas entre ellos, como en *Clarias gariepinus* (Miskolczi *et al.*, 2005).

Sin embargo, aunque en el presente trabajo, la ocurrencia de larvas malformadas de *P. magdalenae* provenientes de semen fresco también fue evidente ($19.66 \pm 1.6\%$), también lo es el hecho de encontrar tratamientos con grandes porcentajes de larvas malformadas ($57.54 \pm 9.02\%$, $71.26 \pm 1.93\%$) estadísticamente diferentes al control ($p < 0.05$), pero iguales entre ellos ($p > 0.05$). Dichos valores de malformación corresponden a los tratamientos DMSO 5% - 5.5% glucosa y DMSO 10% - 6.5% glucosa, de los cuales precisamente se dijo (ver discusión Movilidad) que eran los tratamientos de mayores valores en las características móviles, posiblemente porque la entrada del crioprotector al interior de la célula fuera más efectivo debido a la permeabilidad de la membrana (DMSO 5% - 5.5% glucosa) y la fuerza osmótica del mismo crioprotector (DMSO 10% - 6.5% glucosa). Si bien es una teoría, es posible pensar que el DMSO, a pesar de proteger ciertas variables celulares, está provocando algunos daños tóxicos al ADN, no necesariamente fragmentación (aunque éstos presentan altos valores de fragmentación no diferentes entre ellos, $p > 0.05$), pero que pueden estar induciendo daño al espermatozoide y que se refleja como malformación larval en estos casos. Daño que es más acentuado en el tratamiento DMSO 10% - 6.5% glucosa, por tratarse posiblemente de una mayor concentración del crioprotector, además de una alta deshidratación celular que puede dar lugar más a la presencia del mismo crioprotector que de agua al interior de la célula.

Korkina *et al.* (2000), demostraron que una de las formas de causar malformación o defectos embrionarios en Sea Urchin *Sterechinus neumayeri*, podría ser a través de la puesta en contacto del espermatozoide con agentes tóxicos como Diepoxibutano o Mitomicina C. Así mismo, Horváth y Urbanyi (2000), observaron durante la crioconservación seminal de *C. gariepinus*, un incremento significativo de larvas malformadas en la medida en que aumentaban la concentración de DMSO, lo cual fue estadísticamente mayor que lo encontrado en el grupo control (semen fresco). Coincidentalmente, Miskolczi *et al.* (2005), encontraron, al igual

que para *P. magdalенаe*, el mayor porcentaje de larvas malformadas (44%) en el tratamiento donde el tamaño de la pajilla era 0.5 mL (siendo menor en otras pajillas de 0.25 y 1.2 mL), a su vez el crioprotector era DMSO al 10% y la concentración de la azúcar era ligeramente hipertónica, sin embargo, no fue estadísticamente diferente del grupo de larvas proveniente de semen fresco (28%).

Es posible que parte del porcentaje de malformación presente en los grupos de tratamientos provenientes de semen crioconservado, sean producto de la calidad de los huevos (Horváth *et al.*, 2007; Miskolczi *et al.*, 2005): la temperatura del agua para este periodo no era normal, se consideró una temporada caliente con dificultades en la maduración gonadal de machos y hembras y en la espermiación. Otra fracción del porcentaje de malformación puede ser atribuida también a daños en el ADN provocados por la crioconservación (Zilli *et al.*, 2003). Es posible que la formación de cristales de hielo, ausencia o exceso del crioprotector (en este trabajo), estrés oxidativo originado por la crioconservación (Pérez *et al.*, 2009), originen el daño en el ADN de espermatozoides en todos los tratamientos (estadísticamente diferentes del semen fresco, $p < 0.05$).

En ovocitos de peces se han identificado sistemas de reparación de ADN (Kopeika *et al.*, 2004), los cuales pueden reparar el daño de fragmentación de ácidos nucleicos espermáticos (luego de haber sido inducido su daño por agentes tóxicos), sin embargo se detectó que esta capacidad es limitada, es decir, no todas las veces y de acuerdo al grado del daño mismo. De modo que en nuestro caso podría no haberse podido llevar a cabo este proceso de reparación (por alguna razón, como el grado de su fragmentación) en espermatozoides de estos grupos de tratamientos una vez fecundado el ovocito, evitando la participación del material genético espermático en la fusión nuclear y por tanto su ausencia en la formación de la nueva larva, la cual pudo haber sido haploide o no (Horvath *et al.*, 2007; Miskolczi *et al.*, 2005), dependiendo de la reparación de ADN que pudo haber sufrido el espermatozoide. Generalmente, las larvas haploides originadas sólo con la participación del material genético materno (ginogenéticas) o por el material genético paterno (androgenéticas), exhiben tipos de malformación (May *et al.*, 1988), entre ellos la curvatura de la espina o columna, ausencia de saco vitelino y ausencia de cabeza y cola; tipos de malformación presentes en el tratamiento DMSO 10% - 6.5% glucosa (véase figura 38 y 41).

Finalmente, hay resultados dentro de la presente investigación que ayudan a demostrar que la reparación de ADN fragmentado es limitada también en *P. magdalенаe*, por tanto cambiante entre tratamientos, reparándose el daño en unos y en otros no. Y que debido a ello no siempre observar daño en ADN predice malformación, pues este daño podrá ser eventualmente reparado y dar una larva viable. Esto es confirmado en el presente trabajo, cuando se quiso evaluar la correlación existente entre el grado de fragmentación de ADN espermático y el

porcentaje de malformación larval, determinándose que NO EXISTÍA correlación entre estas variables, ni dependencia ($r= 0.1933$, $P=0.4422$).

8. CONCLUSIÓN

La presión osmótica externa generada por la glucosa en el exterior celular es un concepto poco abordado en la experimentación para crioconservación de peces, sólo limitándose a la inmovilización espermática sin importar qué tanto pueda afectar el grado de esta variable al mantenimiento de las condiciones espermáticas adecuadas para llevar a cabo sus funciones vitales. La crioconservación espermática en peces ha ahondado sus esfuerzos más en el daño que pueda provocar el crioprotector y su concentración a la movilidad espermática y la fertilización, que si bien es importante, aquí se demuestra que en asocio con una concentración de glucosa indicada puede alcanzar mejores rendimientos en la búsqueda de protección celular.

Este trabajo se constituye en el primer reporte de crioconservación espermática exitoso para *Prochilodus magdalenae* en el país, como también es el primero en demostrar los efectos de la concentración de glucosa y su interacción con la concentración del crioprotector, al respecto de lo cual se plantearon nuevas teorías de interacción crioprotector interno-presión osmótica externa (glucosa), de entrada y salida del crioprotector desde la célula, dependiendo de la variación de la presión osmótica externa, además de las consecuencias en la disminución o mantenimiento de la calidad espermática, todas sustentadas en la base de la ciencia básica y de los resultados del experimento, permitiendo plantear nuevos horizontes hacia los cuales podría dirigirse la investigación sobre crioconservación espermática en peces a nivel celular. Así mismo, nunca antes se había establecido en el país los efectos de la crioconservación sobre los daños en el material genético y sus correlaciones con otras variables de interés en la calidad espermática en peces, aspecto que puede servir como modelo para comenzar a explicar los daños en la calidad del espermatozoide en otras especies y desde otra perspectiva diferente a las tradicionales.

De este modo, este podría considerarse un aporte exitoso en la búsqueda de protocolos de crioconservación adecuados para *P. magdalenae*, tanto para la industria acuícola nacional (en procesos de reproducción e intercambio genético), en donde esta especie se sitúa entre las nativas de mayor cultivo para sostenibilidad alimentaria, como también para la consolidación de bancos de recursos genéticos (Ministerio de Agricultura – Universidad de Córdoba) como en los que participa esta especie considerada amenazada. Bancos, donde

precisamente la exigencia de la calidad seminal es mayor y debe ser más integral en cuanto a parámetros que lo reiteren.

Al respecto de la presente investigación relacionada con la crioconservación espermática en *Prochilodus magdalenae*, en donde se evaluó el **EFFECTO DEL DMSO Y LA GLUCOSA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y EL MATERIAL GENÉTICO** de la especie en mención, puede concluirse exclusivamente bajo estas condiciones experimentales que:

1. La interacción *concentración del crioprotector X concentración de glucosa*, afecta sólo a variables móviles como: Movilidad rápida (Ma), media (Mb), Tiempo de activación (Ti-Ac), Velocidad curvilínea (VCL) y Velocidad en línea recta (VSL), ya sea ambos factores al tiempo o de forma separada. Por el contrario, la variación o presencia de Mc (lentos), Movilidad total (MT) y Md (Inmóviles), no depende de la interacción presencia de ambos factores, sino más del factor "*concentración del crioprotector*" que de la concentración de glucosa. Así, de acuerdo a los resultados en general, puede concluirse que los tratamientos que mejor protegen las variables móviles de células espermáticas en *P. magdalenae* durante el evento de la crioconservación son: DMSO 5% - 5.5% glucosa y DMSO 10% - 6% glucosa.

2. La *concentración del crioprotector X concentración de glucosa*, afecta tanto la integridad de membrana como la del ADN, ya sea por la interacción de ambos factores al tiempo (d-Me) o por la acción de los dos factores separadamente (d-ADN) sobre la célula espermática. De este modo, puede concluirse, al observar los resultados, que el tratamiento DMSO 10% - 5.5% glucosa es que ofrece una mejor protección al ADN durante la crioconservación, seguido de DMSO 10% - 6% glucosa ($p>0.05$); mientras que para garantizar mayor protección a la membrana espermática durante la congelación, DMSO 10% - 6% glucosa alcanza el mejor desempeño, seguido de DMSO 10% - 5.5% glucosa ($p>0.05$).

3. La interacción *concentración del crioprotector X concentración de glucosa*, afecta a la tasa de fertilización (TF) y por correlación, a la tasa de eclosión (TE). De ahí que puede concluirse en forma general, que la obtención de una buena tasa de fertilización y por tanto de eclosión para células espermáticas crioconservadas de *P. magdalenae*, está garantizada por tratamientos como DMSO 10% - 5.5% glucosa o 6% glucosa, o por DMSO 5% - 5.5% glucosa; las cuales pueden ser incrementadas, entre otras recomendaciones planteadas en la discusión sobre estas variables, aumentando la relación semen:ovocito.

4. La interacción *concentración del crioprotector X concentración de glucosa*, afecta significativamente ($p<0.0001$) la malformación larval. Sin embargo, se puede recomendar el uso de tratamientos como DMSO 10% - 5.5% glucosa o 6%

glucosa, o DMSO 5% - 6% glucosa, los cuales pueden llegar a garantizar que al menos las larvas serán tan sanas como aquellas provenientes de semen fresco.

5. El incremento de variables como la movilidad, integridad de membrana y ADN, están correlacionadas entre sí y con otras (en este experimento), como la capacidad fertilizante y la eclosión. Con base en esto puede concluirse que si se mantienen estables estas variables incrementará la producción de larvas provenientes de semen crioconservado de forma proporcional y significativa; especialmente Ma, VCL, VSL, MT e integridad de membrana.

Tabla 14. Resumen general de las conclusiones expuestas acerca del experimento de crioconservación espermático en *Prochilodus magdalenae*. Distribución de las variables respuesta del experimento entre los tratamientos que garantizaron sus mejores valores a favor del bienestar espermático posdescongelación.

<i>DMSO 5%</i>		<i>DMSO 10%</i>	
<i>6% glucosa</i>	<i>5.5% glucosa</i>	<i>6% glucosa</i>	<i>5.5% glucosa</i>
(Mal)	(Mov)	(Mov)	(ADN)
	(TF-TE)	(ADN)	(Mem)
		(Mem)	(Mal)
		(Mal)	(TF-TE)
		(TF-TE)	

Mal: malformación larval, **Mov:** movilidad en general, **TF-TE:** tasa de fertilización y eclosión, **ADN:** integridad de ADN, **Mem:** integridad de membrana, **DMSO:** dimetilsulfóxido.

BIBLIOGRAFÍA

Abascal FJ, Medina A, Megina C, Calzada A. Ultrastructure of *Thunnus thynnus* and *Euthynnus alletteratus* spermatozoa. J. Fish Biology 2002; 60: 147-153.

Alavi SH, Rodina M, Viveiros A, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, Linhart O. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). Theriogenology 2009; 72(1): 32-43.

Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmotic pressure. Cell Biol. Int. 2006; 30: 1–14.

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

Atencio-García VJ. Producción de alevinos de especies nativas. MVZ-Córdoba 2001; 6(1): 9-14.

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

Bart AN, Wolfe DF, Dunham RA. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. Trans Am Fish Soc 1998; 127:819- 824.

Barandaran-Noveiri S, Alipour A, Pourkazemi M. Sperm morphometry, density and spermatocrit study in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). J. Appl. Ichthyol. 2006; 22: 380-383.

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

Billard R, Cosson J, Perchec G, Linhart O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. 1995; 129: 95-112.

Bobé J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. Gen. Comp. Endocrinol. (2009). doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.011.

Bolsover RS, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG. Cell Biology. USA, 2004. Segunda edición, pag. 208 - 209.

Brown GG, Mims SD. Cryopreservation of Paddlefish *Polyodon spathula* Milt. J. World Aquaculture Society. 1999; 30: 245-249.

Cabrita E, Engrola S, Conceição LEC, Pousão-Ferreira P, Dinis MT. Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. Aquaculture. 2009; 287: 152-157.

Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez M. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. Cryobiology. 2005; 50: 144 – 153.

Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. J. Fish Biology 2003; 63: 472-489.

Ceccon-Lanes CF, Okamoto M, Varoni CV, Collares T, Farias CV, Deschamps JC, Berteaux RR, Marins LF, Sampaio LA. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*). Aquaculture 2008; 275: 361-365.

Christensen JM, Tiersch TR. Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: Effect of cryoprotectants, straw size, and formulation extender. Theriogenology 1997; 47:639-645.

Chao NH, Liao IC. Cryopreservation on finfish and shellfish gametes and embryos. Aquaculture 2001; 197: 161-189.

Chao NH. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extention efforts. En: Memorias International Symposium on Reproductive biology in aquaculture. Taipei: Fisheriesv Research Institute. 1991.

Cierieszko A, Wolfe TD, Dabrowski K. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. Aquat. Toxicol. 2005; 73: 128–38.

Cierieszko A, Glogowski J, Dabrowski K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch TR and Mazik PM, editors. Cryopreservation in Aquaculture Species. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society; 2000. p. 20-48.

- Ciereszko A. 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.
- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. Washington: ASM Press. 1997. p. 10 – 12, 391, 392.
- Conget P, Fernández M, Herrera G, Minguell JJ. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture*; 1996; 143: 319-329.
- Cruz-Casallas PE, Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Rev Col Cienc Pec.* 2006; 19(2): 146-151.
- Cruz-Casallas PE, Lombo-Rodríguez DA, Velasco-Santamaría YM. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon sibenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research* 2005; 36: 682-686.
- Cruz-Casallas PE, Pardo-Carrasco SC, Arias-Castellanos JA, Lombo-Rodríguez DA, Pardo-Mariño JE. Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *J. World Aquac. Soc.* 2004; 35: 529-535.
- Daly J, Galloway D, Bravington W, Holland M, Ingram B. Cryopreservation of sperm from Murray Cod, *machullochella pelli pelli*. *Aquaculture* 2008; 285: 117-122.
- Darin-Bennet A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology.* 1977; 24: 466–470.
- Dietrich GJ, Szpyrka A, Wajtczak M, Dobosz S, Goryczko K, Zakowski L, Ciereszko A. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility, and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 64: 1809-1822.
- Dreanno C, Seguin F, Cosson J, Suquet M, Billard R. Metabolism of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa: relationship between motility, intracellular nucleotide content, mitochondrial respiration. *Molecular Reproduction and Development.* 1999; 53: 230–243.

Dreanno C, Suquet M, Quemener L, Cosson J, Fierville F, *et al.* Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*. 1997; 48: 589-603.

Drokin S, Stein H, Bartscherer H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta F. Fario*). *Cryobiology*. 1998; 37:263-270.

Eddy EM, O'Brien DA. The espermatozoon. In: Knobil E, Neill JD, editors. 2nd edition. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994; p.29-77.

Enari M. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 8: 365-372.

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

FAO. Muchos peces y tantos intereses 2003; URL: <http://www.fao.org/docrep/003/w4493s/w4493s06.htm>

Fauvel C, Suquet M, Dreanno C, Zonno V, Menu B. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquat. Living Resour.* 1998; 11: 387–394.

Frits MF, Baren MG. Dynamic of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochemistry et Biophysical Acta* 2000;1469:197-235.

Fuller SA, Carmichael GJ. Cryopreservation of sperm of the endangered Gila trout *Oncorhynchus gilae*. *J. Appl. Aquac.* 2007; 19 (1): 71-79.

Fernández *et al.* Test de dispersión de la cromatina, SCD: Sperm Cromathin Dispersion. *Journal Andrology*. 2003; 24: 49-66.

Gage MJG, Macfarlane C, Yeates S, Shackleton R, Parker GA. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. *Journal of fish Biology* 2002; 61: 1528-1539.

Gibbons IR. Microtubule-based motility: an overview of a fast-moving field. In: Warner FD, Satir P and Gibbons IR, editores. *Cell movement: the dynein ATPases*. New York: Alan R, Liss; 1989. p. 3-24.

Glogowski J, Kolman R, Szczepkowski M, Horváth A, Urbanyi B, Sieczynski P, Rzemienieck A, Domagala J, Demianowicz W, Kowalski R, Ciereszko A. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture* 2002; 211: 367-373.

Goulet DI, Courvalin JC, Buendía B. LBR, a chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at the late stages of apoptosis. *J. Cell Sci.* 1998; 111: 1441-1451.

Gusmao-Pompiani P, Malabarba LR, Oliveira C, Quagio-Grassiotto I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Serrasalminae (Ostariophysi: Characiformes) with further evidence on the relationship of the piranhas and pacus. *Neotropical Ichthyology* 2009; 7(3): 385-394.

Gwo J, Arnold CR. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. *Journal Experiment Zoology.* 1991; 264: 444–453.

He S, woods LC. Changes in motility, ultrastructure, and fertilization capacity of striped bass *Morone saxatilis* spermatozoa following cryopreservation. *Aquaculture* 2004; 236:677- 686.

He S, Woods L.C. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass sperm motility. *J. World Aquaculture Society* 2003; 34: 255–265

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.

Horváth A, Miskolczi E, Mihálffy S, Osz K, Szabó K, Urbányi B. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5mL straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology.* 2007; 54: 251-252.

Horváth A, Wayman WR, Urbányi B, Ware KM, Dean JC, Tiersch TR. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethylsulfoxide and hypertonic extender on sperm cryopreservation of the two North-American sturgeon species. *Aquaculture* 2005; 247: 243-251.

Horváth A, Miskolczi E, Urbányi B. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources* 2003; 16: 457–460.

Horváth A, Urbányi B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Research* 2000; 31:317-324.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 62:3-22.

Hwang G H, Sheng W T, Shing F L, Horn LY. Development of cryopreservation procedures for semen of pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture* 2005; 249:205-211.

Inaba K. Molecular mechanisms of the activation of flagellar motility in sperm. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, editores. *Fish Spermatology*. Oxford UK: Alpha Science Inc; 2007. p. 267 – 279.

INCODER – CCI. Resumen de las actividades de pesca reportadas para la Cuenca de los ríos Orinoco, Magdalena y Amazonas, entre los años 1994 y 2006. In: estadísticas de la pesca y acuicultura en Colombia www.ica.gov.co. 2009.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human sperm: relationships with semen quality. *J. Androl.* 2000; 21: 33–44.

Jamieson BGM. *Fish evolution and systematic: Evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University press. 1991; p. 319.

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

Khan DR, Ahmad N, Anzar M, Channa AA. Apoptosis in fresh and cryopreserved buffalo sperm. *Theriogenology* 2009; 71: 872-876.

Kopeika E Y Kopeika J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, editores. *Fish Spermatology*. Oxford UK: Alpha Science Inc; 2008. p. 347 – 396.

Kopeika EF, Cherepanov VV, Dzuba BB, Tsvetkova LI. Oxygen and fish spermatozoa cryoresistance. 34th Annual Meeting of the society for Cryobiology,

Barcelona, España, 1997. p. 8-12.

Korkina LG, Deeva IB, Bierse A, Iaccarino M, Oral R, Warnou M, Pagano G. Redox-Dependent toxicity of diepoxybutane and mitomycin C in sea Urchin embryogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 213-220.

Kothakota S. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278: 294-298.

Krasznai Z, Marian T, Izumi H, Damjanovich S, Balkay L, Tron L, Morisawa M. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 2052-2057.

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 1997; 18: 44-51.

Kurland CG, Andersson SGE. Origin And Evolution Of The Mitochondrial Proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 786–820.

Labbé C, Maisse G. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture* 1996; 145:281-294.

Labbé C, Crowe LM, Crowe JH. Stability of the lipid component of Trout sperm plasma membrane during freeze – thawing. *Criobiology*. 1997; 34:176-182.

Labbé C. *et al.*, Effects of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reproduction Development* 2001; 60: 397- 404.

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

Lahnsteiner F, Berger B, Horváth A, Urbányi B, Weismann T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 2000; 54:1477-1498.

Lahnsteiner F. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research* 2000; 31:245-258.

Lahnsteiner F, Weismann T and Patzner RA. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquacult. Res.* 1997; 28: 471–479.

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *Prog. Fish-Culture* 1996a; 58 :149–159.

Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 1996b; 144:265-274.

Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario.*, *Salmo trutta lacustris*, *Coregonus sp*). *Aquaculture Research* 1995; 26:801-807.

Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner RA. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture* 1992; 103:73–84.

Lahnsteiner F, Patzner RA. A new method for electron-microscopical fixation of spermatozoa of freshwater teleosts. *Aquaculture* 1991; 97:301–304.

Leung LKP. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture*. 1987; 64: 243-247.

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

Li P, Wei Q, Liu L. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *J. Appl. Ichthyol.* 2008; 24: 121–125.

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

Maisse G, Labbe C, Ogier de Baulny B, Leveroni S, Haffray P. Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. INRA Productions Animales. 1998; 11: 57-65.

Marián T, Krasznai Z, Balkay L, Balázs M, Emri M, *et al.* Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. Journal Histochemical and Cytochemical 1993; 41: 291-197.

Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P, Levy R. Kinetics of occurrence of some feature of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. Human Reproduction 2007; 22: 380-388.

Martínez JG, Cardona L, García JJ, Cordero A, Atencio-García VJ, Pardo-Carrasco SC. Evaluación de la congelación y descongelación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* mediante análisis computarizado de la movilidad con el software Sperm Class Analyzer. En: Memorias 2da Conferencia latinoamericana sobre el cultivo de peces nativos. Chascomús – Argentina; 2009a. p. 64.

Martínez JG, Cardona L, Arroyo V, Dalbone-Araujo V, Atencio-García VJ, Pardo-Carrasco SC. Determinación de la concentración espermática de *Prochilodus magdalenae* mediante Sperm Class Analyzer. En: Memorias 2da Conferencia latinoamericana sobre el cultivo de peces nativos. Chascomús – Argentina; 2009b. p. 146.

Martínez JG, Cardona L, Dalbone-Araujo V, Vergara J, Atencio-García VJ, Pardo-Carrasco SC. Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación espermática de *Prochilodus magdalenae* mediante el software Sperm Class Analyzer. En: Memorias 2da Conferencia latinoamericana sobre el cultivo de peces nativos. Chascomús – Argentina; 2009c. p. 145.

Martínez JG y Pardo-Carrasco SC. Crioconservación de semen en peces: Efectos sobre la movilidad y la fertilidad, una revisión. Acta Biológica Colombiana. (En revisión de pares) 2010a.

Mattei X. Spermatozoa ultrastructure and its systematic implications in fishes. Canadian Journal of Zoology 1991; 69: 3038-3055.

May B, Henley KJ, Krueger CC, Gloss SA. Androgenesis as a mechanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 1988; 75: 57-70.

Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. En: 9th International congress on animal reproduction and artificial insemination. Madrid, España, 1980; p. 99-114.

Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (*Brycon amazonicus*). *Arch. Med. Vet.* 2007; 39: 229-237.

Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Aspectos generales de la crioconservación espermática de peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2004; 18(1): 34-48.

Medina A, Megina C, Abascal FJ, Calzada A. The sperm ultrastructure of *Merluccius merluccius* (Teleostei; Gadiformes): phylogentic considerations. *Acta zoológica (Stockolm)* 2003; 84: 131-137.

Miskolczi E, Mihalfy S, Pata Kiné V, Urbanyi B, Horváth A. Examination of larval malformation in african catfish (*clarias gariepinus*) following fertilization with cryoconserved sperm. *Aquaculture* 2005; 247:119-125.

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

Mojica JE, Pinzón SM. Ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystomafasciatum* Linnaeus 1766). Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Agrarias y Recursos Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia, 2002. p. 42.

Lista de peces dulceacuícolas colombianos con algún riesgo a la extinción. En: Mojica JI, Castellanos C, Usma JS, Álvarez R, editores. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales – Universidad nacional de Colombia y ministerio de Medio ambiente; 2002.

- Morisawa M, Ishida K. Short-term changes in levels of cyclic AMP, adenylate cyclase, and phosphodiesterase during the initiation of sperm motility in rainbow trout. *J. Exp. Zool.* 1987; 242: 199-204.
- Moussa M, Marinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from the hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen, *Theriogenology* 2002; 57:1695–1706.
- Muchlisin ZA, Siti-Azizah MN. Ultrastructure study of baung (*Mystus nemurus*: Bagridae) spermatozoa. En: Seminar on fish reproduction, Centre for Distance learning (PPL). University Putra Malaysia; 2009. p. 16-19.
- Muchlisin ZA. Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation (Review). *Biodiversitas* 2005; 6(1): 12-15.
- Muchlisin ZA. Preliminary study on spermatozoa cryopreservation and evaluation of dietary protein on gonadal development of bagrid catfish *Mystus nemurus* female broodstocks. Thesis, University Sciences Malaysia, Penang, 2004.
- Muldrew K, Mcgann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys. J.* 1990; 57: 525-532.
- Navarro OJ, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Evaluación de cinco crioprotectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2004; 17: 53-59.
- Neamati N, Fernández A, Wright S, Kiefer J, McConkey DJ. Degradation of laminin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J. Immunol.* 1995; 154: 3788-3795.
- Notman R, Noro M, O'malley B, Anwar J. Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes. *JACS Communications.* 2006.
- Ogier de Baulny B, *et al.* Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology.* 1997; 34:141-149.
- Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal Animal Science.* 1974; 39: 1144–1149.

Pan J, *et al.* Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. *Aquaculture* 2008; 279:173-176.

Pegg, D. Principles of cryopreservation. In: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (ed. By J.G. Day and G.N. Stacy); 2007; pp. 39-57. Human Press Inc, Totowa NJ.

Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez Pastor F, De-Paz P, Herráez M P. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology*. 2009; 71: 605–613.

Pillai MC, Yanagimachi R, Cherr GN. In vivo and in vitro initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from pacific Herring *Clupea pallasii*. *Journal of Experimental Zoology*. 1994; 269: 6b2-68.

Quagio-Grassiotto I, Gameiro MC, Schneider T, Malabarba LR, Oliveira C. spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the characiformes. *Neotropical Ichthyology*. 2003; 1(1): 35-45.

Ramírez-Merlano JA, Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles YM, Cruz-Casallas. Crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818): efecto de la sustancia crioprotectora sobre la sobrevivencia larval. En: Landines MA, González JF, Ramírez AM, editores. *Memorias V seminario internacional de acuicultura*. Bogotá DC: Universidad Nacional de Colombia; 2005. p. 177.

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

Rutaisire J, Muwazi RT, Booth AJ. Ultrastructure description of spermiogenesis and spermatozoa in *Labeo victorianus*, Boulenger, 1901 (Pisces: Cyprinidae). *African Journal Ecology* 2006; 44: 102-105.

Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 2004; 234: 1 –28.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for penetration and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res*. 2003; 531: 231-251.

Suquet M, M. H. Omnes, Y. Normant, C. Fauvel. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture. 1992; 101: 177-185.

Steinberg H, Hedder A, Baulain R, Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws. Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas at Austin. 1995; 147p.

Tabares CJ, Tarazona A, Olivera A. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 2005. 18:2.

Taddei AR, Barbato F, Abelli L, Canese S, Moretti F, Rana KJ, Fausto AM, Mazzini M. Is a cryopreservation a homogeneous process?, ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). Cryobiology 2001; 42(4): 244-255.

Tanimoto S, Kudo Y, Nakazawa T, Morisawa M. Implication that potassium flux and increase in intracellular calcium are necessary for the initiation of sperm motility in salmonid fishes. Mol. Reprod. Dev. 1994; 39: 409-414.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267: 1456-1462.

Thomson LK, *et al.* Sperm DNA damage during cryopreservation correlates with oxidative stress (resumen). Fertility Weekly 2009; p. 7-8.

. VM, Dietrich GJ, Wojtczac M, Slowinska M, Monserrat J, Ciereszko A. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology 2008; 69(8): 1033-1038.

Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE, Calderón-Fonseca AH. Inseminación artificial en yamú (*Brycon sibenhalae*): determinación de la dosis inseminante con semen fresco y crioconservado. En: Memorias II congreso colombiano de acuicultura, X jornada de acuicultura –IALL. 2004; p. 105-107.

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

Viveiros ATM, Oliveira AV, Maria AN, Orfao LH, Souza JC. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes meios de congelamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* In press 2008a.

Viveiros ATM, Orfão LH, Maria AN, Allaman IB. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*. 2008b; 112: 293-300

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

Viveiros ATM, So N, Komen J. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology*. 2000; 54:1395-1408.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 60-61:481-492.

Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg yolk lipoprotein, *Journal Reproduction Fertility*. 1981; 62: 483–492.

Wheeler P A y Thorgaard GH. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture*. 1991; 93: 95-100.

Withler FC, LIM LC. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*. 1982; 27: 389-392.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin. Chim. Acta* 2004; 339: 1-2.

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

Yao Z, Crim LW, Richardson GF, Emerson CJ. Cryopreservation, motility and ultrastructure of sperm from the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), an internally fertilizing marine teleost. In: FW Goetz & P Thomas, editores. 47 Reproductive Physiology of Fish. Proceedings of the Fifth international Symposium. Austin, TX; 1995. p. 149.

Zachariassen KE, Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*. 2000; 41:257-279.

Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xua YY, Wang CL, Sawant MS, Lid J, Chen SL. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology, *Theriogenology*. 2003; 60: 989–996.

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.

