

**CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE DORADA *Brycon sinuensis* CON
DIFERENTES CRIOPROTECTORES A DOS PORCENTAJES DE INCLUSIÓN**

JORGE ARMANDO CARMONA CALDERÓN

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
MAestría EN CIENCIAS AMBIENTALES
SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO
SUE- CARIBE
MONTERÍA
2021**

**CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE DORADA *Brycon sinuensis* CON
DIFERENTES CRIOPROTECTORES A DOS PORCENTAJES DE INCLUSIÓN**

JORGE ARMANDO CARMONA CALDERÓN

Trabajo de grado, presentado como
requisito parcial, para optar al título de
Magíster en Ciencias Ambientales.

**Directores: VÍCTOR ATENCIO GARCÍA, MSc
JOSÉ ESPINOSA ARAUJO, MSc**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO
SUE- CARIBE
MONTERÍA
2021**

El jurado del trabajo no será responsable de las ideas emitidas por los autores
(Artículo 46, acuerdo 006 del 29 de mayo de 1997 del Consejo Superior)

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Marzo, 2021.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la sabiduría para afrontar este nuevo reto, a mi hijo Juan José, familiares y amigos por su apoyo incondicional y en especial a mis abuelos Horacio y Blanca que aunque no me acompañan hoy en vida siempre creyeron en mí.

Jorge Carmona Calderón.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Víctor Atencio y José Espinosa por su orientación durante el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba - CINPIC, por su contribución con infraestructura, equipos y materiales que fueron necesarios para realizar esta investigación.

A mí amigo Omar Díaz por su aporte y colaboración en el desarrollo estadístico durante la realización de este trabajo.

Al profesional Juan Carlos Salas por su colaboración durante la realización de este trabajo.

A los auxiliares de campo del CINPIC por su valiosa colaboración durante la pesca de los reproductores de dorada.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GENERAL	17
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	17
3. HIPÓTESIS	18
3.1. HIPÓTESIS NULA (H0)	18
3.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H1)	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1. BIOECOLOGÍA DE DORADA <i>Brycon sinuensis</i>	19
4.2. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE PECES	20
4.2.1. Crioprotectores	23
4.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA	24
4.3.1. Movilidad espermática	25
4.3.2. Daño en membrana espermática y mitocondrias	26
4.3.3. Fragmentación del DNA	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1. LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DEL ESTUDIO	28
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO	28
5.3. OBTENCIÓN DEL SEMEN Y EVALUACIÓN SEMINAL	29
5.4. TRATAMIENTOS	29
5.5. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN	30
5.5.1. Empacado y congelación	30
5.5.2. Descongelación del semen	31
5.6. CALIDAD SEMINAL	31
5.6.1. Volumen seminal	31

5.6.2. Concentración espermática	31
5.6.3. Tiempo de activación	32
5.6.4. Movilidad total, tipos de movilidad, velocidades y progresividad espermática.	32
5.7. EVALUACIÓN DE DAÑOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	32
5.7.1. Daño en la membrana espermática y mitocondrias	32
5.7.2. Fragmentación del DNA	33
5.8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADÍSTICO	34
6. RESULTADOS	35
6.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DORADA	35
6.2. CALIDAD DEL SEMEN PRECONGELADO	35
6.3. CALIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO	37
6.4. DAÑO CELULAR EN SEMEN DESCONGELADO	39
6.4.1. Daño en mitocondrias	39
6.4.2. Daño en membrana espermática	40
6.4.3. Fragmentación del DNA	40
6.5. EFECTO DE FACTORES EVALUADOS Y SU INTERACCIÓN	41
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES	53
9. BIBLIOGRAFÍA	54

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reporte de estudios realizados en Colombia relacionados con protocolos de crioconservación de semen de peces.	23
Tabla 2. Diseño experimental usado para la crioconservación de semen de dorada <i>Brycon sinuensis</i> con tres crioprotectores (DMSO, DMA, EG) a dos porcentajes de inclusión (5%, 10%).	29
Tabla 3. Características del semen fresco de dorada <i>B. sinuensis</i> .	35
Tabla 4. Características seminales del semen fresco y precongelado de dorada <i>Brycon sinuensis</i> . Letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0.05$).	37
Tabla 5. Características seminales del semen fresco y crioconservado-descongelado de dorada <i>Brycon sinuensis</i> . Letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0.05$).	39
Tabla 6. Efectos factores y su interacción sobre la calidad del semen criopreservado-descongelado de <i>Brycon sinuensis</i> ($p < 0.001$).	42

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Reproductor macho de dorada.	19
Figura 2. Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba (CINPIC).	28
Figura 3. Daño en mitocondrias (D-Mit) en semen de dorada descongelado.	39
Figura 4. Daño en membrana espermática (D-Mem) en semen de dorada descongelado.	40
Figura 5. Valores de fragmentación del DNA (F-DNA) en semen de dorada descongelado.	41

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la criopreservación de semen de dorada *Brycon sinuensis* con dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) o etilenglicol (EG) a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%); para lo cual se indujeron 12 machos con 5 mg extracto hipofisario de carpa por Kg de peso y seis horas después el semen fue colectado en tubos Falcón de 20 ml. El semen fue diluido (1:4) en la solución crioprotectora compuesta por glucosa 6%, yema de huevo 12% y DMSO o DMA o EG a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%); luego fue empacado en pajillas de 2.5 mL y congelado en vapores de nitrógeno líquido (NL) durante 30 minutos y posteriormente almacenadas en NL en termos de 34 L. El semen fue descongelado por inmersión directa en baño serológico a 35°C durante 60 segundos. La calidad del semen fresco, precongelado y descongelado fue evaluada con la ayuda del software Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic, España) y un microscopio de contraste de fase (Nikon E55, Japón) mediante la movilidad total, tipos de movilidad (rápida, media, lenta), espermatozoides inmóviles, velocidades (lineal y curvilínea), progresividad total y concentración espermática. Además, en el semen descongelado, se evaluaron los daños en membrana espermática (D-Mem), en mitocondria (D-Mit) y fragmentación de DNA (F-DNA) mediante citometría de flujo (Citómetros FACS CANTO II, BD Biosciences San José, CA y LSR 2 FORTESSA) (BD Biosciences San José, CA). El semen fresco presentó alta movilidad total ($97.0 \pm 7.0\%$); mientras que en semen precongelado ($82.5 \pm 17.9\%$) y descongelado ($45.4 \pm 13.6\%$) fue mayor cuando fue tratado con DMSO10% ($p < 0.05$). En semen descongelado los D-Mem oscilaron entre $62.1 \pm 18.8\%$ (DMA 5%) y $49.8 \pm 9.8\%$ (DMSO 5%), los D-Mit oscilaron entre $59.4 \pm 14.8\%$ (DMA 5%) y $83.4 \pm 4.2\%$ (DMSO 10%) y F-DNA oscilaron entre $9.5 \pm 14.0\%$ (EG10%) y $1.6 \pm 0.2\%$ (DMA10%) sin observarse diferencia estadística entre estos valores ($p > 0.05$). Los resultados del presente estudio permiten concluir que DMSO incluido a 5 o 10%, registró mejor calidad del semen descongelado al compararlo con los obtenidos con DMA y EG; sin embargo, la capacidad fecundante del semen criopreservado con esta solución

crioprotectora (DMSO 5 o 10%, yema de huevo 12% y glucosa 6%) debe ser evaluada mediante pruebas de fertilidad y eclosión.

Palabras claves: Dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, peces reofílicos, reproducción.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the semen cryopreservation dorada *Brycon sinuensis* with dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA) or ethylene glycol (EG) at two inclusion rates (5 or 10%); for which 12 males were induced with 5 mg pituitary carp extract per kg of weight and six hours later the semen was collected in 20 ml Falcon tubes. The semen was diluted (1:4) in the cryoprotective solution composed of 6% glucose, 12% egg yolk and DMSO or DMA or EG at two inclusion rates (5 or 10%); it was then packed in 2.5 mL straws and frozen in liquid nitrogen (NL) vapors for 30 minutes and then was stored in NL in 34L thermos. The semen was thawed by direct immersion in a serological bath at 35°C for 60 seconds. The quality of fresh, pre-frozen and thawed semen was evaluated using the Sperm Class Analyzer software (SCA, Microptic, Spain) and a phase counting microscope (Nikon E55, Japan). Total motility, motility types (rapid, medium, slow), static sperm, velocities (linear and curvilinear), total progressivity and sperm concentration were analyzed. In addition, sperm membrane damage (Mem-D), mitochondrial damage (Mit-D) and DNA fragmentation (DNA-F) were analyzed using flow cytometry (FACS CANTO II Cytometers, BD Biosciences San José, CA and LSR 2 FORTESSA) (BD Biosciences San José, CA). Fresh semen showed high total motility ($97.0 \pm 7.0\%$); while in pre-frozen ($82.5 \pm 17.9\%$) and thawed ($45.4 \pm 13.6\%$) semen it was higher when treated with 10% DMSO ($p < 0.05$). In thawed semen the Mem-D ranged between $62.1 \pm 18.8\%$ (5% DMA) and $49.8 \pm 9.8\%$ (5% DMSO), the Mit-D ranged between $59.4 \pm 14.8\%$ (5% DMA) and $83.4 \pm 4.2\%$ (10% DMSO) and DNA-F ranged between $9.5 \pm 14.0\%$ (EG10%) and $1.6 \pm 0.2\%$ (DMA10%) observed no statistical difference between these values ($p > 0.05$). The results of the present study allow us to conclude that DMSO included at 5 or 10%, showed better semen thawed quality when compared with those obtained with DMA and EG; however, the fertilizing capacity of the cryopreserved semen with this cryoprotective solution (5 or 10% DMSO, 12% egg yolk and 6% glucose) should be evaluated its fertilizing capacity through fertility and hatching tests.

Keywords: Dimethylacetamide, dimethylsulfoxide, ethyleneglycol, reophilic fish, reproduction.

1. INTRODUCCIÓN

Dorada *Brycon sinuensis* es un pez reofilico, endémico de la cuenca del río Sinú, con importancia comercial en el Caribe colombiano, particularmente en el departamento de Córdoba (Morales & Lasso, 2011); con características deseables para la piscicultura continental, en virtud de su rápido crecimiento, fácil adaptación a las dietas comerciales y al cautiverio.

La construcción de la hidroeléctrica de Urrá afectó la ruta migratoria de los peces reofilicos como la dorada a la cuenca alta del río Sinú; así mismo, redujo sus áreas de desove incrementando su vulnerabilidad a la pesca, ya que sus poblaciones se concentran entre la presa en Urrá y Tierralta para reproducirse (Atencio-García, 2000). Igualmente, la construcción de un dique de represamiento en el caño de Betancí, anuló a la ciénaga de Betancí como lugar de alimentación y reposo de la poblaciones de peces reofilicos como dorada e impide durante la temporada reproductiva el ingreso de las larvas a la ciénaga para continuar con su ciclo biológico (Atencio-García & Olaya-Nieto, 2012). Otras amenazas son la pesca en áreas de veda, la tala de bosque nativo, la contaminación orgánica e inorgánica de su hábitat, la interrupción de la migración de los peces en las áreas de maduración y desove, pérdida de áreas de desoves aguas arriba, todas estas condiciones generan una pérdida de su potencial reproductivo (Atencio-García & Olaya-Nieto, 2012), lo que ha conllevado a que la dorada aparezca en la categoría casi amenazada en el Libro Rojo de Peces de Agua Dulce de Colombia (Mojica et al., 2012).

La criopreservación es una herramienta biotecnológica relevante que permite la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Bobe & Labbé, 2009). Según Medina-Robles et al. (2005) la crioconservación beneficia las actividades de reproducción en cautiverio, ya que aumenta la posibilidad de reproducción por fuera de la temporada reproductiva, facilita el movimiento e

intercambio de material genético entre productores, mejora la eficiencia en la utilización de los parentales y contribuye a disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores en obtención de nuevos reproductores. Además, la crioconservación ofrece ventajas como optimización de los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal asincrónica y ciclos reproductivos estacionales (Espinosa, 2013), así como un uso eficiente del semen durante los procesos de reproducción artificial (Lahnsteiner et al., 2004).

En el mundo se ha reportado criopreservación de semen de más de 200 especies de organismos acuáticos (Tiersch & Green, 2011). Sin embargo, en Colombia los estudios de crioconservación de semen de peces nativos son recientes; destacándose los avances en el desarrollo de protocolos de crioconservación de cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Navarro et al., 2004, Ramírez-Merlano et al., 2005), yamú *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas et al., 2006; Velasco-Santamaría et al., 2006), bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Ramírez-Merlano et al., 2011), bocachico *Prochilodus magdalenae* (Atencio-García et al., 2013), bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* (Atencio-García et al., 2014), mueluda *Brycon moorei* (Atencio-García et al., 2017) y bagre *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Herrera-Cruz et al., 2019); con resultados satisfactorios en la reproducción artificial de estas especies. Sin embargo, cuando se pretende criopreservar semen de una especie nueva, como el caso de dorada, se sugiere ajustar los protocolos a la especificidad de la especie (Mongkonpunya et al., 2000).

Por otra parte, uno de los problemas de la crioconservación de semen de peces es la carencia de protocolos estandarizados durante cada etapa del proceso. Por esta razón, la comercialización de semen criopreservado de peces en la acuicultura es limitada (Asturiano et al., 2016; Martínez et al., 2016). De igual manera, existen muchos factores que influyen en el proceso de crioconservación que afectan el semen crioconservado, la calidad inicial del semen, la composición del diluyente, los crioprotectores, el factor de dilución, la velocidad de congelación y descongelación, así como los aspectos fisiológicos del espermatozoide y la

especificidad de la especie (Aramli et al., 2015; Linhartova et al., 2013; Shishanova et al., 2012); los cuales generan una disminución de la motilidad del esperma e integridad de la membrana (Trigo et al., 2015).

El desarrollo de programas de mejoramiento de la productividad en la piscicultura ha llamado la atención durante los últimos años (Lind et al., 2012), razón por la cual, la elaboración de un protocolo para la crioconservación de semen de dorada sería una herramienta importante para la reproducción en cautiverio y una estrategia para la conservación de esta especie, puesto que la diversidad de los recursos genéticos y la variabilidad genética de las especies ayudan a aumentar la productividad de las poblaciones de peces para la producción de alimentos aumentando la seguridad alimenticia y el desarrollo económico de las comunidades (FAO 2007).

Pullin et al. (1998) consideró que un banco de semen criopreservado de una especie amenazada o vulnerable ayuda a su conservación, estudio y producción; por tal motivo, el presente estudio tiene como propósito avanzar en la estandarización de un protocolo de criopreservación de semen de dorada con tres crioprotectores internos: dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (EG), incluidos a dos porcentajes (5 y 10%) para contribuir a los programas de fomento piscícola y conservación de esta especie.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (EG) a dos porcentajes de inclusión (5 y 10%) como crioprotectores internos para la crioconservación del semen de dorada *Brycon sinuensis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las características de semen fresco de dorada *Brycon sinuensis*.
- Estimar la calidad espermática de semen precongelado y descongelado mediante la movilidad total, tipos de movilidad, velocidad y progresividad espermática.
- Determinar daños del semen criopreservado-descongelado a nivel de membrana plasmática, mitocondrias y fragmentación de DNA mediante citometría de flujo.

3. HIPÓTESIS

3.1. HIPÓTESIS NULA (H_0)

El semen de dorada puede ser criopreservado con DMSO, DMA o EG incluidos a dos porcentajes (5 o 10%) como crioprotectores internos produciendo un semen descongelado de buena calidad seminal.

3.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1)

El semen de dorada no puede ser criopreservado con DMSO, DMA o EG incluidos a dos porcentajes (5 o 10%) como crioprotectores internos produciendo un semen de descongelado de pobre calidad seminal.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. BIOECOLOGÍA DE DORADA *Brycon sinuensis*

B. sinuensis pertenece al orden Characiformes familia Characidae, subfamilia Bryconinae; conocida comúnmente como dorada, charúa, mulata y come muerto. Fue clasificada como subespecie *Brycon moorei sinuensis* (Dahl, 1971) por tener un número de escamas mayor en la línea lateral que *Brycon moorei*; pero luego fue reconocida como especie *B. sinuensis* (Lima, 2003).



Figura 1. Reproductor macho de dorada (Foto CINPIC, 2010).

Su ciclo de vida depende del río donde se reproduce y las ciénagas donde se alimenta y crece (Atencio-García, 2005), es una especie de migración mediana (Usma et al., 2009) que se reproduce en el periodo lluvioso, principalmente entre abril y junio (Atencio et al., 2010). Durante el periodo lluvioso, las variaciones de

caudal, conductividad eléctrica y sólidos totales disueltos son estímulos finales importantes para la reproducción de esta especie (Kerguelén et al., 2011).

Las hembras de esta especie pueden llegar a medir 44 cm con peso aproximado de 1 a 2 Kg (Salgado & Montes, 2013). Olaya et al. (2007) estimaron la relación longitud intestinal/longitud total en 1.1 propia de un omnívoro que basa su dieta en frutas, semillas, pero también se alimenta de peces como cocobolo *Aequidens pulcher*, chipe *Hoplosternum magdalenae*, sardinas *Astyanax sp.* y yalúa *Cyphocharax magdalenae*; lo cual muestra el amplio espectro alimenticio de esta especie.

4.2. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE PECES

La crioconservación de semen de peces puede ser utilizada como herramienta para la conservación de los recursos genéticos en especies de peces comercialmente importantes y en peligro de extinción (Tiersch, 2008); lo cual permite un manejo simplificado de los reproductores, disminuyendo su número y permitiendo semen durante y fuera del periodo de reproducción de la especie (Cabrita et al., 2010). Además, ayuda a los procesos de reproducción en cautiverio (Bokor et al., 2010), a los programas de mejoramiento selectivo (Adams et al., 2008) y a la conservación de especies vulnerables o amenazadas (Viveiros & Godinho, 2009).

El uso de la crioconservación de semen en peces se ha desarrollado con éxito en numerosas especies alrededor del mundo (Tiersch, 2008), incluyendo especies de gran interés comercial como *Epinephelus fuscoguttatus* (Yusoff et al., 2018) en Malasia, *Sparus aurata* (Zilli et al., 2018) en Italia, *Anarhichas minor* (Beirão & Ottesen 2018) en Noruega, *Gymnocypris przewalskii* (Wei et al., 2018) en China, *Epinephelus marginatus* (Riesco et al., 2017) en Portugal, *Nandus nandus* (Sarder et al., 2012) en Bangladés, *Misgurnus anguillicaudatus* (Shigueki et al., 2009) en Japón, entre otras.

Por su parte, en Brasil se han desarrollado estudios en crioconservación de semen

de peces como *Colossoma macropomum* (Mello et al., 2016), *Prochilodus lineatus* y *Brycon orbignyanus* (Di Chiacchio et al., 2017), *Brycon opalinus* (Orfão et al., 2011), *Brycon orbignyanus* (Carmo et al., 2014), *Brycon opalinus* (Viveiros et al., 2012). De igual manera, en Perú (Restrepo-Betancur et al., 2017) crioconsecaron semen de *Brycon henni*.

En Colombia (tabla 1) estudios relacionados con crioconservación de semen de peces sugieren avances importantes. Navarro et al. (2004) para *Piaractus brachypomus* indican que los mejores tratamientos para preservar el semen fue yema de huevo con DMSO10% y leche entera con metanol (MET) 10%, sin embargo, no recomienda el uso de glicerol (GLY) como crioprotector para semen en esta especie. Por su parte, Ramírez-Merlano et al. (2005) observaron para esta misma especie que el semen crioconservado con DMSO10% y MET10% en pajillas de 2.5 o 5.0 mL es eficiente para alcanzar fertilidades similares a la de semen fresco, mostrando utilidad práctica para inseminar grandes volúmenes de oocitos.

Pinzón-Arciniegas et al. (2005) en ensayos preliminares sobre crioconservación con *Pseudoplatystoma fasciatum* mostraron que concentraciones de DMSO iguales o mayores a 10%, redujeron considerablemente la viabilidad de los espermatozoides, mientras que Ramírez-Merlano et al. (2011) para *Pseudoplatystoma metaense* sugieren la combinación de DMSO 10%, glucosa 5.5%, leche entera al 5% y la mezcla de MET 12% , glucosa 5.5% y leche entera al 5% usando curvas rápidas de congelación C2 (8.4°C/min de 4 a -80°C) pueden constituir un protocolo eficiente para la crioconservación seminal de esta especie. Por su parte, Atencio-García et al. (2014), expresaron que a medida que aumenta el porcentaje de inclusión del crioprotector disminuye la fertilidad y eclosión; lo cual permite sugerir que el uso de EG en porcentajes de inclusión superiores a 5% disminuye la calidad y capacidad fertilizante del semen en *Sorubim cuspicaudus*.

Para *Brycon amazonicus* Cruz-Casallas et al. (2006) reportaron que semen crioconservado con DMSO 5% presentó los mejores porcentajes de movilidad y

tiempo de activación, pero indicaron que al aumentar la concentración del crioprotector la calidad seminal disminuye significativamente y recomendaron evaluar nuevamente el protocolo para ajustar un protocolo definitivo en esta especie.

Martínez et al. (2012) al utilizar DMSO 5% y DMSO 15% en bocachico *Prochilodus magdalenae* encontraron un alto daño en las células por fragmentación de DNA, mientras que con el uso de DMSO 10% y glucosa 6% en pajillas de 0.5 mL obtuvieron menores valores de fragmentación en DNA. No obstante, Atencio-García et al. (2013) para la misma especie evaluaron DMA a tres concentraciones (8, 10 y 12%) observando que DMA 8%, glucosa 6% y yema de huevo 12% es una alternativa viable para la crioconservación de la especie.

Sin embargo, en nuestro país la crioconservación de semen de peces nativas es un área de estudio relativamente nueva y los estudios se han orientado al desarrollo de protocolos de congelación, evaluación de los crioprotectores y diluyentes con el objetivo de disminuir los daños causados en las células espermáticas (Medina-Robles et al., 2005; Martínez, 2008; Martínez-Pastor et al., 2010; Atencio et al., 2013; Padilla, 2014; Atencio et al., 2017). Los daños provocados a células espermáticas durante el proceso de crioconservación afectan la calidad espermática y el desarrollo embrionario, generando malformaciones y bajas tasas de sobrevivencia larval (Kato et al., 2001).

Tabla 1. Reporte de estudios realizados en Colombia relacionados con protocolos de crioconservación de semen de peces.

Especie	Objetivos	Referencia
<i>Piaractus brachyomus</i>	Evaluar la calidad y fertilidad del semen crioconservado con cinco sustancias crioprotectoras GLY ⁷ , DMSO ¹ , MET ⁶ , PPG ⁸ y EG ³ .	Navarro et al. (2004)
<i>Piaractus brachyomus</i>	Efectos de DMSO ¹ , MET ⁶ y EG ³ sobre la calidad del semen pos descongelado	Ramírez-Merlano et al. (2005)
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> Linnaeus, 1766).	Pinzón-Arciniegas. (2005)
<i>Brycon amazonicus</i>	Efecto del tamaño de la pajilla y temperatura de descongelación sobre la calidad espermática.	Velasco-Santamaría et al. (2006)
<i>Brycon amazonicus</i>	Evaluación de diferentes sustancias crioprotectoras, curvas de congelación y volúmenes de empaque sobre calidad seminal pos-descongelado.	Cruz-Casallas et al. (2006)
<i>Pseudoplatystoma metaense</i>	Evaluación diferentes protocolos de crioconservación de semen (efectos de diluyentes, tasa de congelación, movilidad y criodaños).	Ramírez-Merlano et al. (2011)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	Fragmentación del ADN ⁵ y daño en la membrana espermática después de la crioconservación con DMSO ¹ y glucosa.	Martínez et al. (2012)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	Efecto de DMA ² como crioprotector a tres concentraciones 8% (0.85M), 10%(1.07M) y 12% (1.29M).	Atencio-García et al. (2013)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	Determinar tasas de congelación y descongelación para mantener la viabilidad espermática postdescongelación.	Martínez & Pardo (2013)
<i>Sorubim cuspicaudus</i>	Evaluación de la calidad del semen crioconservado utilizando EG ³ a tres niveles de inclusión (5, 10, 15%)	Atencio-García et al. (2014)
<i>Sorubim cuspicaudus</i>	Evaluar el semen criopreservado con DMA ²	Pardo-Carrasco et al. (2015)
<i>Brycon henni</i>	Evaluar el semen criopreservado con DMF ⁴ , DMSO ¹ y EG ³ .	Pineda-Santis et al. (2015)
<i>Brycon henni</i>	Evaluar curva de congelación descongelación de semen criopreservado con DMSO ¹ y DMA ² .	Restrepo-Betancour et al. (2017)
<i>Brycon moorei</i>	Evaluar semen criopreservado con DMSO ¹	Atencio et al. (2017)
<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>	Evaluación de DMSO ¹ , DMA ² y EG ³ a dos niveles de inclusión (5 y 10%).	Herrera-Cruz et al. (2019)

¹Dimetilsulfoxido, ²Dimetilacetamida, ³Etilenglicol, ⁴Dimetilformamida, ⁵Acido desoxirribonucleico, ⁶Metanol, ⁷Glicerol y ⁸Propilenglicol.

4.2.1. Crioprotectores. Los crioprotectores son sustancias químicas que ayudan a minimizar daños de la célula asociados a la congelación y descongelación. Un buen crioprotector se caracteriza por su bajo peso molecular, altamente soluble en solución acuosa de electrolitos, que pueda penetrar en la célula y que no sea tóxico a altas concentraciones (González et al., 2011). Tanto los diluyentes como los

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

Así entonces, encontramos diversas sustancias distribuidas en dos grupos de acuerdo a su permeabilidad en la membrana, que pueden ser permeables o internos como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), etilenglicol (EG), glicerol y 1,2-propanodiol y no permeables a las membranas celulares como yema de huevo, leche en polvo, 2-metil-2,4-pentanodiol, polivinilpirrolidona y hidroxietilalmidón y a diferencia de los productos químicos sintéticos o biomateriales (alginatos, alcohol polivinílico y quitosano) pueden utilizarse para impedir la formación de cristal de hielo (Sambu, 2015). De igual manera, se pueden aplicar antioxidantes y otros compuestos buscando intentar reducir los daños en el ciclo de congelación y descongelación (Safa et al., 2016; Krauskova et al., 2016; Amidi et al., 2016).

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la crioconservación del semen de peces, con los cuales se busca prolongar la viabilidad de la célula espermática por un período corto de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación); además proteger el espermatozoide de la acción tóxica de agentes extraños y de los cambios bruscos de temperatura (Cortés, 2000). Sin embargo, los crioprotectores mismos pueden tener un efecto tóxico en los espermatozoides siendo este efecto relacionado con la concentración utilizada y el tiempo de exposición celular previo a la congelación (Swain & Smith, 2010).

4.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

La calidad espermática es la capacidad que tiene el espermatozoide para fertilizar exitosamente y permitir el desarrollo de un embrión normal (Yildiz et al., 2015), esta

capacidad puede ser analizada mediante parámetros que permiten predecir y determinar el grado de calidad del gameto, (Bobe & Labbé 2010). Se consideran viables los espermatozoides de un pez, que registran valores óptimos de movilidad, progresividad, velocidad espermática, tiempo de activación, concentración espermática e integridad de las estructuras de las células espermáticas (Bobe & Labbé, 2010; Fauvel et al., 2010; Herráez et al., 2017). Actualmente, el control de la calidad espermática es de alto interés en la producción de peces con alto interés comercial (Cabrita et al., 2014; Herráez et al., 2017), siendo las particularidades genéticas y fisiológicas de un espermatozoide viable cuando puede fertilizar exitosamente un óvulo (Herráez et al., 2017), permitiendo el desarrollo de una progenie y descendencia normal (Dumorné et al., 2017; Herráez et al., 2017).

El diagnóstico de la calidad del semen para predecir su capacidad fecundante y contribuir a mejorar las tasas de fertilización y eclosión ha permitido el desarrollo de metodologías de crioconservación o biotecnologías aplicadas al mejoramiento genético (Fauvel et al., 2010). La evaluación de la calidad seminal se puede realizar mediante diversos criterios como la morfología de las células espermáticas, la integridad de la membrana celular y nuclear, el contenido energético y pruebas complejas que incluyen herramientas moleculares para identificar células vivas, muertas y en apoptosis; también la calidad seminal se evalúa mediante la movilidad espermática utilizando el análisis espermático asistido por computadora (CASA); también hay análisis de la viabilidad espermática y apoptosis mediante electroforesis de células individuales y citometría fluorescente (Cabrita et al., 2014; Herráez et al., 2017). La citometría de flujo tiene gran potencial para la evaluación de los criodañados ocasionados en el proceso de criopreservación y permitir una adecuada selección de los crioprotectores (Ogier-De Baulny et al., 1999; Padilla 2014).

4.3.1. Movilidad espermática. La movilidad es la condición por la cual el espermatozoide puede alcanzar el ovocito para lograr exitosamente la fertilización (Tabares et al., 2005) y ha sido considerada como una de las principales variables

de calidad espermática en peces (Rurangwa et al., 2004). Se le considera una variable de calidad integradora, al combinar varios componentes celulares responsables de la activación y sostenibilidad de la movilidad y movimiento progresivo del espermatozoide (Bobe & Labbé, 2010). Los mecanismos involucrados en la activación de la movilidad espermática son considerados de vital importancia en la regulación de procesos como fertilización artificial y la crioconservación (Inaba, 2007).

La movilidad es una variable muy importante en los espermatozoides de los peces, ya que tiene un efecto directo en la capacidad fecundante (Jenkins et al., 2010). Esta variable se le asocia con la activación, sostenibilidad y estabilidad del espermatozoide (Bobe & Labbé, 2009). Cuando se afecta la movilidad se puede sugerir que se reduce la probabilidad de que el espermatozoide alcance el micrópilo (Lahnsteiner et al., 2000). Conocer los daños en las estructuras celulares del espermatozoide permite establecer las causas de disminución de su capacidad fecundante; semen con daños en la mitocondria están asociado a la disminución de la movilidad y semen con daños a nivel del DNA tiene reducida su capacidad fertilizante (Li et al., 2008), (Fraser & Strzezek, 2007). De igual manera, es importante conocer condiciones extrínsecas como calidad de agua, temperatura y osmolaridad, porque estos parámetros fisicoquímicos pueden afectar la movilidad y su duración (Dziewulska et al., 2012).

4.3.2. Daño en membrana espermática y mitocondrias. La crioconservación puede ocasionar daños en las células; Figueroa et al. (2018b) refiere que el daño criogénico genera importantes cambios estructurales y fisiológicos; ruptura de membrana y alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, inactivación enzimática, producción de radicales libres, alteraciones en la concentración de ATP y en la homeostasis del calcio intracelular. La membrana plasmática es una de las principales estructuras afectadas por la crioconservación y este es un componente importante en el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides (Jenkins 2011). La crioconservación puede producir daños a las mitocondrias y fragmentar

el DNA debido a la formación de cristales de hielo, estrés osmótico y toxicidad crioprotectora (Figuroa et al., 2016). De igual manera, se afecta la actividad mitocondrial, integridad del acrosoma y la cromatina, la fluidez y la permeabilidad de la membrana plasmática, conduciendo a la reducción de la viabilidad, movilidad y capacidad de fertilización de los espermatozoides descongelados (Figuroa et al., 2013; Yeste et al., 2015; Magnotti et al., 2018). La integridad de la membrana y función mitocondrial en semen fresco y congelado-descongelado son determinantes en el éxito de los protocolos de crioconservación (Daly & Tiersch, 2011).

4.3.3. Fragmentación del DNA. La fragmentación del DNA se entiende como las anomalías que sufre la estructura de cromatina espermática debido a las diversas condiciones ambientales a las cuales una célula está sometida (Zilli et al., 2003). La integridad del DNA espermático está asociado al éxito de la fertilización, el desarrollo normal de los embriones resultantes o su descendencia (Herráez et al., 2017), convirtiéndose, entonces la fragmentación del DNA en un atributo indispensable para predecir el fracaso o éxito de la fertilización (Li et al., 2008) y por tanto del proceso de crioconservación. Por consiguiente, es necesario estudiar la integridad del DNA de los espermatozoides antes y después de la crioconservación (By et al., 2008).

5. METODOLOGÍA

5.1. LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DEL ESTUDIO

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba (CINPIC), localizado en el municipio de Montería (Córdoba), con coordenadas geográficas de 8°47.5' de Latitud Norte y 75°51.8' de Longitud Oeste, a 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 mm³ (IDEAM, 2014).



Figura 2. Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba (CINPIC).

5.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron reproductores con edad entre dos y tres años, adaptados y mantenidos a condiciones de cautiverio en el CINPIC. Se seleccionaron machos en fase de espermiación, los cuales se caracterizaron por la liberación de semen fluido a ligera presión en cavidad abdominal en sentido cefalo-caudal. Los ejemplares seleccionados fueron trasladados a piletas circulares de manejo (4 m³), con flujo de

agua constante (5 L/min), donde permanecieron durante 48 horas, para adaptarlos a las condiciones experimentales y reducir el estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente. A cada reproductor se le midió la longitud total (cm) y el peso corporal (Kg). La inducción se realizó con extracto pituitario de carpa (EPC) a razón de 5 mg/Kg de peso vivo y se aplicó una dosis única del 80% (Atencio et al., 2003). Los procedimientos de manipulación de los peces fueron realizados de conformidad con las normas y procedimientos para el uso de animales de laboratorio del Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources National Research Council, USA.

5.3. OBTENCIÓN DEL SEMEN Y EVALUACIÓN SEMINAL

Para la extracción del semen los animales fueron tranquilizados con Eugenol a razón de 1mL/10L de agua, para reducir el estrés por manipulación. El semen se obtuvo seis horas después de la inducción con EPC, por medio de masajes abdominales en sentido cráneo-caudal. Las muestras fueron mantenidas bajo condiciones de laboratorio ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$) para las evaluaciones de calidad del semen fresco, la cual sirvió como referencia para evaluar el semen criopreservado-descongelado.

5.4. TRATAMIENTOS

Se evaluaron seis tratamientos, correspondiente a tres crioprotectores internos (DMSO, DMA o EG) con dos porcentajes de inclusión (5 o 10%), adicionalmente se evaluó un tratamiento control (semen fresco).

Tabla 2. Diseño experimental usado para la crioconservación de semen de dorada *Brycon sinuensis* con tres crioprotectores (DMSO, DMA, EG) a dos porcentajes de inclusión (5%, 10%).

Porcentaje de inclusión (factor B)	Crioprotectores (factor A)		
	DMSO	DMA	EG
5%	DMSO5%	DMA5%	EG5%
10%	DMSO10%	DMA10%	EG10%
	Semen fresco		

5.5. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN

Se utilizó como diluyente una solución de glucosa 6% (p:v); a la cual se le incluyó yema de huevo 12% (p:v) y los crioprotectores internos DMSO, DMA o EG a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%, v:v). Para la preparación se mezcló la glucosa con agua destilada calentada previamente a 60°C, posteriormente se adicionó el volumen correspondiente de los crioprotectores internos; finalmente se completó el volumen deseado con agua destilada. De este modo se obtuvieron seis tratamientos (DMSO5, DMSO10, DMA5, DMA10, EG5 y EG10) y el control (semen fresco). Se realizaron tres ensayos y cada tratamiento se evaluó por triplicado para un total de nueve repeticiones.

5.5.1. Empacado y congelación. Para el empaque se utilizó un pool (mezcla) de semen de por lo menos tres machos para cada tratamiento, el cual debió tener una movilidad total de mínimo 90%, el semen fue diluido en proporción 1:4 (Velasco-Santamaría et al., 2006) a temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$; las muestras de semen permanecieron durante cinco minutos expuestas (tiempo de equilibrio) a la solución crioprotectora (semen precongelado, pc), luego se tomó una alícuota de 1 mL, a la cual se le realizaron las pruebas de movilidad y velocidad espermática, obteniendo un patrón de comparación con el semen descongelado (dc), determinando los posibles efectos provocados por la concentración del crioprotector y/o el proceso de crioconservación. Posteriormente la mezcla fue empacada en pajillas de 0.5 mL (Minitub, Abfüll-und Labortechnik GmbH & Co, Alemania) selladas con polivinilo e introducidas en un termo (*dry shipper*) de vapores de nitrógeno líquido de 4 L (MVE, SC 4/2v, USA) por 30 minutos; inmediatamente después, las pajillas fueron

trasladadas a un termo de almacenamiento 34 L (MVE, XC 34/18, USA) y sumergidas directamente en nitrógeno líquido (Cruz-Casallas et al., 2006b).

5.5.2. Descongelación del semen. El semen se descongeló 15 días después, por inmersión directa en un baño serológico a 35°C durante 60 segundos (Mermert, WNB 7, Alemania) (Cruz-Casallas et al., 2006b) y seguidamente se evaluó movilidad y velocidad espermática, fragmentación del DNA y daño de la membrana y las mitocondrias posdescongelación como se describirá seguidamente.

5.6. CALIDAD SEMINAL

5.6.1. Volumen seminal. Se determinó inmediatamente después de colectar la muestra en tubos Eppendorf graduados y estériles, evitando la contaminación por orina y otros fluidos (sangre, bilis y heces). El volumen seminal obtenido se expresó en mL, considerando esta variable para calcular el número total de espermatozoides por muestra y por individuo. Las muestras fueron mantenidas en el laboratorio a $26\pm 1^\circ\text{C}$, para las posteriores evaluaciones.

5.6.2. Concentración espermática. El semen fresco se diluyó (1:700), para lo cual 1 μL de semen se mezcló con 699 μL de glucosa al 6% en un Eppendorf de 2 mL (dilución 1:700), la mezcla fue homogenizada durante cinco segundos en vórtex a 1200 rpm (Velp Scientific, Zxclassic, China) (Cruz-Casallas et al., 2006); luego 10 μL del semen diluido fue colocado en una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) y con la ayuda del programa asistido por computadora para análisis de semen Sperm Class Analyzer SCA (Microptic SL, SCA VET 01, España) y con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, Japón) se estimó la concentración espermática. Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener un valor promedio de la concentración espermática, y no se permitió una diferencia mayor al 10% entre las lecturas; en tal caso se repitió el proceso.

5.6.3. Tiempo de activación. Se evaluó con ayuda de una cámara de conteo Makler, sobre la cual se colocó 1 μL de semen, y se analizó con un microscopio óptico de contraste de fase. La movilidad espermática fue activada con 10 μL de agua destilada, y se estimó hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides dejaron de moverse. Este procedimiento se realizó tres veces para obtener un valor promedio del semen analizado.

5.6.4. Movilidad total, tipos de movilidad, velocidades y progresividad espermática. Estos parámetros fueron estimados con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa SCA (Microptic SL, SCA VET 01, España); para lo cual una muestra de 0.25 μL de semen y 75 μL de agua bidestilada (dilución 1:300) fueron depositados en una cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel). Las muestras fueron analizadas en un periodo de cuatro segundos por el programa SCA®, obteniéndose la movilidad total y tipos de movilidad (a, b, c y d). Los porcentajes de espermatozoides con velocidad rápida tipo a fueron aquellos con velocidades mayores a 100 $\mu\text{m}/\text{seg}$, media o tipo b, aquellos con velocidades entre 45 y 100 $\mu\text{m}/\text{seg}$, lenta o tipo c, con velocidades entre 10 y 45 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y el porcentaje de células estáticas tipo d o sin movimiento (Atencio-García et al., 2017; Cruz-Casallas et al., 2006). El SCA® también estimó las velocidades curvilíneas (VCL) y lineales (VSL); así como la progresividad total (Cruz- Casallas et al., 2006). Todas las velocidades se expresaron en $\mu\text{m}/\text{s}$. Este procedimiento se realizó tres veces para obtener un valor promedio de las velocidades espermáticas del semen analizado.

5.7. EVALUACIÓN DE DAÑOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

5.7.1. Daño en la membrana espermática y mitocondrias. Se evaluó en semen descongelado, para lo cual se tomaron alícuotas de 10 μL , esta muestra se tiñó con 1 mL de solución compuesta por yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina DiOC₆(3) (70 nM) y Ioduro de Propidio (IP) (Sigma, St. Louis, USA) a razón de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó por 20 minutos en completa oscuridad, posteriormente se analizó mediante

citometría de flujo. La tinción con DiOC₆(3) permitió distinguir las células con alta captación de DiOC₆(3) (viables), baja captación (con daño en mitocondria y sin daño en la membrana espermática) y la tinción con IP indicó las alteraciones de la membrana espermática. Se utilizó un citómetro FACS CANTO II (BD Biosciences San José, CA) mediante la excitación de láser de 488 nm y la detección de la fluorescencia a 530/30 nm y 670 nm, para el DiOC₆(3) y el IP, respectivamente. Los resultados se expresaron en porcentajes de espermatozoides con daños en mitocondria y espermatozoides con daño en membrana.

5.7.2. Fragmentación del DNA. El daño del DNA se evaluó en semen descongelado, tomando alícuotas de 100 µL, las cual se fijó con 300 µL de etanol 70% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), posteriormente se incubó por 4 horas a 4°C, luego se lavó con PBS ultrafiltrado BD libre de calcio con agitación mecánica en vórtex, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 300 µL de HOECHST 33342 1 µg/mL por cada millón de células; se mezcló en vórtex y se incubaron en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se analizaron por citometría de flujo. Se utilizó un citómetro LSR 2 FORTESSA (BD Biosciences San José, CA) para el análisis de las muestras, se excitaron con un láser de fase sólida a 355 nm y se analizaron la fluorescencia a 450/50 nm. Los resultados se expresaron en porcentajes células haploides con DNA fragmentado.

5.8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x2; es decir, el factor crioprotector con tres niveles (DMSO, DMA, EG) y el factor porcentaje de inclusión con dos niveles (5 o 10%), además se evaluó semen fresco como tratamiento control. Todas las variables analizadas como movilidad total (%), tipos de movilidad (%), velocidades espermáticas ($\mu\text{m}/\text{seg}$), progresividad total (%), fragmentación del DNA (%), daños en membrana espermática (%) y daños en mitocondrias (%) fueron sometidos a pruebas de normalidad (Prueba Kolmogórov-Smirnov) y de homogeneidad de varianza (Prueba Barlett). Se evaluó el efecto de cada factor y su interacción en cada parámetro analizado; además se realizó un análisis de varianza en una sola vía (ANOVA) y finalmente para identificar diferencias entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey, en todos se utilizó un nivel de confianza de 95% como criterio estadístico para revelar diferencia significativa. Los análisis se realizaron con el software Rstudio 3.3.2 (2017).

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DORADA

La tabla 3, presenta las características del semen fresco de dorada, obtenidos por inducción hormonal con EPC. El color del semen de dorada estuvo en el rango de amarillo a amarillo pardo, con volumen seminal promedio de 1.2 ± 0.3 mL, movilidad superior a 90% con tiempo de activación de 37.1 ± 1.5 s; mientras que la concentración espermática fue de 17524.0 millones/mL.

Tabla 3. Características del semen fresco de dorada *B. sinuensis* obtenido con por inducción hormonal con EPC.

Características	Valor
Número de individuos	12
Longitud total (cm)	32.2 ± 1.8
Peso (g)	1240 ± 23.3
Edad (años)	2-3
Color (semen)	Amarillo
Volumen seminal (mL)	1.2 ± 0.3
Movilidad total (%)	97.0 ± 7.0
Tiempo de activación (s)	37.1 ± 1.5
Concentración espermática (10^6/mL)	17524.0 ± 3542.4

6.2. CALIDAD DEL SEMEN PRECONGELADO

La tabla 4, presenta la calidad del semen precongelado. Los valores de movilidad total ($97.0\pm 7.0\%$), progresividad total ($60.6\pm 23.7\%$), velocidad curvilínea VCL (92.0 ± 23.0 $\mu\text{m}/\text{seg}$) y velocidad lineal VSL (42.0 ± 11.2 $\mu\text{m}/\text{seg}$) de semen fresco

fueron mayores y con diferencia significativa a los valores registrados en el semen precongelado ($p < 0.05$). El semen fresco también registró el mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida ($53.1 \pm 27.1\%$) y media ($32.3 \pm 19.1\%$); así como menor porcentaje de espermatozoides lentos (11.6 ± 11.8) y estáticos ($3.0 \pm 7.0\%$), observándose diferencia significativa con respecto a los de semen precongelado ($p < 0.05$).

La movilidad total del semen precongelado fue mayor cuando fue tratado con DMSO10% ($82.5 \pm 17.9\%$); sin mostrar diferencia estadística con DMSO5% ($73.7 \pm 17.2\%$) ($p > 0.05$); pero sí con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides rápidos en el semen precongelado osciló entre $0.1 \pm 0.2\%$ (DMA10%) y $9.3 \pm 6.8\%$ (DMSO10%), sin observarse diferencia significativa entre estos tratamientos ($p > 0.05$).

Los mayores porcentajes de espermatozoides con movilidad media se observaron en el semen precongelado con DMSO10% ($28.6 \pm 15.5\%$), sin mostrar diferencia significativa con DMSO5% ($26.8 \pm 12.9\%$) ($p > 0.05$), pero sí con los demás tratamientos ($p < 0.05$).

Cuando el semen precongelado fue tratado con EG5% ($47.3 \pm 5.3\%$) y DMSO10% ($44.7 \pm 13.2\%$) registraron los mayores porcentajes de espermatozoides con movilidad lenta sin observarse diferencia significativa entre estos valores ($p < 0.05$) y los menores valores se registraron cuando el semen fue tratado con DMA5% ($30.0 \pm 4.7\%$) ($p < 0.05$).

Los menores porcentajes de espermatozoides estáticos se registraron con el semen precongelado tratado con DMSO10% ($17.5 \pm 17.9\%$), sin mostrar diferencia con DMSO5% ($26.3 \pm 17.2\%$); pero sí con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

La progresividad total del semen precongelado presentó valores oscilando entre 20.6±8.7% (DMSO10%) y 0.5±0.4% (DMA5%) sin observarse diferencia entre estos valores (p>0.05).

Las mayores velocidades curvilíneas del semen precongelado se presentó cuando se trataron con DMSO 10% (48.6±14.0 µm/seg), DMSO5% (48.1±11.2%), EG5% (32.2±4.1%) o EG10% (27.2±4.3%) sin observarse diferencia entre estos valores (p>0.05). Asimismo las mayores velocidades lineales se observaron cuando el semen precongelado se trató con DMSO10% (24.3±6.2%) o DMSO5% (20.9±2.6%) sin observarse diferencia significativa entre estos valores (p>0.05).

Tabla 4. Características seminales del semen fresco y precongelado de dorada *Brycon sinuensis* con diferentes crioprotectores a dos porcentajes de inclusión. Letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa (p<0.05).

Variable	Semen fresco	DMSO5%	DMSO10%	DMA5%	DMA10%	EG5%	EG10%
Mt (%)	97.0±7.0 ^a	73.7±17.2 ^{bc}	82.5±17.9 ^{ab}	31.7±5.1 ^e	33.1±1.4 ^e	59.9±11.8 ^{cd}	43.5±6.8 ^{de}
Rápidos (%)	53.1±27.1 ^a	6.6±4.8 ^b	9.3±6.8 ^b	0.2±0.1 ^b	0.1±0.2 ^b	1.4±0.8 ^b	0.9±0.5 ^b
Medios (%)	32.3±19.1 ^a	26.8±12.9 ^{abc}	28.6±15.5 ^{ab}	1.4±0.4 ^d	2.4±1.1 ^d	11.2±5.7 ^{bcd}	5.2±2.8 ^{cd}
Lentos (%)	11.6±11.8 ^d	40.3±1.6 ^{abc}	44.7±13.2 ^{ab}	30.0±4.7 ^c	30.6±0.2 ^{bc}	47.3±5.3 ^a	37.4±3.9 ^{abc}
Estáticos (%)	3.0±7.0 ^e	26.3±17.2 ^{cd}	17.5±17.9 ^{de}	68.3±5.1 ^a	66.9±1.4 ^a	40.1±11.8 ^{bc}	56.5±6.8 ^{ab}
VCL (µm/s)	92.0±23.0 ^a	48.1±11.2 ^b	48.6±14.0 ^b	20.0±1.7 ^c	21.2±2.4 ^c	32.2±4.1 ^{bc}	27.2±4.3 ^{bc}
VSL (µm/s)	42.0±11.2 ^a	20.9±2.6 ^b	24.3±6.2 ^b	4.4±1.2 ^c	5.6±1.1 ^c	9.3±1.8 ^c	7.7±1.0 ^c
Pt (%)	60.6±23.7 ^a	15.6±5.5 ^b	20.6±8.7 ^b	0.5±0.4 ^b	1.0±0.8 ^b	4.3±2.0 ^b	2.7±0.4 ^b

Mt, movilidad total; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal; Pt, progresividad total

6.3. CALIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO

La tabla 5, presenta la calidad del semen descongelado. La movilidad total del semen descongelado fue mayor cuando fue tratado con DMSO10% (45.4±13.6%); pero sin mostrar diferencia significativa (p>0.05) cuando fue tratado con DMSO5% (40.5±8.7%); pero si con el resto de los tratamientos (p<0.05). Sin embargo, el

porcentaje de espermatozoides rápidos en el semen descongelado osciló entre $2.0 \pm 2.1\%$ (EG10%) y $2.6 \pm 3.5\%$ (EG5%), sin observarse diferencia significativa entre estos tratamientos ($p > 0.05$).

Los mejores porcentajes de espermatozoides con movilidad media fue de $6.2 \pm 2.8\%$ (DMSO5%) y $8.0 \pm 4.0\%$ (DMSO10%) sin observarse diferencia estadística entre estos valores ($p > 0.05$); mientras que el semen tratado con DMA10% (68.0 ± 7.6), EG5% (66.1 ± 7.4) y EG10% (67.3 ± 5.3) registraron mayor porcentaje de espermatozoides estáticos, observándose diferencia significativa con el resto de tratamientos ($p < 0.05$).

Los mayores porcentajes de espermatozoides lentos se registraron cuando el semen fue crioconservado con DMSO5% ($31.7 \pm 9.2\%$) y DMSO10% ($35.2 \pm 11.8\%$) registraron sin observarse diferencia significativa entre estos valores ($p > 0.05$); pero si con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

La progresividad total del semen descongelado presentó valores similares, oscilando entre $3.9 \pm 4.0\%$ (DMA 10%) y $5.4 \pm 3.6\%$ (DMSO 10%) sin observarse diferencia entre estos valores ($p > 0.05$).

La velocidad curvilínea del semen descongelado osciló entre $24.1 \pm 5.7 \mu\text{m}/\text{seg}$ (DMA 5%) y $28.2 \pm 3.9 \mu\text{m}/\text{seg}$ (DMSO 10%) sin observarse diferencia significativa entre estos valores ($p > 0.05$); mientras que las mayores velocidades lineales se observaron en el semen tratado con DMSO10% ($10.1 \pm 2.2 \mu\text{m}/\text{seg}$) o DMSO5% ($10.0 \pm 2.4\%$) sin observarse diferencia significativa entre estos valores ($p < 0.05$).

Tabla 5. Características seminales del semen fresco y descongelado con diferentes crioprotectores a dos porcentajes de inclusión. Letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

Variable	Semen fresco	DMSO5%	DMSO10%	DMA5%	DMA10%	EG5%	EG10%
Mt (%)	97.0±7.0 ^a	40.5±8.7 ^{bc}	45.4±13.6 ^b	34.8±5.8 ^{cd}	32.1±7.6 ^d	33.9±7.4 ^d	32.7±5.3 ^d
Rápidos (%)	53.1±27.1 ^a	2.5±2.4 ^b	2.2±1.9 ^b	2.1±2.9 ^b	2.1±2.2 ^b	2.6±3.5 ^b	2.0±2.1 ^b
Medios (%)	32.3±19.1 ^a	6.2±2.8 ^b	8.0±4.0 ^b	4.1±3.2 ^b	4.0±3.3 ^b	5.1±4.1 ^b	4.7±2.8 ^b
Lentos (%)	11.6±11.8 ^c	31.7±9.2 ^{ab}	35.2±11.8 ^b	28.6±6.6 ^b	25.9±6.2 ^b	26.2±5.2 ^b	26.0±5.7 ^b
Estáticos (%)	3.0±7.0 ^d	59.5±8.7 ^{bc}	54.6±13.6 ^c	65.2±5.8 ^{ab}	68.0±7.6 ^a	66.1±7.4 ^a	67.3±5.3 ^a
VCL (µm/s)	92.0±23.0 ^a	27.6±3.7 ^b	28.2±3.9 ^b	24.1±5.7 ^b	25.3±5.3 ^b	26.3±5.9 ^b	26.4±3.2 ^b
VSL(µm/s)	42.0±11.2 ^a	10.0±2.4 ^b	10.1±2.2 ^b	6.7±3.0 ^c	6.9±2.7 ^c	8.0±3.5 ^{bc}	7.9±2.3 ^{bc}
Pt (%)	60.6±23.7 ^a	4.8±3.7 ^b	5.4±3.6 ^b	4.0±5.0 ^b	3.9±4.0 ^b	4.9±5.9 ^b	4.0±3.9 ^b

Mt, movilidad total; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal; Pt, progresividad total.

6.4. DAÑO CELULAR EN SEMEN DESCONGELADO

6.4.1. Daño en mitocondrias. Los porcentajes de daños en mitocondrias (D-Mit) del semen descongelado de dorada se muestra en la figura 3. Los D-Mit oscilaron entre 83.4±4.2% (DMSO10%) y 59.4±14.8% (DMA 5%) sin observarse diferencia estadística entre estos valores ($p > 0.05$).

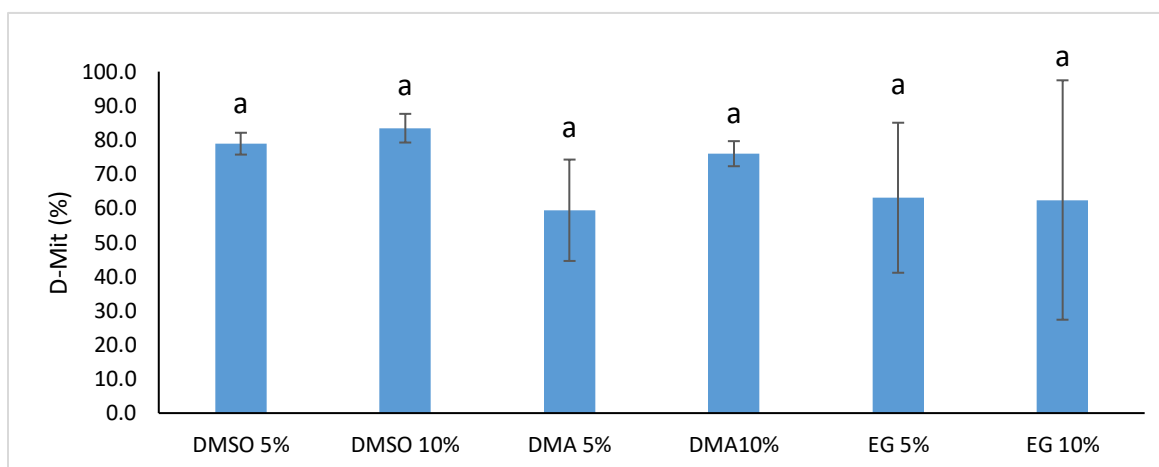


Figura 3. Daño en mitocondrias (D-Mit) en semen descongelado de dorada *Brycon sinuensis*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.4.2. Daño en membrana espermática. Los daños en membrana espermática (D-Mem) de semen descongelado de dorada se muestra en la figura 4. Los porcentajes de D-Mem oscilaron entre $62.1 \pm 18.8\%$ (DMA5%) y $49.8 \pm 9.8\%$ (DMSO5%) sin observarse diferencia estadística entre estos valores ($p > 0.05$).

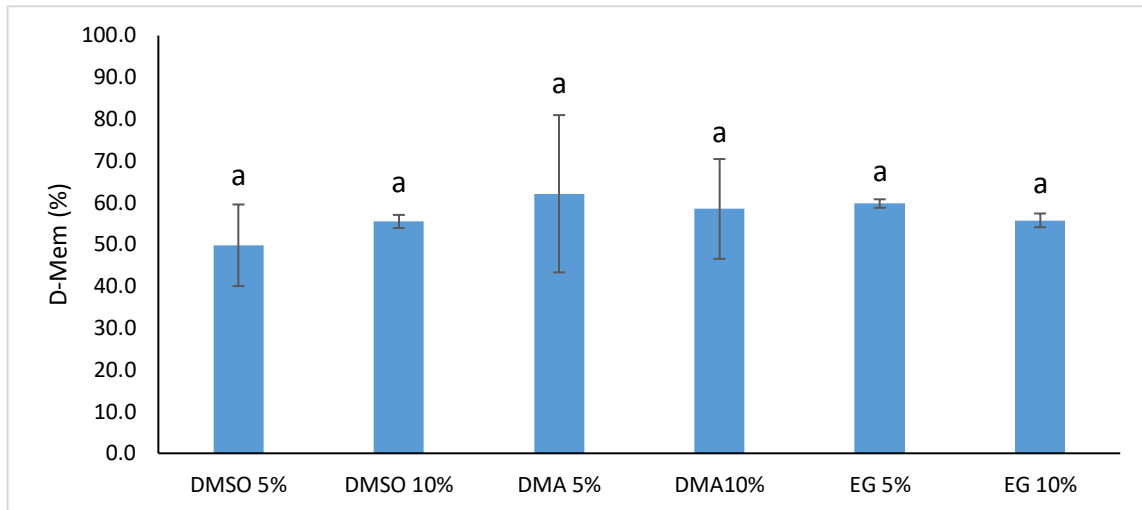


Figura 4. Daño en membrana espermática (D-Mem) en semen descongelado de dorada *Brycon sinuensis*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

6.4.3. Fragmentación del DNA. Los valores de DNA fragmentado (F-DNA) de los espermatozoides de dorada descongelado se muestra en la figura 5. Los valores F-DNA oscilaron entre $9.5 \pm 14.0\%$ (EG10%) y $1.6 \pm 0.2\%$ (DMA10%) sin observarse diferencia estadística entre estos valores ($p > 0.05$).

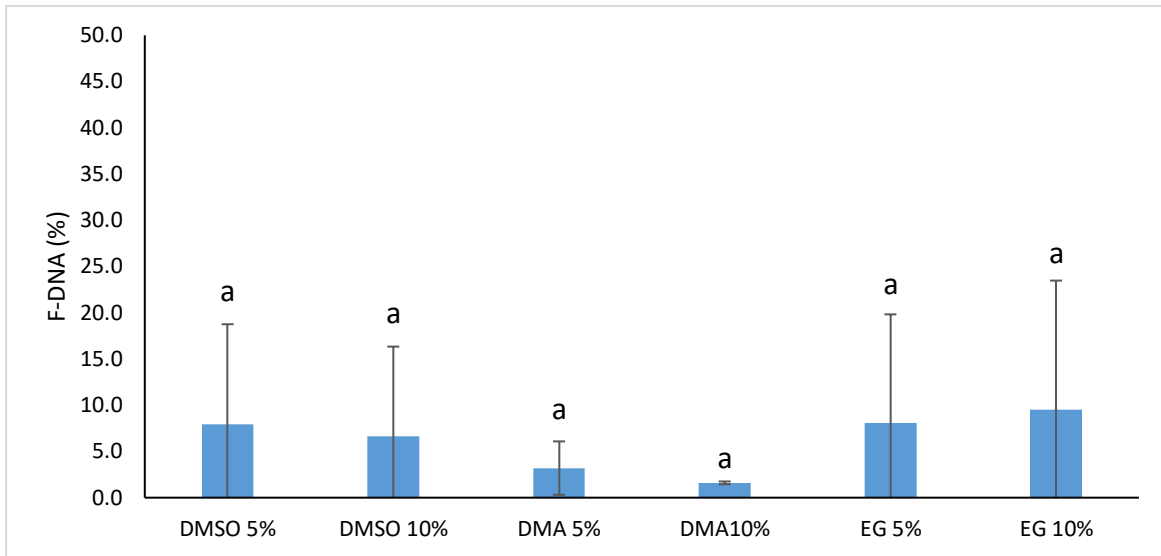


Figura 5. Valores de fragmentación del DNA (F-DNA) en semen descongelado de dorada *Brycon sinuensis*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.5. EFECTO DE FACTORES EVALUADOS Y SU INTERACCIÓN

Los efectos de los factores evaluados (crioprotector y porcentaje de inclusión) en la calidad del semen criopreservado de dorada se presentan en la tabla 6. El factor crioprotector afectó altamente las variables de calidad seminal, caso contrario pasó con el factor porcentaje de inclusión e interacción de las variables, los cuales no tuvieron efecto, en el rango evaluado (5 a 10%) sobre las variables evaluadas.

Tabla 6. Efectos factores y su interacción sobre la calidad del semen criopreservado-descongelado de *Brycon sinuensis*. *** altamente significativa ($p < 0.001$).

Variables	Factor A Crioprotector	Factor B Porcentaje inclusión	Interacción AxB
Movilidad total (%)	***	-	-
Rápidos (%)	***	-	-
Medios (%)	***	-	-
Lentos (%)	***	-	-
Estáticos (%)	***	-	-
Progresividad Total (%)	***	-	-
Velocidad Curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	***	-	-
Velocidad Lineal ($\mu\text{m/s}$)	***	-	-
Daños en membrana	-	-	-
Daños en mitocondria	-	-	-
Fragmentación del DNA	-	-	-

*baja incidencia; **media incidencia; ***alta incidencia; - sin incidencia.

7. DISCUSIÓN

Los resultados de semen fresco de *B. sinuensis* del presente estudio (17524.0 millones/mL y 37.1 s) son similares con los registros reportados por Montes & Salgado (2014) para la misma especie (10058.1 millones/mL y 30.7 s). Además en otros co-específicos se ha reportado características del semen fresco similares a los obtenido en el presente estudio para *Brycon moorei* (vol=3.5±1.8 mL, movilidad > 80%, 33.7±3.3 s y 12393.1 millones/mL) (Atencio-García et al., 2017); *Brycon amazonicus* (vol> 5 mL, movilidad > 90%, 40 a 52.3 s y 6800 a 7598 millones spz/mL) (Jiménez, 2016; Cruz-Casallas et al., 2006); *Brycon henni* (14554 millones/mL, movilidad de 96.1%) (Pineda-Santis et al., 2015) lo cual permite sugerir que las características seminales de las especies migratorias del género *Brycon* presentan características similares, en particular tiempo de activación y concentración espermática. Sin embargo, los datos de concentración espermática reportada por Montoya-López et al. (2006) para *B. henni* (50000 millones/mL) se encuentran muy encima de los valores reportado para la especie y para otros bryconidos migratorios (*B. moorei*, *B. amazonicus* y *B. sinuensis*).

Los resultados obtenidos en semen precongelado con DMSO, DMA y EG permiten sugerir que estos crioprotectores internos afectaron la movilidad total, tipos de movilidad y velocidad espermática. Se registró una reducción drástica de los espermatozoides rápidos (entre 83 a 90%), así como disminución de los espermatozoides con movilidad media, aumento de los lentos y estáticos. También los crioprotectores provocaron disminución de la VCL y la VSL. Los resultados del semen precongelado de dorada mostró una marcada disminución de más del 60% de las variables de calidad espermática cuando el semen fue tratado con DMA 5% o 10%, con relación al semen fresco. Según Viveiros (2005) existe una sensibilidad por parte del semen a los procesos de crioconservación por los efectos tóxicos de los crioprotectores y por las posibles variaciones en la composición del plasma. Linhart et al. (1993) observaron efectos tóxicos sobre la célula espermática en la precongelación del semen de *Silurus glanis* utilizando EG en inclusiones entre 5 y

30% como crioprotector interno, de igual forma Horváth & Urbányi (2000) encontraron que el semen de *Clarias gariepinus* es considerablemente sensible a los daños ocasionados con EG 5% antes de la congelación.

Luego del proceso de pre congelación del semen de dorada, las variables de calidad seminal al entrar en contacto con los crioprotectores DMSO y EG a 5 y 10% de inclusión sufrieron una disminución significativa, mientras que con DMA a 5 y 10% presentaron una disminución más marcada en comparación con el semen fresco; lo cual sugiere que para el semen de dorada DMA es más tóxico comparado con DMSO y EG, incluidos a 5 o 10%.

En la fase de pre congelación (pc) de los tratamientos evaluados, DMSO 5% o 10% fueron mejores al resto de tratamientos, presentando los mayores valores en términos de las variables de calidad seminal analizadas (movilidad total, tipos de movilidad y velocidad espermática) y los menores resultados se observaron cuando el semen fue tratado con DMA y EG (5 o 10%). Sin embargo, para otras especies de peces se ha obtenido mejores resultados con estos crioprotectores. Guarnizo (2007) con semen pre congelado de bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* con EG 5% registró una movilidad total de 76.6% valor superior a los registrados en el presente estudio con EG 5 y 10%pc (59.9 y 43.5%). Sin embargo, el mismo autor registró movilidad total espermática en semen pre congelado con EG 10% (26.6%) y EG 12% (32.8%) utilizando como diluyente yema de huevo 12%, resultados inferiores a los registrados con semen de dorada con los crioprotectores DMSO y EG, pero muy similares con DMA a 5 y 10% (31,7 y 33.1%). Pinzón-Arciniegas et al. (2005) en semen de bagre rayado *P. fasciatum* reportaron disminución de movilidad total a medida que aumentó la concentración de DMSO y el tiempo de exposición del esperma con el crioprotector previo a la congelación (tiempo de equilibrio). Shafler (1981) argumentó que la exposición a altas concentraciones de ciertos crioprotectores por largos periodos de tiempo pueden desnaturalizar las proteínas celulares, reduciendo así la viabilidad del esperma durante la pre congelación.

Pineda-Santis et al. (2015) evaluaron los efectos de la crioconservación del semen de sabaleta *Brycon henni* con dimetilformamida (DMF), DMSO y EG al 5% y encontraron valores de movilidad total del semen descongelado entre 53 y 62%, VCL entre 49 y 53.3 $\mu\text{m/s}$ y VSL entre 23.8 y 25.6 $\mu\text{m/s}$ valores que solo son comparables a los obtenidos con DMSO (5 o 10%) en el presente estudio.

Cruz-Casallas et al. (2006) encontraron que DMSO a niveles de inclusión entre el 5% (76 \pm 2%) y 10% (33 \pm 4%) permitieron buenos porcentajes de movilidad del semen descongelado de *B. amazonicus*, registrando porcentajes de movilidad cercanas a las reportados con DMSO 10% (45.4 \pm 13.6%) en el presente estudio. Por su parte, Murgas et al. (2001) reportaron valores de movilidad espermática de 53% en *Brycon orbygnyanus*, utilizando DMSO 10% y bicarbonato de sodio al 1% como solución activadora.

En el presente estudio, se evidenció que la movilidad total del semen descongelado se redujo aproximadamente a la mitad de la registrada por el semen fresco (97.0 \pm 7.0%) cuando fue tratado con DMSO 5% o DMSO 10% y cayó a alrededor de la tercera parte cuando fue tratado con DMA 5%, DMA 10%, EG 5% y EG 10%. Aunque estadísticamente no se observó diferencia en el porcentaje de espermatozoides rápidos en el semen descongelado; este tipo de espermatozoides disminuyó a una veinticincoavas parte cuando fue tratado con DMSO, DMA y EG (5% y 10%) con relación al semen fresco (53.1 \pm 27.1%).

De igual forma, el porcentaje de espermatozoides con movilidad media del semen descongelado a las diferentes inclusiones del crioprotector no presentó diferencias significativas; pero cuando se utilizó DMA5%, DMA10%, EG5% y EG10% la presencia de los espermatozoides medios se redujo aproximadamente entre 88 a 84% con relación al semen fresco; mientras que cuando DMSO fue utilizado a 5 y 10% este tipo de espermatozoides se redujo entre 81 y 75%. En cuanto al porcentaje de espermatozoides inmóviles se registró un aumento de 20 veces cuando DMSO, DMA y EG se utilizó a 5 y 10% con relación a semen fresco.

Por otra parte, los valores de movilidad total en el semen crioconservado con DMSO 5% y 10%, fueron mayores a los registros con DMA5%, DMA10%, EG5% y EG10%, sugiriendo que DMSO incluido a 5% y 10% son menos tóxicos para esta especie en el proceso de crioconservación.

La reducción de la movilidad y velocidades pudo ser causada por efecto de la toxicidad del crioprotector, más que por el proceso de crioconservación del esperma ya que la reducción más marcada ocurre después de someter el semen a las soluciones crioprotectoras. La movilidad total y la capacidad fecundante del semen crioconservado son considerados criterios de calidad espermática y permiten medir el éxito o fracaso del proceso de crioconservación. Li et al. (2006) consideraron que la calidad del esperma disminuye significativamente durante el proceso de congelación y descongelación, registrando bajos porcentajes de movilidad, reducción del tiempo de activación y pérdida de la progresividad (Lahnsteiner et al., 2000; Wamecke & Pluta, 2003); lo cual sugiere que para mejorar el protocolo y reducir el daño a los espermatozoides se debe optimizar los procesos de congelación y descongelación (Yoon et al., 2015).

Los resultados del presente estudio señalan que las variables de calidad seminal de semen descongelado con DMSO, DMA y EG con porcentajes de inclusión al 5 y 10% sufren una disminución significativa en comparación con el semen fresco. Las causas de este deterioro de la calidad seminal se sugieren están ligados a los daños ocurridos en las mitocondrias, la membrana de la célula espermática y fragmentación del DNA durante los procesos de exposición al crioprotector, congelación y descongelación del semen. Estos daños se ven sustentados en los resultados obtenidos en daño mitocondrial (D-Mit) el cual osciló entre $83.4 \pm 4.2\%$ (DMSO 10%) a $59.4 \pm 14.8\%$ (DMA 5%) y en daño de membrana espermática los valores oscilaron entre $49.8 \pm 9.8\%$ (DMSO 5%) a $62.1 \pm 18.8\%$ (DMA 5%), lo cual indica que la exposición del semen de dorada a las soluciones crioprotectoras y el proceso de crioconservación y descongelación causó daños en membrana y

mitocondria. En cuanto a la fragmentación de DNA (F-DNA) se obtuvieron valores que oscilaron entre $1,6\pm 0,2\%$ (DMA10%) a $9,5\pm 14,0\%$ (EG 10%), lo que indica que hubo una baja fragmentación del DNA del semen descongelado.

Al analizar los resultados obtenidos de movilidad, velocidad espermática, daños de mitocondrias y membrana espermática registrados en cada uno de los tratamientos evaluados; es posible sugerir que la movilidad espermática fue afectada por D-Mem y D-Mit en cada uno de los procesos asociados a la crioconservación.

Ogier de Baulny et al. (1999) argumentaron que la crioconservación provoca una limitación a la actividad mitocondrial y por consiguiente una disminución en los niveles de ATP de la célula espermática. Además, el DNA de las mitocondrias de las células animales codifica las proteínas de la respiración aeróbica celular que da lugar a la producción de ATP (Andersson et al., 2003). Martínez & Pardo (2010) afirmaron que la crioconservación reduce la ineficiencia de la síntesis de proteínas implicadas en la producción energética celular, lo que provoca la disminución de la movilidad espermática. La disminución de la movilidad está asociada con daños en la mitocondria (Fraser & Strzezek, 2007) y se cree que los crioprotectores interactúan directamente con las reservas de ATP (Martínez & Pardo, 2010), lo cual disminuye su concentración en la célula espermática, como consecuencia del estrés osmótico por la adición del crioprotector y/o por la congelación del agua externa (Ogier-De Baulny et al., 1997).

He & Woods (2004) al crioconservar semen de *Morone saxatilis*, encontraron que el nivel de ATP de semen precongelado disminuyó considerablemente cuando el crioprotector estuvo en contacto con las células espermáticas y posteriormente su descenso fue mucho mayor después de la congelación, lo cual indicó un daño en las mitocondrias. Liu et al. (2007) reportó daños en mitocondria de 22.6% en *Pagrus major* con DMSO 15%. Figueroa et al. (2013) reportaron daños en mitocondria de 63.8% en semen de trucha utilizando como crioprotector DMSO 10%.

Adicional a los daños ocurridos del semen a nivel de mitocondria, los daños ocurridos en la célula espermática a nivel de integridad de la membrana ocasionan la reducción de las variables de movilidad espermática y de desempeño reproductivo. Los resultados obtenidos de daños a nivel de membrana espermática sobrepasan el 50% en todos los tratamientos evaluados con semen descongelado.

Entre las probables causas de los daños en la membrana espermática se encuentran la alteración de la bicapa lipídica al tener contacto con DMSO, DMA y EG, y que según Hammerstedt & Graham (1992) afecta las vías del metabolismo intermedio. Labbe et al. (1997) atribuyeron los D-Mem al estrés térmico de la membrana originada por la transición de los fosfolípidos de fase líquida a fase de gel durante la congelación; lo cual suprime las proteínas integrales de membrana de dominios de lípidos de fase de gel, reduciendo así la actividad catalítica y funcional de la misma, también se sugiere como consecuencia del daño mecánico producido por ruptura de la membrana por efectos de la nucleación y consecuente formación de cristales de hielo (Drokin et al., 1998), por los procesos de deshidratación o hidratación que provoca fricción excesiva del agua que sobrepasa la capacidad de difusión de la membrana (Muldrew & McGann, 1990).

Cabrita et al. (1999) consideró que la crioconservación produce pérdida de la funcionalidad de la membrana aumentando la fragilidad de las células, y durante el proceso de congelación y descongelación la sensibilidad de la membrana conlleva a cambios en la estabilidad de la misma, lo que resulta en un incremento en su permeabilidad al agua y a cationes que provocan estrés osmótico (Cabrita et al., 2001). Las técnicas de congelación producen daños químicos y fisiológicos a las membranas interna y externa de los espermatozoides debido a cambios en la fase de transición de lípidos y/o por el incremento de la peroxidación de los lípidos durante la saturación con crioprotectores, congelación y descongelación (Bennetts et al., 2008; O'Connell et al., 2002) y la peroxidación de los lípidos provoca la

disminución de la movilidad, velocidad, morfología, viabilidad y actividad mitocondrial del espermatozoide (O'Connell et al., 2002).

Viveiros et al. (2012) observaron daños en membrana de 18% al crioconservar semen de *Brycon opalinus* con metilglicol 10%. En semen de catfish europeo crioconservado con DMA 15%, fueron registrados daños en membrana de 10% (Ogier- De Baulny et al., 1999). Liu et al. (2007) obtuvieron daños en membrana de 14.7% en espermatozoides de *Pagrus major* con DMSO 15%. Por su parte Martínez et al. (2012) al crioconservar semen de bocachico con DMSO 10% obtuvo D-Mem de 30.2%, valores inferiores a los encontrados en el presente estudio. Caso contrario reportó He & Woods, (2004), quienes obtuvieron 70% de D-Mem en semen de *Morene saxatilis* crioconservado con DMSO 5% valor superior a los alcanzados por dorada en este estudio.

Se observó que los valores de calidad seminal como movilidad total, rápidos, medios, lentos, estáticos, progresividad total, VCL y VSL fueron altamente afectados por el factor crioprotector, caso contrario con relación al porcentaje de inclusión (5 y 10%). Al analizarse los resultados obtenidos en el presente estudio se sugiere que los porcentajes de inclusión evaluados (5 y 10%) no afectaron la capacidad del semen de dorada.

Con los resultados obtenidos, es claro que un alto porcentaje de las células sometidas al estudio se vieron afectadas por daños sufridos a nivel membrana y mitocondria, estableciendo que en todos los ensayos y exposición del semen a las soluciones crioprotectoras y al proceso de congelación y descongelación ocasionó daños en la calidad de la membrana espermática y mitocondria.

Basados en los resultados obtenidos en el presente estudio es evidente que hay un efecto marcado de los daños que sufre la célula espermática durante el proceso de crioconservación (precongelación, congelación, descongelación) sobre cada una de las variables evaluadas en el presente estudio. Golpour et al. (2016; 2017) indica

que los compartimentos subcelulares del espermatozoide como el acrosoma (esturiones), el núcleo (cabeza), la pieza media, el flagelo, el citosol y la membrana plasmática son vulnerables al daño criogénico conllevando al deterioro de la función celular (Nynca et al. 2015). Por su parte, Morris et al. (2012) sugieren que los daños ocasionados en las células espermáticas se encuentran relacionados a un desbalance osmótico ocurrido durante el proceso de descongelación, lo que ocasiona daños en la célula a nivel de membrana y mitocondria, orgánulos fundamentales para la producción de energía y el movimiento del espermatozoide pos-descongelación.

Padilla (2014) señaló que desde el mismo momento en que el semen entra en contacto con la solución crioprotectora se produce daños en las mitocondrias y membrana espermática como consecuencia del choque hiperosmótico y la toxicidad del crioprotector y que estos daños se incrementan durante los procesos de congelación y descongelación y la magnitud de los daños criogénicos puede resultar en la disminución de la movilidad en asociación con reducción de la velocidad y la fertilidad (Ramírez-Merlano et al., 2010).

Por otra parte, Atencio-García et al. (2017) crioconservando semen de *Brycon moorei* con DMSO como crioprotector, evidenció una reducción sobre los tipos de movilidad, rápida, media, progresividad total, VCL y VSL, al igual que un aumento sobre el número de espermatozoides inmóviles en relación al semen fresco, presentando los mejores resultados cuando utilizó DMSO al 5 y 10%; valores muy similares a los obtenidos en la presente investigación. Sin embargo, evidenció que a mayor porcentaje de inclusión (DMSO 15%) mayor será el daño ocasionado a las células y esto se debe a la toxicidad.

De igual manera, Martínez (2010), crioconservando semen de *Prochilodus magdalenae* con DMSO como crioprotector, evidenció una reducción sobre los tipos de movilidad, rápida, media, progresividad total, VCL y VSL, al igual que un aumento sobre el número de espermatozoides inmóviles en relación al semen fresco,

presentando los mejores resultados cuando utilizó DMSO a 10%; valores muy similares a los obtenidos en la presente investigación.

Las características seminales obtenidas en este estudio muestran una buena calidad del semen fresco que se usó en el proceso de crioconservación. Diversos autores han demostrado que valores similares en estas variables garantizan semen de buena calidad. La calidad seminal no solo debería evaluarse estimando la movilidad o fertilidad sino también deberían utilizarse variables que expliquen el grado de genotoxicidad y citotoxicidad de los crioprotectores, tales como la fragmentación del DNA y daños en la membrana (Martínez et al., 2012). Figueroa et al. (2017) indicó que la criopreservación produce una disminución de la actividad metabólica de los espermatozoides, y la razón principal de la disminución de la actividad metabólica y la baja calidad del semen descongelado es la alteración de las estructuras mitocondriales y la membrana en la pieza media durante la criopreservación (Figueroa et al., 2015). Estos cambios ocasionan un impacto extremo en la función de las mitocondrias, incluidos los procesos bioquímicos involucrados en la producción de ATP, lo que reduce la energía disponible para la motilidad (Dzyuba et al., 2010).

El daño de la membrana puede provocar la fuga de los componentes internos de los espermatozoides, lo que conduce a una deficiencia o una actividad reducida de las enzimas (Dietrich et al., 2015). Sin embargo, el proceso de difusión lateral de moléculas (lípidos y proteínas), podría permitir la estabilización transitoria de la membrana plasmática durante el proceso de crioconservación, en el cual la distribución homogénea de partículas y la relación de fosfolípidos y proteínas hacen posible la reversión exitosa de la célula espermática para conservar la capacidad fecundante; este fenómeno podría explicar buenos valores de fertilización con bajos porcentajes de movilidad dado que mantiene la integridad del DNA de la célula (Martínez et al. (2010).

Diversas investigaciones afirman que en procesos de crioconservación, el crioprotector y el porcentaje de inclusión son los aspectos más relevantes para optimizar la viabilidad celular, esto se debe a que el espermatozoide está sujeto a cambios drásticos en su medio físico y químico, y esto está ampliamente documentado que crioprotectores y porcentajes de inclusión no adecuados para cada especie en específico provocan daños en membrana, mitocondrias y DNA, afectando la calidad del semen.

En los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró que en todos los casos el proceso de crioconservación y descongelación con DMSO, DMA y EG al 5 y 10% causó una reducción sobre todas las variables que definen la calidad espermática. Padilla (2014) considera que la disminución de la movilidad total y reducción del porcentaje de espermatozoides rápidos y medios e incremento de los lentos y estáticos; así como disminución de las velocidades espermáticas (VSL, VCL) son consecuencia de los daños que sufren las mitocondrias, membranas y DNA en la fase de precongelación y congelación-descongelación.

En esta investigación se encontraron diferencias en la calidad seminal por efecto de los crioprotectores usados; sin embargo, el crioprotector DMSO mostró mejores resultados en cuanto a calidad seminal en esta investigación, y por su parte Carolsfeld et al. (2003) sugirieron que el DMSO a 10% proporciona mejores resultados como crioprotector para los carácidos migratorios brasileros, entre los que se incluye el género *Brycon*.

Los valores de daños obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que el porcentaje de inclusión empleado en este estudio (5 y 10%) no afecta la calidad del semen de dorada, mientras que el crioprotector DMSO, DMA y EG incide altamente la calidad seminal de *B. sinuensis*.

8. CONCLUSIONES

Luego de evaluar la crioconservación de semen de dorada con tres crioprotectores a dos porcentajes de inclusión, se puede concluir lo siguiente:

Los valores de movilidad total y velocidades espermáticas en semen precongelado presentaron una reducción entre 30 a 20 % respecto al semen fresco; mientras que el semen descongelado presentó una reducción entre 60 a 50% respecto al semen fresco, luego de la crioconservación.

Se evidenció daño en D-Mem de más del 50% y D-Mit osciló entre 60 a 83% en la célula espermática, mientras que F-DNA evidenció daños menores al 10%.

Los crioprotectores DMSO, DMA y EG inciden altamente sobre la calidad seminal de dorada, mientras que los porcentajes de inclusión no tuvieron ninguna incidencia sobre la calidad del semen.

La solución crioprotectora DMSO al 5 y 10%, glucosa 6% y yema de huevo 12% es una alternativa para la crioconservación de semen de dorada, debido a que registra mejor calidad precongelación y postdescongelación.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams S, Smith J, Roberts R, Janke A, King N, Tervit H, Webb S. 2008. Application of sperm cryopreservation in selective breeding of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquac. Res.* 39, 1434-1442.
- Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*; 17:745-756.
- Andersson G, Karlberg O, Canback B, Kurland C. On The Origin Of Mitochondria: A Genomics Perspective. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358:165-179.
- Aramli S, Golshahi R, Nazari, S. 2015. Effect of freezing rate on motility, adenosine triphosphate content and fertilizability in beluga sturgeon (*Huso huso*) spermatozoa, *Cryobiology.* 306; (70): 170-174.
- Asturiano J, Cabrita E, Horvath A. 2016. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 245, 69-76.
- Atencio-García V. 2000. Impactos de la Hidroeléctrica Urrá en los peces migratorios del río Sinú. *Revista Temas Agrarios.* 5 (9): 29-40.
- Atencio-García V., Bello B., Bello L. y Espinosa J. 2003. Manejo de reproductores y reproducción inducida de peces nativos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.*
- Atencio-García V. 2005. Descripción del desarrollo ontogénico y aspectos de alevinaje de la dorada (*Brycon sinuensis* Dahl, 1955). Informe final. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 55 pp.
- Atencio-García VJ, Pardo-Carrasco SC, Barrera Cruz U, Martínez E. Efecto de la densidad de siembra en el alevinaje de la dorada (*Brycon sinuensis* Dahl, 1955). *Rev Col Cienc Pec* 2006; 19:197-203.
- Atencio-García V., Pertuz V., Pérez F., Ortiz R. y Pardo S. 2010. Manejo de la primera alimentación de dorada *Brycon sinuensis* ofreciendo larvas de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias,* 23(3).

Atencio-García V, Olaya-Nieto C. *Brycon sinuensis* Dahl 1955, p205-208. En: Mojica JI, Usma JS, Álvarez-León R, Lasso CA (Eds). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia (2012). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt/Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia/ WWF Colombia/Universidad de Manizales. 2012, 319p.

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

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

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

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

Atencio-García V, Prieto M, Espinosa J, Pertuz V, Montes C, Dorado M, y Navarro E. 2017. Crioconservación del semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfoxido. Revista colombiana de biotecnología, 19(2)87-94.

Beirão J, Ottesen O. 2018. Optimization of a fertilization protocol for spotted wolffish (*Anarhichas minor*). Aquaculture. 484: 133-138.

Bennetts L, De Iuliis G, Nixon B, Kime M, Zelski K, McVicar C, Lewis S, Aitken R. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. Mutation Research 2008; 641: 1-11.

Betancur J, Ospina J, Botero J, Uribe J, Botero M, Montoya A. Efecto de diferentes activadores espermáticos sobre el porcentaje de movilidad y tiempo

de activación en semen de dorada *Brycon moorei* (Dahl, 1955) fresco y criopreservado. Rev Colomb Cienc Pecu. 2009; 22:385.

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

Bobé J. & Labbé C. (2010). Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology, 165(3), 535-548.

Bokor Z, Urbányi B, Horváth L, Horváth Á. 2010. Commercial scale cryopreservation of wels catfish (*Silurus glanis*) semen. Aquac. Res. 41, 1549-1551.

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

Cabrita E, Alvarez R, Anel E, Herráez M. The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. Anim. Reproduction Science 1999; 55: 279-287.

Cabrita E, Anel L, Herráez M. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. Theriogenology 2001; 56: 623-635.

Cabrita E, Sarasquete C, Martínez S, Robles V, Beirao J, Pérez S, Herráez M. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives, Journal of Applied Ichthyology, 26, 623-635.

Cabrita E, Martínez-Páramo S, Gavaia P, Riesco M, Valcarce D, Sarasquete C, Herráez M, & Robles V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. Aquaculture. 432, 389-401.

Carmo M, Silva R, Nascimento N, Nogueira F, Senhorini J, Okada L. 2014. Hatching, survival and deformities of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) embryos subjected to different cooling protocols. Cryobiology. 69: 451-456.

Carolsfeld J, Godinho H, Zaniboni-Filho E, Harvey B. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. J Fish Biol 63: 472-489.

Carolsfeld J, Harvey A, Baer and C. Ross. 2004. Migratory Fish Species of South America: Biology, Fisheries and Conservation. World Bank, Washington. Pp. 371.

- Cortés G. 2000. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Universidad Complutense. Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid-España; 27-32p.
- Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú *Brycon amazonicus*. Rev Colom Cien Pec. 2006b;19(2):153-159.
- Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú. Rev Col Cienc Pecu 2006; 19(2): 146-51.
- Dahl G. 1971. Los peces del Norte de Colombia. INDERENA, Bogotá, D.E. (Colombia) 391 p.
- Daly J, Tiersch T, 2011. Flow Cytometry for Assessment of Sperm Quality in Aquatic Species. In: Cryopreservation in Aquatic Species, 2° Edicion. TR. Tiersch & C.C. Green, editors. Word Aquaculture Society p2001-207.
- Dietrich M, Arnold G, Frohlich T, Otte K, Dietrich G, Ciereszko A. 2015. Proteomic analysis of extracellular medium of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio*) semen. Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics 15, 49-57.
- Di Chiacchio I, Almeida I, Leal M, Viveiros A. 2017. Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. Theriogenology. (90): 284-288.
- 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.
- Dumorné K, Figueroa E, Cosson J, Lee-Estevez M, Ulloa-Rodríguez P, Valdebenito I, & Farías J. (2017). Protein phosphorylation and ions effects on salmonid sperm motility activation, Rev. Aquaculture, 0, 1-11.
- Dziewulska K, Rzemieniecki A, Baranowska-Bosiacka I, Domagała J, & Chlubek D. (2012). The parameters of energetic status of the wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) spermatozoa. Aquaculture Res., 43(1), 139-148.
- Dzyuba B, Boryshpolets S, Rodina M, Gela D, Linhart O. (2010). Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze thawing in different fish species. Journal of Applied Ichthyology 26: 720-725.

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

FAO. 2007. Report of the Eleventh Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. CGRFA-11/07/REPORT.

Fauvel C, Suquet M, Cosson J. 2010. Evaluation of fish sperm quality. J. Appl. Ichthyol. 26, 636-643.

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

Figueroa E, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Sánchez R, Effer B. 2015. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. Theriogenology 83: 238-245.

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

Figueroa E, Valdebenito I, Zepeda A, Figueroa C, Dumorné K, Castillo R. 2017. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. Reviews in Aquaculture 9: 76-87.

Figueroa E, Lee-Estevez, M, Valdebenito I, Farías J, Romero J. 2018b. Potential biomarkers of DNA quality in cryopreserved fish sperm: impact on gene expression and embryonic development. Rev. Aquac. 1-10.

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

Fresneda A, Lenis G, Agudelo E, Olivera M. Espermiación inducida y crioconservación de semen de cachama blanca *Piaractus brachypomus*. Rev Colom Cien Pec. 2004;17:46-52.

Gaitan-Espitia J, Martinez-Silva M, Borrero C, Ramirez L, Valencia J. 2013. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): testing

the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. *Aquaculture* 384-387: 6-12.

Golpour A, Psenicka M, Niksirat H. Ultrastructural localization of intracellular calcium during spermatogenesis of sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Microscopy and Microanalysis*. 2016, 22: 1155-1161.

Golpour A, Psenicka M, Niksirat H. Subcellular distribution of calcium during spermatogenesis of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Morphology*. 2017, 278: 1149-1159.

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

Guarnizo M. Caracterización seminal y ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus 1766). Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa Zootecnista, Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 2007. p 102.

Hammerstedt R, Graham J. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*. 1992; 29:26-38.

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

He Y, Wang K, Zhao X, Zhang Y, Ma Y, Hu J. Differential proteome association study of freeze-thaw damage in ram sperm. *Cryobiology*, 2016, 72: 60-68.

Herráez M, Ausió J, Devaux A, González-Rojo S, Fernández-Díez C, Bony S, Saperas N, & Robles V. Paternal contribution to development: Sperm genetic damage and repair in fish. *Aquaculture*, 2017; 472, 45-59.

Herrera-Cruz E, Aristizabal-Regino J, Estrada Posada A, Yepes Blandon Y, Espinosa-Araujo J, Atencio-García V. Evaluation of three cryoprotectants to preserve striped catfish (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*) semen. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2019, 21(2): 55-62.

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

IDEAM, 2014. Características climatológicas de ciudades principales y municipales turísticas.

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.

Jenkins J, Eilts B, Guitreau A, Figiel C, Draugelis-Dale R, Tiersch T. 2010. Sperm quality assessments for endangered razorback suckers *Xyrauchen texanus*. *Reproduction* 141, 55-65.

Jenkins J. 2011. Infectious disease and quality assurance considerations for the transfer of cryopreserved fish gametes. Pages 939-959 in T. R. Tiersch and C. C. Green, editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.

Jiménez W. 2016. Evaluación de calidad seminal en yamú *Brycon amazonicus* relación con la viabilidad poscongelación. (trabajo de grado). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cundinamarca, Colombia.

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

Kerguelén E, Brú S, Mercado T, Atencio V. 2011. Variables ambientales asociadas a la reproducción de los peces reofílicos en el río Sinú. *En: Memorias de Resúmenes XI Congreso Colombiano de Ictiología y II Encuentro Sudamericano de Ictiólogos*. Ibagué (Tolima), Colombia. Mayo 8 a 13 de mayo de 2011.

Krauskova L, Prochazkova J, Klaskova M, Filipová L, Chaloupková R, Malý S. 2016. Suppression of protein inactivation during freezing by minimizing pH changes using ionic cryoprotectants. *Int J Pharm*; 509: 41-49.

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

- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B, Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*. 54: 1477-1496.
- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B. 2004. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the starlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Res.* 35:519-528.
- Li J, Liu Q, Zhang S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2006, 24: 370-377.
- Li P, Wei Q, Liu L. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *J Appl Ichthyol*. 2008; 24:121-125.
- Lima F. 2003. Checklist of the fresh water fishes of South and Central America. Editora da Pontificia Universidad Católica do Rio Grande do Sul EDIPUCRS. Porto Alegre, Brazil. 147-181.
- Lind C, Ponzoni R, Nguyen N, Khaw H. Selective breeding in fish and conservation of genetic resources for aquaculture. (2012). *Reprod. Domest. Anim.* 47, 255-263.
- Linhart O, Billard R, Proteau J. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. *Aquaculture* 1993; 115: 347-359.
- Linhartova Z, Rodina J, Nebesarova J, Cosson, Psenicka M. Morphology and ultrastructure of beluga (*Huso huso*) spermatozoa and comparison with related sturgeons, *Animal Reproduction Science* 137 (2013) 220-229.
- Liu Q, Li J, Zhang S, Xiao Z, Ding F, Yu D, Xu X. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology* 2007; 67: 1168-1174.
- Magnotti C, Cerqueira V, Lee-Estevez, M, Farias J, Valdebenito I, Figueroa E. 2018. Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. *Rev. Aquacult.* 10: 15-25.
- Martínez S. 2008. Bases para la elaboración de bancos de germoplasma en peces: aplicación a la trucha leonesa. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León. 174p.

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

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

Martínez F, Mata M, y Álvarez M. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. Reproduction in Domestic Animals 45: 67-78. 2010.

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Alvarez M, Anel L, De Paz P. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. Reproduction in Domestic Animals 2010; 45: 67-78.

Martínez J, Pardo-Carrasco S, Tarazona A. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico *Prochilodus magdalenae* in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. Anim Reprod. 2012;9: 19-26.

Martínez J, Atencio-García V, Pardo-Carrasco S. 2012. DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi, Prochilodontidae) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose. Neotrop Ichthyol; 10(3): 577-586.

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

Martínez S, Horváth Á, Labbé C, Zhang T, Robles V, Herráez P, Suquet M, Adams S, Viveiros A, Tiersch T, Cabrita E. 2016. Cryobanking of aquatic species. Aquaculture. 2016.05.042.

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

Medina-Robles V, Guarnizo-Pineda M, Ramírez-Merlano J, Otero-Paternina A, Mira T, Pacheco-Murillo R, Velasco-Santamaría Y, Cruz-Casallas P. 2007. Caracterización y ensayos preliminares de crioconservación seminal de bagre

rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus, 1766). Memorias XIII Jornada de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia, 68-72.

Mello F, Garcia J, Depince A, Labbé C, Streit Jr D. 2016. DNA isolation from fresh and cryopreserved semen of Tambaqui (*Colossoma macropomum*). J Fishscicom 10 (2), 21-24.

Mojica J, Álvarez R, Usma J, Lasso C. (Eds.). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La Serie Libros Rojo de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, U. Nacional de Colombia, Bogotá 2012; 205-208.

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

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

Morales M, Lasso C. 2011. *Brycon sinuensis* (Characiformes, Characidae), Capítulo 7. Pp. 211-213. En: Lasso, C. A., E. Agudelo Córdoba, L. F. Jiménez-Segura, H. Ramírez-Gil, M. Morales-Betancourt, R. E. Ajiaco, F. de P. Gutiérrez, J. S. Usma Oviedo, S. E. Muñoz Torres, A. I. Sanabria Ochoa (Eds.) I. Catálogo de los Recursos Pesqueros Continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia.

Morris G, Acton E, Murray J, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. Cryobiology 2012; 64: 71-80.

Muldrew K, Mcgann L. Mechanisms of intracellular ice formation. Biophys J 1990; 57: 525-532.

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

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

Novoa N. 2014. Conservación de embriones de yamú *Brycon amazonicus* a - 14 °C. como posible estrategia de producción. (Trabajo de grado). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de La Salle, Bogotá.

Nynca J, Arnold G, Frohlich T, Ciereszko A. Cryopreservation induced alterations in protein composition of rainbow trout semen. Proteomics. 2015,15: 2643-2654.

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

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

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

Olaya C., Segura G., Tordecilla P. y Appeldoorn R. 2007. Estimación de los parámetros biológicos básicos de peces comerciales del río Sinú II fase. Informe técnico Universidad de Córdoba.; 258 pp.

Orfão L, Nascimento A, Corrêa F, Cosson J, Viveiros A. 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). Aquaculture. 311, 241-247.

Padilla D. (2014). Evaluación de daños en el espermatozoide de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* durante la crioconservación con etilenglicol (Tesis de maestría). Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba, Montería.

Pardo-Carrasco S, Zaniboni E, Arias J, Suarez H, Atencio V, Cruz P. Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. Rev Colom Cienc Pec. 2006;19: 134-139.

Pineda-Santis H, Rendon-Toro V, Grisales-Pérez E, Montoya-Páez J, Acevedo-Villa O, Gómez-Oquendo J, Restrepo-Betancourt G. Evaluación de la movilidad espermática en semen fresco y post-descongelado de la sabaleta *Brycon henni* mediante el sistema SCA. Memorias IV Conferencia Latinoamericana sobre cultivos de Peces Nativos Latin American and Caribbean Aquaculture 2013 LCQUA2013 XIX Jornada de Acuicultura y el VI Foro regional de Acuicultura. Villavicencio (Col) 2013.

Pineda-Santis H, Gómez J, Montoya J, Toro V, Acevedo O, y Restrepo G. 2015. Crioconservación de semen y calidad espermática en sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae). Orinoquia, 19(2), 166-173.

Pinzón-Arciniegas S, Mojica J, Cruz-Casallas P. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*pseudoplatistomas fasciatum linnaeus 1766*). Revista colombiana Orinoquia 2005. vol 9: versión 02: 28-37.

Pullin R, Bell J, Danting C, Longalong F. 1998. Gene banking for fish and other aquatic organisms: ICLARM's perspectives and experience. In: Action Before Extinction: Proceedings of an International Conference on Conservation of Fish Genetic Diversity. B. Harvey, C. Ross, D. Greer and J. Carolsfeld, editors. World Fisheries Trust, Victoria, British Columbia. Pp. 31-45.

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

Ramírez-Merlano J, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Crioconservación de semen de bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) empleando un congelador programable: evaluación de la movilidad y fertilidad post descongelación. Rev Colomb Cienc Pecu. 2008;21: 473.

Ramírez-Merlano J, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. 2010. Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes, Universidad de Los Llanos Villavicencio, Colombia, Orinoquia; 14: 59-71.

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

Riesco M, Raposo C, Engrola S, Martínez-Páramo S, Mira S, Cunha M, Cabrita E. 2017. Improvement of the cryopreservation protocols for the dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. Aquaculture. (470): 207-213.

Restrepo-Betancur G, Montoya J, y Arboleda L. 2017. Evaluación de dos crioprotectores y tres curvas de congelación programable en la criopreservación de semen de *Brycon henni*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 28(3), 597-605.

Reza L, Salas J. 2010. Crioconservación de semen de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* (Littmann, Burr & Nass 2000) con dimetilacetamida DMA y dimetilsulfóxido DMSO. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Programa de Acuicultura. Universidad de Córdoba. 60p.

Rurangwa E, Kime D, Ollevier F, Nash J. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 2004;234: 1-28.

Safa S, Moghaddam G, Jozani R, Daghigh J, Kia H, Janmohammadi H. 2016. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Anim Reprod Sci; 174: 100-106.

Salgado S y Montes C. 2013. Evaluación del dimetilsulfóxido como crioprotector en la crioconservación de semen de dorada *Brycon sinuensis*, trabajo de grado (Pregrado). Universidad de Córdoba, Montería.

Sambu S. 2015. A Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. Peer J; 3: 10-39.

Sarder M, Sarker M, Saha S. 2012. Cryopreservation of sperm of an indigenous endangered fish species *Nandus nandus* (Hamilton, 1822) for ex-situ conservation. Cryobiology. 65; (3): 202-209.

Shafner M. Pharmacological considerations in cryopreservation. *Organ Preservation for Transplantation*. 2ª edición. 1981; 177-212.

Shigueki G, Arias-Rodrigueza L, Fujimoto T, Arai K. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. *Animal Reproduction Science* 116 (2009) 335-345.

Shishanova E, Trenkler A, Mamonova S. Influence of milt cryoconservation on survival and genetic polymorphism of larvae of Russian sturgeon, *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry* 2 (2012) 105-111.

Swain J, Smith G. Cryoprotectants, in: R.C. Chian, P. Quinn (Eds.), *Fertility Cryopreservation*, Cambridge University Press, New York, 2010, pp. 24-38.

Tabares C, Tarazona A, Olivera A. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev Col Cienc Pec.* 2005;18: 149-161.

Tiersch T. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *R Bras Zootec.* 2008;37: 15-19.

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

Trigo P, Merino O, Figueroa E, Valdebenito I, Sánchez R, Risopatrón J, 2015. Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. *Andrologia* 47, 407-411.

Usma J, Valderrama M, Escobar R, Ajiaco F, Villa F, Castro H, Ramírez A, Sanabria A, Ortega J, Maldonado J, Cipamocha C. 2009. Peces dulceacuícolas migratorios en Colombia. Pp. 103-131. En: Amaya, J. D. y L. G. Naranjo (Eds.). *Plan Nacional de las Especies Migratorias: Diagnóstico e identificación de acciones para la conservación y el manejo sostenible de las especies migratorias de la biodiversidad en Colombia*. MAVDT–WWF. Bogotá D. C. Colombia, 214 pp.

Varela A, Corcini C, Gheller S, Jardim S, Lucia C, Streit D, Figueiredo M. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm for tambaqui *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*. 2012;78: 244-251.

Velasco-Santamaría Y, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Criopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*, 2006; 256:264-71.

Viveiros A. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Anim Breeding Abstr* 2005; 73: 1-9.

Viveiros A, Godinhos H. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species. *Fish Physiol Biochem* 35, 2009:137-50.

Viveiros A, Orfão L, Nascimento A, Corrêa F, Caneppele D. 2012. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga do sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology* 78, 361-368.

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

Wei F, Yu L, Li R, Zhang X, Zhang X, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Liang J, Ma R, Qi H, Qin Q, Zhang R, Zhu S, Li C. 2018. Studies of the cryopreservation condition of *Gymnocypris przewalskii* spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 188: 13-20.

Yasui G, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K. 2009. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. *Animal Reproduction Science*. 116: (3-4); 335-345.

Yeste M, Estrada L, Rocha H, Marín J, Rodríguez-Gil J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus, *Andrology* 3 (2015) 395-407.

Yildiz C, Yavas I, Bozkurt Y, Aksoy M. 2015. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival and fertility of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Cryobiology* 70, 190-194.

Yoon S, Kwon W, Rahman M, Lee J, Pang M. 2015. A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa.

Yusoff M, Hassan B, Ikhwanuddin M, Sheriff S, Hashim F, Mustafa S, Koh I. 2018. Successful sperm cryopreservation of the brown-marbled grouper,

Epinephelus fuscoguttatus using propylene glycol as cryoprotectant. *Cryobiology*. (81) 168:173.

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.

Zilli L, Bianchi A, Sabbagh M, Pecoraro L, Schiavone R, Vilella S. 2018. Development of sea bream (*Sparus aurata*) semen vitrification protocols. *Theriogenology*. 110: 103-109.