

## EVALUACIÓN DE ETILENGLICOL COMO CRIOPROTECTOR EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE BAGRE BLANCO (*Sorubim cuspicaudus*, PIMELODIDAE)

### Evaluation of Ethylene Glycol as a Cryoprotectant in the Sperm Cryopreservation of Trans-Andean Shovelnose Catfish (*Sorubim cuspicaudus*, Pimelodidae)

VÍCTOR J. ATENCIO-GARCÍA<sup>1</sup>, M.Sc.; MARÍA DORADO<sup>1</sup>, M.Sc., Biol; EMILIO NAVARRO<sup>2</sup>, Acuicultor; FRANCISCO PÉREZ<sup>2</sup>, Acuicultor; BRINER HERRERA<sup>1</sup>, Acuicultor; JORGE MOVILLA<sup>1</sup>, Acuicultor; JOSÉ A. ESPINOSA-ARAUJO<sup>1</sup>, M.Sc.

<sup>1</sup> Universidad de Córdoba, Carrera 6 # 76-103. Montería, Colombia. vatencio@hotmail.com; walker\_125@hotmail.com; joseespinosa86@hotmail.com

<sup>2</sup> Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca – A UNAP. Repelón, Colombia. maria.dorado@aunap.gov.co; navemilio@gmail.com; franciscoperez72@hotmail.com

Autor de correspondencia: Víctor J. Atencio-García, vatencio@hotmail.com

Presentado el 19 de diciembre de 2013, aceptado el 25 de febrero de 2014, fecha de reenvío el 11 de marzo de 2014.

Citation / Citar este artículo como: ATENCIO-GARCÍA VJ, DORADO M, NAVARRO E, PÉREZ F, HERRERA B, MOVILLA J, ESPINOSA-ARAUJO JA. Evaluación de etilenglicol como crioprotector en la crioconservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*, Pimelodidae). Acta biol. Colomb. 2014;19(2):271-280.

#### RESUMEN

Se evaluó el semen crioconservado de *Sorubim cuspicaudus* utilizando etilenglicol (ETG) a tres niveles de inclusión (5, 10, 15 %). Machos (n = 13) en fase de espermiación y hembras (n = 6) en maduración final se indujeron con 0,4 ml de Ovaprim®/Kg, después de 12 a 14 horas post-inducción se colectó el semen en viales Eppendorf de 2 ml de capacidad. Las diferentes soluciones crioprotectoras se prepararon con glucosa 6 % (p/v), leche en polvo descremada 5 % (pv) y agua destilada. El semen fue diluido en proporción 1:3 (semen:diluyente), empaquetado en macrotubos de 2,5 ml y congelado en vapores de nitrógeno líquido (NL) durante 30 minutos y luego almacenados en termos criogénicos sumergidos directamente en NL (-196 °C). El semen crioconservado fue descongelado en baño serológico a 35 °C durante 90 segundos. La movilidad total, progresividad y velocidad espermática del semen fresco y descongelado se analizó con el software Sperm Class Analyzer SCA® (Microptic SL, España). La fertilidad y eclosión se evaluó con 1,0-1,5 g de ovocitos en incubadoras experimentales de flujo ascendente de dos litros de capacidad. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. El semen fresco registró tasa de eclosión de 51,8±21 %, sin observarse diferencia significativa con la obtenida con el semen crioconservado con ETG 5 % (38,6 ± 13,9 %) ( $p > 0,05$ ); mientras que ETG 15 % (9,6 ± 2,9 %) reportó la menor eclosión ( $p < 0,05$ ). Los resultados sugieren que la solución crioprotectora compuesta por ETG 5 %, glucosa 6 % y leche en polvo 5 % es una alternativa viable para la crioconservación de semen de *Sorubim cuspicaudus* con fecundaciones similares al usar semen fresco.

**Palabras clave:** análisis seminal, Colombia, crioprotectores, fertilidad, reproducción.

#### ABSTRACT

The catfish *Sorubim cuspicaudus* cryopreservation semen was evaluated using three levels (5, 10, 15 %) of ethylene glycol (ETG). Males (n = 13) undergoing spermiation and in final maturation females (n = 6) were induced with 0.4 ml Ovaprim®/Kg, after

12 and 14 post-induction the semen was collected in 2 ml Eppendorf vials. The different cryoprotectants solutions were prepared with glucose 6 % (w/v) skimmed milk powder 5 % (w/v) and distilled water. The semen was diluted in ratio 1:3 (semen:extender), packed in macrotubes of 2.5 ml and frozen in liquid nitrogen (NL) vapor for 30 minutes, then the macrotubes were stored in cryogenic tanks submerged directly in NL (-196 °C). The sperm were thawed in serological bath to 35 °C for 90 seconds. The total motility, total progressivity and velocities in fresh and thawed semen were analyzed with the Sperm Class Analyzer software SCA® (Microptic SL, Spain). Fertility and hatching rates were assessed with 1.0-1.5 g of oocytes in experimental up flow incubators two liters, a completely randomized design was used. The hatching rate of fresh semen was 51,8±21 %, with no significant differences with semen cryopreserved with ETG 5 % (38.6 ± 13.9 %) ( $p > 0,05$ ), while ETG 15 % (9.6 ± 2.9 %), recorded the lower hatching rate ( $p < 0.05$ ). The results suggest that the cryoprotectant solution composed of ETG 5 %, glucose 6 % and powdered milk 5 % is a viable alternative for semen cryopreservation of the catfish *Sorubim cuspicaudus*.

**Keywords:** Colombia, cryoprotective agents, fertility, reproduction, semen analysis.

## INTRODUCCIÓN

El Bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* es uno de los principales peces migradores de las cuencas de los ríos Sinú y Magdalena, de gran talla e importancia pesquera; pero que registra disminución de sus capturas y tallas en la cuenca del Magdalena (Buitrago-Suarez y Mojica, 2012); por lo cual fue declarado como especie vulnerable a la extinción (Buitrago-Suarez y Mojica, 2012). A pesar de ser un pez carnívoro (Villadiego *et al.*, 2004), es una opción para diversificar la piscicultura colombiana, debido a su gran valor comercial, la calidad de su carne, buena adaptación al cautiverio, adecuada tolerancia al manejo y buena respuesta a los protocolos de reproducción inducida (Villadiego *et al.*, 2004; Espinosa, 2013; Prieto-Guevara *et al.*, 2013).

Pese a los avances en su reproducción artificial, aún persisten dificultades para la producción a gran escala de alevinos; por lo que esta especie no se ha podido ofrecer como alternativa de cultivo por la carencia de una tecnología confiable de producción masiva de semilla (Espinosa, 2013). Uno de estos problemas es el asincronismo reproductivo de la especie en cautiverio. En las estaciones piscícolas durante su periodo reproductivo, de mayo a octubre, es común encontrar hembras maduras, aptas para las reproducciones artificiales; pero no machos bien sea por inmadurez o por disminución de la calidad seminal (Reza y Salas, 2010). Entonces, la crioconservación de semen se presenta como alternativa de solución ya que ofrece ventajas como optimización de los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal

asincrónica y ciclos reproductivos estacionales, conservación de la variabilidad genética de poblaciones domesticadas, apoyo a programas experimentales de estudios genéticos (Suquet *et al.*, 2000); también contribuye a disminuir la presión pesquera sobre las poblaciones silvestres (Medina-Robles *et al.*, 2005), permite la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Bobe y Labbé, 2010).

La crioconservación es una técnica que permite mantener a bajas temperaturas (-130 °C), a cualquier conjunto biológico de células por tiempo indefinido, creando las condiciones necesarias para que conserven la capacidad de sobrevivir después de la descongelación (Day y Stacey, 2007). Sin embargo, en este proceso se producen daños a las células espermáticas crioconservadas, ocasionados por la formación de hielo intracelular (Medina-Robles *et al.*, 2005) y desequilibrio osmótico (Morris *et al.*, 2012). La magnitud de daños criogénicos, durante la congelación y descongelación puede resultar en la disminución de la movilidad con reducción de velocidad espermática y la fertilidad. La alternativa para minimizar este fenómeno es la adición de sustancias que reemplacen el agua dentro de la célula, denominadas crioprotectores. En general, no existe un criterio que determine el éxito de una solución crioprotectora de formulación simple (uno a dos ingredientes) o una compleja (mezcla de uno o varios aditivos de alto peso molecular) (Cabrita *et al.*, 2009); ya que los protocolos de crioconservación son específicos y deben ser optimizado para cada especie (Glogowski *et al.*, 1999); sin embargo, para determinar si una solución crioprotectora es apropiada es importante que prevenga la activación de los espermatozoides y permita la homeostasis celular. Incluso, la solución crioprotectora puede incluir moléculas específicas para proteger a los espermatozoides de daños por efecto de las bajas temperaturas (Gwo, 2000). La composición del diluyente, la concentración del crioprotector y las curvas de congelamiento y descongelamiento son factores que afectan la calidad del semen crioconservado y su capacidad fecundante (De Graaf y Berlinsky, 2004); por tanto los crioprotectores tienen como propósito mantener la viabilidad celular, previniendo el daño celular durante el proceso de congelación y descongelación (Ramirez-Merlano *et al.*, 2010).

La crioconservación de semen de bagre blanco se ha evaluado con crioprotectores como dimetilsulfóxido (DMSO) dimetilacetamida (DMA), etilenglicol (ETG) y metanol (MET), con porcentajes de inclusión entre 6 y 12 % (Reza y Salas, 2010; Espinosa, 2013) pero con resultados poco satisfactorios en términos de movilidad total, fertilidad y eclosión. Por tanto el objetivo del presente estudio fue evaluar etilenglicol (ETG) como crioprotector a tres porcentajes de inclusión (5, 10, 15 %) en la crioconservación de semen de bagre blanco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del material biológico

El estudio se realizó en el Centro de Investigación Piscícola

de la Universidad de Córdoba CINPIC, Colombia. Se utilizaron 19 reproductores de bagre blanco, 13 machos y seis hembras, de tres años de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones de cautiverio en estanque en tierra de 400 m<sup>2</sup> de área, a densidad de 0,5 Kg/m<sup>2</sup>, alimentados dos veces al día con peces forrajeros (alevinos de tilapias) y suplementados con alimento comercial para peces (Italcol®, 24 % proteína bruta). Los machos registraron peso promedio de 486,7 ± 140,4 g, en fase de espermiación, caracterizados por la presencia de semen fluido en la papila urogenital después de un masaje ventral en sentido cráneo-caudal. Las hembras presentaron peso promedio de 695 ± 181 g y mediante biopsia ovárica se confirmó que se encontraban en fase de maduración final.

Los ejemplares seleccionados fueron colectados y trasladados a piletas circulares de manejo de 3 m<sup>3</sup> de capacidad, con flujo de agua constante (5 l/min), donde permanecieron durante 48 h, con el propósito de habituarlos a las condiciones experimentales, reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación, el cambio de ambiente para administrar los tratamientos de inducción a la ovulación en las hembras e incrementar el volumen seminal en los machos. A los reproductores aptos para inducción hormonal se les administró una dosis única de Ovaprim®, tanto a machos como a hembras, a razón de 0,4 ml/Kg de peso vivo, aplicada en la base de la aleta pectoral.

#### Obtención del semen y evaluación seminal

Después de 12 horas de aplicación de la inducción hormonal se realizó la extracción del semen mediante presión en sentido cráneo-caudal, previo secado de la región ventral. El semen se colectó en viales Eppendorf de 2 ml secos y estériles, evitando en todo momento la contaminación por orina y otros fluidos (sangre, bilis y heces) que podrían afectar la calidad seminal (Dreanno *et al.*, 1998). En el semen fresco fue evaluado volumen, color, tiempo de activación, movilidad total y concentración espermática. En el semen descongelado se evaluó movilidad total, tipos de movilidad y velocidad espermática.

El volumen seminal obtenido se expresó en ml, considerando esta variable para calcular el número total de espermatozoides por muestra y por individuo. El color del semen se tuvo en cuenta para evidenciar la posible presencia de sustancias contaminantes, considerando blanco, el color de una muestra no contaminada (Reza y Salas, 2010).

**Tiempo de activación de los espermatozoides.** En una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) se colocó 0,25 µl de semen y se activó con 75 µl de agua bidestilada (dilución 1:300). Las muestras se observaron en un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, Eclipse 50i, Japón) con objetivo 10 X. El tiempo de activación se analizó desde el instante en que se adicionó la solución activadora hasta que alrededor de 90 % de los espermatozoides dejó de moverse según lo propuesto por Martínez (2010).

**Movilidad y progresividad total.** En una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel), se agregó una muestra de 0,25 µl de semen y 75 µl de agua bidestilada (dilución 1:300); la cual con el uso de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) con objetivo 10 X y el programa asistido por computadora para análisis de semen Sperm Class Analyzer SCA® (Microptic SL, España) se analizó la movilidad y progresividad total.

**Tipos de Velocidad.** Fueron estimadas aplicando el programa SCA® (Microptic SL, España), en un periodo de tres segundos. Se obtuvieron los porcentajes de espermatozoides con velocidad rápida (tipo a, velocidades mayores a 100 µm/seg), media (tipo b, velocidades entre 45 y 100 µm/seg), lenta (tipo c, velocidades entre 10 y 45 µm/seg), así como el porcentaje de espermatozoides estáticos (tipo d, sin movimiento). Además el programa SCA® también estimó las velocidades curvilínea (VCL) y lineal (VSL), expresadas en µm/seg.

**Concentración espermática.** Una muestra de 1 µl de semen se diluyó en 699 µl de glucosa a 6 % (Protokimica, Colombia) en un Eppendorf de 2 ml (dilución 1:700), la mezcla se homogenizó durante cinco segundos en un vortex a 1200 rpm (Velp Scientific, Zxclasic, China). Luego se tomaron 10 µl y se colocaron en una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) para la determinación de la concentración mediante el SCA® (Microptic SL, España). Este procedimiento se realizó tres veces para obtener un valor promedio de la concentración espermática del semen analizado.

#### Tratamientos y crioconservación de semen

La crioconservación se efectuó solamente en aquellas muestras que presentaron una movilidad total superior a 80 %. Se utilizó etilenglicol (ETG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a tres porcentajes de inclusión en la solución crioprotectora: 5, 10 y 15 % (v/v). La solución crioprotectora estuvo compuesta por ETG a los diferentes porcentajes de inclusión (5, 10, 15 % v/v), glucosa 6 % (p/v) (Protokimica, Colombia) y leche descremada liofilizada 5 % (p/v) (Proleche, Colombia) (Ramirez-Merlano *et al.*, 2011). El semen fue diluido en proporción 1:3 (semen:diluyente) (Velasco-Santamaría *et al.*, 2006) y envasado en macrotubos de 2,5 ml.

**Congelación y descongelación.** Los macrotubos se introdujeron en un termo de vapores de nitrógeno líquido de 4 l (MVE, SC 4/2v, USA) durante 30 minutos. La curva de congelación en el termo de vapores fue descrita por Cruz-Casallas *et al.* (2006) así: de 28 a -20 °C desciende a razón de 27,3 °C/min, de -20 a -100 °C a razón de 29,9 °C/min y de -100 a -196 °C a razón de 5,5 °C/min; después los macrotubos fueron trasladados a un termo de almacenamiento de 34 l (MVE, XC 34/18, USA) y sumergidos directamente en nitrógeno líquido (Cruz-Casallas *et al.*, 2006).

Los macrotubos fueron descongelados en baño serológico de agua (Mermert, WNB 7-45, Alemania) a 35 °C durante 90 seg (Ramirez-Merlano *et al.*, 2011) y seguidamente se evaluaron la movilidad, progresividad y velocidad pos-descongelación.

**Fertilidad y eclosión.** La fertilización de los ovocitos (1,0-1,5 g, cada gramo 1517 ovocitos) tanto con semen fresco como descongelado fue realizada *in vitro* en viales de 20 ml, adicionando 400 µl de semen de cada uno de los diferentes tratamientos. La incubación se realizó en incubadoras experimentales de flujo ascendente con capacidad de 2 l. Los porcentajes de fertilidad y eclosión se evaluaron de acuerdo a lo propuesto por Martínez (2010); a las seis horas post fertilización (HPF), cuando los huevos se encontraban al final de la gastrulación (cierre del blastoporo) se realizó la estimación de la fertilidad, a partir de tres alícuotas (n = 80-100 huevos) de cada incubadora. Los huevos se depositaron en cajas de Petri y bajo un estereoscopio óptico (Leica, Wild MZ8, Alemania) se determinaron los embriones viables, los cuales se observaron traslúcidos y de apariencia normal, mientras que los no viables, se observaron opacos o blanquecinos (Atencio *et al.*, 2013). A las 11 HPF, se estimó el porcentaje de eclosión de los embriones en fase de faringulación final (embrión de cola libre), tomando tres alícuotas de 80 a 100 huevos, considerando como viables los embriones traslúcidos y con movimiento e inviábiles aquellos opacos y blanquecinos (Atencio *et al.*, 2013).

#### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos basados en los diferentes porcentajes de inclusión de ETG (5, 10, 15 %); además se utilizó como tratamiento control semen fresco; por tanto se utilizaron 24 unidades experimentales (seis repeticiones por tratamiento). Todas las variables (movilidad total, tipos de velocidad, progresividad total, fertilidad y eclosión) fueron sometidas a pruebas de normalidad (test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (test de Bartlett). Para las variables que cumplieron estos supuestos se aplicó ANOVA y cuando se presentaron diferencia significativa se aplicó la prueba de Rangos Múltiple Duncan. En todos los casos  $p < 0,05$  fue utilizado como criterio estadístico para establecer la diferencia significativa y los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue realizado con el *software* SAS versión 9.0 para Windows (Institute Inc, Cary, NC. USA).

## RESULTADOS

El volumen seminal de los machos fue  $1,3 \pm 0,6$  ml, con una movilidad total superior al 90 %. El tiempo de activación del semen fresco se estimó entre 30 y 41 seg y la concentración espermática registró valores entre  $10059,5 \times 10^6$  y  $19274,4 \times 10^6$  espermatozoides (spz)/ml.

#### Movilidad y velocidad espermática

Semen fresco registró alta movilidad total ( $95,1 \pm 4,2$  %), compuesta por espermatozoides rápidos ( $36,2 \pm 9,4$  %) y medios ( $39,2 \pm 8,3$  %), con progresividad total de  $55,1 \pm 12,2$  %, velocidad curvilínea ( $81,4 \pm 14,1$  µm/seg) y velocidad en línea recta ( $54,2 \pm 12,6$  µm/seg). En estas variables semen fresco presentó diferencia significativa con respecto a los resultados con semen descongelado ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1). Entre los tratamientos con semen descongelado, ETG 5 % registró los mayores valores de espermatozoides rápidos ( $1,2 \pm 0,2$  %), medios ( $4,4 \pm 2,3$  %), progresividad total ( $2,7 \pm 1,6$  %), VCL ( $24,3 \pm 2,7$  µm/seg) y VSL ( $9,7 \pm 2,2$  µm/seg) sin observarse diferencia estadística con relación a ETG 10 % y ETG 15% ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).

La mayor cantidad de espermatozoides lentos la registró el semen criopreservado con ETG 5 % ( $32,1 \pm 7,1$  %) sin observarse diferencia significativa con ETG 10 % ( $28,6 \pm 7,2$  %) ( $p > 0,05$ ); mientras que los menores valores de esta variable se estimaron en semen fresco ( $20,8 \pm 7,8$  %) y ETG 15 % ( $21,8 \pm 5$  %). Por otra parte semen fresco presentó el menor porcentaje de espermatozoides estáticos ( $3,8 \pm 4,2$  %) presentando diferencias estadísticas con respecto a los tratamientos con semen descongelado ( $p < 0,05$ ), mientras que con semen descongelado, el tratado con ETG 15 % ( $78,2 \pm 4,6$  %) reportó el mayor porcentaje (Tabla 1).

#### Fertilidad y eclosión

La fertilidad del semen fresco se estimó en  $69,4 \pm 19,8$  %, observándose diferencia significativa con la obtenida con semen descongelado ( $p < 0,05$ ). Entre los tratamientos con semen descongelado los mayores valores de fertilidad fueron reportados para ETG 5 % ( $48,1 \pm 15,5$  %) y ETG 10 % ( $36,6 \pm 9$  %)

Tabla 1. Características seminales de semen fresco y descongelado de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus*.

Características	Semen Fresco	ETG	ETG	ETG
		5 %	10 %	15 %
Rápidos (%)	36,2±9,4 <sup>a</sup>	1,2±0,2 <sup>b</sup>	0,5±0,2 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>b</sup>
Medios (%)	39,2±8,3 <sup>a</sup>	4,4±2,3 <sup>b</sup>	1,1±1,7 <sup>b</sup>	0,5±0,4 <sup>b</sup>
Lentos (%)	20,8±7,8 <sup>b</sup>	32,1±7,1 <sup>a</sup>	28,6±7,2 <sup>ab</sup>	21,8±5,0 <sup>b</sup>
Estáticos (%)	3,8±4,2 <sup>c</sup>	63,3±9,1 <sup>b</sup>	70,2±8,8 <sup>ab</sup>	78,2±4,6 <sup>a</sup>
Movilidad total (%)	95,1±4,2 <sup>a</sup>	36,9±9,1 <sup>b</sup>	32,0±8,8 <sup>b</sup>	25,1±4,6 <sup>c</sup>
Progresividad total (%)	55,1±12,2 <sup>a</sup>	2,7±1,6 <sup>b</sup>	0,4±0,4 <sup>b</sup>	0,4±0,4 <sup>b</sup>
Velocidad curvilínea (µm/seg)	81,4±14,1 <sup>a</sup>	24,3±2,7 <sup>b</sup>	18,7±2,7 <sup>b</sup>	18,1±1,5 <sup>b</sup>
Velocidad lineal (µm/seg)	54,2±12,6 <sup>a</sup>	9,7±2,2 <sup>b</sup>	5,4±1,4 <sup>b</sup>	5,3±1,7 <sup>b</sup>

sin observarse diferencia estadística entre estos valores ( $p > 0,05$ ). El menor porcentaje de fertilidad ( $18,1 \pm 5 \%$ ) se obtuvo con ETG 15 % ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1).

La eclosión con semen fresco fue estimada en  $51,8 \pm 21 \%$ , seguida de la obtenida con ETG 5 % ( $38,6 \pm 13,9 \%$ ) sin presentarse diferencia estadística entre estos valores ( $p > 0,05$ ); mientras que con ETG 15 % se registró el menor porcentaje de eclosión ( $9,6 \pm 2,9 \%$ ) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2).

## DISCUSIÓN

Aunque la evaluación de la movilidad espermática puede ser un método efectivo en la evaluación de semen fresco, no siempre es efectivo para semen descongelado (Paniagua-Chávez *et al.*, 2001). Existen otros parámetros que son importantes en la determinación de la calidad del semen fresco como el tiempo de activación y la concentración espermática; variables que en muchas ocasiones no se reportan

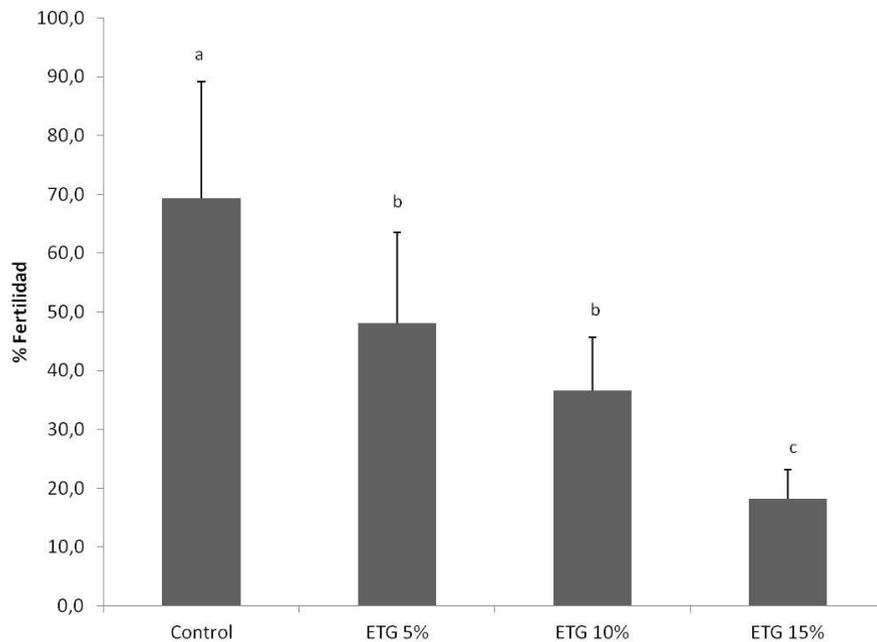


Figura 1. Valores promedio de fertilidad de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* con semen fresco y crioconservado con etilenglicol (ETG). Letras diferentes significan diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).

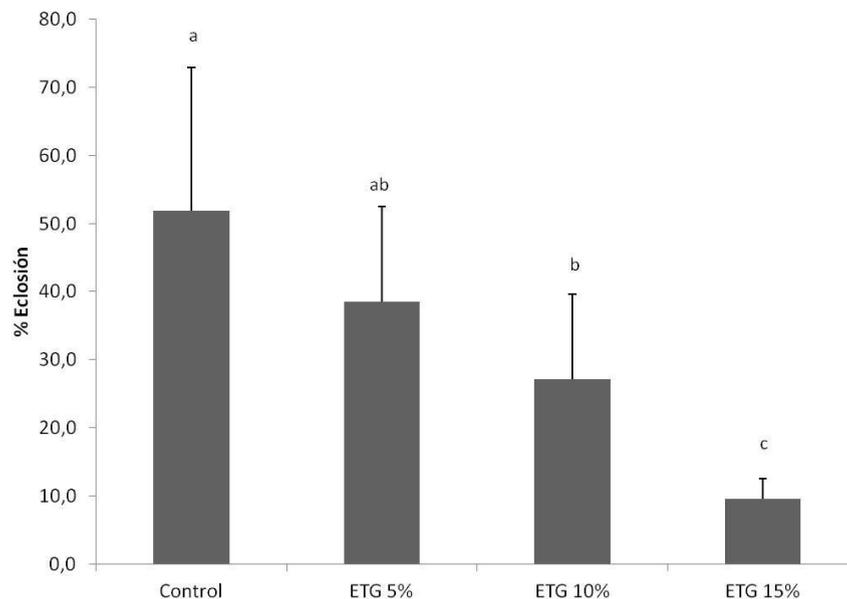


Figura 2. Valores promedio de eclosión de bagre blanco con semen fresco y crioconservado con diferentes concentraciones etilenglicol (ETG). Letras diferentes significan diferencia estadística ( $p < 0,05$ ).

o no se tienen en cuenta (Cuevas-Urbe y Tiersch, 2011). En el presente estudio, el tiempo de activación promedio para semen fresco ( $35,8 \pm 3,4$  seg) se encontró en el rango registrado para bagre blanco (41-34 seg) por otros autores (Reza y Salas, 2010; Espinosa, 2013) e incluso para otros pime-lódidos como *Pseudoplatystoma metaense* (48,9 seg) (Ramirez-Merlano *et al.*, 2010).

La concentración espermática ( $14221,5 \times 10^6 \pm 2761,5 \times 10^6$  spz/ml) en el presente estudio, se encuentra dentro del rango reportado para la especie ( $17861,5 \times 10^6$  a  $24718 \times 10^6$  spz/ml) (Araujo y Cordero, 2004; Reza y Salas, 2010; Espinosa, 2013). Sin embargo en otro siluriformido como *Silurus glanis* (Siluridae) se ha reportado concentración espermática de  $9390 \times 10^6$  spz/ml (Ogier de Baulny *et al.*, 1999); la cual es aproximadamente la mitad de la registrada para bagre blanco; diferencia que podría ser explicada por diferencias inter-específicas asociadas a las estrategias reproductivas.

Los resultados del presente estudio, sugieren que el proceso de crioconservación y descongelación ocasionó una disminución de la movilidad total así como la reducción de los espermatozoides rápidos y medios con incremento de los espermatozoides estáticos comparado con los registros del semen fresco (control). La movilidad total con semen fresco ( $95,1 \pm 4,2$  %) fue tres veces mayor a la obtenida con semen descongelado. La movilidad total es una de las variables más afectadas en el proceso de crioconservación y descongelación (Ogier de Baulny *et al.*, 1999). En el presente estudio, con semen descongelado la mayor movilidad total se obtuvo con ETG 5 % ( $36,9 \pm 9,1$  %); mientras que el menor valor se obtuvo con ETG 15 % ( $25,1 \pm 4,6$  %) observándose una relación inversa entre los porcentajes movilidad y los niveles de inclusión de ETG, hecho que podría estar ligado a los daños ocasionados por el porcentaje de inclusión del crioprotector y/o los daños ocasionados por los procesos de congelación y descongelación en la mitocondria. Según Ogier de Baulny *et al.* (1999), los procesos de congelación y descongelación producen disminución de la actividad mitocondrial y por tanto reducción de los niveles de ATP en la célula espermática. Martínez y Pardo-Carrasco (2010) argumentaron que los daños en el ADN, bien sea el mitocondrial o especialmente el nuclear, por efectos de la crioconservación, podrían afectar la síntesis de proteínas involucradas en la producción energética celular causando la disminución de la movilidad espermática, hecho que podría explicar las pérdidas de movilidad en los tratamientos con semen crioconservado-descongelado en comparación con semen fresco; sin embargo estos mismos autores señalaron que no está completamente claro el mecanismo por el cual la presencia de ciertos crioprotectores puede afectar la movilidad en algunas especies de peces y en otras mantenerla cercana a valores del semen fresco. Además, se ha sugerido que aun conociéndose la efectividad del crioprotector en una especie de pez, la variación en su concentración puede causar efectos tóxicos que son inversos a los deseados (Martínez y Pardo-Carrasco, 2010).

Reza y Salas (2010) reportaron para bagre blanco movilidad de 55,4 % utilizando como crioprotector DMA 8 %, valores superiores a los encontrados en el presente estudio, mientras que Espinosa (2013) para la misma especie registró movilidad inferior a 30 % utilizando como crioprotector ETG (6 a 10 %).

En el presente estudio, el mayor porcentaje de espermatozoides rápidos y medios se observaron en semen fresco (control); presentándose una reducción de este tipo de espermatozoides, aproximadamente de 90 % en el semen descongelado; en el cual predominaron los espermatozoides estáticos (mayor a 60 %). Un comportamiento similar al registrado en la cantidad de espermatozoides rápidos y medios fue observado en la variable progresividad total; en la cual el mayor registro para el semen descongelado se obtuvo con ETG 5 % ( $2,7 \pm 1,6$  %); observándose también una reducción de más de 90 % con relación a la progresividad obtenida con semen fresco.

Con semen fresco la VSL ( $54,2 \pm 12,6$   $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) y VCL ( $81,4 \pm 14,1$   $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) estuvo por encima a los registros de semen descongelado; el cual obtuvo las mayores velocidades lineales ( $9,7 \pm 2,2$   $\mu\text{m}/\text{s}$ ) y curvilíneas ( $24,3 \pm 2,7$   $\mu\text{m}/\text{s}$ ) cuando se utilizó ETG 5 %; es decir se presentó una reducción de aproximadamente de 75 % en la velocidad curvilínea y velocidad lineal en comparación con las velocidades obtenidas con semen fresco. Esta reducción a más de la mitad en los valores de velocidad, pudo haber sido ocasionada por los daños causados en el proceso de crioconservación del semen. Viveiros (2005) sostiene que los daños ocasionados por los efectos tóxicos de los crioprotectores también pueden variar entre una misma especie; ya que encontró diferencias en la composición del plasma seminal de bagres en cautiverio en comparación con los del medio natural.

Ogier de Baulny *et al.* (1999) reportaron pérdidas en las propiedades seminales durante los procesos de crioconservación, siendo viables solo una pequeña fracción de las células espermáticas, reduciendo la capacidad fertilizante de semen descongelado. Li *et al.* (2008) afirmaron que las pérdidas de velocidad (VCL y VSL) ocurridas luego de los procesos de congelación y descongelación son causadas por daños en la integridad del ADN, hecho que es posible cuando la osmolaridad y la concentración de los crioprotectores no son apropiadas. Para *Clarias gariepinus* se reportaron valores de velocidad lineal de 38  $\mu\text{m}/\text{seg}$  y curvilínea de 58  $\mu\text{m}/\text{seg}$  para semen fresco (Rurangwa *et al.*, 2001), resultados ligeramente menores que las reportadas en el presente estudio. Ramirez-Merlano *et al.* (2011) para *Pseudoplatystoma metaense* reportaron velocidades curvilínea y en línea recta de  $8,4 \pm 3,2$   $\mu\text{m}/\text{seg}$  y  $10,8 \pm 3,2$   $\mu\text{m}/\text{seg}$  respectivamente utilizando como crioprotector DMSO 10 %, y al igual que en presente estudio, una reducción significativa de las velocidades con relación al semen fresco. De igual forma Reza y Salas (2010) y Espinosa (2013) registraron caídas de velocidad en una cuarta parte en comparación al semen fresco utilizando DMA como crioprotector

para semen de bagre blanco, comportamiento similar al observado en el presente estudio.

La fertilidad con semen fresco ( $69,4 \pm 19,8$  %) presentó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con la obtenida con semen descongelado; pero con semen descongelado la mayor fertilidad ( $48,1 \pm 15,5$  %) y eclosión ( $38,6 \pm 13,9$  %) se registró con ETG 5 %; incluso la eclosión de este semen descongelado no fue diferente a la obtenida con semen fresco ( $51,8 \pm 21$  %). Estos resultados muestran que a medida que aumentó el porcentaje de inclusión del crioprotector disminuyó la fertilidad y eclosión; lo cual permite sugerir que el uso de ETG en porcentajes de inclusión superiores a 5 % disminuye la calidad y capacidad fertilizante del semen de bagre blanco. Además de acuerdo a los resultados obtenidos es posible sugerir que los porcentajes de inclusión del crioprotector afectaron significativamente la fertilidad, es decir cada crioprotector a los distintos porcentajes de inclusión presenta un desempeño diferente sobre las células espermáticas del bagre blanco, destacándose el uso de ETG a un porcentaje de inclusión del 5 %, por el buen comportamiento en las variables de desempeño reproductivo y regular desempeño en las variables de calidad seminal evaluadas. Por otra parte el uso de concentraciones de ETG del 10 y 15 % podrían ejercer un efecto tóxico sobre el espermatozoide en los distintos pasos del proceso de crioconservación es decir, durante la exposición a la solución crioprotectora (precongelación) y después de la descongelación del semen, causando pérdidas bruscas de movilidad y capacidad fertilizante en el espermatozoide.

Reza y Salas (2010), utilizando DMA 8 % en bagre blanco, obtuvieron porcentajes de fertilidad ( $17,8 \pm 8,3$  %) inferiores a los obtenidos en el presente estudio, de igual forma Espinosa (2013) para la misma especie, utilizando como crioprotector ETG 6 % y con una curva de descongelación más rápida de  $60^{\circ}\text{C}$  por 45 seg reportó fertilidad de  $16 \pm 3,1$  %. La eclosión del semen crioconservado de bagre blanco con crioprotectores como DMA (8 a 12 %), DMSO 10 % (Reza y Salas, 2010), DMA (6 a 10 %), metanol (6 a 10 %) y ETG (6 a 10 %) (Espinosa, 2013) registraron porcentajes de eclosión menores de 15 %; sin embargo en el presente estudio los porcentajes de fertilidad y eclosión con ETG 5 % estuvieron por encima de 35 %; lo cual se sugiere como consecuencia del porcentaje de inclusión del crioprotector.

Woods *et al.* (2004) afirmaron que la descongelación es un punto importante en el proceso de criopreservación y también tiene efectos adversos, la recrystalización del hielo al momento de la descongelación provoca efectos similares a los de la congelación. Por ello es importante establecer las tasas de descongelación adecuadas para reducir los daños en la célula espermática (Pegg, 2007).

Ramírez-Merlano *et al.* (2011) reportaron fertilidades mayores a 60 % utilizando DMA 10 % evaluando dos curvas de congelación en la crioconservación de semen de *Pseudoplatystoma metaense*, índices superiores a los obtenidos en el presente estudio en el cual se utilizó una curva de congelación más

lenta que la sugerida por estos autores. En las curvas de congelación lentas las células tienen más tiempo para deshidratarse antes de la congelación; sin embargo, la exposición prolongada puede presentar un medio residual hiperosmótico que puede influir en la viabilidad de la célula (Denniston *et al.*, 2011), hecho que también podría explicar la reducción de fertilidad del semen descongelado en comparación con el semen fresco.

Morris *et al.* (2012) sugirieron que los daños ocasionados en las células espermáticas se encuentran mucho más relacionados al desbalance osmótico que ocurre durante el proceso de descongelación y no a la formación de hielo intracelular, causando daños en la célula a nivel morfológico (membrana) y daño a nivel de DNA por la alteración del material genético de la célula. En este último caso aunque el espermatozoide presente movimiento y pueda tener capacidad fertilizante el embrión será inviable.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permiten concluir que para la crioconservación de semen de bagre blanco el uso de una solución compuesta por ETG 5 %, glucosa 6 % y leche en polvo descremada 5 % es una alternativa viable para la crioconservación de semen de bagre blanco, con resultados similares de fertilidad y eclosión a los obtenidos con semen fresco.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado en el marco del convenio Universidad de Córdoba y la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca – AUNAP (convenio 00070/2013) y con el apoyo de la División de Investigación y Extensión de la Universidad de Córdoba, Colombia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Araujo H, Cordero W. Principales características seminales del blanquillo *Sorubim cuspicaudus* inducido hormonalmente con Ovaprim®. [tesis de pregrado]. Montería: departamento de ciencias acuícolas, Facultad de MVZ, Universidad de Córdoba; 2004.
- Atencio VJ, Pérez EJ, Espinosa JA, Pardo SC. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Arch Med Vet. 2013;45(2):151-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200006>.
- Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. Gen Comp Endocrinol. 2010;165(3):535-548. DOI: 10.1016/j.yggen.2009.02.011
- Buitrago-Suarez UA, Mojica JI. *Sorubim cuspicaudus* Littmann, Burr y Nass 2000. En: Mojica JI, Usma-Oviedo JS, Álvarez-León R, Lasso C, editores. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. En: La serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia; 2012. p. 163-164.

- Cabrita E, Robles V, Herráez P. Sperm quality assessment. En: Cabrita E, Robles V, Herráez P, Editors. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Taylor y Francis Group, CRC Press; 2009. p. 93-147.
- Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco Santamaría Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev Colom Cienc Pecua*. 2006;19(2):152-159.
- Cuevas-Urbe R, Tiersch TR. Estimation of fish sperm concentration by use of spectrophotometry. En: Tiersch TR, Green CC Editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana, U.S.A. World Aquaculture Society; 2011. p. 162-200.
- Day JG, Stacey DN. *Methods in molecular biology. Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa, New Jersey: Human Press Inc; 2007. p. 347.
- De Graaf J, Berlinsky D. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture*. 2004;234(1-4): 527-540.
- Denniston RS, Michelet S, Bondioli KR, Godke RA. Principles of Embryo Cryopreservation. III. Basics of Cryopreservation. En: Tiersch TR, Green CC Editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana, U. S. A. World Aquaculture Society 2011.p. 274-290.
- Dreanno C, Suquet M, Desbruyères E, Cosson J, Delliou H, Billard R. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*. 1998;169:247-262.
- Espinosa J. Crioconservación de semen de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus*. [tesis de maestría]. Montería: departamento de ciencias acuícolas, Facultad de MVZ, Universidad de Córdoba; 2013.
- Glogowsky J, Ciereszko A, Dabrowsky K. Cryopreservation of muskellunge and yellow perch semen. *N Am J Aquacult*. 1999;61:258-262.
- Gwo JC. Cryopreservation of Sperm of Some Marine Fishes. En: Tiersch TR, Mazik PM, Editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana, U.S.A: World Aquaculture Society; 2000. p. 138-160.
- Li P, Wei Q, Liu L. DNA integrity of Polyodon spathula cryopreserved sperm. *J Appl Ichthyol*. 2008;24(2):121-125. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2007.01025.x
- Martínez JG, Pardo-Carrasco S. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta biol Colomb*. 2010;15(2):3-24.
- Martínez JG. Efecto de la concentración de DMSO y glucosa sobre la calidad espermática y el material genético en semen crioconservado de Bocachico *Prochilodus magdalenae*. [Tesis de maestría]. Medellín: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2010.
- Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleosteos. *Rev Col Cienc Pec*. 2005;18(1): 34-48.
- MICROPTIC S.L. Automatic Diagnostic Systems. SCA®, Sperm Class Analyzer ver 4.0. España. URL: [www.SpermClassAnalyzer.com](http://www.SpermClassAnalyzer.com).
- Morris GJ, Acton E, Murray JB, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*. 2012; 64(2):71-80. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.12.002.
- Ogier de Baulny B, Labbé 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(2):177-184.
- Paniagua-Chavez CG, Tiersch TR. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology*. 2001;43(3):211-223.
- Pegg D. Principles of Cryopreservation. En: Day JG, Stacey GN, Editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology™ 368*. New Jersey: Human Press; 2007. p. 39-57.
- Prieto-Guevara M, Hernández J, Gómez C, Pardo S, Atencio-García V, Rosa P. Efecto de tres tipos de presas vivas en la larvicultura de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*). *Rev MVZ Córdoba*. 2013;18(3):3790-3798.
- Ramírez-Merlano J, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Arch Med Vet*. 2011;43:135-144. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2011000200006>.
- Ramírez-Merlano J, Velasco-Santamaría Y, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachipomus* (Cuvier 1818). *Aquaculture Research*. 2011;42(6):738-745. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02835.x
- Ramírez-Merlano J, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *Rev Orinoquia*. 2010;14(1):59-71.
- Reza L, Salas J. Evaluación de la calidad seminal de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* crioconservado con dimetilacetamida. [tesis de pregrado]. Montería: departamento de ciencias acuícolas, Facultad de MVZ, Universidad de Córdoba; 2010.
- Rurangwa E, Volckaert F, Huyskens G, Kime D, Ollevier F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*. 2001;55(3):751-769.
- SAS. Institute Inc. SAS, ver 9.0 for windows. Cary, NC, USA. 2002.
- Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fishes. *Aquaculture*. 2000; 31(3):231-243.
- Velasco-Santamaría Ym, Medina-Robles Vm, Cruz-Casallas PE. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*. 2006;256:264-271.

- Villadiego P, Ortiz E, Atencio VJ. Evaluación del Régimen Alimentario del Bagre Blanco *Sorubim cuspicaudus* en el río Sinú, Colombia. [tesis de pregrado]. Montería: departamento de ciencias acuícolas, Facultad de MVZ, Universidad de Córdoba; 2004.
- Viveiros ATM. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. Anim Breeding Abstr. 2005;73(3):1-9.
- Woods Ej, Benson Jb, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology. 2004;48(2):146-156.

