

# Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido

## Cryopreservation of dorada *Brycon moorei* sperm with dimethyl sulfoxide

Víctor Atencio-García<sup>1\*</sup>, María Dorado Longas<sup>\*\*</sup>, César Montes Petro<sup>\*\*\*</sup>,  
Martha Prieto-Guevara<sup>\*\*\*\*</sup>, Jose Espinosa-Araujo<sup>\*\*\*\*\*</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.59987

### RESUMEN

El objetivo fue evaluar la calidad del semen descongelado de dorada *Brycon moorei* crioconservado con dimetilsulfóxido (DMSO) a tres porcentajes de inclusión. El semen se obtuvo de nueve machos mantenidos en cautiverio en la Estación Piscícola Repelón (Atlántico, Col), inducidos con extracto pituitario de carpa (4,5 mg/kg). El semen fue diluido en proporción 1:3 con un diluyente compuesto de DMSO a tres porcentajes 5%, 10% y 15%; glucosa al 6% y yema de huevo al 12%; empacado en macrotubos de 2,5 ml, congelados en vapores de nitrógeno y después de tres meses descongelados a 35°C durante 90 s. Semen fresco fue considerado como tratamiento control. En semen descongelado se evaluó movilidad total, tipos de movilidades, progresividad, velocidades y concentración espermática con el programa Sperm Class Analyzer SCA<sup>®</sup>; adicionalmente en semen fresco se determinó volumen, color y tiempo de activación. El semen fresco presentó movilidad mayor a 80% y tiempo de activación entre 28,5 y 41 s; mientras que, la concentración espermática osciló entre 10188,1 y 14590,2 millones/ml. La movilidad total del semen descongelado fue mayor cuando DMSO se incluyó a 5% (40,1±5,0%) o 10% (43,3±8,7%) ( $p>0,05$ ); pero a 15% registró la menor movilidad (30,6±7,9%) y el mayor porcentaje de espermatozoides inmóviles (69,4±7,9%) ( $p<0,05$ ); lo cual sugiere que inclusiones de DMSO por encima de 10% ocasionan mayores daños al espermatozoide de dorada. Los resultados permiten concluir que DMSO debe ser incluido entre 5 y 10%, junto con glucosa al 6% y yema de huevo al 12% para crioconservar semen de dorada.

**Palabras clave:** Concentración espermática, crioprotector, glucosa, Movilidad, velocidad.

### ABSTRACT

The aim was assess thawed sperm quality of dorada *Brycon moorei*, cryopreserved with dimethylsulfoxide (DMSO) to three inclusion rate. The sperm was obtained from nine males, kept in captivity in the Repelón Fish Farming Station (Atlántico, Col), were induced with carp pituitary extract (4.5 mg/kg). The semen was diluted with an extender composed of DMSO to three inclusion rates (5%, 10% and 15%); 6% glucose and 12% egg yolk. The sperm was diluted in 1:3, packed in macrotubes of 2.5 mL and freeze with vapors of nitrogen and after three months were thawed at 35°C for 90 s. The fresh sperm was considered as control treatment. The thawed semen was analyzed total motility, types of motility, progressivity, velocities and sperm concentration with the Sperm Class Analyzer SCA<sup>®</sup> software; further, volume, color and activation time were measured in fresh semen. The fresh sperm showed motility greater than 80% and activation time between 28.5 and 41 s; whereas that sperm concentration ranged between 10188.1 and 14590.2 million/ml. The total motility of thawed sperm was higher when DMSO was included at 5% (40.1±5.0%) or DMSO 10% (43.3±8.7%) ( $p>0.05$ ); but with 15% DMSO, were registered the low motility (30.6±7.9%) and the highest percentage of immotile sperm (69.4±7.9%) ( $p<0.05$ ); which suggests inclusions of DMSO above 10% cause greater damage to dorada spermatozoa. The results showed that DMSO should be included between 5 and 10%, along with 6% glucose and 12% egg yolk for cryopreservation of dorada sperm.

**Key words:** Cryoprotectant, glucose, motility, sperm concentration, velocity.

**Recibido:** febrero 16 de 2017

**Aprobado:** diciembre 15 de 2017

<sup>1\*</sup> MSc., Universidad de Córdoba/FMVZ/DCA/CINPIC, Montería, Colombia. vatencio@hotmail.com. Autor de correspondencia.

<sup>\*\*</sup> Bióloga, AUNAP/Estación Piscícola de Repelón, Atlántico, Colombia. maria.dorado@aunap.gov.co

<sup>\*\*\*</sup> Acuicultor, Universidad de Córdoba/CINPIC, Montería, Colombia. cdmp3\_23@hotmail.com

<sup>\*\*\*\*</sup> PhD., Universidad de Córdoba/FMVZ/DCA/CINPIC, Montería, Colombia. alimvi@hotmail.com

<sup>\*\*\*\*\*</sup> MSc., Universidad de Córdoba/FMVZ/DCA/CINPIC, Montería, Colombia. alimvi@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

La dorada *Brycon moorei*, es un pez endémico de Colombia, distribuido en las cuencas del Magdalena y el Caribe (Maldonado-Ocampo *et al.*, 2008). En el Magdalena se distribuye en las sub-cuencas de los ríos Cauca, San Jorge, Cesar, La Miel y Manso; mientras que en el Caribe se ha reportado en el Ranchería, desde el Cercado hasta Cuestecita (Mojica *et al.*, 2012). Conocida comúnmente como Dorada, mueluda, sardinata (Magdalena) o lisa (Ranchería) (Mojica *et al.*, 2012); es considerada una especie de gran importancia comercial con potencialidad piscícola debido a su tamaño, rápido crecimiento, alimentación omnívora y aceptación de alimento artificiales (Rodríguez-Franco *et al.*, 2014).

En la cuenca del Magdalena la dorada es considerada vulnerable a la extinción, debido a la alta presión pesquera a que es sometida y la fuerte alteración antrópica que experimenta la cuenca; mientras que en el río Ranchería su situación es considerada crítica (Mojica *et al.*, 2012). Ante esta situación se requiere de acciones de conservación, entre las que se destaca la crioconservación de semen, la cual ha sido considerada una herramienta para la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción mediante el establecimiento de bancos genéticos (Bobe & Labbé, 2009).

La crioconservación ofrece ventajas como optimización de los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal asincrónica y ciclos reproductivos estacionales (Atencio-García *et al.*, 2014); así como un uso eficiente del semen durante los procesos de reproducción artificial (Lahnsteiner *et al.*, 2004). Según Medina-Robles *et al.* (2005), la crioconservación beneficia las actividades de reproducción en acuicultura, porque incrementa la posibilidad de reproducción por fuera de la temporada reproductiva, facilita el movimiento e intercambio de material genético, mejora la eficiencia en la utilización de los parentales y contribuye a disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores en procura de nuevos sementales.

Existe reportes de crioconservación de semen de más de 200 especies de organismos acuáticos en el mundo (Tiersch, 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.*, 2004; Velasco-Santamaría *et al.*, 2006), bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Ramírez-

Merlano *et al.*, 2011), bocachico *Prochilodus magdalenae* (Atencio *et al.*, 2013) y bagre blanco *Sorubim cuspi-caudus* (Atencio-García *et al.*, 2014); con resultados satisfactorios del semen crioconservado en la reproducción artificial de estas especies.

Sin embargo, al tratar de utilizar estos protocolos en otras especies los resultados no han sido los mejores, debido a que se considera un proceso especie-específico (Lim & Le, 2013). Para que un protocolo de crioconservación de semen de una especie de pez sea exitoso es necesario ajustar cada uno de los factores considerados críticos en la realización de este proceso, entre los cuales se destacan la recolección del semen, la composición del diluyente, la concentración del crioprotector, y las curvas de congelación y descongelación (Tiersch, 2011, Irawan *et al.*, 2010).

Los diluyentes o agentes crioprotectores son soluciones que tienen como función proteger la integridad del espermatozoide de la acción tóxica de los productos generados por su propio metabolismo durante el proceso de crioconservación, y reducir la temperatura de congelación del medio en el que se encuentran suspendidas las células para disminuir o contrarrestar la formación de cristales de hielo (Woods *et al.*, 2004). La determinación del porcentaje de inclusión del crioprotector es importante porque define la capacidad de protección a la célula espermática y reduce la toxicidad sobre la misma. Por tanto, el objetivo de presente estudio fue evaluar el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) a tres porcentajes de inclusión (5, 10, 15%) como crioprotector en la crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* evaluando la calidad seminal post-descongelación.

## MÉTODOS

### Material biológico

La investigación se realizó en Instituto de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba - CINPIC (Montería, Córdoba). Se seleccionaron nueve machos de dorada de dos años de edad, en fase de espermiación, mantenidos bajo condiciones de cautiverio en la Estación Piscícola de Repelón (EPR) de la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca - AUNAP (Repelón, Atlántico); los cuales fueron transportados al CINPIC vía terrestre en tanques de 1000 l con aireación permanente. Luego fueron mantenidos durante 48 h en tanques circulares de 3m<sup>3</sup> de volumen útil, con flujo de agua constante (5 L/min) para habituarlos a las condiciones experimentales, reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación y el cambio de ambiente. Los machos seleccionados, con peso promedio de 1000±200 g estaban en fase de espermiación; es decir

a leve presión en la cavidad celómica en sentido cráneo-caudal liberaron líquido seminal (Atencio *et al.*, 2013). Los machos fueron inducidos con una dosis única de extracto hipofisario de carpa (EPC) a razón de 4,5 mg/Kg de peso vivo para incrementar el volumen seminal (Atencio, 2001). Todos los procedimientos que implicaron la manipulación de los animales fueron realizados de conformidad con las normas y procedimientos para el uso de animales de laboratorio, descritos por el *Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources National Research - Council of the National Academies (USA)*.

### **Obtención del semen**

El semen se obtuvo entre las 6-7 horas post-inducción y para su extracción los machos fueron previamente tranquilizados por inmersión directa en una solución de Eugenol (Proquident, Colombia) a razón de 0,5 ml/10 l de agua (Perez Ribeiro *et al.*, 2010). El semen fresco fue medido volumen, color, tiempo de activación, movilidad total, tipos de movilidad, progresividad, velocidades y concentración espermática; mientras que en el semen descongelado solo se analizó movilidad total, tipos de movilidad, progresividad y velocidades espermáticas.

### **Tratamientos y crioconservación de semen**

Para el proceso de crioconservación solo se utilizó semen con movilidad total mayor a 80%. El diluyente fue preparado con dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a tres porcentajes (5, 10, 15 % v/v), glucosa 6% (p/v) y yema de huevo 12% (v/v). El semen fresco fue considerando como tratamiento control. El semen fue diluido en proporción 1:3 (Velasco-Santamaría *et al.*, 2006) y luego depositadas en macrotubos de 2,5 ml.

*Congelación y descongelación.* La congelación se realizó en vapores de nitrógeno en un *dry shipper* de 4L (MVE, SC 4/2v, USA) durante 30 minutos. La tasa de enfriamiento del vapor de nitrógeno fue descrita por Cruz-Casallas *et al.* (2006a), así: de 28 a -20 °C desciende a 27,3 °C/min, de -20 a -100 °C baja a 29,9 °C/min y de -100 a -196 °C el descenso es de 5,5 °C/min. Al alcanzar la temperatura de crioconservación ( $\approx$ 196 °C), los macrotubos fueron trasladados a un termo de almacenamiento de 34L (MVE, XC 34/18, USA) y sumergidos en nitrógeno líquido. Los macrotubos fueron descongelados, después de tres meses, en baño serológico (Memmert, WNB 7-45, Alemania) a 35 °C durante 90 segundos.

### **Evaluación de la calidad seminal**

*Volumen y color seminal.* La recolección del semen se realizó en tubos Falcón graduados y estériles, se midió el volumen y se reportó el color. En la recolección se evitó la contaminación por orina y otros fluidos (sangre, bilis y heces) como lo sugiere Cruz-Casallas *et al.* (2006a).

*Tiempo de activación de los espermatozoides.* Una muestra de 0,25  $\mu$ l de semen se colocó en una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) y se activó con 75  $\mu$ l de agua destilada (dilución 1:300). La medición del tiempo se realizó desde el instante en que se adicionó la solución activadora hasta que alrededor del 90 % de los espermatozoides dejó de moverse (Martínez, 2010).

*Movilidad total.* En una cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) se colocó una muestra de 0,25  $\mu$ l de semen y 75  $\mu$ l de agua destilada (dilución 1:300); con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa Sperm Class Analyzer SCA (Microptic SL, SCA VET 01, España) se midió la movilidad total (Atencio *et al.*, 2013).

*Velocidad espermática.* Las muestras fueron analizadas en un periodo de cuatro segundos por el programa SCA®, obteniéndose los porcentajes de espermatozoides con velocidad rápida (tipo a, velocidades mayores a 100  $\mu$ m/s), media (tipo b, velocidades entre 45 y 100  $\mu$ m/s), lenta (tipo c, velocidades entre 10 y 45  $\mu$ m/s), así como el porcentaje de células estáticas (tipo d o sin movimiento) (Atencio *et al.*, 2013). El SCA® también estimó las velocidades curvilínea (VCL) y lineal (VSL).

*Concentración espermática.* Se utilizó 1  $\mu$ l de semen mezclado con 699  $\mu$ l de glucosa al 6 % 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  $\mu$ l y se colocaron en una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) (Atencio *et al.*, 2013). La concentración fue estimada mediante el programa SCA®. De cada macho se obtuvo una repetición para cada tratamiento (n=9) y cada repetición fue evaluada por triplicado para obtener un valor promedio de la característica seminal analizada.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar y todas las variables estudiadas fueron sometidas a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Para las variables que cumplieron estos supuestos se aplicó ANOVA de una sola vía, cuando se encontraron diferencias sig-

**Tabla 1.** Características del semen fresco de dorada *Brycon moorei* obtenidos por inducción hormonal (n=9).

Parámetro	Valor
Color	Amarillo
Volumen (mL)	3,5±1,8
Concentración (x10 <sup>6</sup> /ml)	12393,1±1486,8
Movilidad total (%)	84,0±3,2
Tiempo de activación (s)	33,7±3,3

nificativas se realizó la prueba de Rango Múltiple de Tukey. En todos los casos  $p < 0,05$  fue utilizado como criterio estadístico para establecer diferencia significativa. Los análisis se realizaron con ayuda del programa Statgraphic Centurion.

## RESULTADOS

El color del semen de dorada estuvo en el rango de amarillo pardo a amarillo, con volumen seminal promedio de 3,5±1,8 ml y movilidad total previa al proceso de congelación mayor a 80%, de acuerdo a lo propuesto por Martínez et al. (2011) para *Prochilodus magdalenae*. El tiempo de activación osciló entre 28,5 y 41 s; mientras que la concentración espermática osciló entre 10188,1 y 14590,2 millones/ml (tabla 1).

Los valores de movilidad total (84,0±3,2%), progresividad total (52,4±8,8%), velocidad curvilínea (118,7±23,1 μm/s) y velocidad lineal (65,9±15,7 μm/s) de semen fresco fueron mayores con respecto a los registrados en semen descongelado ( $p < 0,05$ ). El semen fresco también registró el mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida (44,0±9,6%) y media (16,6±4,7%) y el menor porcentaje de espermatozoides estáticos (17,0±3,7%), se observó diferencia significativa con relación a los registros del semen descongelado ( $p < 0,05$ ) (tabla 2).

La movilidad total del semen descongelado fue mayor cuando fue tratado con DMSO 5% (40,1±5,0%) y DMSO 10% (43,3±8,7%) sin observarse diferencia significativa entre estos tratamientos ( $p > 0,05$ ); mientras que DMSO 15% (30,6±7,9%) registró el menor valor ( $p < 0,05$ ). Sin embargo el porcentaje de espermatozoides rápidos en el semen descongelado osciló entre 6,2±4,3% (DMSO 5%) y 1,8±1,3% (DMSO 15%), sin observarse diferencia significativa entre estos tratamientos ( $p > 0,05$ ); así mismo el porcentaje de espermatozoides con movilidad media osciló entre 7,3±5,5% (DMSO 5%) y 5,8±3,3% (DMSO 15%) ( $p > 0,05$ ); mientras que el semen tratado con DMSO 15% registró el mayor porcentaje de espermatozoides estáticos, observándose diferencia significativa con el resto de tratamientos evaluados ( $p > 0,05$ ). Cuando el semen fue crioconservado con DMSO 5%, el porcentaje de espermatozoides con movilidad lenta fue de 26,7±6,4%; valor que no mostró diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) con los resultados obtenidos para semen fresco (21,9±5,0%) ni con el semen crioconservado con DMSO 15% (23,0±5,1%) (tabla 2).

**Tabla 2.** Características seminales de semen fresco y descongelado de dorada *Brycon moorei*. Letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Parámetro	Semen fresco	DMSO 5%	DMSO 10%	DMSO 15%
Movilidad total (%)	84,0±3,2 <sup>a</sup>	40,1±5,0 <sup>b</sup>	43,3±8,7 <sup>b</sup>	30,6±7,9 <sup>c</sup>
Rápidos (%)	44,0±9,6 <sup>a</sup>	6,2±4,3 <sup>b</sup>	4,5±3,1 <sup>b</sup>	1,8±1,3 <sup>b</sup>
Medios (%)	16,6±4,7 <sup>a</sup>	7,3±5,5 <sup>b</sup>	6,8±4,1 <sup>b</sup>	5,8±3,3 <sup>b</sup>
Lentos (%)	21,9±5,0 <sup>b</sup>	26,7±6,4 <sup>ab</sup>	32,1±6,7 <sup>a</sup>	23,0±5,1 <sup>b</sup>
Inmóviles (%)	17,0±3,7 <sup>a</sup>	59,0±5,0 <sup>b</sup>	56,7±8,7 <sup>b</sup>	69,4±7,9 <sup>c</sup>
Vel curvilínea (μm/s)	118,7±23,1 <sup>a</sup>	48,3±17,8 <sup>b</sup>	36,1±8,8 <sup>b</sup>	35,3±9,2 <sup>b</sup>
Vel lineal (μm/s)	65,9±15,7 <sup>a</sup>	25,7±9,3 <sup>b</sup>	17,9±6,1 <sup>b</sup>	15,9±5,7 <sup>b</sup>
Progresividad total (%)	52,4±8,8 <sup>a</sup>	9,9±5,9 <sup>b</sup>	7,1±4,6 <sup>b</sup>	4,4±2,7 <sup>b</sup>

La progresividad total del semen descongelado osciló entre  $9,9 \pm 5,9$  % (DMSO 5 %) y  $4,4 \pm 2,7$  % (DMSO 15%) sin observarse diferencia entre estos valores ( $p > 0,05$ ). La velocidad curvilínea del semen descongelado osciló entre  $48,3 \pm 17,8$   $\mu\text{m/s}$  (DMSO 5%) y  $35,3 \pm 9,2$   $\mu\text{m/s}$  (DMSO 15%) ( $p > 0,05$ ). Una tendencia similar fue observada en la velocidad lineal, la cual osciló  $25,7 \pm 9,3$   $\mu\text{m/s}$  (DMSO 5%) y  $15,9 \pm 5,7$   $\mu\text{m/s}$  (DMSO 15%) (tabla 2).

## DISCUSIÓN

Los resultados de las características seminales de *B. moorei* del presente estudio son los primeros registros para machos mantenidos en cautiverio, cuyo semen fue obtenido mediante inducción hormonal. Sin embargo, existen reportes de las características seminales de otros co-específicos del género *Brycon* en cautiverio, con semen obtenido mediante hipofización como *B. sinuensis* (Montes y Salgado 2014), *B. amazonicus* (Cruz-Casallas et al., 2006a) y sin inducción hormonal como *B. henni* (Montoya-Lopez et al., 2006; Pineda-Santis et al., 2015).

En semen de brycónidos migratorios, obtenido mediante inducción hormonal por hipofización, Montes y Salgado (2014) en *B. sinuensis* reportaron una concentración espermática de  $10058 \pm 5493$  millones/ml y tiempo de activación entre 27 y 46 seg y Cruz-Casallas et al. (2005), en *B. amazonicus* registraron concentración de  $13900 \pm 4000$  millones/ml y tiempo de activación de  $41 \pm 7$  s; mientras que Pineda-Santis et al. (2015), en *B. henni*, un brycónido no migratorio, en semen fresco obtenido sin inducción hormonal, obtuvieron una concentración de  $14554 \pm 5138$  millones/ml, valores que podrían considerarse similares o cercanos a los obtenidos en el presente estudio.

La movilidad total del semen crioconservado es considerada un criterio de calidad espermática, que permite medir el éxito o fracaso del proceso de crioconservación. 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, membrana espermática y fragmentación del DNA como consecuencia del choque hiperosmótico y la toxicidad del crioprotector y que estos daños se incrementan durante los procesos de congelación y descongelación. La magnitud de los daños criogénicos puede resultar en disminución de la movilidad y velocidad espermáticas; lo cual termina afectando la capacidad fertilizante del semen descongelado (Ramírez-Merlano et al., 2010).

En los resultados del presente estudio, se encontró que en todos los casos el proceso de crioconservación y

descongelación causó una reducción de la movilidad total, de las velocidades espermáticas, progresividad total e incrementó el porcentaje de espermatozoides inmóviles en el semen descongelado. La movilidad total del semen descongelado se redujo entre 48-52 % con relación a la del semen fresco (84,0 %) cuando fue tratado con DMSO 5% ( $40,1 \pm 5,0$  %) o DMSO 10 % ( $43,3 \pm 8,7$  %) y cayó a alrededor de la tercera parte cuando fue tratado con DMSO 15 % ( $30,6 \pm 7,9$  %). Pineda-Santis et al. (2015), obtuvo una reducción aproximada de 38 % de la movilidad total del semen fresco de *B. henni* cuando lo criopreservó con DMSO 5 %.

El porcentaje de espermatozoides rápidos en el semen descongelado no mostró diferencia estadística a los diferentes porcentajes de inclusión del DMSO; pero mostró una drástica reducción con relación al semen fresco ( $44,0 \pm 9,6$  %) cuando fue tratado tanto con DMSO 5 % ( $6,2 \pm 4,3$  %) como con DMSO 15 % ( $1,8 \pm 1,3$  %) ( $p > 0,05$ ). El porcentaje de espermatozoides estáticos (sin movimiento) se triplicó con DMSO 5 % ( $59,0 \pm 5,0$  %) y DMSO 10 % ( $56,7 \pm 8,7$  %) con relación a semen fresco ( $17,0 \pm 3,7$  %); pero se incrementó a cuatro veces cuando DMSO se utilizó a 15 % ( $69,4 \pm 7,9$  %) (tabla 2).

Las velocidades espermáticas (curvilínea y lineal) del semen descongelado se redujeron en más del 60 %; mientras que la progresividad total disminuyó en más del 80 % con relación a los registros de semen fresco (tabla 2). A pesar que en estas variables, en el semen descongelado, no hubo diferencia estadística entre las tres inclusiones de DMSO probadas (5, 10 y 15 %), se observa una tendencia de menores velocidades y progresividad a medida que aumenta la inclusión del crioprotector. Según Lahnsteiner et al. (2000), la reducción de la velocidad espermática reduce la probabilidad que el espermatozoide alcance el micrópilo.

La movilidad total del semen crioconservado con DMSO 5 % o 10 %, fueron mayores a las obtenidas con DMSO 15 % ( $p < 0,05$ ), lo cual sugiere que porcentajes de inclusión por encima de 10 % ocasionan mayores daños a los espermatozoides de dorada; que cuando DMSO se incluye entre 5 % y 10 %. En otros brycónidos, la crioconservación de semen con DMSO entre 5 y 10 %, también ha mostrado resultados adecuados como los reportados por Cruz-Casallas et al. (2006b), para *B. amazonicus*, quienes encontraron que DMSO a niveles de inclusión entre 5 % ( $76 \pm 2$  %) y 10 % ( $33 \pm 4$  %) permitieron buenos porcentajes de movilidad del semen descongelado. Murgas et al. (2001), reportaron valores de movilidad espermática de 53 % en piracanjuba *Brycon orbynyanus* utilizando DMSO al 10 %, valo-

res muy cercanos a los obtenidos en el presente estudio. Martínez (2010) recomendó crioconservar semen de *Prochilodus magdalenae* con DMSO a 10 % para obtener una alta movilidad total (71±9.02 %).

Los daños que sufren las mitocondrias y la membrana citoplasmática en el proceso de crioconservación se consideran como las principales causas de la pérdida de movilidad, tipos de movilidad y velocidades espermáticas (Cabrita *et al.*, 2010; Padilla, 2014). Varios estudios han encontrado alta correlación entre el daño mitocondrial y la movilidad total (Fraser & Strzezek, 2007; Martínez *et al.*, 2012; Padilla, 2014). La funcionalidad de la mitocondria juega un papel importante en la activación espermática, ya que suministra la energía en forma de ATP necesaria el movimiento del espermatozoides y la duración del mismo (Medina-Robles *et al.*, 2005).

Los daños que sufren las mitocondrias se explican como consecuencia de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS); lo cual disminuye la movilidad por el descenso en la fosforilación de proteínas del axonema (O'Connell *et al.*, 2002; Paasch *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004). Se ha sugerido que el incremento del estrés oxidativo es causado por un desbalance entre la producción y remoción de las EROS que conduce al aumento en la concentración de los radicales libres y en consecuencia un aumento en el daño celular (Gallardo, 2007).

Martínez & Pardo (2010) sugieren que es probable que los crioprotectores interactúan directamente con las reservas de ATP, lo que 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.

He y Woods (2004) crioconservaron semen de *Morone saxatilis* y encontraron que el nivel de ATP de semen precongelado disminuyó considerablemente cuando el crioprotector entró en contacto con los espermatozoides, y su pérdida fue mayor después de la congelación, lo cual les permitió sugerir que el proceso de crioconservación ocasiona daño en las mitocondrias.

## CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten concluir que DMSO debe ser incluido entre 5 y 10%, junto con glucosa al 6% y yema de huevo al 12% para crioconservar semen de dorada *Brycon moorei*; ya que concentraciones mayores ocasionan altas pérdidas de calidad del semen crioconservado.

## AGRADECIMIENTOS

A la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca – AUNAP por la financiación del presente estudio mediante convenio 00070/2014 y al apoyo de la vice-rectoría de Investigación y Extensión de la Universidad de Córdoba.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atencio, V. (2001). Producción de alevinos de especies nativas. *Rev. MVZ Córdoba*, 6(1), 9-14.
- Atencio, V., Pérez, E., Espinosa, J., y Pardo, S. (2013). Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Arch Med Vet*, 45,151-158.
- Atencio-García, V., Dorado, M., Navarro, E., Pérez, F., Herrera, B., Movilla, J., y Espinosa-Araujo, J. (2014). Evaluación de etilenglicol como crioprotector en la crioconservación de semen de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus*, Pimelodidae. *Acta Biol Colomb*, 19(2), 271-280.
- Bobé, J., y Labbé, C. (2009). Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol*, 165(3), 535-548.
- Cruz-Casallas, P., Pardo-Carrasco, S., Arias-Castellanos, J., Lombo-Castellanos, P., Lombo-Rodríguez, D., y Pardo-Mariño, J. (2004). Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *J World Aquacult Soc*, 35(4), 529-535.
- Cruz-Casallas, P., Lombo-Rodríguez, D., y Velasco-Santamaría, Y. (2005). Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquac Res*, 36, 682-686.
- Cruz-Casallas, P., Medina-Robles, V., y Velasco-Santamaría, Y. (2006a). Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Rev Col Cienc Pecu*, 19(2),146-151.
- Cruz-Casallas, P., Medina-Robles, V., y Velasco-Santamaría, Y. (2006b). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú *Brycon amazonicus*. *Rev Col Cienc Pecu*, 19(2), 152-159.
- Fraser, L., y 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.
- Gallardo, J. (2007). Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal. *Rev Invest Clin*, 59(19), 42-47.
- He, S., y Woods, L. (2004). Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to

- striped bass *Morone saxatilis* sperm. *Cryobiology*, 48, 254-262.
- Irawan, H., Vuthiphandchai, V., y Nimrat, S. (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp *Cyprinus carpio* sperm. *Anim Reprod Sci*, 122, 236-243.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., y Urbányi B. (2004). Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the starlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquac Res*, 35, 519-528.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbányi, B., y Weismann, T. (2000). Cryopresevation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54, 1477-1496.
- Lim, H., y LE, M. 2013. Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm. *Theriogenology*, 79, 867-871.
- Maldonado-Ocampo, J., Vari, R., y Usma, J. (2008). Checklist of the freshwater fishes of Colombia. *Biota Colombiana*, 9(2), 143-237.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P., y Levy, R. 2004. Cryopreservation induces and apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, 71, 28-37.
- 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, Medellín.
- Martínez, J., y Pardo-Carrasco, S. (2010). Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biol Colomb*, 15(2), 3-24.
- Martínez, J., Atencio-García, V., y Pardo-Carrasco, S. (2011). Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Rev MVZ Córdoba*, 16(2), 2554-2563.
- Martínez, J., Atencio García, V., y 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.
- Medina-Robles, V., Velasco-Santamaría, Y., y Cruz-Casallas, P. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 18, 34-48.
- Mojica, J. Castellanos, C. Usma, S. Álvarez, R. y Lasso, A. (2012). *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 y Universidad de Manizales.
- Montes, C., y Salgado, S. (2014). Efecto de la concentración de glucosa sobre la movilidad espermática de la dorada *Brycon sinuensis* (Trabajo de pregrado). Departamento Ciencias Acuícolas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, Montería.
- Montoya-López, A., Olivera-Ángel, M., y Carrillo, L. (2006). Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Pisces: Characidae). *Rev Colomb Cienc Pecu*, 19(2), 180-186.
- Murgas, L., Gualhanone, A., Silva, M., Mello, C., Freitas, R., y Zangeronimo, G. (2001). Calidad seminal del pez piracanjuba *Brycon orbignyanus* post-descongelación. *An Vet. (Murcia)*, 17, 3-10.
- Navarro, O., Velasco-Santamaría, Y., y Cruz-Casallas, P. (2004). Evaluación de cinco crioprotectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev Colomb Cienc Pecu*, 17, 53-59.
- O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, 1, 704-709.
- Paasch, U., Sharma, R., Gupta, A., Grunewald, S., Mascha, E., y Thomas, A., (2004). Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod*, 71, 1828-1837.
- 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.
- Perez Ribeiro, P., Santos Costa, L., Eloy A., Vieira, R.P., y Solis Murgas, L. (2010). Aceite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *An Vet (Murcia)*, 26, 69-76.
- Pineda-Santis, H., Gómez-Oquendo, J., Montoya-Páez J., Toro-Rendón, V., Acevedo-Villa, O., y Restrepo-Betancur, G. (2015). Crioconservación de semen y calidad espermática en sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Orinoquia*, 19(2), 176-182.
- Ramírez-Merlano, J., Velasco-Santamaría, Y., Medina-Robles, V., y Cruz-Casallas, P. (2005). 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*, 18(4), 331.
- Ramírez- Merlano, J., Medina-Robles, V., y Cruz-Casallas, P. (2010). Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *Orinoquia*, 14(1), 59-71.
- Ramírez-Merlano, J., Medina-Robles, V., y Cruz-Casallas, P. (2011). Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Arch Med Vet*, 43, 135-144.
- Rodríguez-Franco, N., Castañeda-Álvarez, GD., y David-Ruales, C. (2014). Ensayo preliminar de engorde de dorada (*Brycon moorei* Steindachner 1878) en dos densidades de siembra. *Orinoquia*, 18(2), 203-207.
- Tiersch, T., y Grenn, C. (Ed). (2011). *Cryopreservation in aquatic species. 2nd edition*. Louisiana, USA: World Aquaculture Society.
- Velasco-Santamaría, Y., Medina-Robles, V., y Cruz-Casallas, P. (2006). Cryopreservation of yamú *Brycon amazonicus* sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*, 256, 264-271.
- Woods, E., Benson, J., Agca, Y., y Critser, J. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48(2), 146-156.