



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ACUICOLAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PISCÍCOLAS (CINPIC)**



# REPRODUCCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN: HERRAMIENTAS DE CONSERVACIÓN

Prof. VÍCTOR J. ATENCIO-GARCÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN PISCÍCOLA  
DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



**CINPIC**

29 de abril/2020

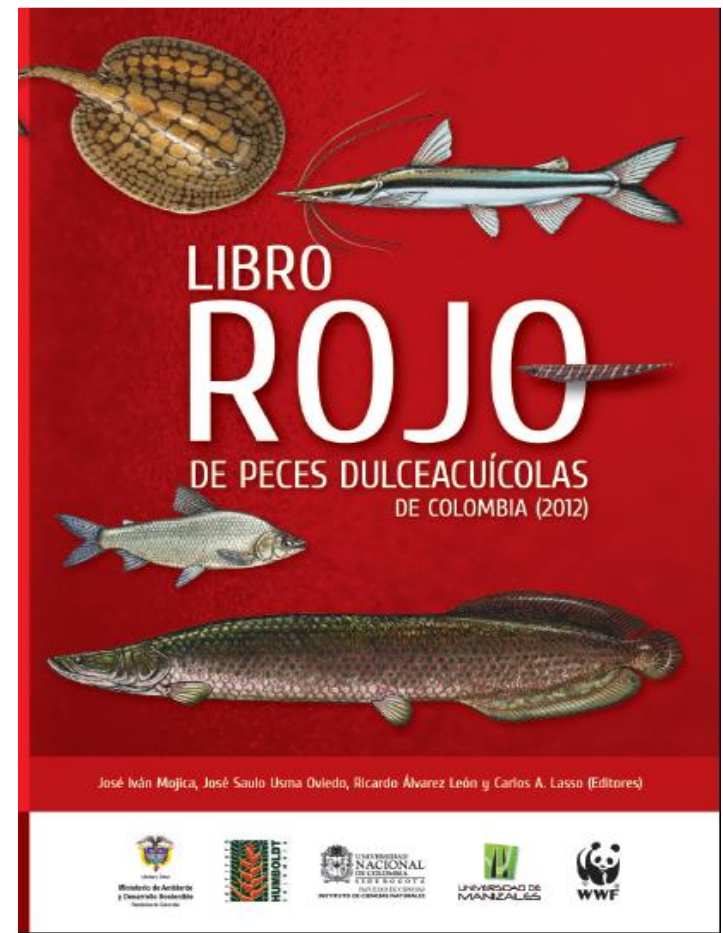
Vía Internet

# Libro Rojo de Peces Dulceacuícolas (Mojica et al., 2012).

- 81 especies con algún grado de amenaza
- 1 extinta
  - *Rhizosomichthys totae* (Runcho)
- 1 peligro crítico
  - *Pseudoplatystoma magdaleniatum*
- 4 peligro
  - *Brycon labiatus* (Sabaleta de piedra)
  - *Ichthyoelephas longirostris* (Pataló)
  - *Notarius bonillai* (Bagre cazon)
  - *Osteoglossum ferreirai* (Arawuana azul)
- 48 vulnerable
- 24 casi amenazadas
- 3 preocupación me



**Taxonomía**  
Orden: Siluriformes  
Familia: Trichomycteridae  
Especie: *Rhizosomichthys totae* Miles 1942



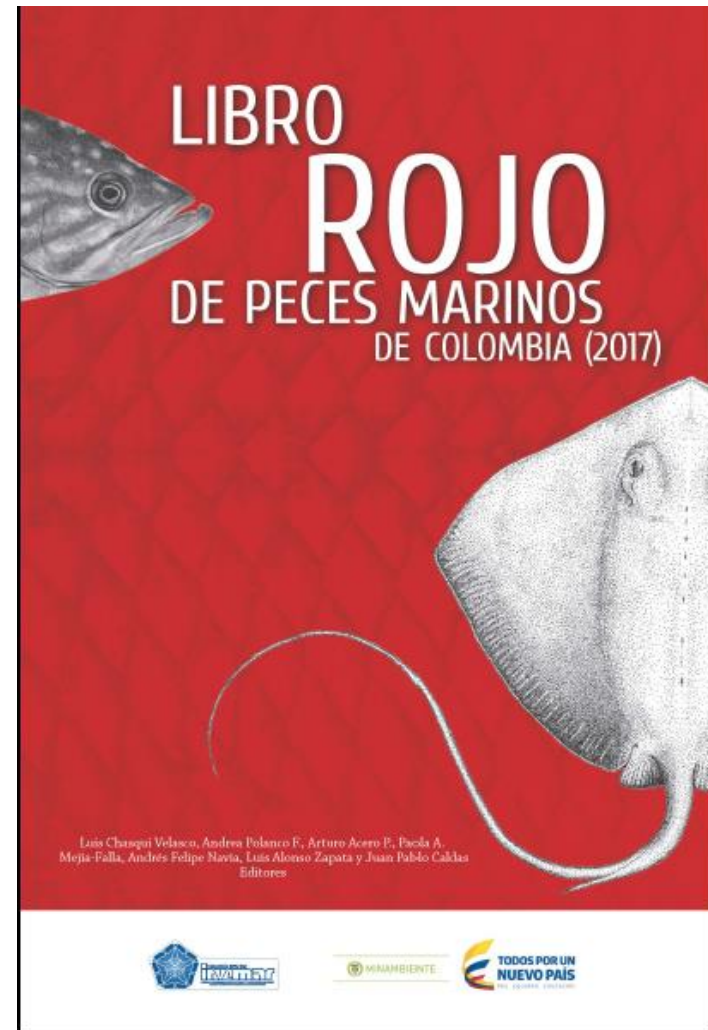
## *Pseudoplatystoma magdaleniatum*



Libro rojo de peces marinos de Colombia (2017)  
(Chasqui et al., 2017)

56 especies con algún grado de amenazadas

- 6 Peligro crítico
  - *Epinephelus itajara* (Mero guasa)
  - *Epinephelus striatus* (Cherna)
  - *Gambusia lemaitrei* (Pipón de totumo)
  - *Megalops atlanticus* (Sabalo)
  - *Pristis pectinata* (Pez sierra)
  - *Pristis pristis* (Pez sierra)
- 7 Peligro
  - *Ariopsis sp* (Chivo cabezon)
  - *Balistes vetula* (Cachua)
  - *Diplobatis colombiensis* (Raya torpedo)
  - *Lachnolaimus maximus* (Pargo pluma)
  - *Scarus coelestinus* (Pez loro, loro negro)
  - *Scarus coeruleus* (Pez loro azul)
  - *Scarus guacamaia* (Pez loro, lora)
- 43 Vulnerables.

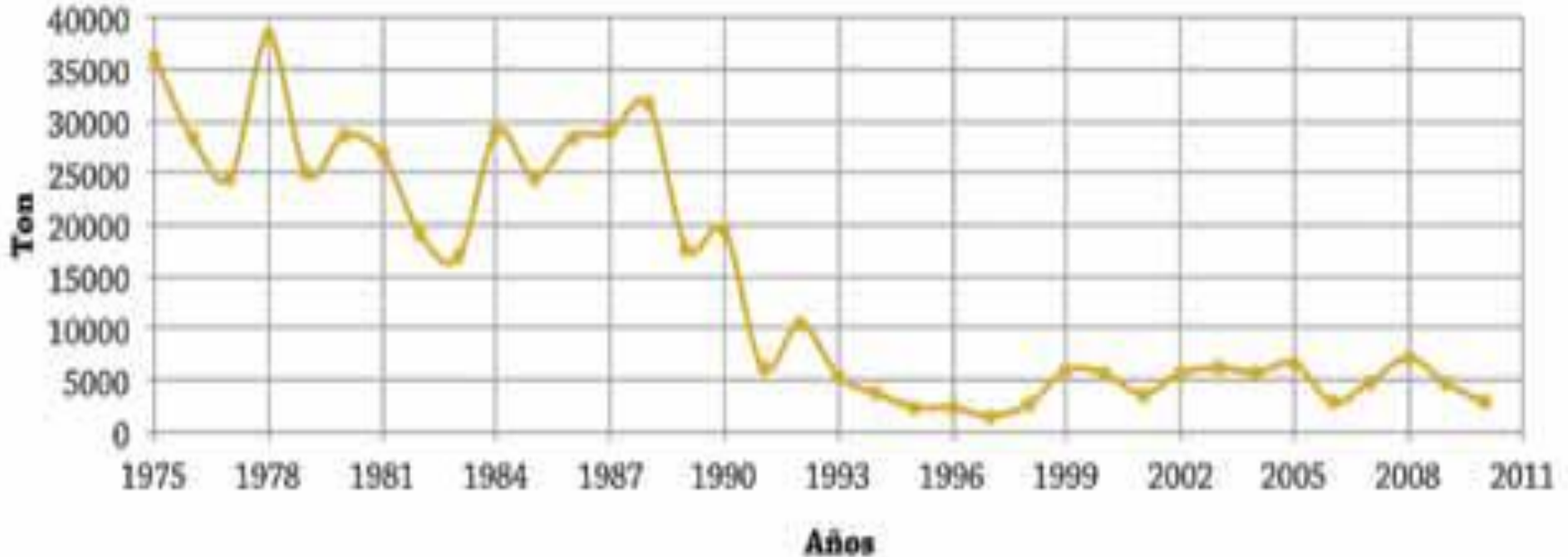


## Bagre



Capturas anuales *Pseudoplatystoma magdaleniatum* en la cuenca del Magdalena (Fuente: C. Barreto, datos sin publicar. Tomado del Libro Rojo de Peces Dulceacuícola de Colombia Mojica et al., 2012).

## Bocachico



Evolución histórica de las captura totales de *Prochilodus magdalenae* en la cuenca del Magdalena (Fuente Barreto, 2011. Tomado del Libro Rojo de Peces Dulceacuícola de Colombia Mojica et al., 2012).

# CAUSAS DE LA DISMINUCIÓN DE LA POBLACIONES DE PECES

## Alteraciones ambientales causadas por acciones antrópicas

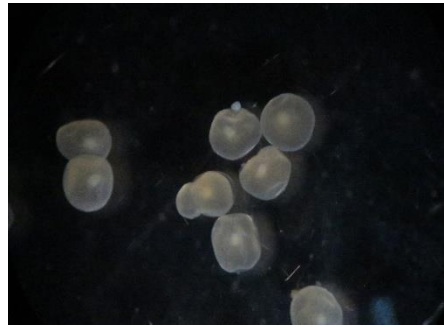
- Deforestación
- Construcción de obras
  - Hidroeléctricas (embalsamientos)
  - Carreteras
- Contaminación
  - Orgánica e inorgánica
- Reducción y/o desaparición de planos inundables
- Reducción y/o desaparición de caños
- Pesca con artes destructivos y sobrepesca
- Minería



# Conservación *ex situ in vivo*

- Reproducción en cautiverio

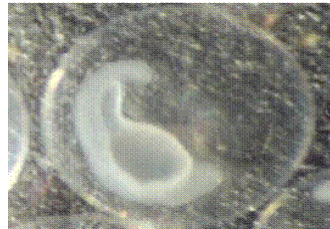
## Manejo y selección de reproductores



## Reproducción inducida



## Larvicultura y alevinaje



# REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL

- Es la inducción a la maduración final, ovulación y desove de los peces mediante:
  - Manipulación ambiental (temperatura, fotoperiodo, salinidad)
  - Terapia hormonal
    - Gonadotropinas (hCG, eCG, LH) (Enfoque hipofisario, hipofización)
    - Análogos de GnRH (LHRH, sGnRH) (Enfoque hipotalámico)
- En un estado de madurez apropiado.
- En la inducción hormonal (terapia hormonal) se debe responder la siguientes preguntas
  - Estado de maduración de los parentales?
  - Tipo de hormona a utilizar?
  - Dosificación de la sustancia inductora?
  - Vía de aplicación?
  - Proporción espermatozoide/ovocito?
  - Volumen de agua para la activación?
  - Carga de huevos en las incubadoras?
- La respuestas a estos interrogantes es lo que se conoce como protocolo de reproducción



- Selección de reproductores para reproducción inducida

- Hembras

- Completado la vitelogenésis
- Iniciado la maduración final

- Selección de reproductores para inducción hormonal

- Características externas (Diagnóstico presuntivo)

- Papila genital dilatada y rojiza
- Abdomen abultado y flácido

- Características internas

- Biopsia ovárica (Diagnóstico confirmativo)

- Análisis que determina el grado de maduración ovocitaria
- Posición del núcleo o VG
- Diámetro de los ovocitos (800-1200  $\mu\text{m}$ )
- Color de los ovocitos

- Toma de muestra de ovocitos

Canulación



Punción abdominal



- Análisis de los ovocitos

### Tamaño y forma

Los ovocitos deben ser esféricos y de tamaño homogéneo

- Color

- Homogeneidad en el color

- Posición del núcleo o vesícula germinal

- Céntrico

- Migrando (Ovocito en Maduración final, FOM)

- Periférico (Ovocito en Maduración final, FOM)

- Rompimiento de la membrana nuclear (GVBD)
  - Se observan sin núcleo

- Atresia folicular

- Forma irregular, no esférico (uvas pasas), color blancuzco

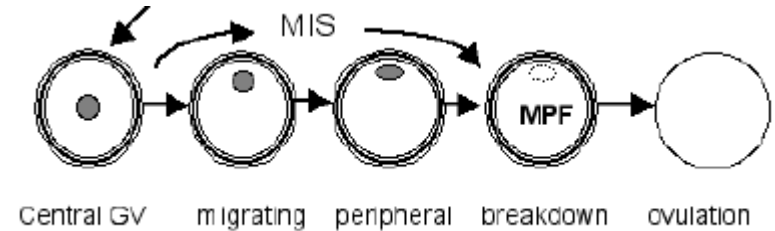
- Más transparentes,

- Licuefacción del vitelo

- Sobremaduros (over-ripe)

- Mayor tamaño

- Respuesta negativa a la inducción

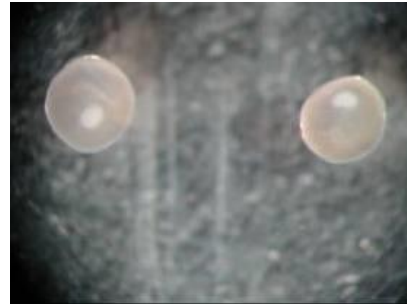
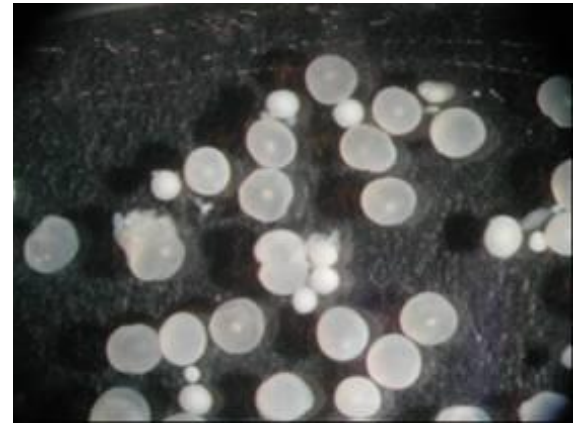


# Muestras de Biopsia ovárica

Bocachico



Dorada



Cachama negra



Bagre blanco



Yaron et al. (2009) En carpa común *Cyprinus carpio* L. encontró que:

La ovulación fue exitosa solo cuando éstas presentaban un porcentaje de ovocitos migrando por encima del 66% en su biopsia ovárica,

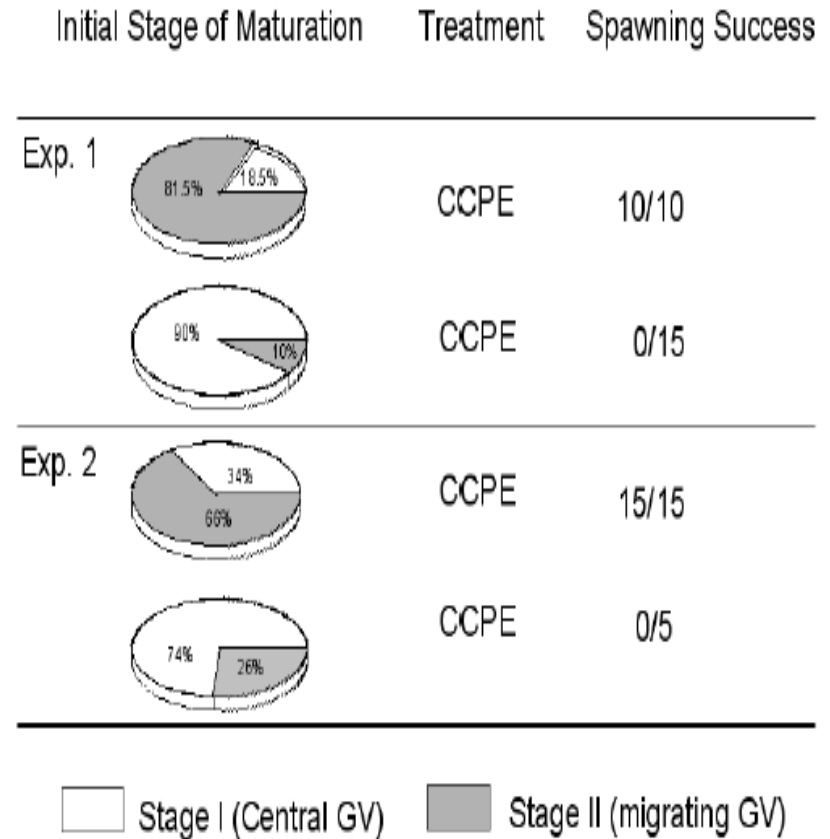


Fig. 7. Results of two experiments to determine the readiness of female common carp for spawning induction. Ovarian biopsies were taken from fish selected for spawning induction by palpation of abdominal softness. Oocytes (>40) were biopsied, cleared, and their maturation stage was determined under a dissecting microscope. Fish were induced to spawn by CCPE as in Fig. 6. Stripping was attempted 7-10 h following administration of the resolving dose. No response, or partial or abnormal release of eggs, was regarded as unsuccessful. Before treatment, two main cohorts of post-vitellogenic oocytes were distinguished: stage I oocytes with central germinal vesicle (GV) and stage II oocytes with migrating GV. The percent of initial oocyte stages was compiled *a posteriori* from all females in the cohort (modified from Yaron et al., 2002a,b).

- Sharaf (2012)
  - African catfish, *Clarias gariepinus*,
    - Sugirieron como viables aquellas hembras con más del 60% de los ovocitos con vesícula germinal migratoria
- Zadmajid et al. (2017).
  - Evaluando el potencial para inducir la ovulación en *Capoeta trutta* usando, con Ovaprim™.
    - Solo hembras con más del 60% de los ovocitos en posición migrando.

Características de los ovocitos en hembras y desempeño reproductivo de bocachico en diferentes periodos de la temporada reproductiva (Atencio et al., 2018).

| Tipo de ovocito     | Temporada               |                         |                          |                         |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                     | Inicio<br>(mar-may)     | Media<br>(jun-ago)      | Final<br>(sep-oct)       | Fuera<br>(nov)          |
| Céntricos (%)       | 8.3±2.9 <sup>b</sup>    | 13.4±2.1 <sup>b</sup>   | 29.3±2.9 <sup>a</sup>    | 23.4±4.4 <sup>a</sup>   |
| Migrandos (%)       | 38.1±23.1 <sup>a</sup>  | 40.2±20.7 <sup>a</sup>  | 28.5±20.1 <sup>ab</sup>  | 13.5±14.0 <sup>b</sup>  |
| Periféricos (%)     | 7.2±17.0 <sup>a</sup>   | 0.1±0.6 <sup>b</sup>    | 0.4±1.2 <sup>b</sup>     | 0.0±0.0 <sup>b</sup>    |
| Maduros (%)         | 30.2±24.4 <sup>a</sup>  | 27.1±18.0 <sup>a</sup>  | 32.7±18.0 <sup>a</sup>   | 26.5±14.6 <sup>a</sup>  |
| Atrésicos (%)       | 15.5±2.6 <sup>b</sup>   | 7.8±2.0 <sup>a</sup>    | 9.2±2.6 <sup>ab</sup>    | 31.6±3.8 <sup>c</sup>   |
| Total OMF (%)       | 75.5±6.2 <sup>a</sup>   | 67.4±3.8 <sup>a</sup>   | 61.6±5.2 <sup>a</sup>    | 39.9±7.6 <sup>b</sup>   |
| Parámetros          | Temporada               |                         |                          |                         |
|                     | Inicio<br>(mar-may)     | Media<br>(jun-ago)      | Final<br>(sep-oct)       | Fuera<br>(nov)          |
| IO (%)              | 95.6±10.2 <sup>a</sup>  | 68.3±7.6 <sup>b</sup>   | 90.0±11.4 <sup>ab</sup>  | 72.5±16.1 <sup>ab</sup> |
| Fec (g ovoc/hembra) | 201.6±15.6 <sup>a</sup> | 187.2±11.1 <sup>a</sup> | 165.7±15.2 <sup>ab</sup> | 126.5±22.1 <sup>b</sup> |
| pH desove           | 7.45±0.05 <sup>a</sup>  | 7.39±0.03 <sup>a</sup>  | 7.41±0.05 <sup>a</sup>   | 7.39±0.07 <sup>a</sup>  |
| F (%)               | 68.5±6.9 <sup>a</sup>   | 50.6±5.1 <sup>b</sup>   | 46.5±6.9 <sup>b</sup>    | 31.8±10.8 <sup>b</sup>  |
| E (%)               | 57.7±8.2 <sup>a</sup>   | 42.5±5.02 <sup>ab</sup> | 36.6±6.8 <sup>ab</sup>   | 25.08±11.6 <sup>b</sup> |

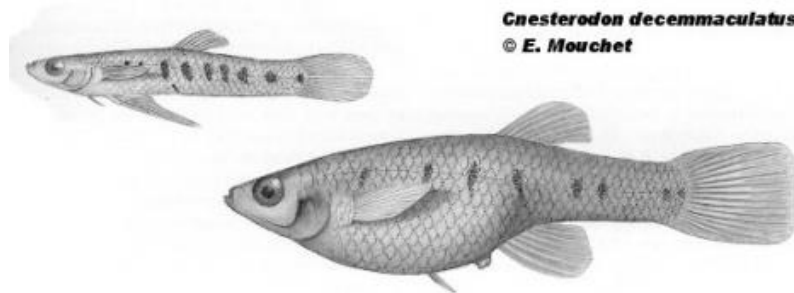
- ***ENFOQUE HIPOFISIARIO (HIPOFIZACIÓN)***

- Extractos brutos de hipófisis → Homogenizados de hipófisis de donadores maduros en suero fisiológico (Hipofización)
- Actúa en las gónadas
- Principio activo es la gonadotropina
- Utilización de la hipófisis de peces de menor valor comercial para inducir el desove de peces de mayor interés comercial
- Puede ser producida por el piscicultor
- Poseen otras sustancias de efectos sinérgico a las gonadotropinas
- Dosificación
  - Media a una hipófisis por reproductor
-

- Primeros trabajos de hipofización en Suramérica
  - Bernardo Houssay (1930) → Inyectó al poecilido vivíparo *Cnesterodon decemmaculatus* con extracto de *Prochilodus platensis* y observó que las hembras ovularon.
    - Houssay BA (1930). Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. Rev Soc Arg Biol 1930; 6: 686-88
  - Cardoso (1934)
    - Cardoso DM. Relação genito-hipofisaria e reprodução nos peixes. Arq Inst Biol 1934; 5: 133-136.
  - Rudolph Von Ihering & Pedro de Azevedo → Desove de *Prochilodus argenteus* (1936)
    - Von Ihering R, Azevedo P de. A desova e a hipofisação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. Arq Inst Biol 1936; 7(9): 107-180.
    - Homoplásticos
    - Heteroplásticos



**Bernardo Alberto Houssay**  
Premio Noble de Medicina, 1947

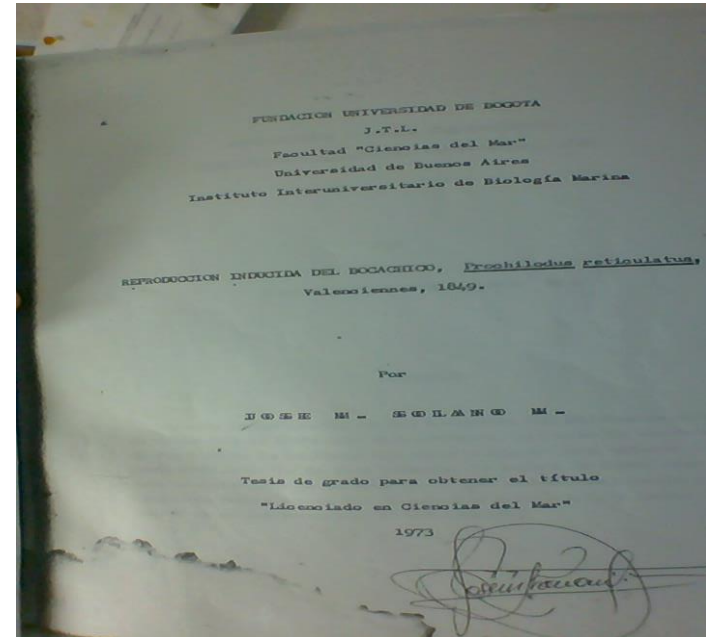


**Rudolf Von Ihering**  
Desarrolla la reproducción artificial mediante la hipofización

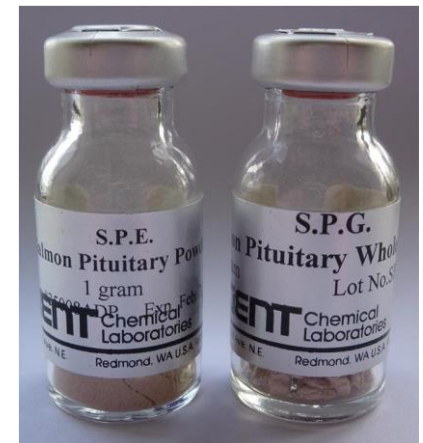


# Primeros trabajos en Colombia

- Alonso Ramos (1963), ensayos preliminares de reproducción artificial
- Gilberto Toro (1967), Primer desove inducido y fertilización exitosa, no obtuvieron larvas
- José Solano (1973) obtuvo las primeras larvas induciendo con Extracto bruto de hipófisis de bocachico,
- Desventajas
  - Problemas en la estandarización de las dosificaciones (cualitativa)
  - Propagación de enfermedades
  - Reacción inmune



- Hipófisis deshidratadas
    - Inicialmente uso de la acetona
    - Actualmente mediante liofilización
  - Extractos de Pituitaria (CPE, SPE)  $\Rightarrow$  5 a 7 mg/Kg
  - Actúa en las gónadas
  - Principio activo es la gonadotropina (GtH II, LH)
  - Utilización de la hipófisis de peces de menor valor comercial para inducir el desove de peces de mayor interés comercial
  - Puede ser producida por el piscicultor
  - Poseen otras sustancias de efectos sinérgico a las gonadotropinas
  - Fácil almacenamiento
- 
- Desventajas
    - Estandarización de las dosificaciones (cualitativa)
    - Riesgo de transmisión de enfermedades
    - Reacción inmune
      - Cuando se usan más de una vez
      - Incremento de las dosificaciones (Mylonas & Zohar, 2001)



- Extracción de gonadotropina de placenta, orina y suero de mamíferos
  - Gonadotropina Coriónica Humana (hCG, dosificación 1000-5000 UI/Kg)
    - Primogonyl, Pregnyl (HCG, 5000 UI, Schering Lab)
    - Chorulon ( HCG, 5000 UI, Intervet Lab)
    - Fertivet® (HCG, 2500 UI, Lab. Chalver)
  - Gonadotropina Serica de Yegua Preñada (eCG)
    - Folligon, (eCG, 500-1000 UI, Intervet Lab)
- SG-G100 (Salmon Gonodotropine)



- Actúa en las gónadas
- Principio activo es la gonadotropina (HCG, LH)
- Fácil almacenamiento por largos períodos
- Facilidad de adquisición
- Estandarización cualitativa



- Desventajas
  - Reacción inmune
  - Costo elevado
  - Protocolo no definido en muchas especies



- Protocolo de aplicación de inductores cuyo principio activo es la gonadotropina
- La dosis se aplica en dos partes:
  - La primera aplicación es conocida como estimulante (10-30%)
  - La segunda inyección es conocida como dosis final (90-70%)
- Tiempo entre la primera y segunda aplicación oscila entre 6 y 14 horas
- A los machos se le aplica entre el 50 y 80% de la dosis de la hembra

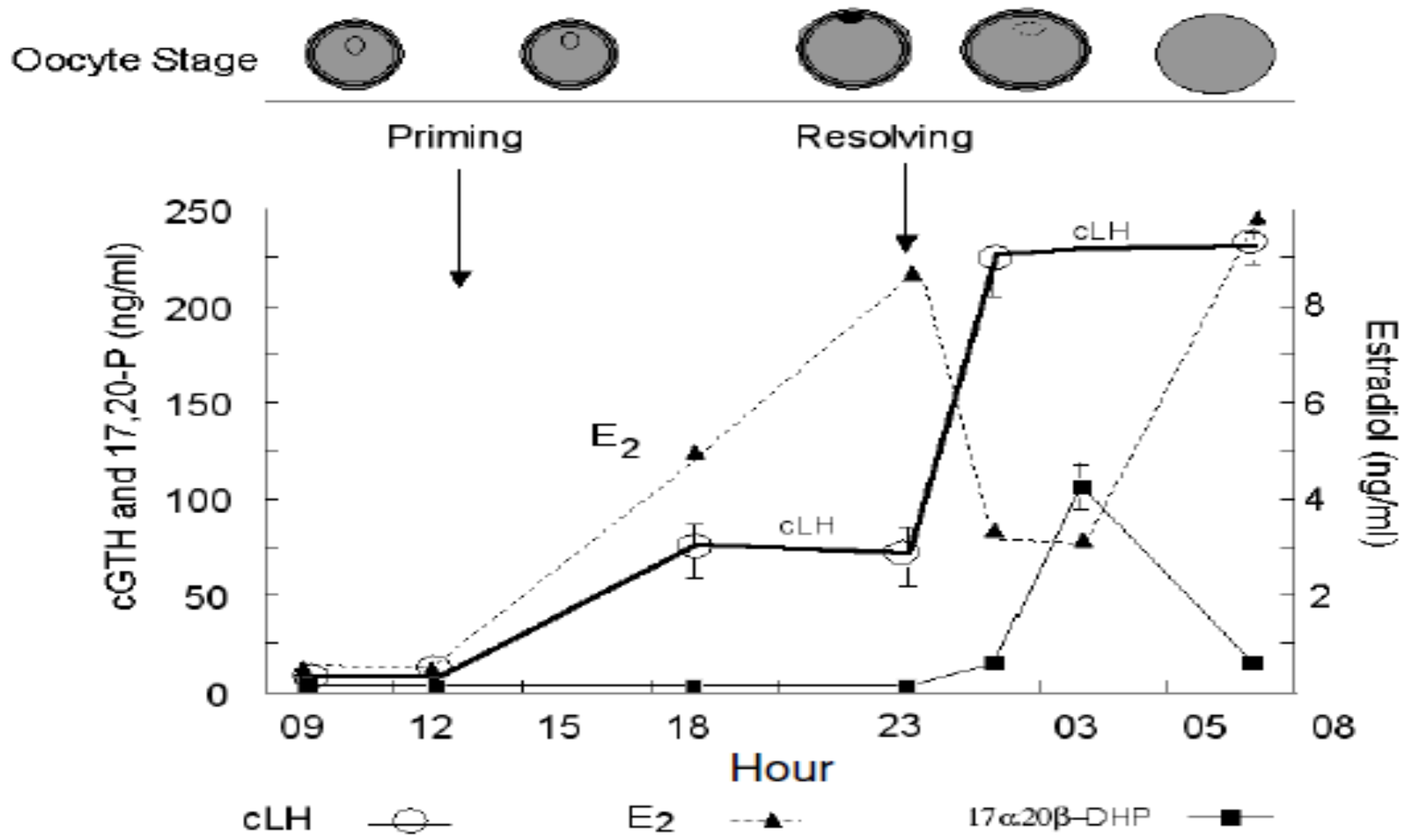


Fig. 6. Progress of oocyte final maturation (illustration at top) and fluctuations in carp LH (cLH), estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), and maturation-inducing steroid (MIS; 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -DHP) in the circulation of female carp induced to spawn by CCPE. The priming dose containing 0.07 mg cLH/kg BW was administered at 12:00 (left arrow) and the resolving dose containing 0.35 mg cLH/kg BW was given 11 h later (right arrow). All females ovulated and eggs were stripped the next morning (data from Yaron and Levavi-Zermonsky, 1986).

(Tomado de Yaron et al., 2009)

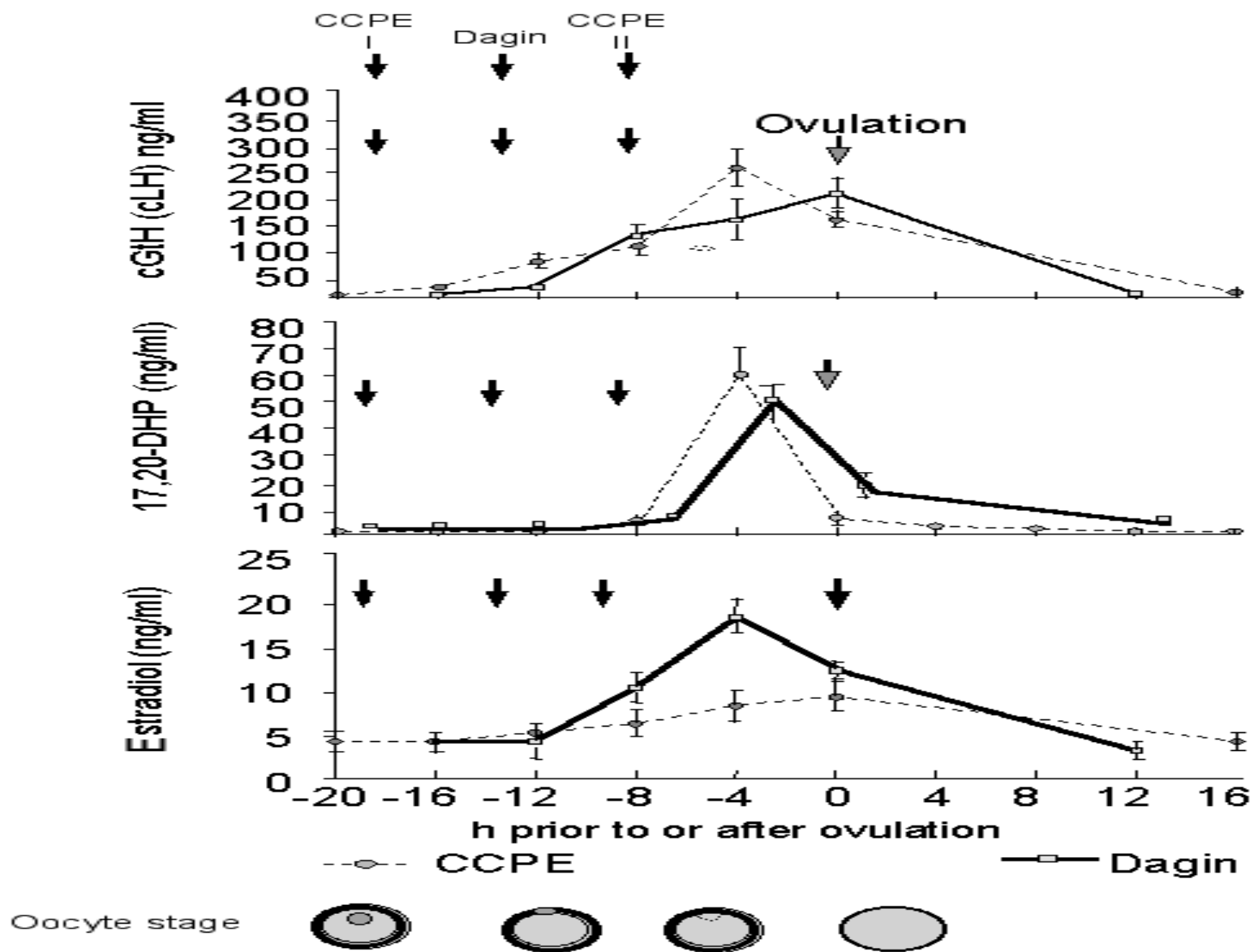


Fig. 9. Circulating levels of (a) cGtH (cLH), (b)  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP, and (c) estradiol in female common carp (Dor 70 line, 1-1.5 kg BW) after injection of CCPE (priming and resolving doses as per Fig. 6) or Dagin (as per Fig. 8). Blood was sampled at intervals to measure hormone levels and ovarian biopsies were taken to determine the progress of oocyte maturation. Hormone levels are expressed as means  $\pm$ SEM (data from Drori et al., 1994). Bottom panel shows progress of oocyte maturation during spawning induction (from left): migrating GV (stage II), peripheral GV (stage III), GV breakdown (stage IV), and ovulated egg (stage V).

- **ENFOQUE HIPOTALÁMICO**

Análogos de GnRH (*Gonadotropine Releasing Hormone*)

- mGnRH (Análogo de mamífero, LHRH, Buserelina, Gonadorelina)

- sGnRH (Análogo de Salmón)

- Actúan sobre la hipófisis

- 5-20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$

- Dosis única (desovadores totales)

- Base de la aleta pectoral

- Ventajas

- Menos labor

- Menor costo

- No riesgo de enfermedades

- Estandarización cualitativa

- Reparar alteraciones endocrinas causadas por el cautiverio

- No causan reacción inmune, por lo que puede usarse repetidamente

- Estructura similar en muchos peces, lo que permite su uso en un gran número de peces con gran afinidad.



# Productos para el desove de peces producidos por Laboratorios Syndel



LHRH  
(des-Gly<sup>10</sup>, [D-Ala<sup>6</sup>] LH-RH  
Ethylamide)



**Ovaplant**  
Ovaplant is the brand name for a "pellet  
implant" sGnRH



sGnRH<sub>a</sub>



Ovaprim  
sGnRH + Domperidona



## Desventajas

- Rápida degradación (*in vitro*)
- 23 min los análogos
- 5 min las formas nativas
- La vida corta media de las formas naturales es debido a la acción de las endopeptidasas o exopeptidasas ubicadas en la hipófisis, hígado y riñón que actúa en los enlaces péptidicos en posición 5-6 (endopeptidasas) y 9-10 exopeptidasas), transformándola en pequeños fragmentos inactivos
- La mayoría de los resultados negativos cuando se induce con análogos es debido a su corto tiempo de residencia
- En los desovadores totales se puede aplicar en una sola dosificación (vía parenteral).
- Requiere de liberación sostenida (Pelets) en los desovadores parciales
- Almacenamiento en refrigeración

- **Enfoque hipotalámico**

- sGnRHa + antagonista de la dopamina (domperidona, metoclopramida, pimozide)

- **Ovaprim®**

- sGnRH + domperidona
- 20 µg/mL + 10 mg/mL
- Vehículo inerte ⇒ Propilenglicol, soluble en agua e higroscópico
- Dosis única de 0.5 mL/Kg



- **Fertagyl®**

- LHRH (Gonadorelina)
- 100 µg/mL
- Manténgase a temperatura ambiente (15 a 25°C) protegido de la luz.
- Los viales abiertos deben conservarse en refrigeración (2-8 °C).



- **Conceptal®**

- LHRH (Gonadorelina, Acetato de Buserelina)
- 4 µg/mL
- Después de abierto, puede almacenarse 2-8 °C hasta 24 horas



Tiempo de respuestas del Ovaprim  
Entre 12-16 horas ( $T = 26-28^{\circ}\text{C}$ )

## VENTAJAS

Menor laboriosidad  
Facilidad de adquisición  
Presentaciones de 10 o 100 mL  
Menores costos

## PRECAUCIONES

Almacenado en lugares oscuros a temperatura ambiente o en refrigeración.

Atender las recomendaciones del fabricante

Evitar el contacto directo con la luz del sol

# Criopreservación de semen de peces

## Beneficios de la criopreservación

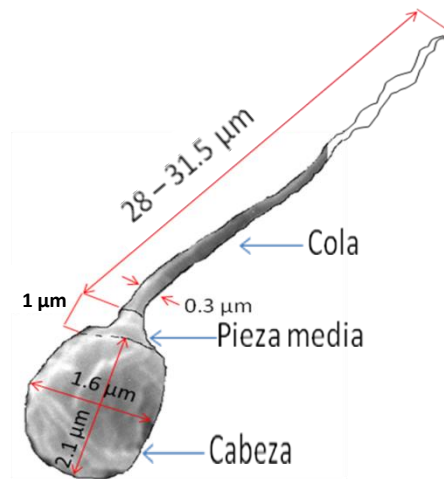
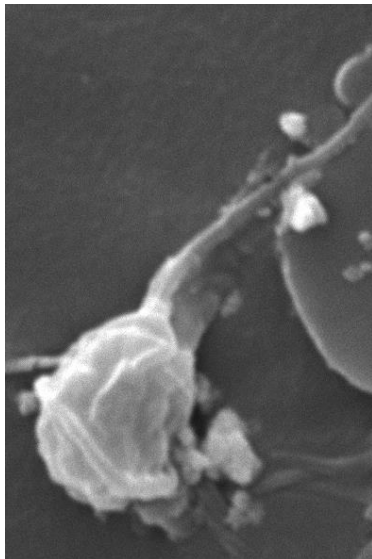
- Optimización de los procesos reproductivos en cautiverio de especies
- Posibilidad de reproducción por fuera de la temporada reproductiva
- Facilita el movimiento e intercambio de material genético entre productores
- Conservación de especies amenazadas

En Colombia, los estudios de crioconservación de semen de peces nativos son recientes y se ha establecido protocolos de crioconservación de:

- *Piaractus brachypomus* (Navarro et al., 2004; Ramírez-Merlano et al., 2005)
- *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas et al., 2006; Velasco-Santamaría et al., 2006)
- *Prochilodus magdalenae* (Martínez et al., 2010; Atencio-García et al., 2013)
- *Pseudoplatystoma metaense* (Ramírez-Merlano et al., 2011)
- *Sorubim cuspicaudus* (Atencio-García et al., 2012; 2014)
- *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Atencio-García et al., 2016, Herrera et al., 2019)

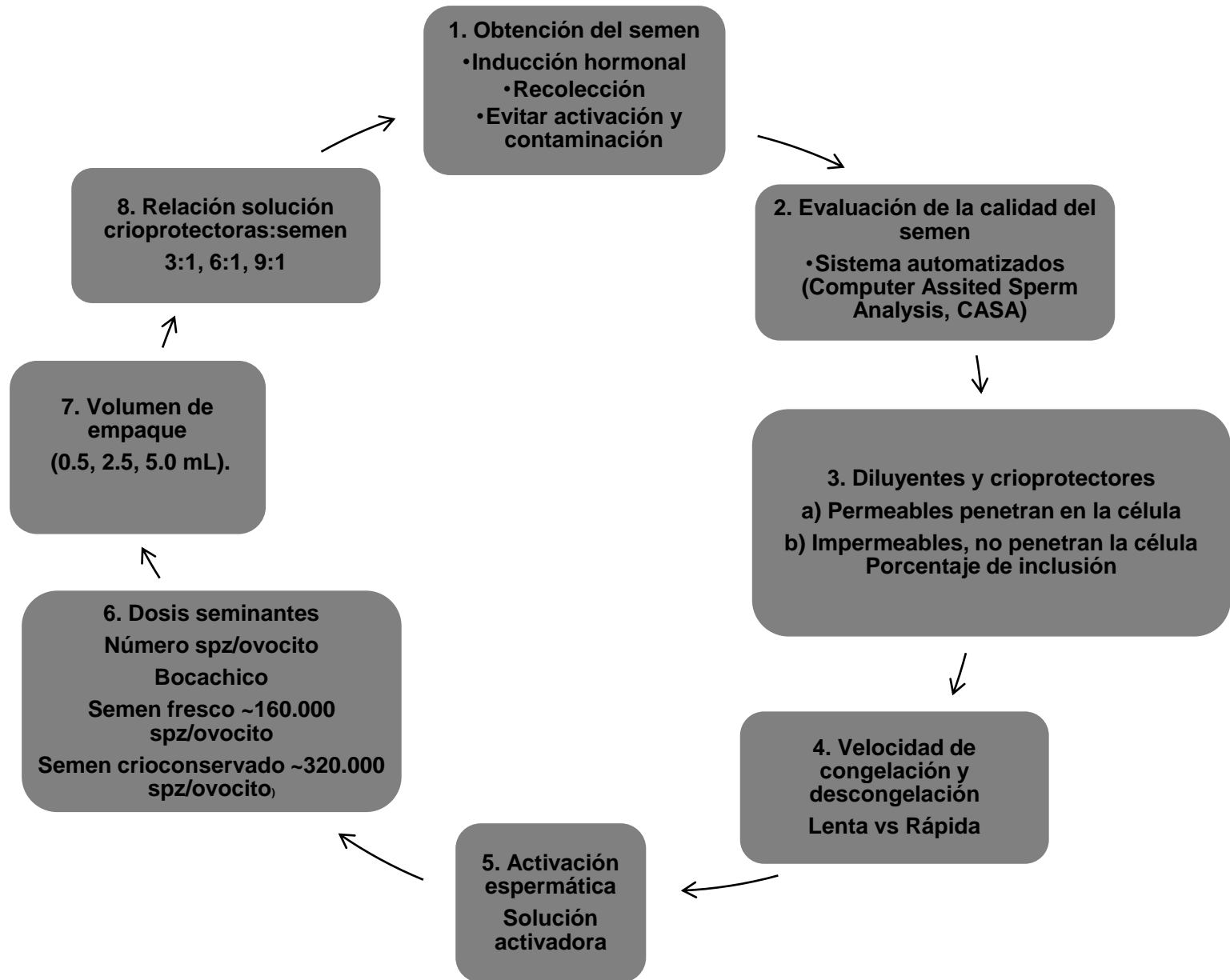
# Características del semen de peces de agua dulce de fertilización externa (Billard & Cosson, 1992)

- Inmovilidad del espermatozoide en líquido seminal
- Corta duración de su movimiento después de su activación (20-40 seg)
- Activación del movimiento del espermatozoide (solución activadora)



Morfología de espermatozoide de bocachico *Prochilodus magdalenae* (Martinez et al., 2010)

# Puntos críticos en la criopreservación de semen



# OBTENCIÓN DE SEMEN Bocachico



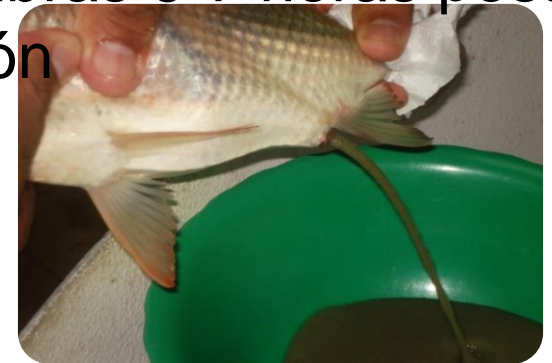
♂ 3-4 mg EPC/Kg



♀ 5-6 mg EPC/Kg

Aplicación de hormona  
Extracto Pituitario de Carpa (EPC)

Machos 5-7 horas post-inducción      Hembras 6-7 horas post-inducción





# OBTENCIÓN DE SEMEN

Bagre blanco

MACHOS

HEMBRAS



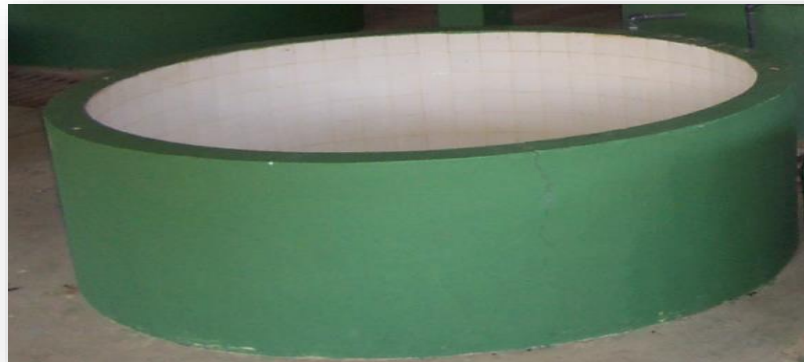
OVAPRIM®

GnRH análogo de Salmón + Domeperidona  
0.3-0.4mL/Kg ⇒ 14 HPI

Liberación fluida de  
líquido seminal

Biopsia ovárica  
Maduración final

Piletas circulares



# EVALUACIÓN CALIDAD DEL SEMEN

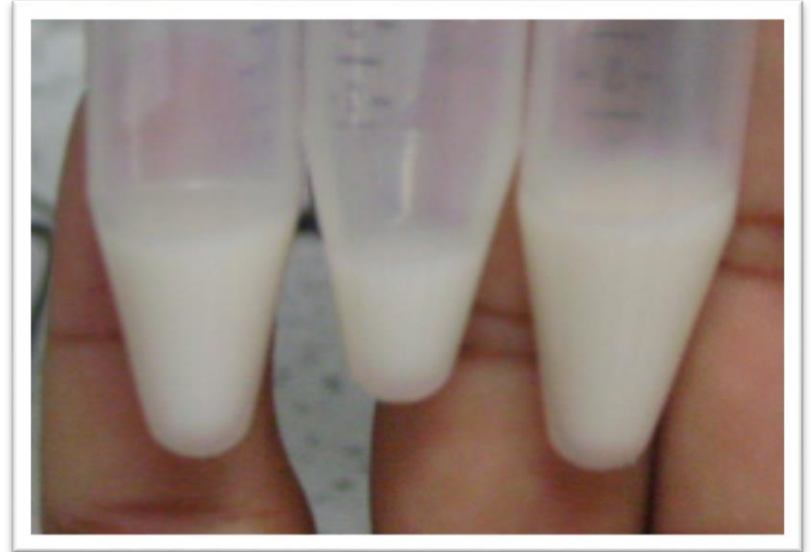
Fresco, pre-congelación y post-congelación

## Macroscópica

Volumen (mL)

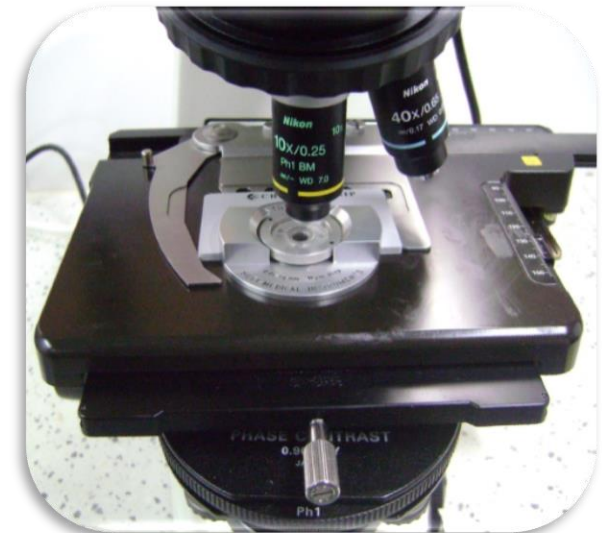
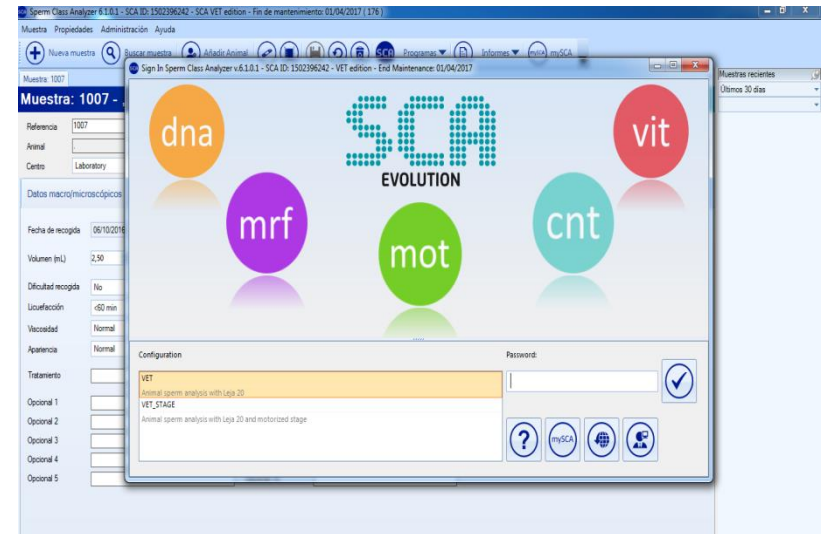
Color

Densidad (Escala 0 a 4)



# MICROSCÓPICAS

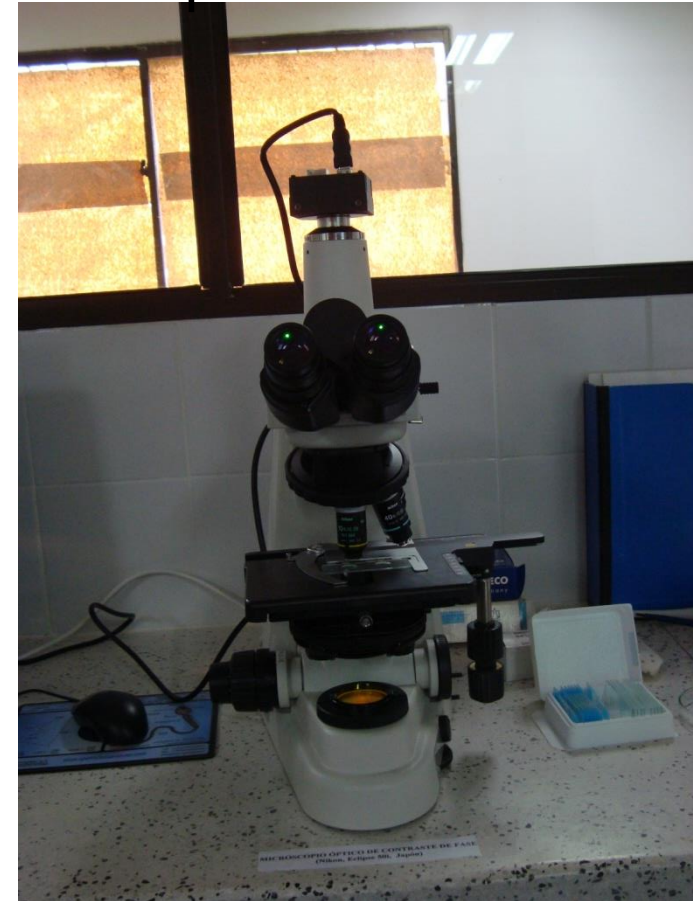
- Movilidad total (%)
  - Tipos de movilidad (a, b, c)
- Velocidad espermática ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )
  - Velocidad lineal (VSL)
  - Velocidad curvilínea (VCL)
- Progresividad total (%)
- Concentración
  - millones spz/mL
  - millones spz/ $\mu\text{L}$
- Duración de la activación (seg)



# Computer Assisted Sperm Analysis CASA

Sperm Class Analyzer, SCA,  
Microptic, España

Microscopio contraste de fase



Analyze Reports Sperm Class Analyzer v.6.1.0.1 VER edition [100%]

File Configuration Field Sort Report Export View Help

New Open To the database To a file Send To... Exit

ANALYZE Report

Fields 1/5 Spermatozoa 203/500 Normozoospermia Concentration: 59.57 M/mL Progressive (PR): 72.41%

Sample data Results Results (I) Kinematic Comparison Spermatozoa Advanced

|                             | Concentration |          |       |          |
|-----------------------------|---------------|----------|-------|----------|
|                             | Total         | %        | M/mL  | M/Sample |
| Total                       | 203           | 100,00 % | 59,57 | 148,94   |
| Motile                      | 189           | 93,10 %  | 55,47 | 138,66   |
| Progressive (PR)            | 147           | 72,41 %  | 43,14 | 107,85   |
| Rapid progressive (type A)  | 55            | 27,09 %  | 16,14 | 40,35    |
| Medium progressive (type B) | 92            | 45,32 %  | 27,00 | 67,50    |
| Non progressive (type C)    | 42            | 20,69 %  | 12,33 | 30,81    |
| Immotile (type D)           | 14            | 6,90 %   | 4,11  | 10,27    |

Medium progressive (type B) Non progressive (type C) Immotile (type D) Rapid progressive (type A)

Captured Fields

# DILUYENTES Y CRIOPROTECTORES

## Funciones

- Mantener la viabilidad celular.
- Incrementar volumen del eyaculado
- Protegen al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura
- Los diluyentes utilizados en semen de peces deben simular la composición y osmolaridad del plasma seminal de cada especie, con el propósito de no activar la movilidad.
- Soluciones no isosmóticas conducen a cambios iónicos en las membranas produciendo la activación espermática.

Los crioprotectores pueden ser clasificados en dos grupos según la permeabilidad de la membrana a la sustancia.

| <b>Crioprotector</b>                      | <b>Tipo de acción</b> |
|---|-----------------------|
| <b>Glicerol</b>                           |                       |
| <b>Dimetilsulfóxido (DMSO)</b>            |                       |
| <b>Etilenglicol (ETG)</b>                 |                       |
| <b>Metanol (MET)</b>                      |                       |
| <b>Dimetilacetamida (DMA)</b>             |                       |
| <b>Dimetilformamida (DFA)</b>             |                       |
| <b>1, 2 propanodiol</b>                   |                       |
| <b>Butanediol</b>                         |                       |
| <b>Alcohol polivinílico (PVA)</b>         |                       |
| <b>Hidroxietil almidón (HES)</b>          |                       |
| <b>Hialuronato de sodio</b>               |                       |
| <b>Dextrano</b>                           |                       |
| <b>Albúmina</b>                           |                       |
| <b>Polietilenglicol (PEG)</b>             |                       |
| <b>Leche en polvo descremada</b>          |                       |
| <b>Leche descremada ultrapasteurizada</b> |                       |
| <b>Yema de huevo</b>                      |                       |

- Penetran la célula
- Bajo peso molecular
- Disminuyen la velocidad de formación de hielo del agua intracelular,
- Reducen el efecto del cambio del volumen de la célula.

- No penetran la célula
- Alto peso molecular
- Bajan el punto de congelación extracelular.
- Remueven osmóticamente el agua intracelular
- Preservan la estabilidad de la membrana

# DILUYENTES COMERCIALES

## Solución de Cortland

| Elemento                             | Cantidad (g)   |
|--------------------------------------|----------------|
| NaCl                                 | 7.25           |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0.23           |
| KCl                                  | 0.80           |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0.41           |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 1.00           |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.23           |
| Glucosa                              | 1.00           |
| Agua                                 | c.s.p. 1000 ml |

## Solución de Hanks

| Elemento  | Cantidad (g)  |
|---|---------------|
| CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 0.16          |
| NaCl  | 8.00          |
| KCl   | 0.40          |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 0.20          |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.20          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0.06          |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 0.35          |
| Glucosa   | 1.00          |
| Agua  | c.s.p 1000 ml |

# DILUYENTES PARA PECES TROPICALES

| <b>Componente</b>     | <b>Cantidad</b>      |
|-----------------------|----------------------|
| <b>Yema de huevo</b>  | <b>12 ml</b>         |
| <b>Glucosa</b>        | <b>6.0 g</b>         |
| <b>DMSO</b>           | <b>5 a 15 ml</b>     |
| <b>Agua destilada</b> | <b>c.s.p. 100 ml</b> |

| <b>Componente</b>       | <b>Cantidad</b>      |
|-------------------------|----------------------|
| <b>Leche descremada</b> | <b>3-5 g</b>         |
| <b>Glucosa</b>          | <b>6.0 g</b>         |
| <b>DMA, ETG</b>         | <b>5 a 10 ml</b>     |
| <b>Agua destilada</b>   | <b>c.s.p. 100 ml</b> |



# Diluyentes comerciales para bovinos

## Equipro®

**Composición:** Mezcla de glucosa, sacarosa, leche en polvo sin grasa y antioxidantes con una selección de antibióticos (timentina).



## INRA 82 e INRA 96

**Composición:** Solución de Hanks, glucosa, lactosa, rafinosa, fosfocaseína, citrato sódico, citrato potásico y leche descremada, y suplementados comúnmente para congelación con yema de huevo y glicerol

## Cáceres

**Composición:** Solución de Hank suplementada con HEPES (2-[4-(2-HidroEtil)Piperazidina-1-yl]acido EtanoSulfónico), glucosa, lactosa, BSA (Bovine Serum Albúmine) y fosfocaseinato de leche, yema de huevo, dimetilformamida y glicerol.

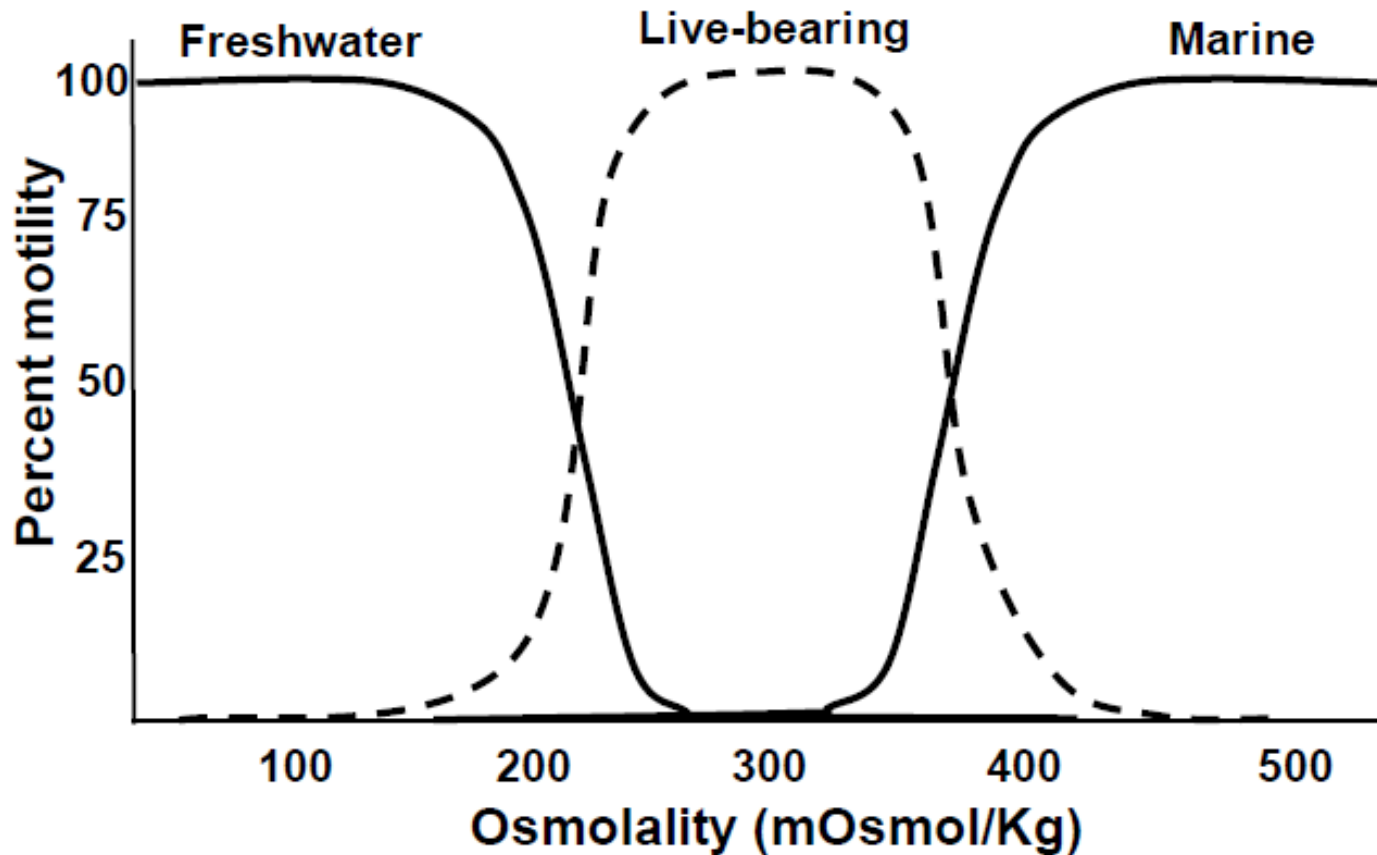
## Botu-crio®

**Composición:** Agua ultrapura, aminoácidos, carbohidratos, glicerol, amidas, gentamicina, penicilina y yema de huevo.

## Gent®

**Composición:** Soluciones tampón, leche, yema de huevo y glicerol

## Efecto de la osmolaridad



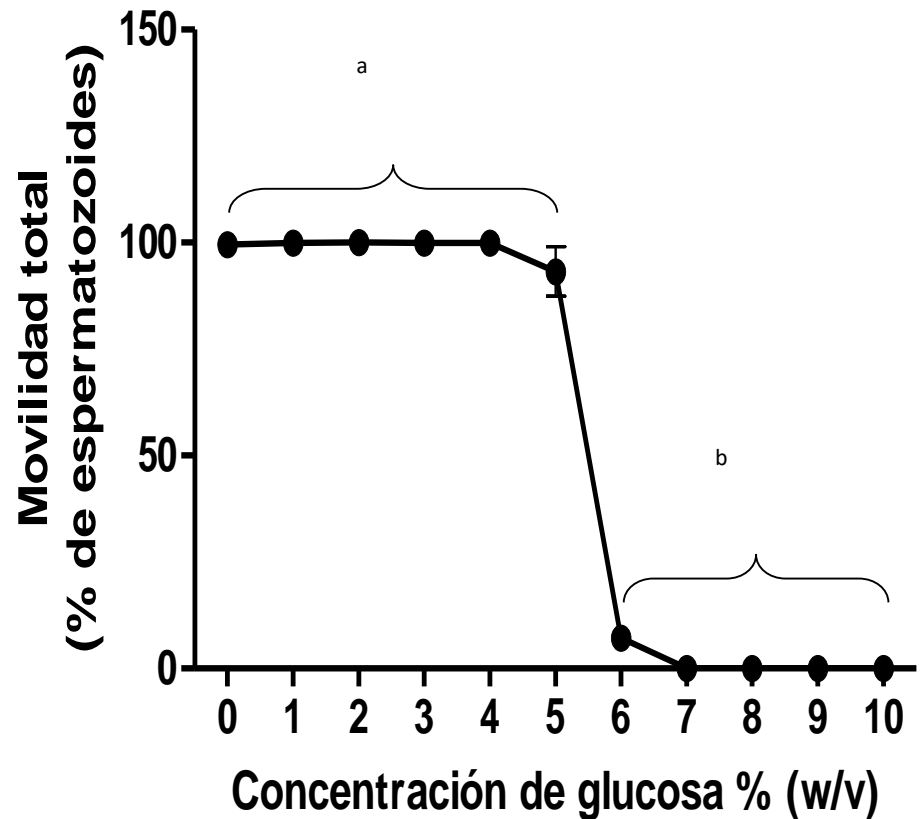
Efecto de la osmolaridad en la movilidad total en tres grupos de peces (Tomado de Cuevas-Urbe, 2011; modificado de Tiersch et al. 2007)

# Glucosa como diluyente para peces tropicales

Valores de osmolaridad en las diferentes soluciones de glucosa

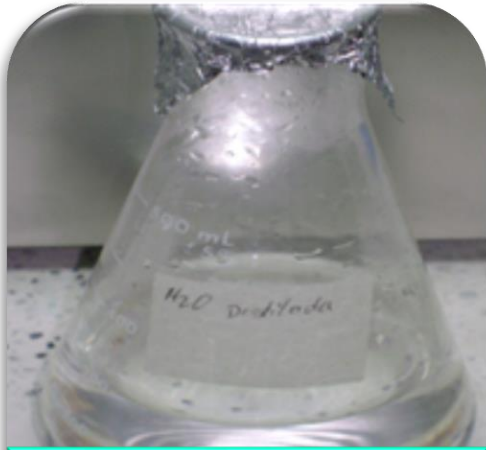
| Concentración de glucosa (%) | Osmolaridad (mOsm/Kg) |
|------------------------------|-----------------------|
| 0                            | 0                     |
| 1                            | 62                    |
| 2                            | 124                   |
| 3                            | 186                   |
| 4                            | 250                   |
| 5                            | 310                   |
| 6                            | 360                   |
| 7                            | 410                   |
| 8                            | 472                   |
| 9                            | 536                   |
| 10                           | 620                   |

Osmolaridad del liquido seminal ~250 - ~300 mOsm/kg.



(Martínez, Atencio, Pardo, 2011)

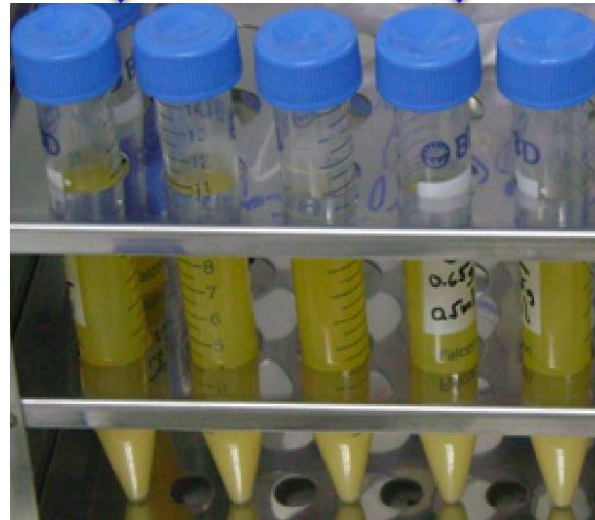
# Preparación de solución crioprotectora



Agua destilada



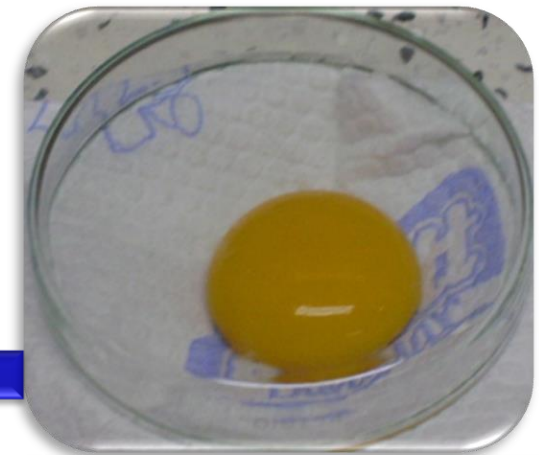
Glucosa (6%)



Crioprotector

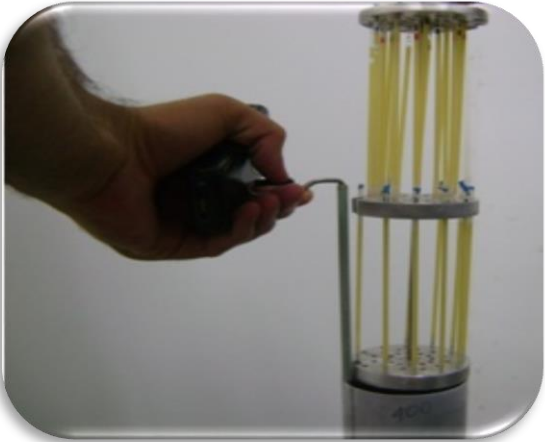


DMSO (10%)



Yema de huevo

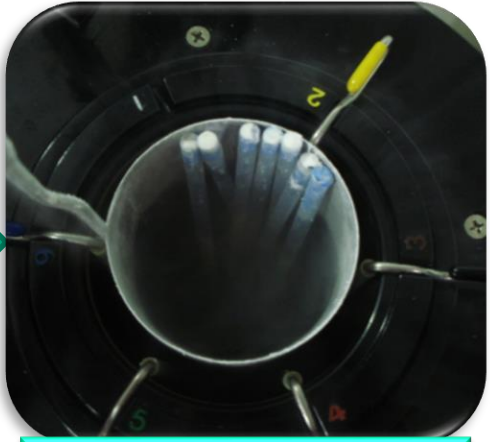
# EMPACADO, CONGELACIÓN, DESCONGELACIÓN



EMPACADO



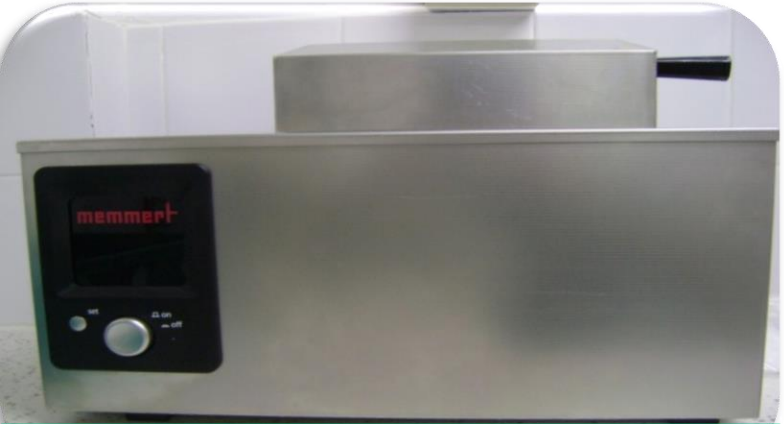
CONGELACION EN TERMO DE VAPORES



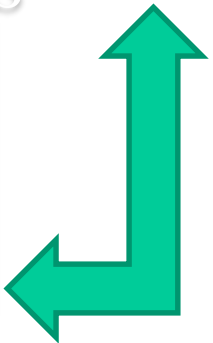
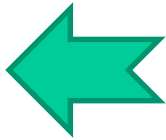
PAJILLAS CONGELADA



ALMACENAMIENTO EN (NL)



30-60°C durante 30-90 segundos  
(Mermmert WNB 7)



# Tasa de congelación y descongelación

Tasas de congelación deben ser definidas en conjunto con la temperatura inicial y final del proceso.

Denniston et al. (2011)



congelación rápida



•Formación de cristales



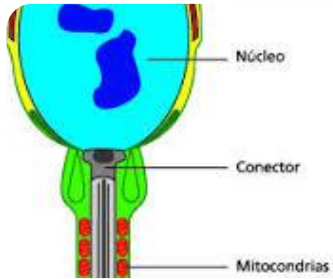
congelación lenta



Deshidratación no apropiada  
Alta exposición a la solución crioprotectora

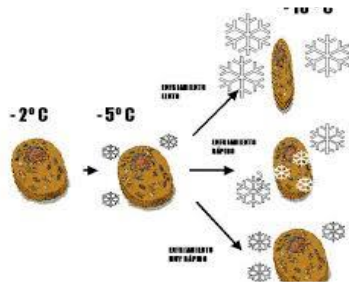


# DAÑOS CELULARES EN EL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN



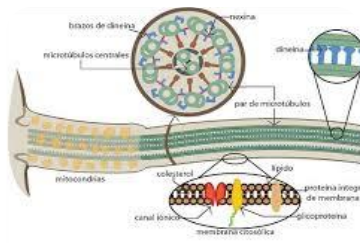
## Qué pierde el semen crioservado-descongelado?

La crioconservación reduce la movilidad, velocidades, tiempo de activación y la capacidad fertilizante del semen.



## Porqué se ocasionan los daños?

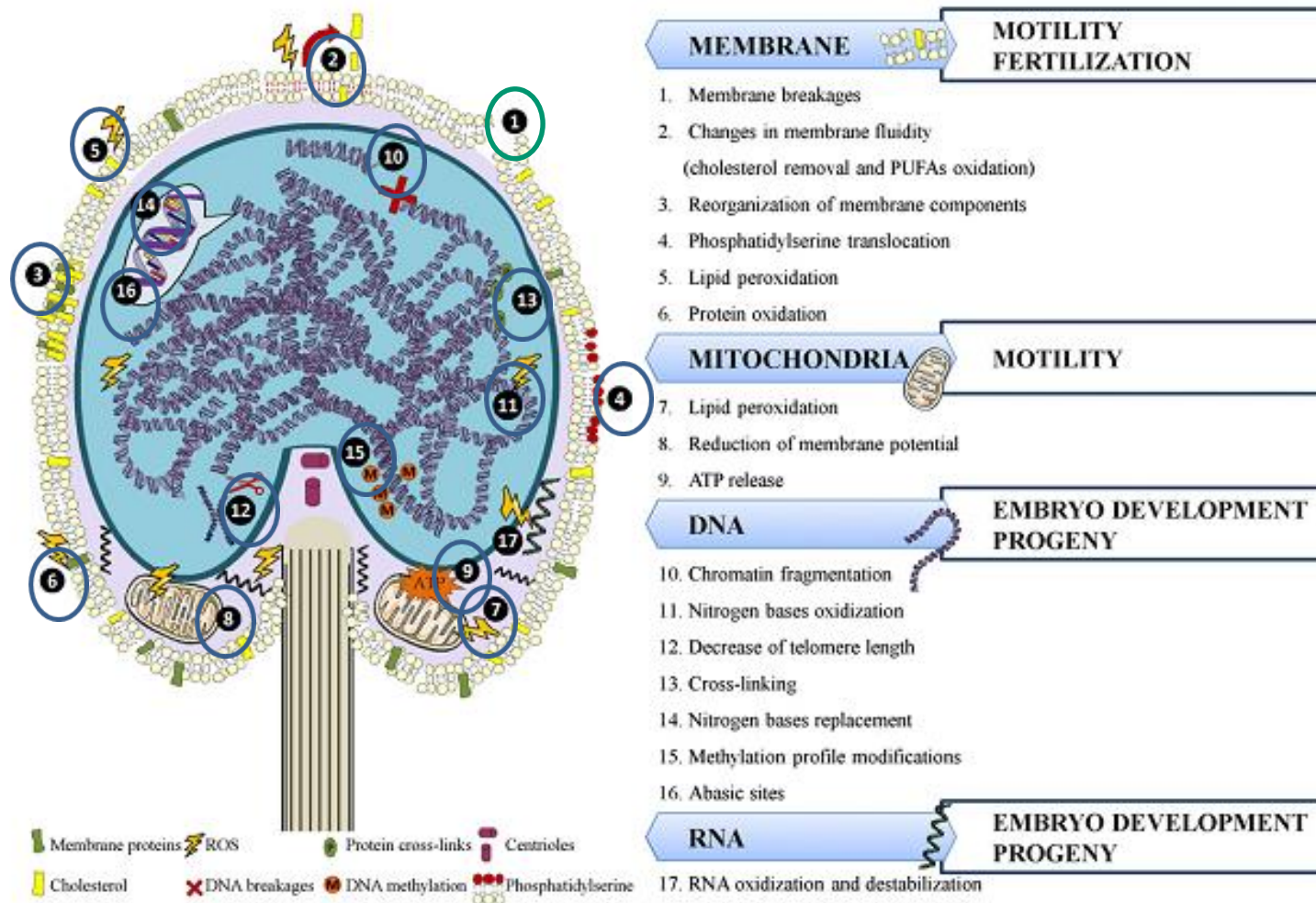
Los daños son ocasionados por los choques térmicos, la formación de hielo, el estrés tóxico y osmótico en las fases de precongelación, congelación y descongelación (Chao & Liao, 2001; Muchlisin & Siti Azizah, 2009; Li et al 2010a; Dietrich et al., 2015).



## Qué dañan?

Se han reportado daños a nivel de membrana plasmática, mitocondrias, DNA y morfología celular del semen crioservado que afectan la viabilidad espermática y en últimas su capacidad fertilizante (Alavi et al., 2009; Muchlisin & Siti Azizah, 2009; Cartón-García et al., 2013).

Figura 1. Partes de la membrana y axonema flagelar involucradas en la viabilidad espermática. Fuente: Los autores.



**Fig. 2.** Fish spermatozoa illustration showing the principal types of damage occurring in plasma membrane, mitochondria, DNA and RNA that could be used as sperm quality markers. These markers can identify changes in sperm motility, fertilization ability, embryonic development and progeny fitness.



## Daño en membrana plasmática

- Ocasiona pérdida de componentes intracelulares como proteínas y enzimas que disminuyen la calidad espermática (Li et al., 2010).
- Ocasiona alteraciones en proteínas implicadas en funciones asociadas con el metabolismo, respuesta al estrés, señal de transducción, apoptosis, transcripción, translación, plegamiento de proteínas y reparación del DNA.
- Estas alteraciones comprometen funciones fisiológicas como movilidad, capacidad fertilizante y eventos iniciales después de la fertilización (Dietrich et al., 2015)

Neotropical Ichthyology, 10(3):577-586, 2012  
Copyright © 2012 Sociedade Brasileira de Ictiologia

**DNA fragmentation and membrane damage of bocachico  
*Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi: Prochilodontidae) sperm following  
cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose**

José Gregorio Martínez<sup>1</sup>, Víctor Atencio García<sup>2</sup> and Sandra Pardo Carrasco<sup>1</sup>

## **Daños a mitocondrias**

- El estrés oxidativo se considera como una de las principales causas del daño mitocondrial (Cabrita et al., 2010), debido a que promueve la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales afectan la eficiencia respiratoria mitocondrial (Ferramosca et al., 2013).
- La pérdida de la funcionalidad mitocondrial reduce el potencial de la membrana mitocondrial ocasionando pérdida de la movilidad y velocidad espermática (Yao et al., 2000).

## Fragmentación del DNA

- La fragmentación del DNA es debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que modifican las histonas presentes en el DNA (Ziech et al., 2011; Chervona & Costa, 2012).
- La fragmentación del DNA tiene efectos importantes en el desarrollo embrionario inicial más que en la fertilización, en virtud de su papel en el control de la expresión génica en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Carrell & Hammoud, 2010; Delbés et al., 2010; Ward, 2010).

## Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*<sup>#</sup>

Evaluation of dimethylacetamide as cryoprotectant for cryopreservation of sperm of bocachico *Prochilodus magdalenae*

VJ Atencio <sup>a</sup>, EJ Perez <sup>a</sup>, JA Espinosa <sup>a</sup>, SC Pardo <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación Piscícola CINPIC, Departamento de Ciencias Acuáticas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, Colombia.

<sup>b</sup> Grupo de Investigación Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia-Medellín, Medellín, Colombia.

Cuadro 1. Características de semen fresco (control) y crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae*.  
Characteristics of fresh (control) and cryopreserved-thawed semen of bocachico *Prochilodus magdalenae*.

| Características               | Semen fresco              | DMA 8%                   | DMA 10%                  | DMA 12%                 |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Movilidad total (%)           | 98,8 ± 1,1 <sup>a</sup>   | 31,0 ± 8,6 <sup>b</sup>  | 30,9 ± 1,0 <sup>b</sup>  | 18,7 ± 0,7 <sup>c</sup> |
| Movilidad rápida (%)          | 85,5 ± 1,0 <sup>a</sup>   | 6,9 ± 0,8 <sup>c</sup>   | 8,6 ± 1,0 <sup>b</sup>   | 0,7 ± 0,4 <sup>d</sup>  |
| Movilidad media (%)           | 7,3 ± 1,0 <sup>a</sup>    | 5,4 ± 1,4 <sup>b</sup>   | 3,8 ± 0,2 <sup>b</sup>   | 0,8 ± 0,2 <sup>c</sup>  |
| Movilidad lenta (%)           | 6,3 ± 0,3 <sup>b</sup>    | 18,8 ± 8,5 <sup>a</sup>  | 20,9 ± 4,3 <sup>a</sup>  | 17,5 ± 0,7 <sup>a</sup> |
| Inmóviles (%)                 | 1,1 ± 0,4 <sup>c</sup>    | 69,1 ± 8,6 <sup>b</sup>  | 66,8 ± 3,2 <sup>b</sup>  | 81,1 ± 0,8 <sup>a</sup> |
| Velocidad curvilínea (µm/seg) | 186,6 ± 15,4 <sup>a</sup> | 63,2 ± 11,6 <sup>b</sup> | 54,7 ± 0,9 <sup>b</sup>  | 21,8 ± 4,0 <sup>c</sup> |
| Velocidad lineal (µm/seg)     | 87,4 ± 14,7 <sup>a</sup>  | 36,4 ± 5,0 <sup>b</sup>  | 26,5 ± 1,3 <sup>b</sup>  | 6,0 ± 0,5 <sup>c</sup>  |
| Progresividad total (%)       | 79,1 ± 12,3 <sup>a</sup>  | 11,0 ± 2,6 <sup>b</sup>  | 10,7 ± 0,8 <sup>b</sup>  | 1,4 ± 0,2 <sup>c</sup>  |
| Progresividad tipo a (%)      | 26,4 ± 1,2 <sup>a</sup>   | 2,9 ± 1,0 <sup>b</sup>   | 2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>   | 0,0 ± 0,1 <sup>c</sup>  |
| Progresividad tipo b (%)      | 61,5 ± 10,4 <sup>a</sup>  | 8,1 ± 2,8 <sup>b</sup>   | 8,7 ± 0,8 <sup>b</sup>   | 1,1 ± 0,4 <sup>b</sup>  |
| Progresividad tipo c (%)      | 10,9 ± 1,6 <sup>c</sup>   | 19,1 ± 1,0 <sup>b</sup>  | 22,5 ± 3,0 <sup>a</sup>  | 17,8 ± 1,1 <sup>b</sup> |
| Progresividad tipo d (%)      | 1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>    | 69,1 ± 7,4 <sup>a</sup>  | 66,8 ± 12,1 <sup>a</sup> | 81,1 ± 6,6 <sup>a</sup> |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística (P < 0,05).

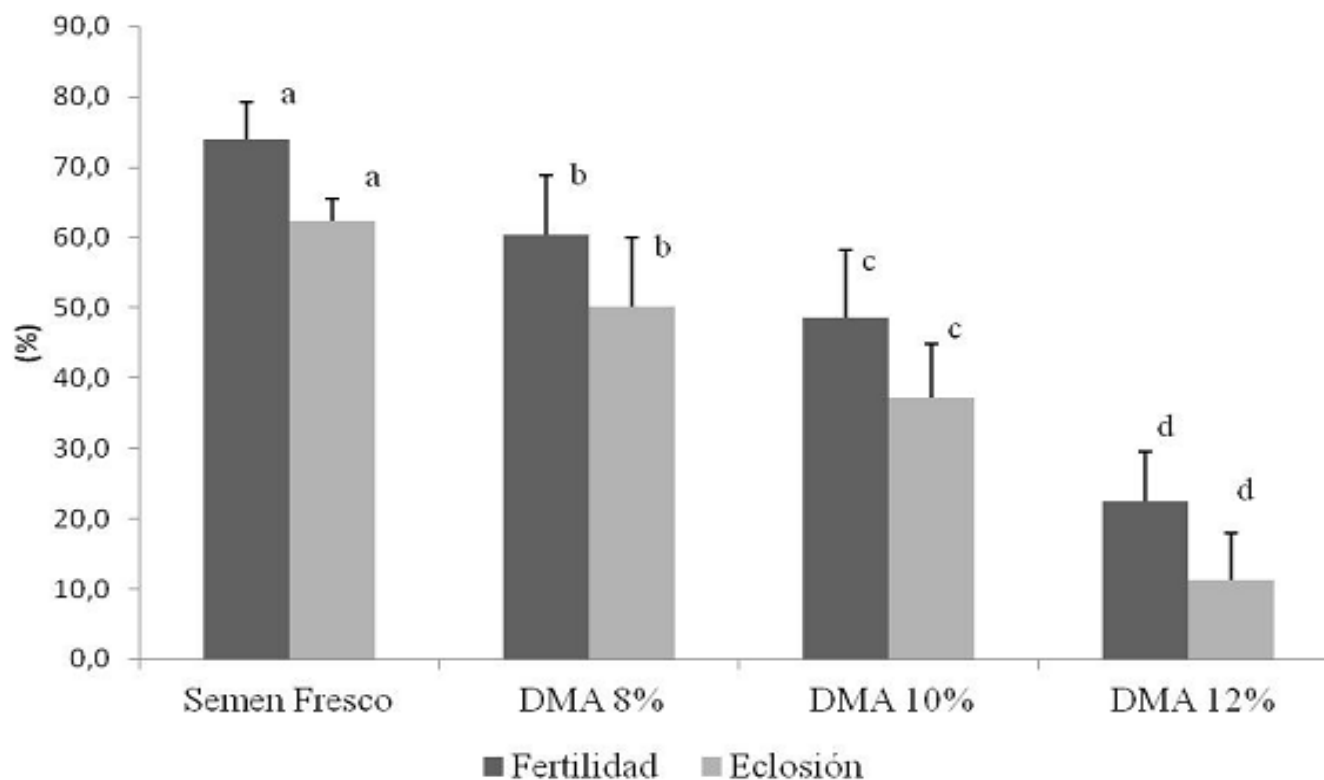


Figura 1. Tasas de fertilidad y de eclosión de bocachico *Prochilodus magdalenae* inseminado con semen fresco y crioservado-descongelado con DMA a diferentes concentraciones. Entre barras, valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Fertility and hatching rates of bocachico *Prochilodus magdalenae* fertilized with fresh and cryopreserved-thawed semen with DMA at different concentrations. Between bars, values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Atencio et al. (2013)

Movilidad total y daños celulares en semen de Bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* precongelado y descongelado (Atencio, et al., 2016).

| (%)   | Fresco                | Precongelado           |                         |                        | Descongelado           |                       |                       |
|-------|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
|       |                       | ETG 6%                 | ETG 8%                  | ETG 10%                | ETG 6%                 | ETG 8%                | ETG 10%               |
| Mt    | 95.1±2.7 <sup>a</sup> | 61.0±15.3 <sup>b</sup> | 51.2±10.5 <sup>bc</sup> | 33.8±11.6 <sup>d</sup> | 35.0±5.7 <sup>cd</sup> | 31.9±2.1 <sup>d</sup> | 32.5±5 <sup>d</sup>   |
| D-Mit | 1.4±0.9 <sup>c</sup>  | 16.1±2 <sup>b</sup>    | 16.5±3.4 <sup>b</sup>   | 18.3±5.7 <sup>b</sup>  | 49.0±7.3 <sup>a</sup>  | 51.4±2.7 <sup>a</sup> | 47.8±5.4 <sup>a</sup> |
| D-DNA | 2.4±0.8 <sup>c</sup>  | 6.7±2.5 <sup>b</sup>   | 6.8±3.3 <sup>b</sup>    | 9.5±2.6 <sup>b</sup>   | 44.4±3.4 <sup>a</sup>  | 37.9±2.8 <sup>a</sup> | 38.6±6.8 <sup>a</sup> |
| D-Mem | 1.0±0.5 <sup>c</sup>  | 2.4±1.1 <sup>bc</sup>  | 3.0±2 <sup>bc</sup>     | 4.1±1.2 <sup>b</sup>   | 24.8±2.2 <sup>a</sup>  | 24.5±2.2 <sup>a</sup> | 26.6±5.4 <sup>a</sup> |

Fertilidad y eclosión de semen fresco y crioconservado de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* (Atencio et al., 2016).

| Tratamientos          | Fertilidad (%)        | Eclosión (%)          |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Semen fresco          | 70.5±2.8 <sup>a</sup> | 49.0±2.4 <sup>a</sup> |
| ETG 6% <sup>dc</sup>  | 40.2±3.4 <sup>b</sup> | 22.6±0.7 <sup>b</sup> |
| ETG 8% <sup>dc</sup>  | 25.9±9.7 <sup>b</sup> | 14.1±1.5 <sup>b</sup> |
| ETG 10% <sup>dc</sup> | 41.6±8.7 <sup>b</sup> | 18.4±6.7 <sup>b</sup> |

# GRACIAS POR SU ATENCIÓN

