

**MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA ESPERMÁTICA EN SEMEN FRESCO
Y CRIOCONSERVADO A LARGO TÉRMINO DE CACHAMA BLANCA
(*Piaractus brachypomus*)**

JOSE DAVID CÁRDENAS BERNAL

JUAN FELIPE MILLÁN BOHÓRQUEZ

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VILLAVICENCIO – META

2020

**MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA ESPERMÁTICA EN SEMEN FRESCO
Y CRIOCONSERVADO A LARGO TÉRMINO DE CACHAMA BLANCA
(*Piaractus brachypomus*)**

JOSE DAVID CÁRDENAS BERNAL

JUAN FELIPE MILLÁN BOHÓRQUEZ

Trabajo de tesis para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Director: Víctor Mauricio Medina Robles MVZ, MSc, (c) Dr

Co-Director: Edwin Gómez Ramirez, Biol, MSc

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VILLAVICENCIO – META

2020

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	4
1.1 Abstrac	5
2. OBJETIVO GENERAL	7
2.1 Objetivos específicos	7
3. INTRODUCCION	8
4. MARCO TEORICO	12
4.1 Aspectos generales de la especie	12
4.2 Crioconservación seminal en peces	12
4.3 Morfología y ultraestructura espermática	14
5. MATERIALES Y METODOS	17
5.1 Localización y descripción del área de estudio	17
5.2 Material biológico	17
5.3 Obtención de semen	18
5.4 Preparación del semen pre-congelación	20
5.5 Empacado y congelación	20
5.6 Descongelación seminal	22
5.7 Evaluación seminal	22
5.7.1 Determinación de motilidad y tiempo de activación espermática	22
5.7.2 Morfología espermática	23
5.8 Ultraestructura espermática	24
5.8.1 Microscopia electrónica de transmisión	24
5.9 Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSION	34
8. CONCLUSIONES	38
9. BIBLIOGRAFIA	39

1. RESUMEN

La crioconservación seminal en peces nativos es considerada una biotecnología reproductiva poco estudiada, debido a la baja cantidad de ensayos que se han reportado para éstas especies. Sin embargo, en *Piaractus brachypomus* con el aumento de la producción piscícola éste proceso puede contribuir al desarrollo del mejoramiento genético de la especie, además de su conservación. En consecuencia, es necesario estudiar varios aspectos de dicha biotecnología, entre los cuales está las alteraciones morfológicas y ultraestructurales que sufren los espermatozoides crioconservados, debido a que estos cambios pueden afectar el proceso de fertilidad. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue aportar al conocimiento básico del efecto de la crioconservación seminal a largo término sobre la calidad espermática en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Para ello se realizó colecta seminal de 6 machos (n=6) ubicados en las instalaciones del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL) de la Universidad de los Llanos en Villavicencio Meta, Colombia. Las muestras colectadas fueron diluidas en una solución crioprotectora (agua destilada estéril, 5,5% (p: v) de glucosa, 12% (v:v) de yema de huevo de gallina y 10% (v:v) de dimetilsulfóxido) y luego empacadas en pajillas de 5ml y llevadas a almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido a temperaturas de -196°C. Se evaluaron 3 tiempos de conservación del semen en nitrógeno líquido (24h, 1 mes y 6 meses), además de la evaluación de la muestra control (semen fresco). El proceso de descongelación se realizó en baño de agua a una temperatura de 37°C durante 60 segundos, seguido de la evaluación de calidad seminal (tiempo de activación seminal, motilidad, concentración, morfología y ultraestructura espermática). El control de semen fresco obtuvo el porcentaje de motilidad más alto ($90 \pm 0,0\%$) y la motilidad más baja fue de 50 ± 9 y $51 \pm 11 \%$, en los tratamientos de 1 y 6 meses, respectivamente. Las anomalías espermáticas específicas que más se presentaron fueron colas cortas, evidenciándose mayoritariamente en el tratamiento de 6 meses de congelación. A nivel de

ultraestructura espermática, se encontraron rupturas parciales en las membranas plasmáticas flagelares por procesos de lisis, además en la pieza media se halló pérdida de la forma mitocondrial y presencia de protuberancias facilitando así un aumento significativo de esta estructura.

Palabras clave: *crioconservación, espermatozoides, morfología, ultraestructura espermática*

1.1 ABSTRACT

Seminal cryopreservation in native fish is considered a poorly studied reproductive biotechnology, due to the low number of trials that have been reported for these species. However, in *Piaractus brachypomus* with the increase in fish production this process can contribute to the development of the genetic improvement of the species, in addition to its conservation. Consequently, it is necessary to study several aspects of said biotechnology, among which are the morphological and ultrastructural alterations that cryopreserved sperm undergo, because these changes can affect the fertility process. Therefore, the objective of this research was to contribute to the basic knowledge of the effect of long-term seminal cryopreservation on sperm quality in white cachama (*Piaractus brachypomus*). For this purpose, a seminal collection of 6 males (n = 6) located in the facilities of the Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL) of the Universidad de los Llanos in Villavicencio Meta, Colombia. The collected samples were diluted in a cryoprotective solution (sterile distilled water, 5.5% (p: v) glucose, 12% (v: v) chicken egg yolk and 10% (v: v) dimethylsulfoxide) and then packed in 5ml straws and taken to storage in liquid nitrogen tanks at temperatures of -196°C. Three times of semen conservation in liquid nitrogen (24h, 1 month and 6 months) were evaluated, in addition to the evaluation of the control sample (fresh semen). The defrosting process was carried out in a water bath at a temperature of 37°C for 60 seconds, followed by the seminal quality evaluation (seminal activation time, motility, concentration, morphology and sperm ultrastructure). Fresh semen control obtained the highest motility percentage (90 ± 0.0%) and the lowest motility was 50 ± 9 and 51 ± 11%, in the 1 and 6 month

treatments, respectively. The specific sperm abnormalities that occurred most were short tails, evidenced mostly in the treatment of 6 months of freezing. At the level of sperm ultrastructure, partial ruptures were found in the flagellar plasma membranes due to lysis processes, and in the middle piece it was found to be lost in the mitochondrial form and the presence of bumps, thus facilitating a significant increase in this structure.

Keywords: *cryopreservation, sperm, morphology, sperm ultrastructure*

2. OBJETIVO GENERAL

Aportar al conocimiento básico del efecto de la crioconservación seminal a largo término sobre la calidad espermática en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

2.1 Objetivos específicos

- Evaluar la motilidad y tiempo de activación en semen fresco y crioconservado a largo término de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).
- Determinar anomalías primarias y secundarias en semen fresco y crioconservado a largo término de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)
- Describir anomalías ultraestructurales en semen fresco y crioconservado a largo término de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

3. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la sociedad enfrenta grandes desafíos para proporcionar alimentos a su población. Según el informe demográfico de las naciones unidas en el 2017 el número de habitantes en la tierra era de 7550 millones de personas y se espera que, a mediados del siglo XXI, supere con creces los 9000 millones. Con este panorama, es necesario buscar medidas que permitan ofrecer alimentos con alto contenido de proteína de origen animal, con el fin de suplir las necesidades nutricionales. Desde 1961 el crecimiento anual mundial de consumo de pescado ha duplicado el crecimiento demográfico, por lo que la industria pesquera se muestra como una opción para lograr el objetivo planteado por la FAO de un mundo sin hambre ni malnutrición (FAO, 2018). Estos productos derivados de la pesca son una alternativa fundamental en la nutrición y la seguridad alimentaria, dado que, son fuente de proteína, macronutrientes y micronutrientes de origen animal asequible que permite la diversificación en la alimentación de la población subalimentada.

En Colombia, la acuicultura también ha presentado un crecimiento acelerado tanto de especies comerciales como de especies nativas, estas últimas con fines de repoblamiento, fomento y conservación, seguridad alimentaria y producción industrial (FAO, 2005). Esta tendencia de crecimiento ha logrado un 12% anual entre el año 1990 y 2011, superando así el crecimiento de otros productos del sector agropecuario (Merino *et al.*, 2013).

La producción acuícola nacional en el 2011 fue de 82733 toneladas, de las cuales más de la mitad correspondió a especies exóticas como la tilapia roja (*Oreochromis sp*) y nilótica o plateada (*Oreochromis niloticus*), y 20% cachama blanca y negra (*Piaractus brachypomus* y *Colossoma macropomum*) (AUNAP - FAO, 2013). De esta última, es necesario buscar alternativas que permitan aumentar su producción, aprovechando el potencial y las bondades de la especie.

Otro aspecto de interés, radica en la conservación de la diversidad e integridad genética de las especies que permitan aumentar el número de reproducciones por ciclo o etapa productiva. (Merlano *et al.*, 2010). A raíz de esto se ha generado el desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas para conservar y/o repoblar áreas donde se ha presentado disminución poblacional de especies nativas, además, crear alternativas productivas con especies potencialmente comerciales. (Tiersch y Masik, 2000). Desde el año 1953 la crioconservación de material genético y en especial de semen ha sido una de las tecnologías empleadas, como un método de resguardo de estos genes y, además, como una técnica reproductiva en diferentes tipos de producciones animales (Fabbrocini *et al.*, 2000). Sin embargo, es de vital importancia evaluar esta biotecnología con el fin de determinar las alteraciones funcionales y estructurales que se producen sobre los espermatozoides, con el uso de estos sistemas de crioconservación a largo término.

Al ser una nueva biotecnología en peces nativos, aun no hay una técnica estandarizada que nos permita un mínimo daño a los espermatozoides, pues se ha informado que estos procesos pueden afectar la calidad espermática y comprometer la capacidad del espermatozoide para realizar de manera adecuada el proceso de fertilización y desarrollo embrionario (María *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que en el transcurso de estos procesos de crioconservación, se generan alteraciones morfológicas del espermatozoide, como por ejemplo ruptura de la membrana plasmática de la cabeza, pieza media y cola del espermatozoide (Zhang *et al.*, 2003), las cuales causan una disminución en la calidad espermática. Por lo tanto, es necesario determinar el porcentaje de daño que se presenta en los espermatozoides expuestos a procesos de crioconservación en diferentes periodos de tiempos e igualmente, evaluar la integridad del espermatozoide a nivel ultraestructural, ya que los efectos de la congelación y descongelación en los procesos de viabilidad espermática son comúnmente asociados con alteraciones de movilidad y fertilidad (Labbe *et al.*, 2001). Algunas de las alteraciones ultraestructurales reportadas son: espermatozoides con membranas aumentadas

de tamaño, rotas o ausencia de mitocondrias e hinchazón del flagelo y presencia de vesículas citoplasmáticas, las cuales, han sido descritas en la especie Pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Gárriz *et al.*, 2013). Sin embargo, todavía se desconocen los daños que se pueden generar a nivel ultraestructural, en semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) crioconservado a largo término. En la actualidad, el aumento acelerado de la población mundial, ha incentivado la búsqueda de alternativas que favorezcan la seguridad alimentaria. Una de ellas es la obtención de alimentos de origen animal, que para el año 2050 se espera un incremento de la demanda en un 70% más, en comparación con el año 2010 (Friedrich, 2014). Allí la producción de pescado juega un papel importante por el aumento progresivo que ha tenido el consumo per cápita mundial (FAO, 2016) ya que desde 1961, el crecimiento anual mundial del consumo de pescado ha duplicado el crecimiento demográfico, poniendo de manifiesto que el sector pesquero es fundamental para alcanzar la meta de la FAO de un mundo sin hambre ni malnutrición (FAO, 2018). En términos per cápita, el consumo de pescado comestible aumentó de 9,0 kg en 1961 a 20,2 kg en 2015, a una tasa media de aproximadamente un 1,5% al año. Se estima que para el 2016 y 2017 se genere un nuevo aumento de 20,3 kg y 20,5 kg, respectivamente, hasta alcanzar 21,8 kg en el 2025 (FAO, 2016). Algunas de las especies nativas de peces en Colombia son el bocachico (*Prochilodus magdalenae*), la cachama blanca y negra (*Piaractus brachypomus* y *Colossoma macropomum*, respectivamente) y el yamú (*Brycon amazonicus*). La cachama blanca es endémica de las cuencas de la Orinoquía y Amazonía. Allí se han realizado trabajos en reproducción y cultivo a comienzos de la década de los 80, con una importancia productiva que radica en especies nativas, que se cultivan en todo el país y tiene crecimientos rápidos (FAO, 2005). Por lo anterior, es necesario buscar alternativas que garanticen una producción continua de carne de pescado, una de ellas es la reproducción artificial y controlada de las especies.

Según Collazos *et al.*, (2014), uno de los mayores inconvenientes de la reproducción de estas especies, radica en la su estacionalidad reproductiva. Es por esto que

procesos como la crioconservación logran ampliar los periodos estacionales de producción de semilla, disponer de gametos masculinos de líneas seleccionadas para mejoramiento genético (Ogier *et al.*, 1997), crear bancos de germoplasma para establecer programas de reproducción y eliminar la problemática de la actividad reproductiva asincrónica entre machos y hembras (Viveiros *et al.*, 2010) garantizando así, una óptima producción de estos peces.

Autores como María *et al.*, (2010), plantean que el semen de cachama crioconservado tuvo una menor calidad que el semen fresco. Igualmente, Velasco *et al.*, (2006) concluyeron que los porcentajes de fertilización observados con esperma fresco de yamú (*Brycon amazonicus*) fueron significativamente más altos que los de los espermatozoides crioconservados. Esto se puede deber a daños en la estructura física de la célula y el ADN, y el efecto negativo que se genera en la fisiología de los espermatozoides como en la fertilidad de los peces (Labbe *et al.*, 2001). Es por esto que el conocimiento de estas alteraciones morfológicas macro y a nivel ultraestructural de los espermatozoides, es de gran importancia, para la búsqueda de posibles soluciones. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo de investigación es aportar al conocimiento básico del efecto de la crioconservación seminal a largo término sobre la calidad espermática en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y observar los posibles daños ultraestructurales que puedan presentarse en espermatozoides de la especie bajo esta biotecnología.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Aspectos generales de la especie

La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), pertenece al orden Characiformes, a la familia Characidae y subfamilia Serrasalminae. Es un pez redondo originario de las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco y puede alcanzar hasta 20 kg de peso corporal (Alcântara *et al.*, 1990), es de hábitos omnívoros y presenta una importancia económica considerable para la acuicultura a escala comercial en Colombia, Brasil, Perú, Venezuela y América Central (Nascimento *et al.*, 2010). Su valor productivo depende de sus hábitos omnívoros con tendencia a consumo de frutos y semillas que le permite aceptar diferentes tipos de alimentos naturales, logrando altas tasas de conversión alimenticia (Mesa y Botero, 2007); es una especie resistente al manejo en cautiverio, de fácil adaptación a condiciones medioambientales adversas y con alta docilidad y rusticidad (Alzate *et al.*, 2017), además de esto posee gran aceptación en el mercado gracias a su excelente calidad y sabor de su carne. Estas características hacen que *P. brachypomus* se situé como una de las especies más promisorias para la producción acuícola, tanto así que países como India la introdujeron como especie exótica durante 2003 y 2004 para su cultivo en conjunto con especies como la carpa (Chatterjee y Mazumder, 2009). En nuestro país, cerca de la cordillera de los andes, *P. brachypomus* es el pez más cultivado en sistemas intensivos y semiintensivos, produciendo 25.000 toneladas en 2018 (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018).

4.2 Crioconservación seminal en peces

Como la reproducción es un cuello de botella típico en la producción animal, la evaluación de la calidad del esperma desempeña un papel fundamental en la práctica reproductiva acuícola. (Kowalski y Cejko, 2019). Es por esto que procesos como la conservación de semen usando temperaturas bajo cero, han facilitado alternativas de reproducción artificial en diversas especies. Entre estas, la industria

piscícola no ha sido indiferente ante la situación, y también ha acogido estos procesos con el fin de optimizar su proceso productivo.

La crioconservación es un proceso basado en la congelación y almacenamiento de material biológico por debajo de -80°C , generalmente, a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) o cerca de ella (Karnieli *et al.*, 2017), con el fin mantener viable su función biológica a través del tiempo. Los primeros registros de crioconservación de semen se presentan en 1776, cuando Lázaro Spallanzani intento preservar los espermatozoides en la nieve (Royere *et al.*, 1996). Tiempo después se genera un avance científico importante en este campo, gracias al descubrimiento de las propiedades crioprotectoras que tiene el glicerol (Polge *et al.*, 1949), con lo cual se crean nuevas herramientas en las técnicas de crioconservación. Como lo mencionan Nascimento *et al.*, (2010) y Judycka *et al.*, (2019) la crioconservación seminal en peces optimiza los procesos de reproducción, generando disponibilidad de gametos durante todo el año y mejorando programas de conservación y reproducción. Igualmente, esta tecnología nos facilita la formación de nuevos bancos genéticos que nos ayudan a garantizar la diversidad genética y el éxito reproductivo en las estrategias de manejo poblacional de las especies, ya que se viene observando una disminución de la variedad genética en los planteles de reproductores en granjas dedicadas a la producción de alevinos (Fresneda *et al.*, 2004).

Un factor clave en la criobiología de los espermatozoides es que son células pequeñas con una gran superficie (John Morris *et al.*, 2012, Morris, 2006). Estas características afectan la viscosidad y la temperatura de transición vítrea del citosol intracelular en los espermatozoides, lo que los hace menos susceptibles al daño potencial en su estructura (Isachenko *et al.*, 2003); el uso de agentes crioprotectores es fundamental, ya que en ausencia de ellos la formación de cristales de hielo pueden conducir a la destrucción de los orgánulos celulares. Se han informado efectos adversos que se presentan durante este proceso; uno de ellos son los que se observan sobre parámetros de funcionalidad de los espermatozoides, como la

integridad de la membrana plasmática, el potencial de membrana mitocondrial, la fragmentación del ADN y el contenido de ATP, los cuales se han estudiado en diversas especies a un corto tiempo (Shaliutina *et al.*, 2013; Aramli *et al.*, 2013; Aguilar-Juárez *et al.*, 2014; Aramli, 2014; Trigo *et al.*, 2015; Merino *et al.*, 2017;).

Estos parámetros fisiológicos son importantes porque están relacionados con la motilidad, la capacidad de fertilización y la calidad de la descendencia (Lahnsteiner *et al.*, 1997; Pérez-Cerezales *et al.*, 2010). Trabajos realizados por Balamurugan y Munuswamy (2017) con semen de pardetes (*Mugil cephalus*) conservados durante una semana, muestran que la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides en todos los experimentos disminuyeron en comparación con los espermatozoides frescos. Ding *et al.* (2009) encontraron que en el pez mandarín (*Siniperca chuatsi*) la tasa de fertilización y la tasa de eclosión de los espermatozoides congelados por 1 semana y un año, fueron similares a los de los espermatozoides frescos. En general, los espermatozoides de peces crioconservados tienen movilidad y fertilidad deterioradas en comparación con los espermatozoides frescos, esto generado por la exposición de los mismos a temperaturas criogénicas las cuales implican una suma de factores tales como la susceptibilidad al choque frío, el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular (Cabrita *et al.*, 2005), que son las responsables de los daños celulares causados.

4.3 Morfología y ultraestructura espermática

La morfometría espermática es un método que nos permite estandarizar los parámetros morfológicos normales y a partir de allí determinar los cambios que se puedan presentar en el tamaño y organización de la estructura celular. La evaluación ultraestructural también nos brinda realizar una predicción de la disposición e integridad de los orgánulos celulares, y nos permite identificar los daños que con microscopía óptica convencional pueden pasar desapercibidos. Parámetros como motilidad espermática subjetiva, intensidad de la motilidad espermática, ultraestructura, integridad de la membrana, capacidad de fertilización,

entre otros, se han evaluado después del descongelamiento para determinar la calidad de los espermatozoides (Rurangwa *et al.*, 2001), y la búsqueda de la correlación de estos parámetros, son el objetivo de muchos de los trabajos en reproducción de peces. Factores como la evaluación de crioprotectores los cuales son esenciales para disminuir el daño espermático ocasionado por el descenso de temperatura (Cruz *et al.*, 2006), la relación de dilución, condiciones de congelación y descongelación, el almacenamiento en frío y el tiempo de almacenamiento en nitrógeno, se evalúan en la calidad del semen y es por esto que se deben formar protocolos estandarizados de crioconservación en cada especie. En la mayoría de los estudios la tasa de motilidad espermática es la más evaluada y puede ser afectada por los factores mencionados, entre ellos el tiempo de congelación.

Una de las variables que cabe resaltar en los protocolos de crioconservación, es que estos tienen una influencia significativa en la morfología, integridad y función del espermatozoide (Ramírez *et al.*, 2010). Como lo menciona Figueroa *et al.*, (2019), las criolesiones generan cambios estructurales y fisiológicos importantes: ruptura de la membrana plasmática, alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, fragmentación del ADN, inactivación de enzimas, producción de radicales libres y alteraciones en la concentración de ATP y en la homeostasis del calcio intracelular. Igualmente, trabajos hechos por Zhang *et al.*, (2003) muestran daños morfológicos por procesos de ruptura de membrana plasmática, pieza media y cola, así como en la mitocondria, esto como resultado de la pérdida de la envoltura densa de estas (Zachariassen y Kristiansen., 2000). Taddei *et al.*, (2001), han atribuido la formación de protuberancias en el flagelo y la cabeza a la pérdida de cromatina nuclear. Según lo reportado por Muchlisin (2009) usando tres métodos de crioconservación la mayoría de las anomalías de los espermatozoides se produjeron en la cabeza, especialmente en la membrana citoplasmática y en la pieza intermedia. Balamurugan *et al.*, (2019) empleando microscopia electrónica de barrido, encontraron en semen congelado y descongelado de *Mugil cephalus* alteraciones como: la contracción de la membrana plasmática alrededor de la

cabeza del espermatozoide, la lisis de la región de la pieza media y la pérdida parcial y completa de flagelo.

Según Yao *et al.*, (2000) realizando un examen ultraestructural de espermatozoides congelados-descongelados usando microscopía electrónica de barrido (SEM), encontraron varios grados de hinchazón en las mitocondrias, o deshidratación de la membrana celular en la pieza intermedia, en espermatozoides de *Macrozoarces americanus* L. Igualmente Figueroa *et al.*, (2019) reporta pérdida de la forma mitocondrial, pérdida de la membrana mitocondrial externa y la pieza media, lo que condujo a una desorganización estructural de la misma en espermatozoides de *Salmo salmar* criopreservados durante 2 meses. En un estudio realizado por Garríz *et al.*, (2013), usando Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en espermatozoides criopreservados, reportaron 18% de anomalías en semen fresco y un 60% en semen descongelado, hallando espermatozoides con membranas inflamadas, rotas o ausentes en la cabeza que mostraban citoplasma en exceso, alteración de la posición de las mitocondrias y en algunos casos la ausencia de estos orgánulos e hinchazón del flagelo y además demasiadas vesículas citoplasmáticas. Los espermatozoides de peces muestran una mayor diversidad morfológica que los de otros vertebrados y su ultraestructura proporciona parámetros para el análisis filogenético (Jamieson *et al.*, 1991).

No obstante, cabe resaltar que el conocimiento de estas anomalías producidas por la criopreservación seminal, son útiles para el uso de nuevas alternativas o un mejor desarrollo del proceso de criopreservación de gametos masculinos y así mejorar los resultados reproductivos utilizando estas tecnologías.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización y descripción del área de estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Crioconservación del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, ubicado en la ciudad de Villavicencio, departamento del Meta (Colombia). Sus instalaciones están situadas a una altura promedio sobre el nivel del mar de 420 metros, con temperatura media ambiental de 26°C, humedad relativa del 75% y precipitación anual de 4050 mm.

5.2 Material biológico

Para la obtención del semen se utilizaron animales (n=6) machos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) sexualmente maduros (presencia de semen en la papila urogenital mediante presión abdominal), provenientes del plantel de reproductores de la estación piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL - UNILLANOS). La forma de captura se desarrolló mediante malla de arrastre, donde una vez seleccionados fueron trasladados en bolsas de plástico a piletas circulares de cemento de 7m³ ubicadas en la sala de reproducción de la estación piscícola, con recambio de agua diario de 5% y sin alimentación, en donde permanecieron durante 24 horas con el propósito de reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación y administrar los tratamientos de inducción hormonal para propiciar la respectiva espermiación.



Figura 1. Captura y selección de reproductores de *Piaractus brachypomus* en estanques de tierra por medio de malla de arrastre.

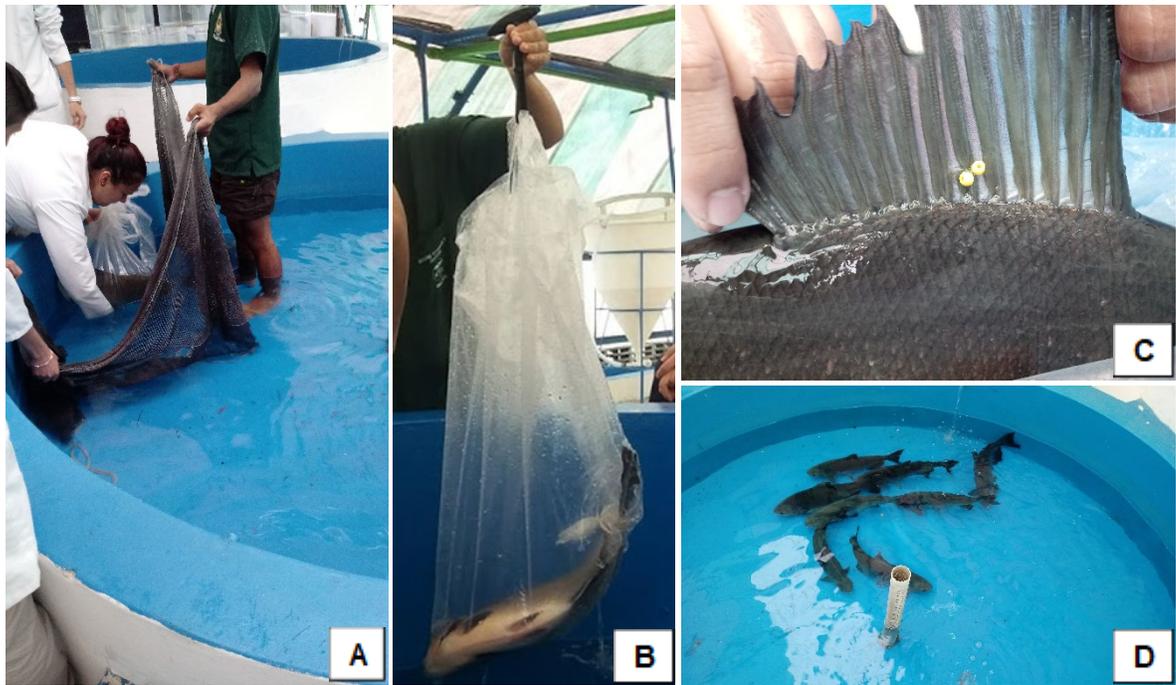


Figura 2. **A:** Captura de ejemplares de *P. brachypomus* para realización de pesaje, **B:** pesaje de individuos por medio de bolsa plástica y balanza electrónica, **C:** marcación e identificación de individuos en la aleta dorsal por medio de dispositivos de colores y **D:** Mantenimiento de individuos de *Piaractus brachypomus* en piletas redondas de manejo.

5.3 Obtención del semen

Para esto se preparó y administro extracto de Hipófisis de Carpa (EHC, Stoller Fisheries, USA) vía intramuscular en la base de la aleta dorsal en una única dosis total de 4 mg/kg de peso vivo, administrada aproximadamente 18 horas antes de la extracción del semen.



Figura 3. Inducción hormonal de machos de *P. brachypomus* mediante la administración de EHC por inyección intramuscular.

Previo a la obtención seminal, los animales fueron tranquilizados por inmersión en una solución 0.5 mg /L de fenoxietanol (Sigma Co, St Louis, Missouri), durante 3 a 5 minutos. Inmediatamente después de la pérdida del eje de nado, fueron retirados de la solución anestésica, secados cuidadosamente en la región genital, aplicando una leve presión para provocar la expulsión de orina, heces o bilis para reducir el riesgo de contaminación del material seminal. Seguido de esto, se realizó la expulsión del semen mediante un masaje cráneo-caudal de la cavidad celómica, el semen fue recolectado individualmente en tubos de vidrio a forados estériles para determinar el volumen seminal (VS) y sus características macroscópicas (color).



Figura 4. **A:** Tranquilización química de machos de *P. brachypomus* mediante la inmersión en fenoxietanol, **B:** limpieza y secado de la cavidad genital y **C:** colecta

de semen en tubos de vidrio aforados mediante masaje cráneo-caudal de la cavidad celómica.

5.4 Preparación del semen pre-congelación

Con el semen almacenado en tubos de vidrio, se procedió a realizar la congelación del mismo. Se realizó una dilución de cada una de las muestras en una solución en proporción 1:4 (semen - diluyente) con una solución a base de 12% (v:v) de yema de huevo de gallina, 10% (v:v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y 5.5% (p:v) de glucosa. Para esto se inició mezclando la glucosa con aproximadamente el 60% de agua destilada del volumen final calculado para luego adicionar el volumen total de DMSO. Posterior a esto se adicionó el volumen de yema de huevo correspondiente y finalmente se adicionó agua destilada para completar el volumen del diluyente deseado.

5.5 Empacado y congelación

Posteriormente con ayuda de micro pipetas, el semen se empacó en pajillas de 5.0 mL (Instrument de Médecine Vétérinaire, Minneapolis, USA) previamente rotuladas con fecha y número de pajilla, las cuales se sellaron con esferas de polivinilo identificadas con colores en cada uno de sus extremos.



Figura 5. Pajillas de 5.0 ml selladas con esferas de colores en polivinilo para el almacenamiento de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

Una vez las muestras se cargaron en las respectivas pajillas, estas se colocaron en soporte de polímero de PVC y aluminio, diseñado de acuerdo al diámetro y longitud de estas y la profundidad del termo de congelación. Posterior a esto, se introdujeron en un termo con vapores de nitrógeno líquido (Taylor-Wharton, CP 100, Theodore, AL, USA) durante 30 minutos hasta alcanzar una temperatura de -70°C .

Una vez completado este tiempo, las pajillas fueron llevadas al termo de almacenamiento final donde alcanzaron una temperatura de crioconservación de -196°C (Taylor-Wharton HC 35, Theodore, AL, USA), allí se sumergieron directamente en nitrógeno líquido y se conservaron durante los respectivos periodos de tiempo a evaluar en el experimento (24 horas, 1 y 6 meses)

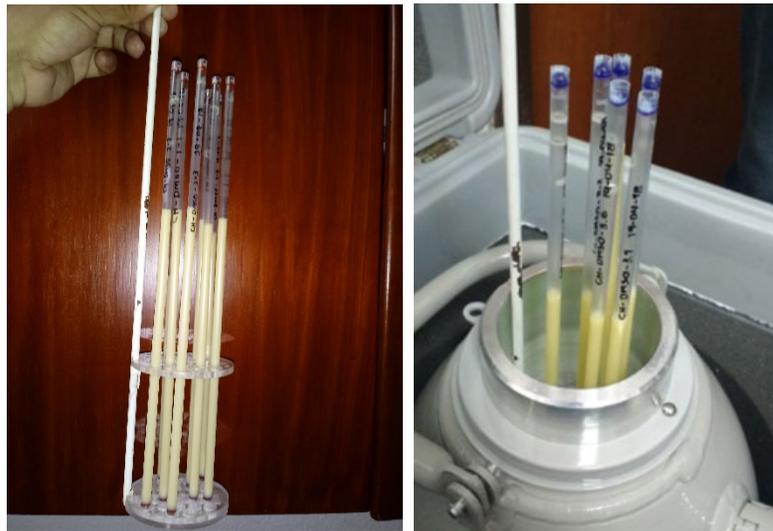


Figura 6. Disposición de pajillas con semen de *Piaractus brachypomus* en soporte de PVC y su posterior introducción en termo seco con vapores de nitrógeno líquido.

5.6 Descongelación del semen

Las pajillas fueron descongeladas mediante inmersión directa en baño de agua termoregulada a 37°C durante 60 segundos. Para esto se preparó previamente el baño de agua con el propósito de que el tiempo que transcurre entre la retirada de las pajillas del nitrógeno líquido y su inmersión en el baño de agua, sea lo más corto posible. Con este sistema se ofrece una tasa de descongelación rápida, lo que nos permite evitar el daño a la membrana plasmática y la muerte espermática. Una vez el semen se descongeló, la pajilla fue abierta en uno de sus extremos y el semen vertido en un tubo de vidrio estéril para su posterior evaluación.



Figura 7. Descongelación de pajilla con semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) mediante inmersión parcial en baño de agua termoregulada a una temperatura constante de 37°C durante 60 segundos.

5.7 Evaluación seminal.

5.7.1 Determinación de motilidad y tiempo de activación espermática

La motilidad espermática se define como el porcentaje (%) de movimiento en masa que presentan los espermatozoides de la muestra y esta se determinó de manera subjetiva y por la misma persona. Para esto se dispuso una alícuota de semen (20 μ L) en una lámina de vidrio excavada (1.0 – 1.2 mm de profundidad, Micro Slides Premiere, China) ubicada en un microscopio óptico (Eclipse E400) a 10x de magnificación. En un primer momento se

observó la lámina para verificar la inactividad espermática. Acto seguido y con observación constante, se adicionaron 180 μL de agua destilada con el fin de lograr la activación espermática, que se expresa en porcentaje de espermatozoides móviles. Al mismo tiempo, con la ayuda de un cronómetro, se determinó el tiempo de activación espermática, el cual fue medido inmediatamente después de la adición del agua destilada hasta el momento en que se presenta la suspensión del 90% de movimientos de los espermatozoides.

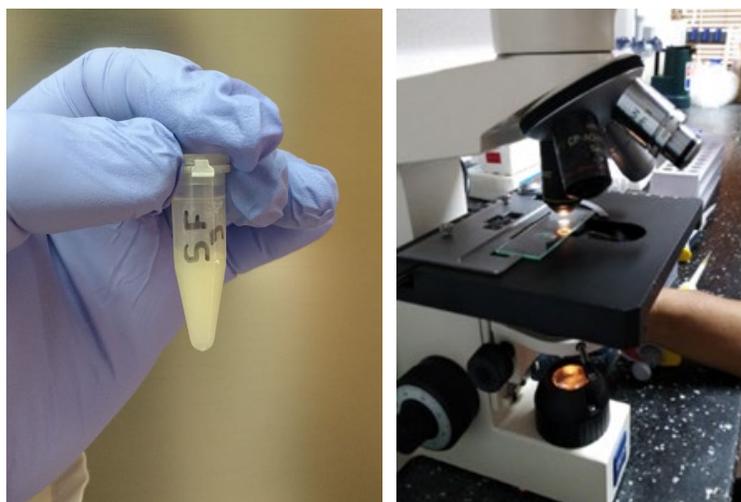


Figura 8. Disposición del material seminal de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en tubos eppendorf para su posterior análisis en microscopio óptico convencional.

5.7.2 Morfología espermática

Para la determinación de la morfología espermática se realiza la fijación de cada una de las muestras. Para esto, 1 μl de semen es fijado en 999 μl de solución formol – citrato [formaldehído 35% (4%) y citrato de sodio (2.9%)] en un tubo Eppendorff, (1:1000). Para su análisis se tomó un alícuota (15 μl) de la solución, previamente homogenizada mediante un Vórtex (Fisher

Scientific™ Digital Vortex Mixer, EEUU) durante 60 segundos, y se dispuso en una lámina portaobjetos (Microscope slides, Ground edges) donde se añadieron 5 µl de rosa de bengala 3%; esta disolución se homogenizó y se realizó un extendido. La visualización y análisis de las láminas se realizó mediante microscopio óptico de contraste de fase (Nikon- Eclipse E-400, Japón) a una magnificación de 1000x. El análisis morfológico se determinó sobre 100 espermatozoides, donde se establecieron el número de espermatozoides normales y el número de espermatozoides que presentaban algún tipo de anomalía morfológica como: macrocefalia, cabeza degenerada, cabeza separada, pieza media degenerada, cola suelta, cola doblada, cola rota y cola corta. Los resultados de morfología espermática fueron expresados como porcentaje de anomalías. Este mismo procedimiento se realizó con las muestras de semen crioconservado de 24 h, 1 y 6 meses.

5.8 Ultraestructura espermática.

5.8.1 *Microscopía electrónica de transmisión*

Para este procedimiento, se realizó una dilución de la muestra de semen fresco y descongelado y un compuesto fijador (Glutaraldehído al 2% 0,2 M Fosfato Buffer), con una dilución de 1:20 (25 µL de semen y 475 µL de solución fijadora), esta solución se almacenó en tubos de reacción (Eppendorf) en un refrigerador a una temperatura no mayor de 4°C. Las muestras fueron enviadas a la Universidad Militar Nueva Granada donde se procesaron para su posterior visualización. Antes de comenzar la preparación de las muestras para su análisis, estas fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 3 minutos.

Para la microscopía electrónica de transmisión, se realizó la preparación de las muestras para la inclusión en resina y esta se realizó en varias fases. Una primera fase de post-fijación con tetraóxido de osmio al 4% preparado en el

mismo tampón durante 2 horas. Seguido a esto se llevó a cabo un primer contraste en acetato de uranilo al 2% durante una hora. La muestra se deshidrató en una serie graduada de alcoholes al 50, 70, 90 y 100% durante 10 minutos en cada concentración, seguido de una solución 1:1 de alcohol 100% y acetona durante 15 minutos y finalizando en una inmersión en acetona 100% durante 15 minutos. Se realizó la inclusión de las muestras en una solución 2:1 de acetona y resina epóxica durante 1 hora. Pasado este tiempo se hizo una inmersión en solución 1:1 acetona y resina epóxica durante 1 hora y se finalizó en una inmersión en resina epóxica pura durante 2 horas, para después realizar la polimerización en resina epóxica pura durante 12 horas a 70 grados centígrados. Pasadas las 12 horas se obtienen las muestras inmersas en bloques de resina sólidos de los cuales se obtienen cortes de 1 micra (corte semifino) con un micrótopo de rotación (Slee Cut 4060), los cuales son teñidos con azul de toluidina al calor. Posteriormente, se realizaron cortes de 0,130 micras (corte ultrafino) en un ultramicrotopo (LEICA UC7), que se colocan en rejillas de cobre. Se llevan las rejillas con los cortes ultrafinos a una solución de metanol y acetato de uranilo al 2% para hacer su contraste. Posterior a esto se realizó un segundo contraste con citrato de plomo al 0,4%. Una vez contrastados los cortes, se llevaron al microscopio electrónico MET 120 kV JEOL JEM-1400 Plus equipado con una cámara modelo GATAN marca ORIUS. Las fotos fueron tomadas en el software GATAN DigitalMicrograph 1.80.70 a 20 mil aumentos.



Figura 9. Microscopio electrónico de transmisión para evaluación de daños en la ultraestructura de espermatozoides frescos y crioconservados de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

5.9 Análisis estadístico

Los datos fueron descritos como media \pm error estándar de la media (ESM). Posteriormente, para analizar los efectos de los tratamientos sobre la variable se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía verificando previamente los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett). Los datos de las variables expresadas en porcentajes (%) como motilidad, morfología espermática y anormalidades ultraestructurales fueron transformados con la raíz de arco-seno. Se utilizaron la prueba de Tukey para comparar las medias entre los diferentes tratamientos, como prueba a posteriori. Para todos los análisis se asumieron niveles de significancia del 95 % ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos fueron realizados usando los paquetes R (ver. 3.3.1).

6 RESULTADOS.

El control (semen fresco) obtuvo el porcentaje más alto en motilidad ($90 \pm 0,0\%$) y fue significativamente diferente a los demás tratamientos. La motilidad más baja se obtuvo en los tratamientos de 1 y 6 meses con valores de 50 ± 9 y $51 \pm 11\%$, respectivamente. De igual forma, no se determinaron diferencias significativas entre los tiempos de conservación del semen en nitrógeno líquido para esta variable ($p > 0.05$). Por otra parte, el tiempo de activación seminal presentó un mayor valor en el tratamiento 24 horas (67 ± 11 s) con respecto al control (51 ± 5.5 s) pero sin diferencias significativas con los demás tratamientos ($p > 0.05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de motilidad y tiempo de activación en semen fresco (control) y crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) durante diferentes tiempos de congelación. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa ($p < 0.05$). **h:** horas, **m:** meses, **NL:** nitrógeno líquido, **seg:** segundos.

Variable	Control	Tiempo de conservación en NL		
		24 h	1 m	6 m
Motilidad (%)	$90 \pm 0,0^a$	$60 \pm 8,9^b$	50 ± 9^b	51 ± 11^b
Tiempo de activación seminal (seg)	$51 \pm 5,5^b$	67 ± 11^a	$52,3 \pm 7,18^{ab}$	55 ± 11^{ab}

Con respecto a las anomalías postdescongelación (Figura 10) todos los tratamientos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) al control, siendo los tiempos de 24h y 1 mes los que obtuvieron un resultado satisfactorio en esta variable ($6 \pm 0,8\%$). Igualmente, durante el periodo de almacenamiento se presentó un aumento significativo a través de los tiempos de evaluación. Se observó que en

los dos primeros no hubo diferencias significativas entre sí, contrario a lo obtenido durante el mes 6 ($12 \pm 0,4\%$) (Figura 10).

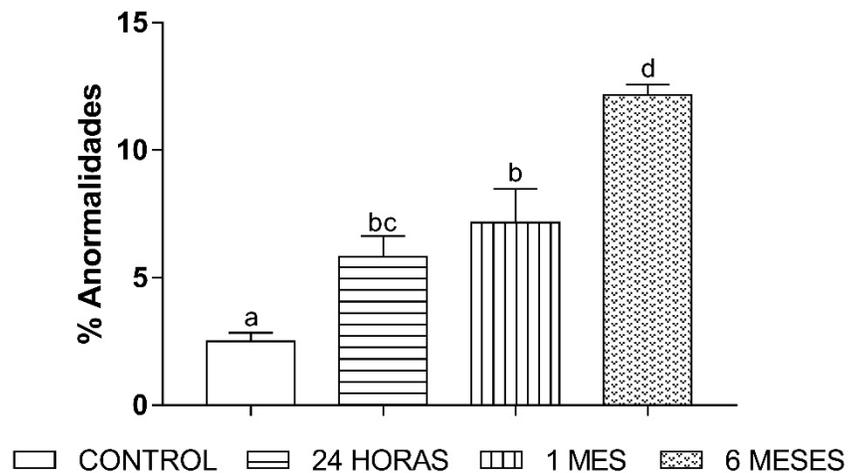


Figura 10. Anormalidades espermáticas post-descongelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Control= semen fresco. Entre barras letras distintas indican diferencia estadística ($P < 0.05$). Valores mostrados como media \pm SEM. ($n=100$ espermatozoides/tratamiento)

Con relación al porcentaje % de anomalías espermáticas específicas postdescongelación, la alteración que más se presentó fue cola corta siendo mayor a los 6 meses de congelación ($5 \pm 1\%$) y menor en el tratamiento control ($0,3 \pm 0,3\%$). Igualmente, la anomalía menos observada en los diferentes tiempos de congelación fue la cola rota, con un valor de $0 \pm 0\%$ para el control, 24 horas y 6 meses de congelación, y sin diferencias significativas respecto a 1 mes ($0,5 \pm 0,2\%$).

Igualmente, se observó que cabeza separada y cola corta fueron las únicas anomalías que presentaron diferencia estadística significativa entre tratamientos, con valores de $1 \pm 0,2\%$ en el control y $0,3 \pm 0,3\%$ en 1 mes para cabeza separada. Por otra parte, cola corta tuvo diferencia significativa entre el control ($0,3 \pm 0,3\%$) y los demás tiempos de congelación (Tabla 2).

Tabla 2. Anormalidades morfológicas de semen fresco (SF) y crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Los valores fueron expresados en porcentaje y mostrados como media \pm SEM. Entre filas letras distintas indican diferencia estadística ($P < 0.05$). $n = 100$ espermatozoides/tratamiento

Tratamiento	Anormalidades espermáticas							
	Macrocefalia	Cabeza separada	Cabeza degenerada	Pieza media degenerada	Cola suelta	Cola doblada	Cola corta	Cola rota
Control (SF)	0 \pm 0 ^b	1 \pm 0,2 ^a	0 \pm 0 ^b	0,2 \pm 0,2 ^b	0,7 \pm 0,5 ^{ab}	0,2 \pm 0,2 ^b	0 \pm 0 ^b	0,3 \pm 0,3 ^b
24 h	0 \pm 0 ^b	1 \pm 0,5 ^{ab}	0,2 \pm 0,2 ^b	0,2 \pm 0,2 ^b	0,7 \pm 0,3 ^{ab}	1 \pm 0,6 ^{ab}	0 \pm 0 ^b	2 \pm 0,4 ^a
1 m	0,2 \pm 0,2 ^b	0,3 \pm 0,3 ^b	0,7 \pm 0,3 ^{ab}	0,2 \pm 0,2 ^b	2 \pm 0,2 ^{ab}	0,5 \pm 0,3 ^{ab}	0,5 \pm 0,2 ^{ab}	3 \pm 0,8 ^a
6 m	3 \pm 1 ^{ab}	1 \pm 0,5 ^{ab}	0,7 \pm 0,3 ^{ab}	0,7 \pm 0,3 ^{ab}	1 \pm 0,4 ^{ab}	1 \pm 0,5 ^{ab}	0 \pm 0 ^b	5 \pm 1 ^a

Las anomalías morfológicas se presentaron en todos los tratamientos y algunas de estas alteraciones fueron registradas mediante microscopía óptica convencional. En la figura 11, se aprecian las imágenes tomadas de estas anomalías halladas en espermatozoides frescos y criopreservados de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

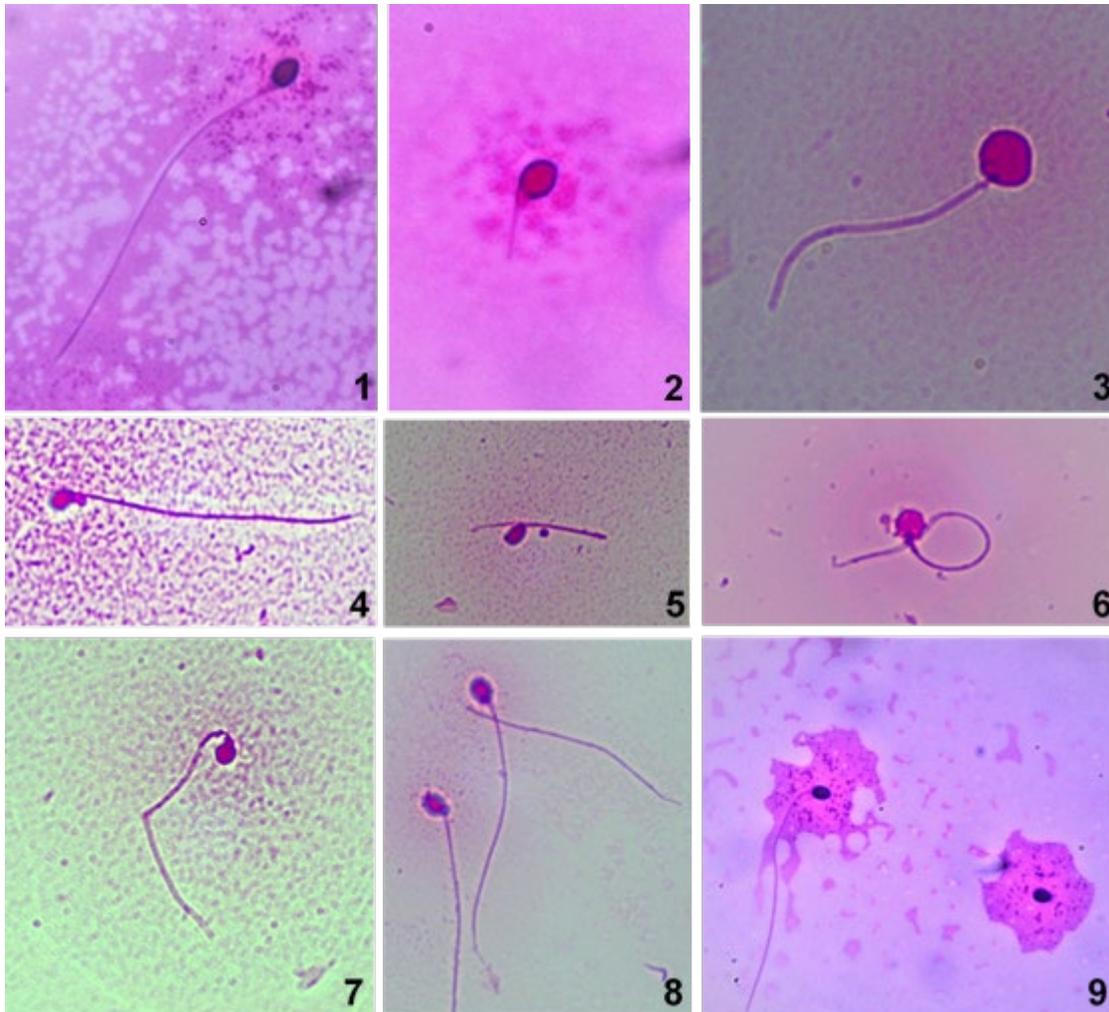


Figura 11. Anormalidades morfológicas en semen descongelado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). **1:** espermatozoide normal, **2:** cola corta, **3:** macrocefalia, **4:** degeneración de pieza media, **5:** cola doblada, **6:** degeneración de la cabeza, **7:** cola rota, **8:** espermatozoide normal y cola suelta y **9:** cabeza separada. Magnificación de 1000x.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se muestran en la figura 12, y se utilizaron para caracterizar la ultraestructura de espermatozoides frescos y criopreservados de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

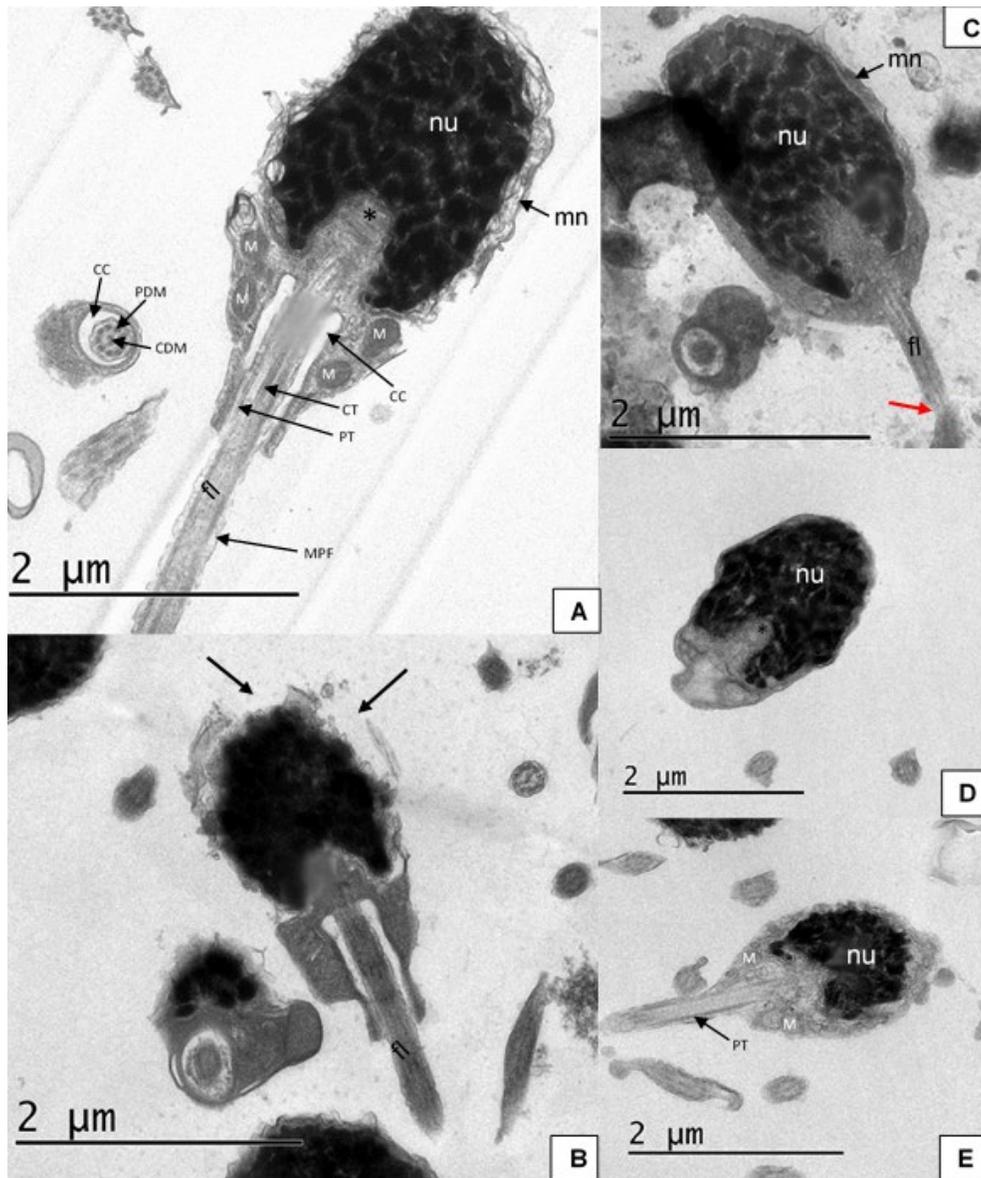


Figura 12. Micrografías TEM de espermatozoides criopreservados de *Piaractus brachypomus* en diferentes tiempos de congelación. (A) Sección longitudinal de espermatozoide fresco que muestra un núcleo ovoide, mitocondrias de la pieza media y el flagelo, además la sección transversal del flagelo que muestra una configuración 9 + 2 de la estructura axonal. **(B)** Las flechas indican la ruptura de la membrana nuclear por procesos

de lisis; acortamiento del flagelo; 24 horas de congelación **(C)** La flecha indica la ruptura de la membrana plasmática flagelar; 1 mes de congelación. **(D)** Pérdida total de flagelo; 6 meses de congelación. **(E)** Contracción de la cromatina nuclear; 6 meses de congelación. **PDM**, dobletes periféricos de microtúbulos; **CDM**, dobletes centrales de microtúbulos; **PT**, microtúbulos periféricos; **CT**, microtúbulos centrales; **mn**, membrana nuclear; **M**, mitocondrias; *****, complejo centriolar. **fl**, flagelo; **MPF**, membrana plasmática flagelar. **NU**, núcleo;

Las micrografías nos muestran la estructura normal de los espermatozoides de *P. brachypomus* en donde se reconocen tres partes principales: la cabeza, pieza media y flagelo. La cabeza de forma ovalada carece de acrosoma y almacena en su interior el núcleo con el material de cromatina, rodeado por una membrana nuclear que en la base del núcleo se invagina formando la fosa nuclear. Esta fosa facilita la conexión entre el núcleo posterior y la pieza media. La pieza media del espermatozoide de cachama blanca es de forma irregular y consta de un flagelo central rodeado por 2 a 3 pares de mitocondrias de forma esférica desiguales en su tamaño. El axonema o flagelo es de forma cilíndrica y está cubierto por una membrana plasmática. Presenta un patrón de organización 9 + 2 pares de microtúbulos entre periféricos y centrales que son visibles en el corte transversal. Los espermatozoides conservados en nitrógeno líquido no mostraron una anomalía morfológica marcada durante todos los tiempos de conservación. Sin embargo, se observa que en todos los meses de evaluación las membranas plasmáticas flagelares sufrieron rupturas parciales por procesos de lisis, acortamientos en la parte terminal del flagelo y la ausencia del mismo. En la pieza media hubo pérdida de la forma mitocondrial y presencia de protuberancias, lo que condujo a un aumento significativo de tamaño de la pieza media. Las alteraciones más observadas en la cabeza de los espermatozoides son daños en la integridad de su superficie correspondientes a rupturas de la membrana plasmática. El aumento de tamaño en la cabeza y la retracción de la cromatina fueron otras de las alteraciones observadas.

En el presente estudio, tanto en el escaneo óptico, como la microscopía electrónica de transmisión se registraron daños morfológicos ocasionados por los efectos criogénicos en los espermatozoides congelados y descongelados.

7 DISCUSIÓN

El aumento en la producción piscícola de especies nativas y en especial de cachama blanca ha llevado al uso de biotecnologías reproductivas como la crioconservación seminal, y con ello la importancia de realizar estudios para lograr optimizar los procesos de conservación genética a través del tiempo. Estos resultados se suman a reportes descritos sobre la calidad espermática de semen fresco y crioconservado de cachama blanca como los obtenidos por Navarro *et al.*, (2004) donde lograron motilidad (92%) y tiempo de activación (79.4 s) en semen fresco, valores mayores pero cercanos a los obtenidos en la presente investigación. La motilidad espermática presentó rangos similares a los reportados por Suarez *et al.*, 2019; Fresneda *et al.*, 2004 y Nascimento *et al.*, 2010 en la misma especie. El tiempo de duración de la motilidad fue semejante a la descrita por Suarez *et al.*, (2019), aunque menor a la obtenida por Fresneda *et al.*, (2004) y Navarro *et al.*, (2004). En general los estudios enfocados en esta especie se centran en realizar la caracterización de la calidad seminal post descongelación y su relación con diferentes parámetros como el volumen del empaque del semen, los diluyentes empleados y los periodos reproductivos en que se colectan los machos (Fresneda *et al.*, 2004; María *et al.*, 2015 y Suarez *et al.*, 2019).

Con respecto a la morfología espermática se observó una pérdida en cuanto a la calidad estructural del espermatozoide, ocasionado principalmente por el proceso de congelación y descongelación de las pajillas. No existen en Colombia estudios publicados a cerca de los daños microscópicos de los espermatozoides de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Sin embargo, Robles *et al.*, (2019) determinaron las anomalías espermáticas ocasionadas por el proceso de crioconservación de semen de cachama negra (*Colossoma macropomum*), evaluando diferentes crioprotectores y sistemas de empaque, obteniendo diferencias significativas de todos los tratamientos respecto a el control.

Igualmente, Drumond *et al.*, (2008) en semen crioconservado de *Zungaro jahu*, evidenciaron la presencia de alteraciones morfológicas, principalmente microcefalia

en semen diluido con DMSO. Alteraciones como cabeza y cola suelta, macrocefalia, cabezas degeneradas y flagelos rotos fueron reportadas en semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma metaense*) crioconservado por 15 días, utilizando diferentes tipos de crioprotectores (Ramírez-merlano *et al.*, 2011).

A través del tiempo se han identificado distintos factores que afectan negativamente la calidad de los espermatozoides, uno de ellos relacionados con el medio de almacenamiento como la temperatura, pH, concentración de oxígeno o contaminación de la muestra con orina, además de factores relacionados a la edad de maduración del macho (Ingermann *et al.*, 2002, Liley *et al.*, 2002, Valdebenito *et al.*, 2009). En general, se presentaron diferencias significativas entre el control (semen fresco) y el semen crioconservado, esto posiblemente por el acople de los crioprotectores en los fosfolípidos de la bicapa lipídica, causando modificaciones en el metabolismo de las membranas celulares (Hammerstedt y Graham, 1992). Igualmente, el estrés térmico generado en las membranas citoplasmáticas, hacen que éstas pasen de una fase líquida a fase de gel, ocasionando la formación de cristales de hielos intracelular y posteriormente la inminente ruptura de las mismas.

De igual forma, es posible que también se vea afectada la integridad del ADN de semen crioconservado, como ya ha sido reportado en otras especies (Li *et al.*, 2007; Peris *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2004). Estas alteraciones del material genético, están directamente relacionadas con el daño mecánico ocasionado por la formación de hielo intracelular, aunque no se descarta que la fragmentación del ADN sea a causa del estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se presentan en las primeras etapas de almacenamiento y manipulación (Pérez *et al.*, 2009; Figueroa *et al.*, 2017). En el presente estudio no se evaluó este parámetro, por lo que se hace necesario realizar estudios adicionales con el fin de obtener nuevos conocimientos, para perfeccionar estos procesos.

Las micrografías tomadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), nos permiten confirmar los daños que se observan mediante la microscopía óptica

convencional. Se revela que el proceso de congelación y descongelación induce daños ultraestructurales como ruptura de la membrana plasmática nuclear, fragmentación del flagelo y pérdida completa del mismo. Hallazgos similares a los reportados en este estudio, se han encontrado en diferentes especies como: *Paralichthys olivaceus*, *Mugil cephalus* y *Salmo salar* (Zhang *et al.*, 2003; Balamurugan *et al.*, 2017; Figueroa *et al.*, 2019).

En el presente estudio más del 80% de los espermatozoides de semen fresco y crioconservado, preservaron su morfología y estructura mitocondrial normal, además de porcentajes de motilidad mayor al 50%, confirmando la eficacia del protocolo de conservación, ya que algunos autores como María *et al.*, (2011) afirman que muestras congeladas y descongeladas que arrojen resultados de motilidad por encima del 50%, son muestras que pueden arrojar buenos resultados de fertilidad, por lo que se recomendó realizar pruebas adicionales con el fin de afianzar el conocimiento.

El análisis de la ultraestructura de espermatozoides de *Piaractus brachipomus* revela que, en el extremo posterior del núcleo se forma una ligera invaginación, formando una depresión conocida como fosa nuclear y a su vez el canal citoplasmático, a la que se une el flagelo en dirección perpendicular. Esta disposición morfológica es propia de espermatozoides primitivos tipo I, de acuerdo a la clasificación Mattei (1988).

A través de los tiempos de congelación, se observa una diferencia significativa en el porcentaje de anormalidades entre el control (semen fresco) y el semen crioconservado. Aunque no se encontraron daños morfológicos específicos en cada tiempo de congelación, las mayores afectaciones estructurales se encontraron en el flagelo y cabeza de los espermatozoides. Figueroa *et al.*, (2019) evaluando semen de *salmo salar* crioconservado durante 2 meses encontró que los mayores daños se presentaron en la pieza media, observándose pérdida de la forma mitocondrial, pérdida de la membrana de la pieza media, y desacoplamiento, resultados que también se observaron en el presente estudio. Liu *et al.*, (2007)

atribuyen el aumento de tamaño y la ruptura de la membrana flagelar de espermatozoides de *Pagrus major*, a la formación de hielo intracelular, pero no descartan causas como: fluctuación de pH, choque frío, efecto osmométrico y toxicidad crioprotectora. Zhang *et al.*, (2003) atribuyeron la disminución de la motilidad en espermatozoides crioconservados, a la dilatación severa o incluso la pérdida de mitocondrias en la parte media, y la ruptura de la cola en el esperma después de la descongelación. Estos cambios podrían afectar adversamente la función de las mitocondrias y las colas, reduciendo así el movimiento del flagelo de los espermatozoides.

8 CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación da unas pautas de la conformación estructural de los espermatozoides de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) para los procesos de crioconservación seminal, debido a que es una especie nativa con gran proyección en la piscicultura comercial.

Las conclusiones del presente trabajo son:

- Las mayores alteraciones estructurales a través del tiempo de crioconservación se dieron en la cabeza y los flagelos de los espermatozoides.
- Se presentaron alteraciones ultraestructurales en todos los tratamientos de crioconservación induciendo daños ultraestructurales como ruptura de la membrana plasmática nuclear, fragmentación del flagelo y pérdida completa del mismo.
- A pesar de que en todos los tiempos de conservación del semen de cachama blanca se encontraron alteraciones morfológicas y ultraestructurales, los porcentajes de motilidad fueron mayores al 50 % en todos los tiempos de almacenamiento.
- La crioconservación de semen de cachama blanca *Piaractus brachypomus* es una biotecnología reproductiva indicada para la conservación genética de la especie a través del tiempo, además cabe resaltar que se deben realizar más estudios a fondo evaluando porcentaje de fertilidad del semen crioconservado.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Juárez, Marisela; Ruiz-Campos, Gorgonio; Paniagua-Chávez, Carmen G. Cold storage of the sperm of the endemic trout *Oncorhynchus mykiss nelsoni*: a strategy for short-term germplasm conservation of endemic species. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 2014, vol. 85, no 1, p. 294-300.
- Alcântara Filho, P. De; Ascui De Oliveira, A.; Silva Nobre, MI da. Considerações sobre a amostragem da pirapitinga, *Colossoma brachypomum* Cuvier, no estado do Ceará (Brasil). *Ciência agrônoma (Brasil)*. (, 1990, vol. 21, no 1-2, p. 43-49).
- Alzate Díaz, Hernán Antonio. Efecto de la fuente proteica del alimento sobre la calidad de la carne de la cachama blanca *Piaractus brachypomus* en un sistema de tecnología biofloc. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. (2017).
- Aramli, M. S. Retracted: ATP Content, Oxidative Stress and Motility of Beluga (*Huso huso*) Semen: Effect of Short-Term Storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014, vol. 49, no 4, p. 636-640.
- Aramli, Mohammad Sadegh, et al. Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. *Animal reproduction science*, 2013, vol. 143, no 1-4, p. 112-117.
- Asturiano, Juan F.; Cabrita, Elsa; Horváth, Ákos. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *General and comparative endocrinology*, 2017, vol. 245, p. 69-76.
- Balamurugan R, Munuswamy N. Cryopreservation of sperm in Grey mullet *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). *Animal Reproduction Science*, 2017, vol. 185, p. 205-213.
- Balamurugan R, Prapaporn W, Munuswamy N. Sperm activation and effects of cryopreservation on motility, ultrastructure and DNA integrity in Grey mullet *Mugil cephalus*. *Aquaculture Reports*, 2019, vol. 14, p. 100204.
- Cabrita E, Robles V, Cuñado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herráez, MP. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after

- cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology*, 2005, vol. 50, no 3, p. 273-284.
- Chatterjee NR, Mazumdar B. Induced breeding of pacu (*Piaractus brachypomus*) in captivity with pituitary extract. *Aquaculture Asia*, 2009, vol. 14, no 2, p. 23.
 - Collazos LF, Gutiérrez-Espinosa MC, Restrepo-Betancur LF. Supervivencia de larvas de cachama blanca, *Piaractus brachypomus* Cuvier 1818, sometidas a cambios experimentales de temperatura. *Orinoquia*, 2014, vol. 18, p. 193-197.
 - Contreras P, Ulloa P, Merino O, Valdebenito I, Figueroa E, Farías J, & Risopatrón J. Effect of short-term storage on sperm function in Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) sperm. *Aquaculture*, 2017, vol. 481, p. 58-63.
 - Cruz-Casallas PE, Medina-Robles, VM, Velasco-Santamaria YM. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev Colom Ciencias Pecuarias*. 2006, vol.19, n.2, pp.152-159
 - De Baulny BO, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maise G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*, 1997, vol. 34, no 2, p. 141-149.
 - Ding S, Ge J, Hao C, Zhang M, Yan W, Xu Z, Huang Y. Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Animal reproduction science*, 2009, vol. 113, no 1-4, p. 229-235.
 - Drumond MM. Reprodução induzida de jaú, Zungaro jahu: análise das características seminais e ovocitárias. Unpublished Ms. C. Dissertation, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 108p, 2008.
 - Fabbrocini A, Lubrano SL, Rispoli S, Sansone G. Cryopreservation of Seabream (*Sparus aurata*) Spermatozoa. *Cryobiology*. 2000; 40: 46-53.
 - FAO. 2005. Visión general del sector acuícola nacional – Colombia. FAO Fisheries and Aquaculture Department [en línea], fecha año [revisado 22 de junio 2018]. Disponible en internet: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es.

- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma: 2016. 224 pp.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Figueroa E, Valdebenito I, Zepeda AB, Figueroa CA, Dumorné K, Castillo RL, Farias JG. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Reviews in Aquaculture*, 2017, vol. 9, no 1, p. 76-87.
- Figueroa E, Lee-Estevez M, Valdebenito I, Watanabe I, Oliveira RPS, Romero J, Castillo RL, Farías JG. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. *Aquaculture*, 2019, vol. 511, p. 634-190.
- Fresneda A, Lenis G, Agudelo E, Ángel MO. Espermiación inducida y crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2004, vol. 17, no 4, p. 46-52.
- Friedrich T. Producción de alimentos de origen animal. Actualidad y perspectivas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 2014, vol. 48, no 1, p. 5-6.
- Gárriz A, Miranda LA. Ultrastructure of fresh and post thawed sperm of pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Neotropical Ichthyology*, 2013, vol. 11, no 4, p. 831-836.
- Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 1992, vol. 29, no 1, p. 26-38.
- Sachenko E, Isachenko V, Katkov I, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive biomedicine online*, 2003, vol. 6, no 2, p. 191-200.
- Judycka S, Nynca J, Ciereszko A. Opportunities and challenges related to the implementation of sperm cryopreservation into breeding of salmonid fishes. *Theriogenology*, 2019, vol. 132, p. 12-21.
- Karnieli, O. Bioreactors and Downstream Processing for Stem Cell Manufacturing. En *Stem Cell Manufacturing*. 2017. p. 141-160.

- Kumar A, Pradhan PK, Das PC, Srivastava SM, Lal KK, Jena JK. Growth performance and compatibility of pacu, *Piaractus brachypomus* with Indian major carps in polyculture system. *Aquaculture*, 2018, vol. 490, p. 236-239.
- Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 2001, vol. 60, no 3, p. 397-404.
- Liu QH, Li J, Zhang SC, Xiao ZZ, Ding FH, Yu DD, Xu XZ. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology*, 2007, vol. 67, no 6, p. 1168-1174.
- Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Silva CA, Carneiro PC. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, vol. 26, no 5, p. 779-783.
- Maria AN, Carvalho AC, Araújo RV, Santos JP, Carneiro PC, Azevedo HC. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). *Cryobiology*, 2015, vol. 70, no 2, p. 109-114.
- Mattei X. The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. *Ultrastructure and evolution. Biology of the Cell*, 1988, vol. 63, no 2, p. 151-158.
- Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2005, vol. 18, no 1, p. 34-48.
- Merino MC, Bonilla SP, Bages F. Diagnóstico del estado de la acuicultura en Colombia. *Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia AUNAP-FAO. Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*, 2013.
- Merino O, Figueroa E, Cheuquemán C, Valdebenito I, Isachenko V, Isachenko E, Risopatrón J. Short-term storage of salmonids semen in a sodium alginate-based extender. *Andrologia*, 2017, vol. 49, no 5, p. e12661.
- Mesa-Granada MN, Botero-Aguirre MC. La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. 2007.

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESAROLLO RURAL. Dirección de cadenas Pecuarias Pesqueras Y Acuícolas - Cadena De La Acuicultura, 2018 (2018).
- Mira-López TM, Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Valores morfométricos em larvas de yamú *Brycon amazonicus* (Pisces: Characidae) obtenidas com sêmen fresco y crioconservado. *Actualidades Biológicas*, 2007, vol. 29, no 87, p. 203-213.
- Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*, 2012, vol. 64, no 2, p. 71-80.
- Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction*, 2006, vol. 21, no 8, p. 2075-2083.
- Muchlisin ZA, Siti MN. Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation *Cryobiology* p. (2009) 166–169.
- Nadarajah S, Flaaten O. Global aquaculture growth and institutional quality. *Marine Policy*, 2017, vol. 84, p. 142-151.
- Nascimento AF, Maria AN, Pessoa NO, Carvalho MA, Viveiros AT. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal reproduction science*, 2010, vol. 118, no 2-4, p. 324-329.
- Navarro OJ, Santamaría YM, Casallas PE. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2004, vol. 17, no 4, p. 53-59.
- Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez F, De Paz P, Herráez MP. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology*, 2009, vol. 71, no 4, p. 605-613.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949, vol. 164, no 4172, p. 666.
- Ramírez JA, Medina VM, Cruz PE. Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *Revista ORINOQUIA*, 2010, vol 14 - no 1, p. 59-71.

- Ramírez JA, Medina VM, Cruz PE. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Archivos de medicina veterinaria*, 2011, vol. 43, no 2, p. 135-144.
- Robles VM, Guaje-Ramírez DN, Marin-Cossio LC, Sandoval-Vargas LY, Casallas PE. Crioconservación seminal de *Colossoma macropomum* como estrategia de producción y conservación en la Orinoquia Colombiana. *Orinoquía*, 2019, vol. 23, no 1, p. 15-24.
- Rurangwa E, Volckaert FA, Huyskens G, Kime DE, 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, vol. 55, no 3, p. 751-769.
- Shaliutina A, Hulak M, Gazo I, Linhartova P, Linhart O. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Animal reproduction science*, 2013, vol. 139, no 1-4, p. 127-135.
- Suárez RO, Medina VM, Cruz PE. Efecto de dos colectas de semen en una temporada reproductiva sobre la calidad seminal de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2019, vol. 30, no 3, p. 1184-1195.
- Trigo P, Merino O, Figueroa E, Valdebenito I, Sánchez R, Risopatrón J. Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. *Andrologia*, 2015, vol. 47, no 4, p. 407-411.
- Velasco YM, Medina VM, Cruz PE. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*, 2006, vol. 256, no 1-4, p. 264-271.
- Viveiros ATM, Nascimento AF, Orfão LH, Isaú ZA. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 2010, vol. 74, no 4, p. 551-556.

- Zachariassen KE, Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*. 2000; 41: 257-279.
- Zhang Yz, Zhang Sc, Liu Xz, Xu Yy, Wang Cl, Sawant MS, Li J, Chen SL. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*. 2003; 60: 989-996.