

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE

ALIMENTOS

Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero

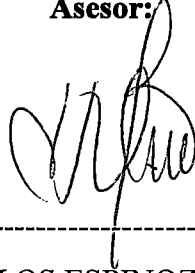
CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ANCHOVETA

PERUANA (*Engraulis ringens*, Jenyns 1842)

CHRISTIAN MICHEL CATCOPARCO SALAZAR

BELLAVISTA, 2009

Asesor:



Mag. CARLOS ESPINOZA PARDO.
Laboratorio de Biología Experimental
Instituto del Mar del Perú

Co asesor:



Ing. ANTONIO MARILUZ FERNANDEZ
Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos
Universidad Nacional del Callao

EL PODER DEL PENSAMIENTO

SI PIENSAS QUE ESTÁS VENCIDO, VENCIDO ESTÁS;
SI PIENSAS QUE NO TE ATREVES, NO LO HARÁS;
SI PIENSAS QUE TE GUSTARÍA GANAR,
PERO QUE NO PUEDES, NO LO LOGRARÁS;

SI PIENSAS QUE PERDERÁS, YA HAS PERDIDO;
PORQUE EN EL MUNDO ENCONTRARÁS
QUE EL ÉXITO COMIENZA
CON LA VOLUNTAD DEL HOMBRE.

TODO ESTÁ EN EL ESTADO MENTAL;
PORQUE MUCHAS CARRERAS SE HAN PERDIDO
ANTES DE HABERSE CORRIDO;
Y MUCHOS S HAN FRACASADO
ANTES DE HABER SU TRABAJO EMPEZADO

PIENSA EN GRANDE Y TUS HECHOS CRECERÁN;
PIENSA PEQUEÑO Y QUEDARÁS ATRÁS;
PIENSA QUE PUEDES Y PODRÁS;
TODO ESTÁ EN EL ESTADO MENTAL.

SI PIENSAS QUE ESTÁS AVANTAJADO, LO ESTÁS;
TIENES QUE PENSAR BIEN PARA ELEVARTÉ;
TIENES QUE ESTAR SEGURO DE TI MISMO
ANTES DE INTENTAR GANAR UN PREMIO;

LA BATALLA DE LA VIDA NO SIEMPRE LA GANA
EL HOMBRE MÁS FUERTE O EL MÁS LIGERO;
PORQUE TARDE O TEMPRANO, EL HOMBRE QUE GANA...
ES AQUEL QUE CREE PODER HACERLO.

(DR. CHRISTIAN BARNARD)

DEDICATORIA

*En primer lugar a Dios, por haberme
dado la existencia y la fuerza para no
claudicar en el difícil inicio de este
duro trabajo, como es la
investigación científica.*

*A mis padres, Miguel y Elsa,
por brindarme su apoyo constante
durante toda mi vida.*

*A mi hermano Ronald, por ser una
persona muy importante en mi vida.*

Agradecimientos

Imaginé este momento muchas veces, conciente de que cuando llegara marcaría por fin, el final de la tesis. Son varias las personas que han contribuido a hacerla posible, y no sé si seré lo suficientemente elocuente o demasiado exagerado para expresar lo agradecido que estoy a todos.

Al Mag. Carlos Espinoza Pardo, asesor de esta tesis, por la confianza puesta en mi persona y por darme la oportunidad de realizarla; por su estímulo, apoyo y su inagotable paciencia durante la fases experimentales y de redacción, sin los cuales la conclusión de este trabajo no hubiese sido posible. Mi agradecimiento por la generosidad con la que ha compartido conmigo sus conocimientos a lo largo de este tiempo.

Al Ing. Antonio Mariluz, co asesor de esta tesis, por las acertadas sugerencias durante la realización de la misma, por ayudarme a resolver las dificultades a cada paso y por tener siempre buena disposición para despejar mis dudas.

A mis compañeras del Laboratorio de Biología Experimental Liz Romero, Paola Cisneros y Raquel Siccha por sus consejos, y además porque me ayudaron en el acondicionamiento y alimentación de los peces.

Al Blgo. Victor Vera, por sus consejos, y por hacerme recordar que de los errores también se aprende algo bueno.

Al personal del Laboratorio de Biología Reproductiva, Betsy, Angel, Javier y Cecilia quienes me brindaron sus instalaciones y diversos materiales que utilicé en el presente trabajo.

Deseo reconocer la ayuda ofrecida por la Mag. Martha Valdivia Cuya y a la Blga. Claudia Rodríguez del Laboratorio de Fisiología de Reproducción Animal de la

UNMSM, quienes me brindaron su experiencia en el tema de congelamiento de células vivas.

A mis amigos de la universidad Luis, Juan, Paul, Antonio, Robinson, Santiago, César, Cinthia, Rocío y del Imarpe Miguel, Karina, Carmela, Yesenia quienes me apuraban por verme frente al atril disertando la tesis, nuevamente gracias por su amistad a pesar del tiempo.

A todos ustedes eternamente agradecidos.

INDICE

Resumen	9
Abstract	10
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	
1. Formulación y definición del problema	11
2. Justificación del problema	12
3. Importancia del problema	12
4. Hipótesis	13
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	
1. Objetivo general	14
2. Objetivos específicos	14
CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO	
1. Antecedentes	15
2. Bases teóricas	17
2.1. Crioprotectores ..	19
2.2. Tasas de congelamiento	21
2.3. Descongelación de muestras criopreservadas	24
3. Definición de términos básicos	25
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Material biológico	27
2. Obtención y acondicionamiento de peces	28
3. Inducción de la espermiación y colección del semen	29
4. Evaluación de la concentración y motilidad espermática del semen fresco	30
5. Determinación de la motilidad espermática post-incubación en diferentes crioprotectores	31
6. Determinación de tasas óptimas de congelamiento en ME2SO	31
7. Efecto del vitelo de huevo de gallina (VHG) como crioaditivo no permeable	33
8. Diseño experimental	

8.1. Motilidad espermática post-incubación en soluciones crioprotectoras ..	34
8.2. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME2SO	34
8.3. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME2SO (1,5 M) y ME2SO (1,5 M) + VHG	34
9. Análisis estadístico	35
CAPÍTULO V: RESULTADOS	
1. Motilidad espermática post-incubación en soluciones crioprotectoras	36
2. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME2SO	37
3. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME2SO (1,5 M) y ME2SO (1,5 M) + VHG	39
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	41
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
1. Conclusiones	45
2. Recomendaciones	45
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46
TABLAS Y FIGURAS	53
FOTOS	58

RESUMEN

Con la finalidad de optimizar las técnicas de reproducción en cautiverio de anchoveta peruana *E. ringens*; se elaboró una metodología de criopreservación de espermatozoides. La investigación fue desarrollada en tres etapas, la primera consistió en evaluar la toxicidad producida por cada crioprotector mediante la evaluación porcentual de motilidad espermática post-incubación en cada uno de ellos. Los crioprotectores utilizados fueron dimetil sulfóxido (ME₂SO), etanol (ET), propilén glicol (PG) y glicerol (GL) a 3 concentraciones diferentes (0,5 M, 1,0 M y 1,5 M); encontrándose diferencias significativas entre el porcentaje de motilidad espermática de los incubados en ME₂SO ($90,0 \pm 4,9$ %) con el de los otros crioprotectores ($p < 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni). La segunda etapa consistió en evaluar 5 diferentes tasas de congelamiento (-10, -20, -30, -40 y -50 °C/min), utilizando sólo ME₂SO a 3 concentraciones (0,5; 1,0 y 1,5 M). El mayor porcentaje de motilidad post-descongelamiento obtenido ($61,3 \pm 7,6$ %) fue al congelar los espermatozoides en 1,5 M ME₂SO a -20 °C/min. Finalmente, en una tercera etapa del estudio se evaluó el efecto de un crioaditivo no permeable (vitelo de huevo de gallina, VHG), con la finalidad de determinar si es posible maximizar los porcentajes de motilidad espermática post-descongelamiento. Se utilizó ME₂SO (1,5 M) + VHG a 10 % v/v pero no se encontró diferencias significativas en los porcentajes de motilidad post-descongelamiento comparado con el tratamiento sin VHG.

Palabras clave: Criopreservación, *Engraulis ringens*, espermatozoides, ME₂SO, tasa de congelamiento

ABSTRACT

In order to optimize the techniques of reproduction of Peruvian anchovy (*Engraulis ringens*) in captivity, a methodology of cryopreservation of spermatozooids was performed. The investigation was developed in three stages, the first consisted of evaluating the toxicity produced by each cryoprotective by means of the percentage evaluation of spermatic motility post-hatching in each of them. The cryoprotectants used were dimetil sulfoxid (ME₂SO), ethanol (ET), propilenglycol (PG) y glycerol (GL), at 3 different concentrations (0,5 M, 1,0 M y 1,5 M); Significant differences were found between percentage of spermatic motility of the incubated in ME₂SO (90,0 ± 4,9 %) versus the other cryoprotectants ($p < 0,05$; t-student with Bonfferroni's correction). The second stage consisted of evaluating 5 different rates of freezing (- 10, -20, -30, -40 and -50 °C/min), using only 3 concentrations (0,5; 1,0 y 1,5 M). The highest percentage of motility post-thawing obtained (61,3 ± 7,6 %) was when freezing the spermatozoa at 1,5 M ME₂SO and -20 °C/min. Finally, in the third step the effect of a nonpermeable cryoaditive was evaluated (yolk of hen egg, VHG), in order to determine if is possible to maximize the percentage of spermatic motility post-thawing. Additionally, ME₂SO (1,5 M) + VHG a 10 % v/v was used but there were no significant differences in the percentage of motility post-thawing compared with the treatment without VHG.

Key words: Cryopreservation, *Engraulis ringens*, spermatozoa, ME₂SO, freezing rate.

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1. FORMULACIÓN Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La reproducción de organismos marinos ocurre bajo ciertas condiciones ambientales, que cuando son alteradas, se modifican inmediatamente los patrones de fecundidad, porcentajes de fecundación, porcentaje de eclosión de huevos, porcentajes de mortalidades de huevos y larvas, etc. La importancia del conocimiento de aquellos procesos en especies de importancia pesquera como la anchoveta peruana *Engraulis ringens*, radica en las consecuencias sobre sus reclutamientos y posterior biomasa de los stocks.

Sin embargo, el conocimiento de los procesos reproductivos de esta especie, requiere también metodologías de investigación con las cuales se tenga un control y monitoreo constante de los ejemplares evaluados; para lo cual, experimentos en cautiverio juegan un rol importante.

Con la finalidad de obtener huevos y larvas de *Engraulis ringens*; para realizar experimentos de sobrevivencia, crecimiento y definición de rangos de tolerancia de factores ambientales en ellos, se vio la necesidad de reproducir a esta especie en cautiverio. Se han utilizado técnicas de inducción hormonal al desove, lográndose obtener bajos porcentajes de huevos fecundados debido a la presencia de asincronía entre la expulsión de gametos de hembras y machos. Por tal motivo se planteó la posibilidad de criopreservar espermatozoides para contar con ellos en el momento adecuado para la fecundación de ovocitos.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que aún no es posible la reproducción espontánea de la anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) en cautiverio, es necesario realizar la inducción del desove mediante inyección de hormonas exógenas (Cisneros *et al.*, 2006). Sin embargo, estas técnicas tienen el problema de asincronía entre el desove de hembras y la expulsión de semen de los machos; por lo que se vio la necesidad de desarrollar técnicas de criopreservación de espermatozoides en esta especie.

Para adoptar las técnicas de criopreservación a una especie, es necesario evaluar y optimizar cada uno de los procesos del congelamiento de células vivas, desde la incubación en los crioprotectores, hasta el congelamiento y descongelamiento de los espermatozoides.

3. IMPORTANCIA

La criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana permitirá tener una herramienta alternativa para afrontar la asincronía ocurrida durante el desove de *E. ringens* en cautiverio, de tal manera que se logre obtener mayores porcentajes de fecundación y en consecuencia mayor cantidad de huevos y larvas. Además, la criopreservación de espermatozoides de *E. ringens* permitirá almacenar, de manera adecuada y durante largos periodos, material necesario para investigaciones en genética.

4. HIPÓTESIS

El semen de *Engraulis ringens* incubado en solución crioprotectora y congelados a una tasa constante, permitirá obtener al menos 50 % de espermatozoides móviles post-descongelamiento.

CAPITULO II: OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Criopreservar espermatozoides de anchoveta peruana *Engraulis ringens* a bajas temperaturas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de diferentes crioprotectores a distintas concentraciones sobre la motilidad de espermatozoides de *E. ringens*.
- Identificar la tasa de congelamiento con la cual se obtenga los mayores porcentajes de motilidad post descongelamiento en espermatozoides de *E. ringens*.
- Evaluar el efecto de vitelo de huevo de ave, como crioprotector no permeable, sobre la motilidad espermática en *E. ringens*.

CAPÍTULO III: MARCO TEORICO

I. ANTECEDENTES

Las técnicas de criopreservación en especies hidrobiológicas se han desarrollado principalmente con fines productivos, encontrándose información bibliográfica desde microalgas (Cañavate y Lubian, 1995; Mortain-Bertrand *et al.*, 1995; Tzovenis *et al.*, 2004; Rhodes *et al.*, 2006), rotíferos (Koehler, 1967; Toledo y Kurokura; 1990; Oliveb y Wang, 1997), moluscos como *Mesodesma donacium* (Joo y Dupré, 2002), *Argopecten purpuratus* (Dupré y Espinoza, 2004), *Crassostrea gigas* (Ieropoli *et al.*, 2004), *Pinctada margaritifera* (Acosta-Salmón *et al.*, 2007), *Pinctada fucata martensii* (Kawamoto *et al.*, 2007) hasta peces.

Existen muchos reportes sobre criopreservación de espermatozoides en peces de agua dulce, principalmente en ciprínidos (Lubzens *et al.*, 1997; Linhart *et al.*, 2000; Akçay *et al.*, 2002; Horváth *et al.*, 2003; Warnecke y Pluta, 2003); salmónidos (Stoss y Holtz, 1983; Lahnsteiner *et al.*, 1997; Babiak *et al.*, 1998; Glogowski *et al.*, 2000; Cabrita *et al.*, 2001; Salte *et al.*, 2004) y carácidos (Fresneda *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004; Martino, 2005; Cruz *et al.*, 2006; Maria *et al.*, 2006).

La bibliografía también es amplia respecto a peces marinos de importancia acuícola como *Scophthalmus maximus* (Dreanno *et al.*, 1997), *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999), *Pseudopleuronectes americanus* (Rideout *et al.*, 2003), *Paralichthys olivaceus* (Zhang *et al.*, 2003), *Latris lineada* (Ritar, 1999), *Thunnus orientalis* (Hwang *et al.*, 2005), *Thamnaconus septentrionales* (Kang *et al.*, 2004), *Macrozoarces americanus* (Yao *et al.*, 2000). Sin embargo no se han reportado trabajos en especies no utilizados en acuicultura, tales como los engraulidos, cuya importancia es pesquera y su reproducción en cautiverio tendría fines experimentales.

La criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana permitirá facilitar su

reproducción en cautiverio para obtener huevos y larvas con la finalidad de realizar pruebas experimentales con ellas.

Actualmente, están estandarizadas las técnicas de captura y acondicionamiento al cautiverio de ejemplares adultos de anchoveta peruana (Espinoza *et al.*, 2008), sin embargo el desove espontáneo en tanques de cría no es posible. Por tal motivo, se utiliza la inducción hormonal mediante la inyección de hormonas exógenas (Cisneros *et al.*, 2006), lo cual ha permitido obtener expulsión tanto de ovocitos como se semen, pero de manera asincrónica. En consecuencia se planteó la criopreservación de espermatozoides como alternativa para solucionar dicho problema.

Sin embargo, la aplicación de técnicas de criopreservación de espermatozoides de una especie a otra requiere de ciertas modificaciones de acuerdo a las características fisiológicas de cada especie. Para ello, los estudios requieren ser realizados en 3 etapas como lo menciona Medina *et al.* (2005): evaluación de sustancias crioprotectoras, estandarización de protocolos de congelación y extrapolación de resultados a otras especies según sus similitudes.

En tal sentido, se planteó la investigación del desarrollo de una técnica de criopreservación de espermatozoides de *E. ringens* en tres etapas, primero, evaluar el efecto de diferentes crioprotectores a distintas concentraciones sobre la motilidad de espermatozoides de anchoveta peruana; segundo, identificar la tasa de congelamiento con la cual se obtenga los mayores porcentajes de motilidad espermática post descongelamiento, y tercero, evaluar el uso de crioaditivos no permeables para maximizar la motilidad espermática post-descongelamiento.

2. BASES TEÓRICAS

La criopreservación es el procedimiento por el cual las células son congeladas a bajas temperaturas con el objetivo de mantener su viabilidad y funcionalidad sin alteraciones por tiempos prolongados. Esta técnica utiliza fenómenos regidos por leyes naturales, cuyo dominio pertenece al campo de la criobiología, ciencia que estudia el comportamiento de organismos biológicos sometidos a temperaturas por debajo de 0 °C.

Según Storey y Storey (1991), la sobrevivencia de estos organismos se basa en dos estrategias: la primera consiste en evitar la exposición a temperaturas por debajo del punto de congelación de los fluidos corporales. Estos animales simplemente eligen lugares de hibernación bastante cálidos, ya sea bajo el agua o a cierta profundidad bajo tierra; como diversos tipos de ranas *Rana sylvatica*, *Hyla crucifer*, *Hyla versicolor*, *Pseudacris triseriata* los cuales excavan el suelo para permanecer por debajo del horizonte de la helada.

La segunda estrategia a la congelación consiste en utilizar adaptaciones específicas que estabilicen el estado líquido a temperaturas inferiores a cero, ya que todas las soluciones acuosas, entre ellas los fluidos corporales tienen un punto de congelación de equilibrio que corresponde a la temperatura a la que un cristal de hielo colocado en una solución empieza a crecer. Pero todas las soluciones acuosas pueden también ser sobre-enfriadas, es decir, pueden enfriarse muy por debajo del punto de congelación de equilibrio sin que por ello el agua se cristalice. Sin embargo, la presencia ciertos compuestos que provocan el crecimiento del hielo denominados nucleadores evitan la extensión de este sobreenfriamiento, por ello para estabilizar el estado líquido, los animales tienen que eliminar estos nucleadores o evitar que estos desencadenen la cristalización general. Los peces marinos polares emplean una estrategia de este tipo, evitando la congelación con

proteínas anticongelantes en sus fluidos corporales. Muchos artrópodos, entre los que se encuentran las arañas y ácaros han desarrollado sus propias proteínas anticongelantes tan potentes que pueden impedir la formación de hielo a temperaturas de hasta - 15 °C. Otros insectos requieren una mayor protección invernal por lo que han desarrollado un anticongelante adicional a base de azúcares o alcoholes de bajo peso molecular; como son el glicerol y el etilenglicol; esto sucede con la oruga de *Epiblema scudderiana*, la cual presenta hasta 40 % de glicerol del total de sus fluidos corporales (Storey y Storey, 1991).

Por lo tanto, para resistir el proceso de congelación, estos organismos deben emplear adaptaciones bioquímicas específicas, una de ellas es el control de la formación de hielo, donde el crecimiento de los cristales de hielo debe iniciarse en los fluidos extracelulares de tal manera que el ritmo de congelación se mantenga lento y el tamaño de los cristales sea pequeño.

Otra condición, implica la protección de la estructura y de las funciones celulares. La membrana celular semipermeable, que separa los compartimentos extracelular e intracelular, permite el libre intercambio del agua y de algunos solutos, pero restringe el movimiento de otros compuestos; de modo que cuando se forma hielo fuera de las células, esto cambia de inmediato el equilibrio de agua y de solutos en el interior de aquellas. A medida que el hielo extracelular se va formando, excluye de sus estructuras solutos tales como sales, azúcares y proteínas. Así, el fluido extracelular restante se hace cada vez mas concentrado. Este proceso supone un estrés osmótico para la célula, porque la concentración total de solutos a ambos lados de la membrana celular debe equilibrarse siempre. En respuesta a dicha tensión del interior de las células fluye agua y los solutos penetran en su interior. Según Storey y Storey (1991), esta salida de agua celular provocada por la formación de hielo extracelular reduce rápidamente el volumen

celular, si el cual se reduce por debajo de un mínimo crítico, entonces la bicapa de fosfolípidos de la membrana se comprime tanto que su estructura se rompe.

Para contrarrestar dichas tensiones sobre la estructura celular, se emplean compuestos químicos denominados crioprotectores.

2.1. Crioprotectores

Las sustancias denominadas crioprotectores, impiden por interacción molecular con el agua, la acción destructiva del congelamiento sobre las células; es decir, las protegen de la formación de cristales de hielo con un grado bajo de toxicidad. Una de las hipótesis en las cuales se basa el efecto de los crioprotectores es que sus características físico-químicas le confieren afinidad por el agua intracelular y de esa forma atrapar la molécula de agua en su interior, lo que impide que el agua forme cristales geométricos ordenados. En consecuencia, la solidificación del medio se establece con una distribución molecular desordenada del agua y la sustancia toma el carácter de sustancia vítrea protectora (Hubalek, 2003).

Los crioprotectores se clasifican según la permeabilidad del compuesto crioprotector a través de la membrana celular; pudiendo ser crioprotectores permeables o crioprotectores no permeables.

En el primer grupo, se encuentran las sustancias que poseen bajos pesos moleculares y que, por lo tanto, penetran al citoplasma celular. Estas protegen a las células de posibles daños causados cuando la tasa de congelación es lenta, siendo los más utilizados el glicerol, el ME_2SO , metanol, etanol, etilenglicol y propilenglicol.

El ME_2SO y el metanol han sido los más utilizados en criopreservación de espermatozoides de peces marinos, obteniéndose mejores resultados con el ME_2SO (Suquet *et al.*, 2000).

La acción crioprotectora del ME_2SO se atribuye principalmente a prevenir la

acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y también reducir la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana. Su bajo peso molecular permite la rápida entrada a través de la membrana celular (García, 1984; Suquet *et al.*, 2000), modula la estabilidad de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Sin embargo, se ha sugerido interacciones electrostáticas de ME₂SO con fosfolípidos de la membrana, lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la misma (Porcu, 2001; Suquet *et al.*, 2000).

El propilenglicol, ha sido utilizado principalmente para congelación de blastocistos y embriones en estado de pre-implantación en humanos y otras especies (Porcu, 2001).

Utilizando el glicerol se ha logrado obtener buenos resultados en la protección de células espermáticas de dorada *Sparus aurata* (Gwo, 1994) pero su protección fue mínima al utilizarla en el turbot (*Scophthalmus maximus*) (Dreanno *et al.*, 1997, Suquet *et al.*, 2000).

Los crioprotectores no permeables, son sustancias de alto peso molecular efectivas a altas tasas de congelación, son utilizados para remover mediante ósmosis el agua intracelular reemplazándola por los crioprotectores permeables durante el enfriamiento y adicionalmente para prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Medina *et al.*, 2005), son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular. Los utilizados en especies marinas son sacarosa (Gwo, 1991; 1998, Dreanno, 1997) y glucosa (Gwo *et al.*, 2005).

Otro tipo de crioprotectores no penetrantes son las lipoproteínas presentes en la yema de huevos de aves, las cuales se utilizan para prevenir daños en la membrana plasmática (Scott y Baynes, 1980 citado en Suquet *et al.*, 2000). Cabrita *et al.* (1998), sugirieron

que estos aditivos incrementan la resistencia de la membrana celular ante el estrés osmótico producido durante el congelamiento-descongelamiento de espermatozoides de trucha arco iris.

2.2. Tasa de congelamiento

Durante el proceso de enfriamiento y congelación, las células están sujetas a cambios físicos y químicos de su medio. Uno de estos cambios sucede intracelularmente cuando el agua en fase líquida pasa a sólida en forma de cristales (Medina *et al.*, 2005). Por debajo de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ la célula aún permanece sin congelar debido al sobreenfriamiento y depresión del punto de congelamiento ocasionado por la gran cantidad de solutos presentes. Entre -5 y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ se forma hielo extracelular, pero el contenido celular permanece sin congelar y sobreenfriado, probablemente debido a que la membrana plasmática bloquea la formación de cristales de hielo dentro de la célula. Como consecuencia de la formación de hielo extracelular, el potencial químico extracelular se hace mayor y el agua intracelular fluye hacia el exterior donde se congela (Mazur, 1977).

La posibilidad en que se formen cristales de hielo grandes o pequeños depende de la velocidad con que el agua fluya a través de la membrana celular, cumpliendo la tasa de congelamiento un rol importante en ello (Mazur, 1984). Sin embargo, los procesos de ósmosis ocasionados por los cambios de potencial químico generados por la formación de hielo dependen, en primera instancia, de la permeabilidad de la membrana, así como del efecto que pueda tener cada crioprotector, los cuales son especie-específico (Glowoski *et al.*, 1999). Por lo tanto, la tasa de congelamiento óptima para un determinado tipo de célula varía de acuerdo a la permeabilidad que tenga la membrana celular al agua y al crioprotector utilizado.

Según Mazur *et al.* (1972), si la tasa de congelamiento es inferior al óptimo, la célula sufrirá daños por efectos osmóticos, ya que se formarán cristales de hielo de gran tamaño; debido a que hay tiempo suficiente para que mayor cantidad de moléculas de agua se agreguen a los cristales de hielo en formación. Luego aumenta la concentración de solutos en el agua extracelular que permanece sin congelar y, como respuesta de la célula, se produce un flujo de agua hacia fuera de ella para igualar concentraciones entre el medio intra y extra celular. Por lo tanto, la célula se deshidrata en exceso, lo cual genera un arrugamiento de la membrana plasmática que sobrepasa su límite de flexibilidad y termina por romperse. Por otro lado, las tasas de congelamiento superiores al óptimo, conllevan al congelamiento intracelular inmediato. Este hecho se produce debido a que el tiempo es insuficiente para que la célula pueda perder el agua que le permita un equilibrio entre el potencial químico de los medios intra y extracelular. La congelación rápida permite que se formen mayor cantidad de centros de nucleación, formándose sólo cristales de hielo muy pequeños, tanto intra como extracelulares.

Posiblemente las moléculas del crioprotector se estarían adsorbiendo a la periferia de los cristales de hielo, uniéndose a ellos quizá mediante puentes de hidrógeno e impidiendo que más moléculas de agua se unan a este pequeño núcleo de hielo (Zachariassen y Kristiansen, 2000). Esta forma de evitar el crecimiento de los cristales de hielo, sería muy similar a la que proponen Storey y Storey (1991) para las proteínas anticongelantes en especies ectotérmicas que soportan temperaturas inferiores al punto de congelamiento de sus fluidos orgánicos.

Por otro lado, la tasa de congelación es una de los factores más críticos en el proceso de criopreservación de semen, esta es la variable menos estandarizada en los estudios de

criopreservación seminal en peces (Rana, 1995), ya que con algunas especies un congelamiento lento es mas eficaz que un congelamiento rápido.

Este proceso se puede clasificar de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento en protocolos de congelación rápida y descongelación lenta o congelación lenta y descongelación rápida; en las cuales la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable.

La congelación ultra-rápida o vitrificación no requiere la utilización de un congelador programable; se basa en la congelación rápida en una mezcla de altas concentraciones de crioprotectores, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un sólido amorfo, sin formación de hielo (Ávila-Portillo *et al.*, 2006); este tipo de pruebas fue descrita para la congelación de embriones por Trouson en 1986 e implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente ME_2SO y sacarosa, seguida de inmersión directa en nitrógeno líquido.

La congelación espermática se puede realizar utilizando los vapores de nitrógeno para luego sumergir totalmente la muestra en el nitrógeno líquido; es probablemente la técnica más utilizada en peces (Suquet *et al.*, 2000) y la cual se utilizó en el presente trabajo. Muchos trabajos han utilizado este método el cual consiste en suspender las muestras de espermatozoides sobre vapores de nitrógeno por un periodo adicional antes de sumergirlas definitivamente dentro del nitrógeno líquido. Los principales problemas incluyen tasas de enfriamiento no uniformes entre alícuotas y dificultades en mantener reproducibles las condiciones de congelación. (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

2.3. Descongelación de muestra criopreservada

El crecimiento de los cristales de hielo no termina con el congelamiento. Cuando empieza el descongelamiento puede ocurrir la recristalización, es decir, seguir

agregándose más moléculas de agua a los microcristales ya formados; lo cual ocurre sólo dentro de cierto rango de temperatura, que es entre -15 y -60 °C (Mazur, 1984).

La descongelación muestra ser uno de los parámetros más sensibles durante la criopreservación de espermatozoides. Los rangos de temperaturas de descongelación de células son diferentes dentro y entre especies. Es probable que las temperaturas óptimas puedan estar relacionadas directamente con las temperaturas del agua en la cual los peces desovan; es decir, temperaturas de descongelación más bajas para peces de agua fría y más altas para peces de agua cálida, lo que podría estar influenciado por las características de distribución de los fosfolípidos en la membrana espermática (Medina *et al.*, 2005).

La descongelación se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30 °C para evitar la recristalización de las células. Las temperaturas utilizadas para la descongelación de espermatozoides de especies marinas se encuentra entre 10 y 40 °C (Suquet *et al.*, 2000); mientras que para especies de agua dulce, generalmente entre 30 y 80 °C (Rana, 1995)

3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Criopreservación: Procedimiento utilizado para preservar y almacenar células vivas por congelación.

Crioprotectores: Compuestos que impiden el daño celular durante los procesos sucesivos de congelación y descongelación; son agentes muy solubles en agua y poco tóxicos.

Espermatozoide: Célula reproductiva móvil y haploide de animales del género masculino y de algunas plantas y protistas.

Gónada: Es la glándula productora de gametos; puede ser ovario en hembras o testículo en machos.

Hipófisis (pituitaria): Es una glándula situada en la base del cerebro, que produce y libera diferentes hormonas incluidas FSH, LH y prolactina.

Hipotálamo: Es una región del encéfalo situada en la base del cerebro, unida por un tallo nervioso a la hipófisis y en la que residen centros importantes para la vida vegetativa. Segrega diferentes hormonas, entre ellas las liberadoras de gonadotrofinas. Estas hormonas estimulan la producción de gonadotropinas por la hipófisis.

Hormona: Sustancia secretada por glándulas endocrinas específicas del cuerpo, que pasan directamente a la corriente sanguínea. Las hormonas tienen un efecto regulador o estimulante en uno o varios órganos y pueden activar varios procesos bioquímicos.

Hormonas gonadotróficas (Gn): Sustancias secretadas por la hipófisis, cuyo principal órgano blanco son las gónadas. Son la hormona luteinizante y hormona folículo estimulante. La misma terminología es dada en peces debido a su estructura y función homólogas a las de humano.

Hormona Liberadora de gonadotropinas (GnRH): Una sustancia secretada cada aproximadamente noventa minutos por el hipotálamo. Esta estimula la liberación de LH y FSH por la hipófisis; los que a su vez estimulan la maduración de las gónadas.

GnRHa: Análogo de hormona liberadora de gonadotropina.

Membrana plasmática: Membrana superficial semipermeable que envuelve al contenido de las células y que deben cruzar todos los materiales que entran o salen de las células.

Metabolismo: El conjunto de reacciones químicas que se producen en las células vivas. Suma de los procesos físicos y químicos por el que se producen y conservan los sistemas vivos. Transformaciones por las que quedan disponibles la energía y materia para su empleo por el organismo.

Motilidad espermática: La capacidad de nadar que presentan los espermatozoides.

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Experimental del Instituto del Mar del Perú, localizado en la provincia constitucional del Callao, durante el periodo Enero del 2007 - Febrero del 2008.

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Taxonomía de Anchoveta Peruana (Engraulis ringens)

Reino:	Animalia
Phylum:	Chordata
Clase:	Actinopterygii
Orden:	Clupeiformes
Familia:	Engraulidae
Género:	<i>Engraulis</i>
Especie:	<i>ringens</i>
Nombre Común:	Anchoveta peruana, peladilla (juveniles)
Nombre Inglés:	Peruvian anchovy

Símil de Importancia Internacional: *Engraulis japonicus* (Japón), *Engraulis mordax* (E.E.U.U.), *Engraulis encrasicolus* (Europa).

Morfología: El dorso de este pez presenta una pigmentación de tono verde claro brillante que se hace más oscuro y azulino en los individuos adultos, mientras que la zona lateral y ventral son de color plateado brillante. Las aletas pectorales, dorsales y ventrales son de tonos claros y la caudal oscura, casi negra. No muestran diformismo sexual externo.

Reproducción: La anchoveta tiene sexos separados, alcanza su madurez sexual a los 12 cm y fecundación externa. El desove de la anchoveta abarca casi todo el año, con dos periodos de mayor intensidad, el principal en invierno (Agosto-Septiembre) y otro en el verano (Febrero-Marzo).

Distribución geográfica: Desde Punta Aguja (Perú) hasta Talcahuano (Chile).

Localización de la Pesquería en el Perú: Todo el litoral peruano, distribuido en dos grandes zonas de pesca, Norte-Centro (de Tumbes a Pisco) y Sur (de Pisco a Tacna).

Medidas de ordenación: Vedas, talla mínima de captura, tamaño de malla, cuota de captura.

2. OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS PECES

Se trabajó en total con 126 ejemplares adultos de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) con tallas entre 14,5 – 16,5 cm de longitud (Tabla1); los cuales fueron capturados en la Bahía del Callao por medio de un sistema de red izada y luces de atracción adaptado al Buque de Investigación Científica SNP-2 perteneciente al IMARPE según metodología descrita por Espinoza *et al.* (2008) (Foto 1a, 1b).

Los rastreos acústicos se iniciaron desde el atardecer, una vez ubicados los cardúmenes de anchoveta se procedió a fondear el barco y lanzar la red. Inmediatamente después, se colocó el transductor del ecosonda portátil en el centro del área de pesca de la red y se encendieron las luces para conseguir la agregación de peces. Posteriormente, se levantó la red y los peces fueron colectados con redes de mano (Foto 1c) y colocados en tanques de fibra de vidrio de 300 L de capacidad, los cuales se mantuvieron con aeración y circulación del agua permanentes mediante una bomba de vacío MINIPORT y una bomba de agua sumergida RULER 1500 respectivamente (Foto 1d y 1e).

A continuación, los peces fueron trasladados al muelle del IMARPE y transferidos a tanques de 10 m³ de capacidad en el LBE para su acondicionamiento al cautiverio (Foto 1f), según metodología descrita por Espinoza *et al.* (2008). Dichos tanques formaron parte de un sistema de recirculación de agua; donde la temperatura se mantuvo constante ($16,5 \pm 0,2$ °C) utilizando una bomba de calor de 3 HP. Además, se aplicó un fotoperiodo de 10 horas luz (08:00 horas – 18:00 horas) y 14 horas oscuridad.

La alimentación de los peces fue *ad libitum* en tres raciones diarias (9:00; 13:00 y 17:00 h), utilizando un suplemento alimenticio en polvo, LARVAL AP100 ®, el cual fue reemplazado gradualmente por alimento extruído crecimiento KR2 Nicovita ®. A los 30 días posterior a la captura, los peces fueron desparasitados mediante baños de formaldehído (250 mg L⁻¹) durante 60 minutos y posteriormente transferidos a tanques de 2 m³ hasta alcanzar su maduración gonadal.

3. INDUCCIÓN DE LA ESPERMIACIÓN Y COLECCIÓN DEL SEMEN

Los peces fueron anestesiados mediante baños en solución de tricafina (MS-222) a una concentración de 80 mgL⁻¹ durante 3 minutos (Foto 2a), una vez adormecidos los individuos, se procedió a determinar el peso de cada uno para calcular el volumen de hormona (*acetato de buserelina*) a inyectar (Foto 2b). Éste se administró a los peces mediante una inyección intraperitoneal, en dosis de 0,01 µg g⁻¹ de pez (Foto 2c), las cuales se aplicaron utilizando agujas hipodérmicas calibre 29.

Luego de la inyección los peces fueron colocados en un tanque de 300 L con aeración permanente y a la misma temperatura que en el periodo de acondicionamiento.

A las 12 horas post-inyección se realizó una ligera presión abdominal en sentido cráneo caudal a cada pez, con la finalidad de obtener la muestra de semen. Mediante el uso de

una micropipeta automática, se extrajo 10 μL de semen teniendo cuidado de no contaminarlo con agua, orina o heces, ya que de lo contrario la motilidad espermática hubiese sido afectada (Dreanno *et al.*, 1998; Poupard *et al.*, 1998) (Foto 2d).

4. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN FRESCO

Una vez obtenida la muestra de semen (10 μL), se procedió a colocarla en una cámara de cultivo celular conteniendo 90 μL de solución salina (al 0,9 %), para mantener en inactividad a los espermatozoides. Posteriormente, se extrajo 5 μL de la muestra mezclada en solución salina para ser nuevamente diluida en 195 μL de solución salina donde permaneció durante 10 minutos (tiempo de incubación). Transcurrido este tiempo, se extrajo 5 μL de la segunda dilución para colocarla en 95 μL de agua de mar y activar los espermatozoides para analizar la motilidad y concentración espermática bajo microscopía óptica en una cámara de Neubauer.

5. DETERMINACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA POST-INCUBACIÓN EN DIFERENTES CRIOPROTECTORES

La finalidad fue descartar los crioprotectores en el cual los porcentajes de motilidad espermática sean bajos con respecto a los obtenidos con semen fresco. Para ello, se evaluó la motilidad espermática post-incubación en 4 diferentes agentes crioprotectores (ME_2SO , propilenglicol, glicerol, etanol) a tres concentraciones diferentes (0,5 M; 1,0 M y 1,5 M). Cada muestra de semen tuvo su muestra control.

Los peces fueron anestesiados en baños de MS-222, para posteriormente inyectar la dosis de *acetato de buserelina* y extraer la muestra de semen siguiendo los pasos indicados en el punto anterior.

Luego de obtenida la muestra de semen, ésta se diluyó en solución salina y luego una alícuota de la mezcla se incubó en cada crioprotector y concentración de los mismos. El tiempo de incubación en los diferentes crioprotectores fue de 10 minutos, luego del cual la muestra obtenida fue diluida en agua de mar para activar a los espermatozoides y analizar su motilidad a los 0, 5 y 10 min. El porcentaje de espermatozoides móviles se evaluó bajo microscopía óptica con un aumento de 400x.

6. DETERMINACIÓN DE TASAS ÓPTIMAS DE CONGELAMIENTO EN ME₂SO

Luego de obtener una muestra de semen de 10 μL , ésta se diluyó en 90 μL solución salina y de ésta mezcla se tomó una alícuota de 5 μl para colocarla en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidad, el cual contenía 195 μL de la solución crioprotectora (solución salina + ME₂SO) en 3 diferentes concentraciones. El tiempo de incubación fue de 10 minutos.

Posteriormente se procedió a congelar las muestras a 5 tasas diferentes de congelamiento (-10, -20, -30, -40 ó -50 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$); utilizando para ello un equipo de congelamiento mecánico según modelo descrito por Dupré y Espinoza (2004) (Foto 3a). Este equipo consta de un termo de nitrógeno líquido de boca ancha de 2 L de capacidad, una polea graduada que permite regular el movimiento de una placa portamuestras (Foto 3b). La polea se marcó con divisiones de 1 mm para poder determinar las velocidades de descenso ($\text{div}\cdot\text{min}^{-1}$), las cuales se transformaron a tasa de congelamiento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Antes de cada congelamiento, el termo fue llenado con 500 mL de nitrógeno líquido y mantenido cerrado durante 15 min para que la temperatura se estabilice. En la placa portamuestras del congelador se colocaron tubos de microcentrífuga conteniendo las muestras de semen en solución crioprotectora, ésta placa se mantuvo sobre la superficie del termo de nitrógeno líquido, durante 5 min antes de iniciar el congelamiento, donde

la temperatura fue 5 °C (Foto 3c). Luego, las muestras fueron introducidas en el termo a una velocidad constante hasta llegar a 1 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido donde permanecieron otros 5 min. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron sumergidas completamente en el nitrógeno líquido para luego ser transferidas y almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido de 35 L de capacidad (Foto 3d).

Después de 7 días, las muestras fueron extraídas del nitrógeno líquido y fueron descongeladas, sumergiendo los tubos de microcentrífuga en un recipiente conteniendo agua de mar a 40 °C durante 30 s y luego en otro recipiente con agua de mar a 16 °C hasta descongelarse completamente.

Una vez descongelada la muestra, se extrajo 5 µL de cada tubo de microcentrífuga y se colocó en una cámara de cultivo celular conteniendo 95 µL de agua de mar para su dilución y activación espermática (Foto 3e). Se calculó el porcentaje de espermatozoides móviles a los 0, 5 y 10 min post descongelación (Foto 3f).

7. EFECTO DEL VITELO DE HUEVO DE GALLINA (VHG) COMO CRIADITIVO NO PERMEABLE

Para ello se preparó una solución crioprotectora con 1,5 M de ME₂SO (SC 1) y otra con 1,5 M de ME₂SO + 10 % (v/v) VHG (SC 2).

La mezcla de VHG + ME₂SO en solución fue centrifugada a 1000 rpm durante 10 min y se descartó el precipitado para almacenar el sobrenadante a 5 °C hasta su posterior uso.

El procedimiento del manejo de los peces fue similar al seguido en las pruebas anteriores. Luego de obtener una muestra (10 µL), ésta se colocó en 90 µL de solución salina y de ésta mezcla se tomó una submuestra de 5 µl para colocarla en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidad conteniendo 195 µL de la SC 1 ó SC 2, según

sea el caso. Luego, se procedió a congelar las muestras a 5 tasas diferentes de congelamiento (-10, -20, -30, -40 ó -50 °C·min⁻¹) y descongelándolas según la metodología descrita en el punto anterior, para finalmente analizar el porcentaje de espermatozoides móviles a los 0; 5 y 10 min post descongelamiento.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1. Motilidad espermática post-incubación en soluciones crioprotectoras

	C1				C2				C3				C4			
	CC1	CC2	CC3	C	CC1	CC2	CC3	C	CC1	CC2	CC3	C	CC1	CC2	CC3	C
t1																
t2																
t3																

pez 1 x 9

pez 2 x 9

pez 3 x 9

pez 4 x 9

= 36 peces.

8.2. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME₂SO

	T1				T2				T3				T4				T5			
	CC1	CC2	CC3	C	CC1	CC2	CC3	C	CC1	CC2	CC3	C	CC1	CC2	CC3	C	CC1	CC2	CC3	C
t1																				
t2																				
t3																				

pez 5 x 9

pez 6 x 9

pez 7 x 9

pez 8 x 9

pez 9 x 9

= 45 peces

8.3. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME₂SO

(1,5 M) y ME₂SO (1,5 M) + VHG

	T1			T2			T3			T4			T5		
	ME ₂ SO	ME ₂ SO + VHG	C	ME ₂ SO	ME ₂ SO + VHG	C	ME ₂ SO	ME ₂ SO + VHG	C	ME ₂ SO	ME ₂ SO + VHG	C	ME ₂ SO	ME ₂ SO + VHG	C
t1															
t2															
t3															

pez 10 x 9

pez 11 x 9

pez 12 x 9

pez 13 x 9

pez 14 x 9

= 45 peces

9. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó la normalidad de los datos utilizando el Test de Lilliefors y la homogeneidad de varianzas con el Test de Cochran. En todos los test estadísticos se consideró un nivel de significancia de 0,05 y para ello se utilizó el programa SYSTAT 8.0 para Windows.

Para determinar diferencias significativas de los porcentajes de motilidad espermática post incubación en diferentes crioprotectores se utilizó t-student con corrección de Bonferroni.

En la prueba de evaluación de motilidad espermática post tratamiento a diferentes tasas de congelamiento utilizando ME₂SO como crioprotector a diferentes concentraciones se utilizó ANDEVA y el test de Tukey para las comparaciones entre tasas de congelamiento dentro de la misma concentración de crioprotector, mientras que t-student con corrección de Bonferroni para las comparaciones entre pruebas de diferentes concentraciones para cada tasa de congelamiento.

Finalmente, para analizar la motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento de las pruebas con crioaditivo, se utilizó ANDEVA y el test de Tukey para las comparaciones de diferentes tasas de congelamiento dentro del mismo crioprotector, y t-student para las comparaciones entre crioprotectores de la misma tasa de congelamiento.

CAPÍTULO V: RESULTADOS

1. Motilidad espermática post-incubación en soluciones crioprotectoras

A 0,5 M

A los 0 minutos, los valores de motilidad espermática variaron entre 60 y 90 %, observándose diferencias significativas sólo entre los resultados en ME₂SO y GL (90,0 ± 4,9 % y 66,2 ± 3,8 % respectivamente) ($p < 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni). A los 5 minutos, los mayores porcentajes de motilidad se obtuvieron en PG y ME₂SO (94,8 ± 3,4 % y 73,4 ± 10,0 % respectivamente) sin encontrarse diferencias significativas entre ambos valores ($p > 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni). A los 10 minutos, los valores obtenidos con PG (96,4 ± 15,8 %) fueron mayores que con el resto de crioprotectores, excepto a los obtenidos con ME₂SO (54,1 ± 13,8 %) ($p < 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni) (Figura 1).

A 1,0 M

El porcentaje de motilidad espermática a los 0 minutos post incubación en ME₂SO (84,0 ± 4,7 %) fue significativamente diferente a los obtenidos con los otros crioprotectores ($p < 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni). A los 5 y 10 minutos post incubación en ME₂SO, los valores de motilidad espermática se mantuvieron por encima del 50 % mientras que con los demás crioprotectores se obtuvieron valores menores al 40 % (Figura 1).

A 1,5 M

Los valores de motilidad espermática a los 0 y 5 minutos post incubación en ME₂SO (70,3 ± 4,3 % y 42,9 ± 6,1 % respectivamente) fueron significativamente diferentes a los obtenidos con los otros crioprotectores ($p < 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni). Los valores de motilidad espermática a los 10 minutos post incubación en

los 4 crioprotectores fueron menores al 20 %, no encontrándose diferencias significativas entre ellos ($p>0,05$; t-student con corrección de Bonferroni) (Figura 1).

2. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME₂SO

A los 0 minutos

El mayor porcentaje de motilidad espermática obtenido fue $61,3 \pm 7,6$ % utilizando como medio de incubación 1,5 M de ME₂SO a la tasa de congelamiento de 20 °C/min, este valor no fue significativamente diferente al porcentaje de espermatozoides móviles incubados en 1,0 M de ME₂SO a la misma tasa de congelamiento ($46,5 \pm 8,1$ %) ($p>0,05$; t-student con corrección de Bonferroni) (Figura 2).

Empleando las tasas de congelamiento de 30 y 40 °C/min y utilizando 1,5 M de ME₂SO se alcanzaron porcentajes de motilidad espermática de $51,7 \pm 9,7$ % y $53,8 \pm 4,9$ % respectivamente, estos valores fueron significativamente diferente al incubar espermatozoides a 1,0 M de ME₂SO aplicando las mismas tasas de congelamiento ($22,9 \pm 5,8$ % y $28,01 \pm 3,6$ % respectivamente) ($p<0,05$; t-student con corrección de Bonferroni) (Figura 2).

Al utilizar 0,5 M de ME₂SO los porcentajes de motilidad no lograron sobrepasar el 15% con ninguna de las tasas de congelamiento.

Utilizando la tasa de congelamiento de 50 °C/min a las tres concentraciones diferentes de ME₂SO se obtuvieron porcentajes de espermatozoides móviles menores al 23% (Figura 2).

A los 5 minutos

El mayor porcentaje de motilidad espermática observado fue $41,7 \pm 7,3$ % utilizando 1,5 M de ME₂SO a la tasa de congelamiento de 20 °C/min, este valor no fue significativamente diferente al porcentaje de espermatozoides móviles incubados en 1,0

M de ME₂SO a la misma tasa de congelamiento ($31,1 \pm 9,3$ %) ($p > 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni) (Figura 2).

Empleando las tasas de congelamiento de 30 y 40 °C/min y utilizando ME₂SO a 1,5 M se obtuvieron porcentajes de motilidad espermática de $35,5 \pm 8,3$ % y $34,8 \pm 7,5$ % respectivamente, estos valores fueron significativamente diferente al incubar espermatozoides sobre ME₂SO a 1,0 M donde los valores fueron menores al 20 % ($p < 0,05$; t-student con corrección de Bonferroni) (Figura 2).

Al utilizar ME₂SO al 0,5 M en las diferentes tasas de congelamiento los porcentajes de motilidad no lograron sobrepasar el 5 %.

Utilizando la tasa de congelamiento de 50 °C/min a las tres concentraciones diferentes de ME₂SO se obtuvieron porcentajes de espermatozoides móviles menores al 10 % (Figura 2).

A los 10 minutos

En este caso los valores porcentuales de motilidad espermática no superaron el 25 % a excepción de los espermatozoides móviles incubados en ME₂SO empleando las tasas de congelamiento de 30 y 40 °C/min ($24,2 \pm 7,1$ % y $25,3 \pm 10,0$ % respectivamente) (Figura 2).

3. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME₂SO (1,5 M) y ME₂SO (1,5 M) + VHG

A los 0 minutos

Los porcentajes de motilidad espermática incubados en ME₂SO fueron mayores con las tasas de congelamiento de 20, 30 y 40 °C/min ($61,3 \pm 7,6$ %; $51,7 \pm 9,7$ % y $53,8 \pm 4,9$ % respectivamente) los cuales fueron significativamente diferentes a los obtenidos con 10 y 50 °C/min ($14,8 \pm 6,7$ % y $22,3 \pm 7,9$ % respectivamente) (ANDEVA, Test de

Tukey, $p < 0,05$). Por otro lado, al adicionar VHG a la solución crioprotectora ($\text{ME}_2\text{SO} + \text{VHG}$) los porcentajes de motilidad espermática fueron mayores con la tasa de 40 °C/min ($63,5 \pm 4,9 \%$), valor significativamente diferente a los obtenidos con las tasas de congelamiento de 10, 20 y 50 °C/min con los cuales se obtuvieron valores menores al 15 %. (ANDEVA, Test de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 3).

Al comparar los porcentajes de motilidad de espermatozoides incubados en ME_2SO y los incubados en $\text{ME}_2\text{SO} + \text{VHG}$ se observaron diferencias significativas solo con la tasa de congelamiento a 20 °C/min, estos valores fueron $61,3 \pm 6,6 \%$ y $32,9 \pm 7,6 \%$ respectivamente ($p < 0,05$; t-student) (Figura 3).

A los 5 minutos

Al igual que en el caso anterior, los porcentajes de motilidad espermática incubados en ME_2SO fueron mayores con las tasas de congelamiento de 20, 30 y 40 °C/min ($42,4 \pm 7,3 \%$; $35,4 \pm 8,3 \%$ y $34,8 \pm 7,5 \%$ respectivamente) los cuales fueron significativamente diferentes a los obtenidos con 10 y 50 °C/min ($4,2 \pm 2,9 \%$ y $10,4 \pm 5,8 \%$ respectivamente) (ANDEVA, Test de Tukey, $p < 0,05$). Por otro lado, al adicionar VHG a la solución crioprotectora ($\text{ME}_2\text{SO} + \text{VHG}$) los porcentajes de motilidad espermática fueron mayores con la tasa de 40 °C/min ($47,6 \pm 7,8 \%$), valor significativamente diferente a los obtenidos con las tasas de congelamiento de 10; 20; 30 y 50 °C/min ($2,0 \pm 1,9 \%$; $11,2 \pm 3,5 \%$; $32,6 \pm 4,7 \%$ y $2,0 \pm 1,5 \%$ respectivamente) (ANDEVA, test de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 3).

Al comparar los porcentajes de motilidad de espermatozoides incubados en ME_2SO y los incubados en $\text{ME}_2\text{SO} + \text{VHG}$ solo se obtuvo diferencias significativas en la tasa de congelamiento a 20 °C/min, estos valores fueron $42,4 \pm 7,3 \%$ y $11,2 \pm 3,5 \%$ respectivamente ($p < 0,05$; t-student) (Figura 3).

A los 10 minutos

En este caso los valores porcentuales de motilidad espermática no superaron el 25 % a excepción de los espermatozoides móviles incubados en ME₂SO + VHG empleando la tasa de congelamiento de 40 °C/min donde el promedio fue $33,6 \pm 7,5$ %

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

El ME₂SO demostró ser más eficiente durante las pruebas de toxicidad y congelamiento de espermatozoides de *Engraulis ringens*, respecto al ET, GL y PG; ya que utilizando este crioprotector en sus diversas concentraciones se logró obtener hasta 90 % de motilidad espermática. Por otro lado al utilizar ET, GL o PG como agentes crioprotectores se logró conseguir porcentajes de motilidad espermática hasta 80 %, pero a concentraciones mas altas los porcentajes de espermatozoides móviles disminuían hasta su totalidad, este resultado no aseguraba una protección durante el congelamiento. Esto se debería a que el ME₂SO es una molécula de mayor tamaño que el ET, GL y PG, la cual podrían estar atravesando las membranas con menor velocidad que los otros, permitiendo tasas de deshidratación más lenta que con los otros crioprotectores. Ello evita que origina el rompimiento de las membranas por arrugamiento de ella (Meryman, 1971).

Por tal motivo, se utilizó el ME₂SO como agente crioprotector para las pruebas de congelamiento de espermatozoides de *E. ringens*, mostrando ser un eficiente crioprotector tal como sucede en otras especies marinas, *Enineohelus malabaricus* (Gwo J., 1993), *Macrozoarces americanus* (Yao *et al.*, 2000), *Scophthalmus maximus* (Chen *et al.*, 2004) y *Paralichthys olivaceus* (Zhang *et al.*, 2003).

Durante las pruebas de congelamiento, se determinó que el mayor porcentaje de motilidad espermática ($61,3 \pm 7,6$ %) obtenido en *E. ringens* fue al utilizar el ME₂SO a 1,5 M. Estos resultados son similares a los obtenidos en otras especies marinas como *Scophthalmus maximus* donde se utilizó 15 % de concentración de ME₂SO (Dreanno *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2004) ($63,3 \pm 4,6$ % y $71,7 \pm 2,9$ % respectivamente) o a los obtenidos en *Epinephelus malabaricus* donde se obtuvieron porcentajes de motilidad espermática entre 50 y 70 % al incrementar la concentración de 10 a 20 % (Gwo, 1993).

En *Thunnus orientalis*, utilizando concentraciones entre 10 y 20 % de ME₂SO se obtuvieron resultados de $68,3 \pm 7,5$ % y $93,3 \pm 8,2$ % de motilidad espermática respectivamente (Gwo *et al.*, 2005). Esto sugiere que a mayores concentraciones de ME₂SO habría mayor acción crioprotectora contra la formación de hielo durante el congelamiento.

Se puede inferir entonces, que la incubación de espermatozoides de *E. ringens* en ME₂SO a 1,5 M no tiene un efecto tóxico, sino más bien un incremento de la protección de las células durante el congelamiento-descongelamiento de espermatozoides de anchoveta peruana.

Con la finalidad de optimizar los resultados obtenidos con ME₂SO sólo, se evaluó el efecto de un crioaditivo no permeable. Esto podría suceder ya que dichos crioprotectores no permeables o extracelulares cumplen diferentes funciones de protección complementarias al de los crioprotectores permeables o intracelulares durante el proceso de criopreservación, tales como disminución del punto de fusión (Rana, 1995), servir como buffers osmóticos (Mc Williams *et al.*, 1995) durante el congelamiento y descongelamiento, o posiblemente fortalecer la membrana celular. Muchos autores han reportado mejores resultados de motilidad espermática post descongelación al utilizar ambos tipos de crioprotectores, respecto al uso de crioprotectores permeables solos. Se han utilizado crioprotectores no permeables como sacarosa (Babiak *et al.*, 1998), VHG (Dreanno *et al.* 1997, Glowoski *et al.*, 1999; Dupré y Espinoza, 2004), leche descremada liofilizada (Leung, 1987; Sztejn *et al.*, 2001); glucosa + NaCl (Gwo *et al.*, 2005). En especies de agua dulce los crioprotectores no permeables como proteínas (BSA) o lipoproteínas (VHG) son mayormente usados para prevenir daños sobre la membrana celular (Scott y Baynes, 1980).

Sin embargo, en otras especies marinas como *Clupea pallasii*, la adición de 10 % de VHG no permitió un incremento de la sobrevivencia de los espermatozoides luego del descongelamiento de las mismas (Pillai *et al.*, 1994 citado en Suquet *et al.*, 2000). (Dreanno *et al.* 1997) utilizaron VHG al 10%, BSA al 10 % y una combinación de ambos (5 % + 5 %) como crioprotectores no permeables no encontrando diferencias en la motilidad espermática para la criopreservación del turbot post congelamiento-descongelamiento.

Durante las pruebas de congelamiento, se determinó que los mayores porcentajes obtenidos de motilidad espermática fue al utilizar ME₂SO a 1,5 M utilizando para ello tasas de congelamiento de -20, -30 y -40°C/min, la adición de VHG no demostró un incremento significativo de motilidad de espermatozoides de *Engraulis ringens*.

Estas tasas de congelamiento se encuentran dentro del rango con la cual se han trabajado en otras especies marinas, como la utilizada en atún aleta azul donde la mejor tasa de congelamiento también fue 40 °C/min (Doi *et al.*, 1982). En *Hippoglossus hippoglossus* la mejor tasa de congelamiento fue 10 y 40 °C/min (Bolla *et al.*, 1987), en *Enineohelus malabaricus* entre 20 y 154 °C/min (Gwo, 1993), Richardson *et al.* (1999) encontró la tasa óptima de congelamiento de 19,5 °C/min sobre espermatozoides de *Pleuronectes ferrugineus*, mientras que en *Thamnaconus septentrionales* la tasa de congelamiento óptima se encontró entre 40 y 100 °C/min (Kang *et al.*, 2004).

Se debe de tener en cuenta que la motilidad espermática no siempre tiene correlación con los porcentajes de fecundación, como lo mencionan Richardson *et al.* (1999), quienes no encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de fecundación con espermatozoides frescos y con espermatozoides criopreservados (61,5 ± 3,4 % y 56,1 ± 3,6% respectivamente) en el *Pleuronectes ferrugineus*. Ritar (1999) encontró que la motilidad de los espermatozoides criopreservados fue significativamente menor que

la de los espermatozoides fresco (80,0 % y 43,3 % respectivamente), pero en pruebas realizadas en el *Latris lineada* no reportaron diferencias significativas entre los porcentajes de fecundación al utilizar espermatozoides frescos o espermatozoides criopreservados (82,7 % y 71,2 % respectivamente).

Por tal motivo es necesario continuar con las investigaciones y realizar pruebas de fecundación para verificar la viabilidad de los espermatozoides criopreservados de *Engraulis ringens*.

CAPÍTULO VI

1. CONCLUSIONES

Los mayores porcentajes de motilidad espermática de *Engraulis ringens* se obtuvieron utilizando ME₂SO a 1,5 M y congelados a tasas entre -20 y -40 °C/min, con o sin la utilización de VHG.

El rango de motilidad máxima espermática se puede considerar dentro del rango de 0 y 5 minutos post descongelamiento.

2. RECOMENDACIONES

Analizar la motilidad de espermatozoides de *E. ringens* en diferentes tiempos de incubación en ME₂SO para determinar si es posible mejorar el intercambio agua-crioprotector y por consiguiente mejorar la crioprotección.

Determinar porcentajes de fecundación de ovocitos de *Engraulis ringens* utilizando espermatozoides criopreservados e identificar alguna correlación entre porcentajes motilidad espermática de *E. ringens* con los porcentajes de fecundación.

Cultivo de las larvas obtenidas de fecundación de ovocitos frescos y espermatozoides criopreservados, para la determinación de algún tipo de malformaciones y/o mortalidades durante el desarrollo larvario el cual indicaría un posible daño a nivel genético del espermatozoide.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta-Salmón H., D. Jerry, P. Southgate. 2007. Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa. *Cryobiology*, 54: 13-18.
- Akçay E., Y. Bozkurt, S. Secer, N. Tekin. 2004. Cryopreservation of Mirror Carp Semen. *Turkey Journal Veterinary Animal Science*, 28: 837-843.
- Ávila-Portillo L., J. Madero, C. Lopez, M. León, L. Acosta, C. Gómez, L. Delgado, C. Gómez, J. Lozano y M. Reguero. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57: 291-300.
- Babiak I., J. Glogowski, M. Luczynski, S. Goryczko, S., Dobosz y H. Huzminski. 1998. The effect of individual male potency on fertilization ability of fresh and cryopreserved milt of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29: 337-340.
- Cabrita E., V. Robles, R. Alvarez, M. Herraéz. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, 201: 301-314.
- Cañavate J., y L. Lubian. 1995. Some aspects on the cryopreservation of microalgae next term used as food for marine species. *Aquaculture*, 136: 277-290.
- Chen S-L., X-S. Ji, G-C. Yu, Y-S. Tian, Z-X. Shang. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, 236: 547-556.
- Cisneros, P.; C. Espinoza; B. Buitrón; A. Perea; V. Vera; M. Valdivia y D. Vizziano. 2006. Efecto de (GnRH α) y domperidona sobre el desove en cautiverio de la anchoveta peruana *Engraulis ringens*. En: XV Reunión Científica ICBAR, 7 - 9 Agosto del 2006, Libro de Resúmenes: 86.

- Cruz P., V. Medina y Y. Velasco. 2006. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus*, Spix y Agassiz 1829). Rev. Col. Cienc. Pec., 19: 146-151.
- Dreanno C. M. Suquet, E. Destruyeres, J. Cosson, H. Le Delliou y R. Billard. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture 169: 247-262.
- Dreanno C., M. Suquet, L. Quemener, J. Cosson, F. Fierville, Y. Normant y R. Billard. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. Theriogenology 48: 589-603.
- Dupré E. y C. Espinoza. 2004. Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico, Invest. Mar., Valparaíso, 32: 3-9.
- Espinoza, C., Perea, A., Calderón, J., Salazar., Buitrón, B., Vera, V., Mecklenburg, E., y Rojas, P.2008. Captura y acondicionamiento en cautiverio de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). Inf. Inst. Mar Perú, 34(4):269-277.
- García J. 1984. Criopreservadores concepto y manejo. Biol. Clin. Hematol., 6: 219.
- Glogowski J., M. Kwasnik, B. Piros, K. Dabrowski, K. Goryczko, S. Dobosz, H. Huzminski y A. Ciereszko. 2000. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. Aquaculture Research, 31: 289-296.
- Gwo J.C. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. Theriogenology 39: 1331-1342.
- Gwo J.C. 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa. Theriogenology, 41: 989-1004.

- Gwo J.C. 2003. Cryopreservation of black grouper (*Eninnehelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39: 1331-1342.
- Gwo H., T. Weng, L. Fan y Y. Lee. 2005. Development of cryopreservation procedures for semen of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Aquaculture*, 249: 205-211.
- Horváth A., E. Miskolczi y B. Urbányi. 2003. Cryopreservation of common carp sperm; *Aquat. Living Resour.*, 16: 457-460.
- Hubalek Z. Review. 2003 Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Criobiology*, 46: 205-229.
- Ieropoli S., P. Masullo, M. Do Espiritu Santo y G. Sansone. 2004. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostea gigas*). *Cryobiology*, 49: 250-257.
- Joo R. y E. Dupré. 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia), *Investigaciones Marinas*, 30: 75-79.
- Kang K-H., K-H. Kho, Z-T. Chen, J-M. Kim, Y-H. Kim y Z-f. Zhang. 2004. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunther, 1877) sperm. *Aquaculture Research*, 35: 1429-1433.
- Kawamoto T., T. Narita, K. Isowa, H. Aoki, M. Hayashi, A. Komaru y H. Ohta. 2007. Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology*, 54: 19-26.
- Koehler J. 1967. Studies on the survival of the rotifer next term philodina after freezing and thawing. 1967, *Cryobiology*, 3: 392-399.

- Lahnsteiner F, T. Weismann y R. Paztner. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, 28: 471-479.
- Leung, L. 1987. Cryopreservation of spermatozoa of the Barrumundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture*, 64: 243-247.
- Linhart O., M. Rodino y J. Cosson 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*, 41: 241-250.
- Lubzens E., N. Daube, I. Pekarsky, Y. Magnus, A. Cohen, F. Yusefovich y P. Feigin. 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa criobanks – strategies in research an application. *Aquaculture*, 155:13-30.
- Maria A., A. Viveiros, R. Freitas, y A. oliveira. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260: 298-306.
- Mazur, P.; S. Leibo y E. Chu. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Research*, 71: 345-355.
- Mazur, P. 1977. The role of intracellular Freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14: 251-272.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247 (Cell Physiol. 16): C125-C142.
- Medina V. Y. Velasco y P. Crus. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18: 34-48.

- Mortain-Bertrand A., F. Etchart y M. Boucaud. 1995. A method for the cryoconservation of *dunaliella salina* (Chlorophyceae): effect of glycerol and cold adaptation. *Journal of Phycology*, 32: 346-352.
- Navarro O., Y. Velasco y p. Cruz. 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*); *Rev Col Cienc Pec*, 17: 53-59.
- Oliveb P. y W. Wang. 1997. Cryopreservation of *Nereis virens* (Polychaeta, Annelida) Larvae: The Mechanism of Cryopreservation of a Differentiated Metazoan. *Cryobiology*, 34: 284-294.
- Porcu E. 2001. Oocyte Criopreservation. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. London, UK: Martin Dunitz Ltd.
- Poupard G., C. Paxion, J. Cosson, C. Jeulin, F. Fierville y R. Billard. 1998. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*, 160: 317-328.
- Rana, K. 1995. Preservation of gametes. En: N. Bromage y R. Roberts (eds.). *Broodstock management of egg and larval quality*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 53-73.
- Richardson G., C. Wilson, L. Crim y Z. Yao. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture*, 174: 89-94.
- Rideout M., K. Litvak y E. Trippel. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents; *Aquaculture Research*, 34: 653-659.

- Ritar A. 1999 Artificial insemination with cryopreserved semen from striped trumpeter *Latris lineate*. *Aquaculture*, 180: 177-187
- Rhodes L., J. Smith, R. Tervit, R. Roberts, J. Adamson, S. Adams y Decker M. 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. *Cryobiology*, 52: 152-156.
- Storey K. y Storey J. 1991. Congelados y vivos. *Investigación y Ciencia*, 173: 58-64.
- Stoss J. y W. Holtz. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*salmo gairdneri*) sperm IV: The effect of dmsO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and kcl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32: 321-330.
- Suquet, M., C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson y R. Billard. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31: 231-243.
- Sztejn, J.; K. Nobel; J. Farley y L. Mobraaten. 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 41: 28-39.
- Tzovenis I., G. Triantaphyllidis, X. Naihong, E. Chatzinikolaou, E. Papadopoulou, G. Xouri y T. Tafas. 2004. Cryopreservation next term of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. *Aquaculture*, 230: 457-473.
- Warnecke D. y H. Pluta. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio L.*) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture*, 215: 167-185.

- Yao Z., L. Crim, G. Richardson y C. Emerson. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus*.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, 181: 361-375.
- Zhang Y.Z., S-C. Zhang, X-Z. Liu, Y-Y. Xu, C-L. Wang, M-S. Sawant, J. Li y S-L. Chen. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60: 989-996.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Número de peces utilizados en las diferentes pruebas experimentales

MUESTRA	Nº	LONGITUDES
Determinación de la motilidad espermática post-incubación en diferentes crioprotectores	36	14,5 – 16,5
Determinación de tasas óptimas de congelamiento en ME2SO.	45	14,5 – 16,5
Determinación motilidad espermática post cong. – descong en ME2SO y ME2SO + VHG	45	14,5 – 16,5

Figura 1. Determinación de la motilidad de espermatozoides de *E. ringens* post incubación (0, 5 y 10 minutos) en diferentes crioprotectores y a diferentes concentraciones de los mismos. (Valores con las mismas letras indican grupos estadísticamente iguales entre tratamientos al mismo tiempo).

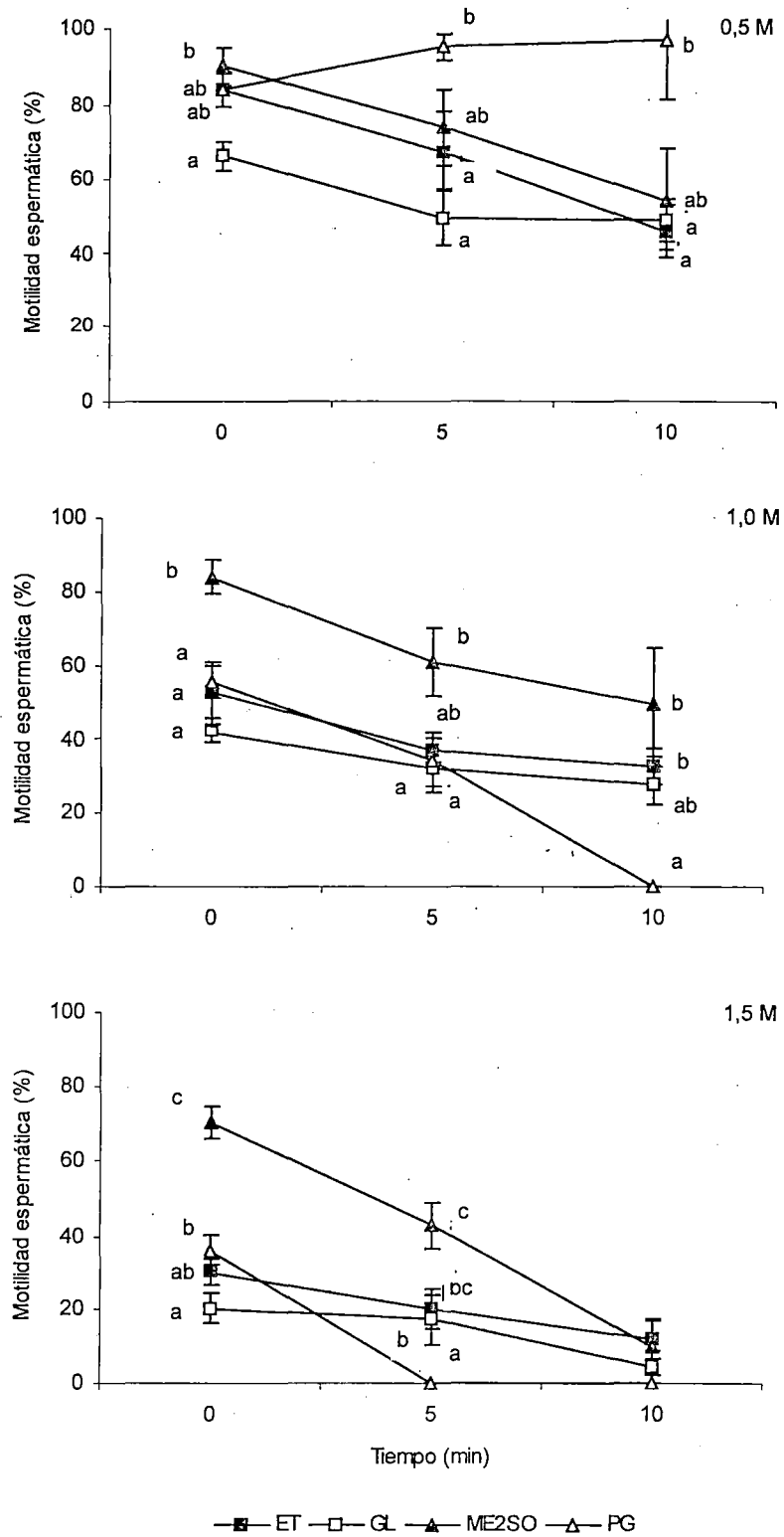


Figura 2 Determinación de la motilidad de espermatozoides de *E. ringens* post tratamiento a diferentes tasas de congelamiento utilizando únicamente ME₂SO como agente crioprotector. Valores con las mismas letras indican grupos estadísticamente iguales entre tratamientos con la misma concentración de crioprotector, mientras que asteriscos indican diferencias entre tratamientos de diferentes concentraciones en la misma tasa de congelamiento.

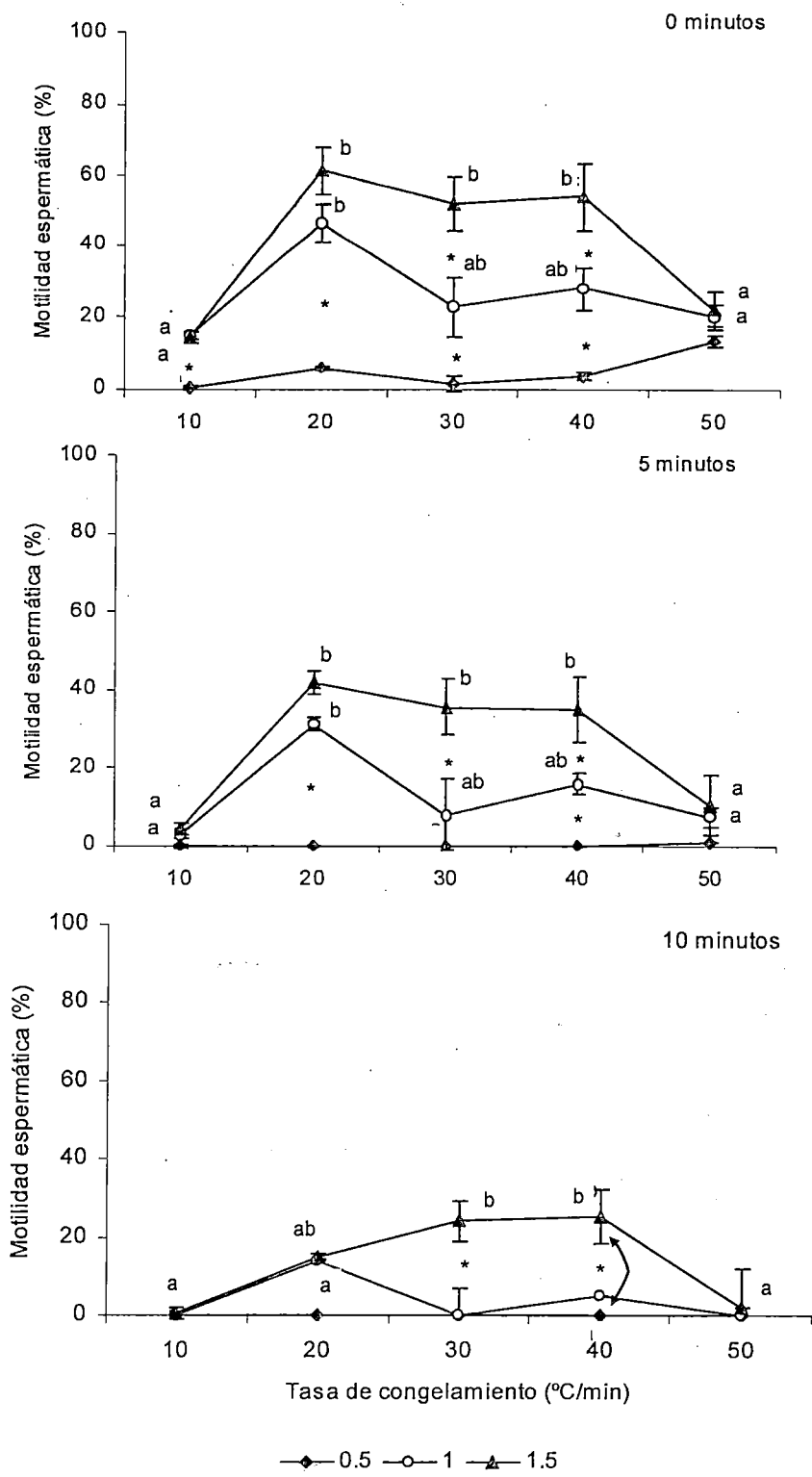
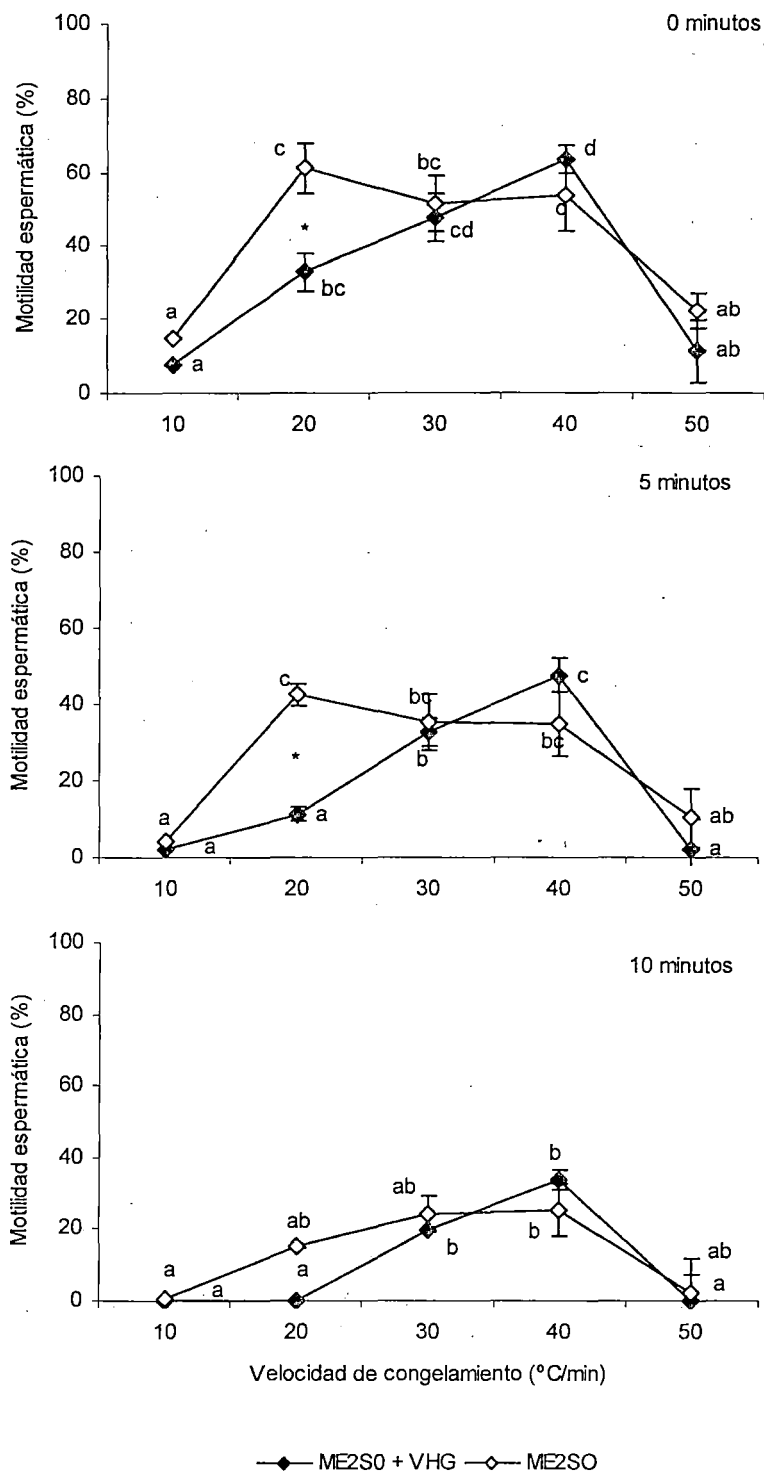


Figura 3. Motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento en ME₂SO y en ME₂SO + VHG. Valores con las mismas letras indican grupos estadísticamente iguales entre tratamientos de congelación con la misma solución crioprotectora. Asterisco indican diferencias significativas entre tratamientos con diferentes crioprotectores para cada tasa de congelamiento.



FOTOS



Foto 1. Captura de anchoveta viva. a) Buque de Investigación Científica SNP 2; b) Sistema de atracción con luces y red izada; c) Colecta de anchoveta con uso de redes de mano; d) Distribución de peces en tanques de 300 L; e) Anchovetas recién capturadas; f) Acondicionamiento de peces en tanques de 10 m³.

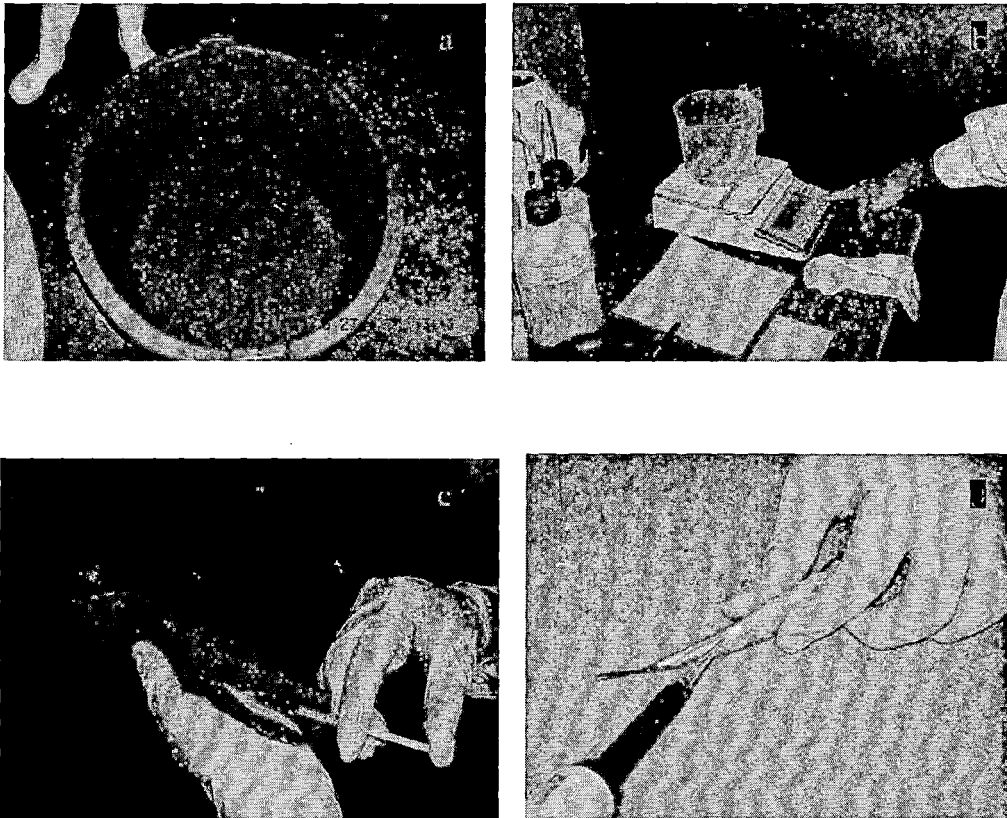


Foto 2. Inducción a la espermiación de *E. ringens*. a) Adormecimiento de peces en solución de tricaina; b) Determinación de peso de pez; c) Inyección de *acetato de buserelina*, según peso; d) Extracción de muestra de semen 12 h post-inyección.

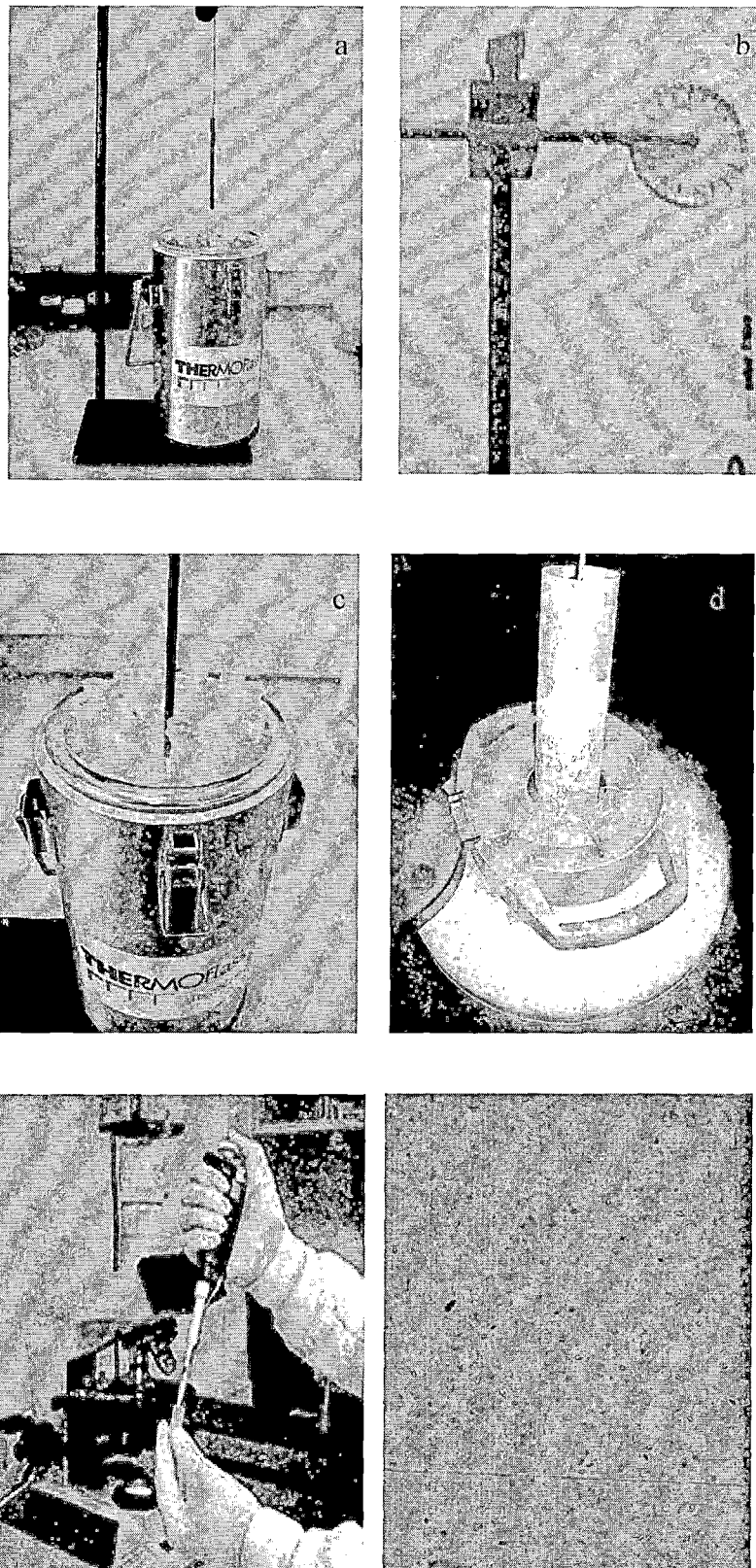


Foto 3. Congelamiento de espermatozoides. a) Equipo de congelamiento; b) Polea graduada de equipo de congelamiento; c) Muestras descendiendo a termo de nitrógeno; d) Almacenamiento de muestras en tanque de nitrógeno de 35 L; e) Extracción de muestras post descongelación; f) Espermatozoides de *E. ringens* post descongelamiento.