

**EVALUACIÓN DE CUATRO AGENTES CRIOPROTECTORES EN LA
CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATÓFOROS, MASA Y SUSPENSIÓN
ESPERMÁTICA DEL CAMARÓN MARINO *Litopenaeus vannamei*
(Bonne, 1931)**

MAGDA ANGÉLICA LEZCANO RÍOS

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA

BOGOTÁ D.C.

2001

**EVALUACIÓN DE CUATRO AGENTES CRIOPROTECTORES EN LA
CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATÓFOROS, MASA Y SUSPENSIÓN
ESPERMÁTICA DEL CAMARÓN MARINO *Litopenaeus vannamei*
(Bonne, 1931)**

**Trabajo de grado presentado a la
Facultad de Biología Marina para
optar el título de Biólogo Marino**

MAGDA ANGÉLICA LEZCANO RÍOS

DIRECTOR

**MARCELA SALAZAR M.D. Ph.D.
Subdirectora Científica
CENIACUA**

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA

BOGOTÁ D.C.

2001

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Bogotá D.C. (, , 2001)

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo, en muchas ocasiones incondicional de las personas que de una u otra forma estuvieron dispuestas a ayudarme:

A mi mami por darme confianza en los momentos más críticos y enseñarme que las cosas se hacen luchando por lo que uno quiere.

A la Doctora Clara Maria Sanín Posada, Directora Ejecutiva de CENIACUA, por permitirme realizar este trabajo en la Institución que ella dirige.

A la Doctora Marcela Salazar, directora de esta tesis, por su apoyo y colaboración.

A Carlos Alberto Gutiérrez, presidente de CGR Biotecnología Reproductiva, por la confianza y apoyo incondicional que me brindó, sin las cuales no se hubieran podido obtener los presentes resultados.

Al Doctor Rajmohan Arun, de la Universidad de Madras, India, por responderme la gran cantidad de preguntas que he tenido y por instruirme en el tema.

A Gonzalo Malagón, Director del laboratorio de CGR Biotecnología Reproductiva, por su colaboración y enseñanzas.

A la Doctora Marcela Camacho, del Centro Internacional de Física de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración.

A Clarissa Granja quien me ayudó inmensamente en la realización y análisis de la evaluación por citometría de flujo.

A la Doctora Maria Consuelo Casas, directora del Instituto Regional Andino, por brindarme su consejo oportuno.

Al Doctor Carlos Jiménez, por sus consejos y por las correcciones hechas al documento.

A Fernando Lizcano, Lilian Barreto y Licet Hernández, por haberme acompañado y ayudado en muchos de los procedimientos de éste trabajo.

A Gina Cuellar y Sandra Vallejo por su colaboración en el proceso de Citometría de Flujo.

A todo el personal de CENIACUA por su constante colaboración, en especial al Doctor Jorge Arturo Suárez por ser un jefe comprensivo y atento con cada una de las personas a su cargo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.....	18
1. MARCO TEÓRICO.....	30
1.1 Características del espermatozoide de Decápodos.....	30
1.2 Agentes Crioprotectores.....	30
1.3 Osmolaridad.....	32
1.4 Principios de Criopreservación.....	33
1.5 Integridad de la membrana celular y su evaluación por Citometría de Flujo	38
1.6 Reacción Acrosómica.....	39
 2. METODOLOGÍA	 42
2.1 Material Biológico.....	42
2.2 Extracción del Material Espermático.....	42
2.3 Agentes Crioprotectores Evaluados	43
2.4 Mediciones de Osmolaridad.....	44
2.5 Evaluación de la tolerancia de las células a la toxicidad de las soluciones de congelamiento a temperatura ambiente.....	45
2.6 Metodología de congelación rápida ($>5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	48
2.6.1 Metodología de descongelación de las muestras de congelación rápida ($>5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	50
2.7 Metodología de Congelación lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	50
2.7.1 Metodología de descongelación de las muestras de congelación lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	55
2.8 Evaluación mediante Citometría de Flujo de la viabilidad espermática después de congelaciones lentas ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).	56

2.9 Estandarización de la concentración de Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica espermática.....	58
2.10 Análisis Estadístico.....	59
3. RESULTADOS	62
3.1 Extracción del material espermático	62
3.2 Mediciones de Osmolaridad.....	62
3.3 Evaluación de la tolerancia de las células a la toxicidad de las soluciones de congelamiento a temperatura ambiente.....	63
3.4 Congelación Rápida ($>5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	67
3.5 Congelación Lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	68
3.5.1 Congelación Lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) del espermátforo completo.....	68
3.5.2 Congelación Lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de la masa espermática.....	69
3.5.3 Congelación Lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de la suspensión espermática.....	71
3.6 Evaluación mediante Citometría de Flujo de la viabilidad espermática después de congelaciones lentas ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).	72
3.7 Estandarización de la concentración de Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica espermática.....	77
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	78
4.1 Extracción del material espermático.....	78
4.2 Mediciones de Osmolaridad.....	79
4.3 Evaluación de la tolerancia de las células a la toxicidad de las soluciones de congelamiento a temperatura ambiente.....	80
4.4 Congelación Rápida ($>5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	84
4.5 Congelación Lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	85
4.6 Evaluación mediante Citometría de Flujo de la viabilidad espermática después de congelaciones lentas ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	90
4.7 Estandarización de la concentración de Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica espermática	92
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	94
6. BIBLIOGRAFÍA.....	97
7. ANEXOS.....	106

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Pesos moleculares de los agentes crioprotectores evaluados.....	31
Tabla 2. Tratamientos para la evaluación de la toxicidad de las soluciones crioprotectores.....	47
Tabla 3. Tratamientos para la congelación rápida ($>5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	49
Tabla 4. Tratamientos evaluados en la congelación lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).....	51
Tabla 5. Tratamientos para la evaluación de la concentración de Ionófora A23187 en la evaluación de la reacción acrosómica espermática	59
Tabla 6. Osmolaridad de cada uno de las soluciones empleadas en los ensayos de criopreservación.....	63
Tabla 7. Promedio de células con “spike” en cada uno de los tratamientos de toxicidad a lo largo del periodo de observación de 120 minutos.....	65
Tabla 8. Rangos medios para las concentraciones mas semejantes al control (agua de mar estéril) en cada tiempo evaluado.....	67
Tabla 9. Diferencia entre las mejores concentraciones de cada agente crioprotector según la prueba de Miller.....	67
Tabla 10. Promedio de células con “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con espermátóforo completo.....	68
Tabla 11. Promedio de células con “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con masa espermática.....	70
Tabla 12. Promedio de células con “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con suspensión espermática.....	71
Tabla 13. Promedio de células con integridad de membrana, “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con suspensión espermática.....	76

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Propagación de cristales de hielo en la congelación de un ovocito humano.....	34
Figura 2. Corte trasversal de una pajilla (0.25ml de capacidad) de esperma humano criopreservado en glicerol.....	37
Figura 3. Extracción del espermátforo derecho, se observa la masa espermática saliendo del poro genital.....	43
Figura 4. Osmómetro Precision Systems.....	45
Figura 5. Monitoreo de la temperatura de las muestras durante el tiempo de contacto (10 min.) con el agente crioprotector.....	52
Figura 6. Macrotubo y Pajillas francesas.....	53
Figura 7. Congelador programable Cryologic CL 2000.....	54
Figura 8. Cargado del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido con las muestras congeladas.....	54
Figura 9. Citómetro de flujo (FacsSort).....	57
Figura 10. Morfotipo de célula espermática con “spike”.....	64
Figura 11. Morfotipos de células espermáticas sin spike y evertida	64
Figura 12. Promedio de células con “spike” en la congelación con espermátforo completo.	69
Figura 13. Promedio de células con “spike” en la congelación con masa espermática.	70
Figura 14. Promedio de células con “spike” en la congelación con suspensión espermática.....	72

Figura 15. Grafica de Dot-plot de tamaño vs. granularidad de la población espermática de la muestra sin congelar.....	73
Figura 16. Grafica de Dot-plot de Fluorescencia de yoduro de propidio vs. tamaño de la muestra sin congelar.....	73
Figura 17. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con metanol al 10% en la congelación lenta.....	74
Figura 18. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con Me ₂ SO al 10% en la congelación lenta	74
Figura 19. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con glicerol al 10% en la congelación lenta.....	75
Figura 20. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con etilen glicol al 10% en la congelación lenta.....	75
Figura 21. Promedio de células con integridad de membrana en la congelación lenta con suspensión espermática.....	76

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo A. Diagrama de Flujo de la Metodología.....	107
Anexo B. Conteos celulares en cada tratamiento de la evaluación de toxicidad	108
Anexo C. Conteos celulares en la congelación lenta con espermátforo.....	112
Anexo D. Conteos celulares en la congelación lenta con masa espermática.....	113
Anexo E. Conteos celulares en la congelación lenta con suspensión espermática.....	114
Anexo F. Porcentajes de Integridad de Membrana y células con “spike” de la muestras de suspensión espermática congeladas lentamente.....	115
Anexo G. Conteos celulares de la estandarización de la Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica.....	116

RESUMEN

Con el propósito de formular un protocolo para la congelación espermática del camarón marino *Litopenaeus vannamei*, especie de gran importancia económica en la acuicultura del país, se diseñaron varios ensayos que permitieran entender de una mejor forma los aspectos que puedan afectar la viabilidad espermática debido a la disminución de la temperatura hasta niveles criogénicos.

En primer lugar, se midió la osmolaridad del agua de mar estéril (35 ppm) y del agua de mar artificial libre de calcio formulada por Leung-Trujillo y Lawrence (1987). Se encontraron valores bastante altos, 1048 y 739 mOsmol/kg respectivamente.

Posteriormente, se diseñó un protocolo para evaluar por un periodo de dos horas la toxicidad de cuatro agentes crioprotectores internos como lo son, el dimetil sulfóxido (Me_2SO ¹), metanol, glicerol y etilen glicol; disueltos en tres concentraciones 5, 10 y 30% (v/v) en agua de mar estéril (35 ppm). En segundo lugar, se evaluó la toxicidad del agua de mar artificial libre de calcio y se le adicionaron en dos oportunidades sustancias que aumentarían en gran medida la osmolaridad como lo son la yema de huevo y el suero fetal bovino. El agua de mar estéril (35 ppm) se empleó como medio control, pues en ella los espermias suspendidos pueden permanecer por largos periodos de tiempo sin perder su viabilidad. Los tratamientos que produjeron menor influencia en la viabilidad celular fueron: metanol, glicerol y Me_2SO a una concentración de 10% y el etilen glicol al 5% (>60% de células viables morfológicamente); el agua de mar artificial libre de calcio fue tóxica (todas las células evertidas) desde el momento inicial; pero al adicionarle 20% de yema de huevo o 50% de suero fetal bovino se disminuía su toxicidad (>75% de células viables morfológicamente al finalizar las dos horas de evaluación). Por tal razón, se asume que medios que presenten osmolaridades menores a 1000 mOsmol/kg son osmóticamente tóxicos para este tipo de células y por otro lado se observó que los agentes crioprotectores a concentraciones mayores o cercanas a 30% son tóxicos químicamente para estas células.

Basándose en los resultados anteriores se diseñaron dos protocolos de congelación, el primero consistía en evaluar una curva de congelación rápida (>5°C/min.) y el segundo evaluaba una curva lenta de congelación (-0.5°C/min.). En ambos protocolos se evaluaban los cuatro agentes crioprotectores internos (metanol, Me_2SO , glicerol y etilen glicol) a una concentración de 10% (v/v) disueltos en agua de mar estéril con 0.2M de glucosa y tres tipos de material espermático, el

¹ Dimetil sulfóxido (Me_2SO) abreviatura sugerida por "Society for Cryobiology", 2001.

espermátforo completo, la masa espermática y una suspensión espermática. En el protocolo de congelación rápida, no se encontraron células morfológicamente viables post-descongelación. En el protocolo de congelación lenta la mayor cantidad de células viables morfológicamente post-descongelación (61.6%) se obtuvo al emplear metanol 10% y masa espermática. Este resultado es basado en las características intrínsecas de éstas células espermáticas, dado que son células que están aclimatadas a altas concentraciones salinas y por lo tanto altas osmolaridades y además, se encuentran suspendidas en una matriz gelatinosa, hacen que la regulación de los factores tanto osmóticos como químicos que tienen lugar al disminuir la temperatura a niveles criogénicos sea más conveniente al emplear curvas de congelación lentas.

A continuación, se deseaba evaluar la viabilidad espermática mediante la integridad de membrana celular de las muestras congeladas lentamente, para lo cual, se realizó el protocolo de tinción de ADN con yoduro de propidio con muestras descongeladas y se analizó cada célula empleando un citómetro de flujo. Dado que el lugar mas afectado por el proceso de congelación-descongelación es la membrana celular, por tal razón, los porcentajes de viabilidad fueron inferiores a los obtenidos mediante observación morfológica; el crioprotector interno que presento el mayor porcentaje de células con integridad de membrana (13.03%) fue el etilen glicol al 10%.

Por último, se planteó la posibilidad de implementar la evaluación de la viabilidad espermática basados en la activación de la reacción acrosómica inducida por la lonófora A23187; para lo cual se emplearon suspensiones espermáticas sin congelar a las que se le adicionaron diferentes concentraciones (8, 24, 40 y 56 microlitros/ml) de lonófora A23187 incubándose por 5 minutos, tal como lo descrito por Clark y colaboradores (1981). En ninguna de las concentraciones se encontraron células que presentaban indicios de la reacción acrosómica en decápodos descrita por Clark y colaboradores (1981). Combinando éste resultado y dado que el agua de mar, medio natural de ésta especie, contiene calcio, y que el esperma de ésta especie no se ve activado por estas cantidades como si sucede en otras especies, se estima que la cantidad de lonófora A23187 necesaria para activar la reacción acrosómica en ésta especie es bastante alta, mucho mas que las empleadas en el presente ensayo.

ABSTRACT

In order to propose a protocol for the spermatic cryopreservation of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*, a very important species for the aquaculture of this country, a variety of essays were designed to achieve a better knowledge of the factors that could affect the spermatic viability after going through cryogenic temperatures.

In first place, it was measured the osmolality of sterile seawater (35 ppm) and artificial seawater calcium free (Leung-Trujillo and Lawrence, 1987). Both values were very high, 1048 and 739 mOsmol/kg respectively.

The next essay, was design to evaluate in a period of two hours the toxicity of four penetrative cryoprotectants agents as: dimethyl sulfoxide (Me_2SO), glycerol, methanol and ethylene glycol; at 5, 10 and 30% (v/v) dissolved in sterile seawater. In second place, it was evaluated the toxicity of the artificial seawater calcium free with in first place egg yolk and in second place fetal calf serum. The sterile seawater was used as control because the spermatic cells can tolerate long periods of time without loosing their viability. The methanol, glycerol and Me_2SO at 10% and ethylene glycol at 5% had the higher viability of the cells (>60% viability). The artificial seawater calcium free was extremely toxic from the beginning, but when adding 20% egg yolk or 50% fetal calf serum the toxicity was decreased (>75% viability). For this reasons, it is concluded that medias with osmolalities less that 1000 mOsmol/kg are osmolality toxic for these cells and it is also concluded that the cryoprotectants agents at concentrations close or superior to 30% are also toxic.

Based on the above assays, it was arranged two cryopreservation protocols, one with high cooling rates (>5°C/min.) and the other with low cooling rates (-0.5°C/min.). It was also evaluated the four cryoprotectants agents (methanol, glycerol, Me_2SO and ethylene glycol) at 10% (v/v) dissolved at sea water with 0.2M glucose. The spermatic cells were used as: the spermatophore, spermatic mass and spermatic suspension. At the high cooling rate there were no cell viable after thawing. At the low cooling rate there were observed 61.6% cells viable after thawing when methanol and spermatic mass were evaluated. These results are based on the properties of this kind of cells owing that they live at high salinities and for consequences high osmolalities and also it should be taken on account that these cells are immersed in a gelatinous matrix that will give a precise way of regulate the procedures that occur when the temperature decrease at cryogenic points.

The next essay, was to evaluated the membrane integrity as a sperm viability essay in samples cryopreserved at low cooling rates and sperm suspension. It was used

the DNA Propidium Iodide marker and a flow cytometer for this evaluation. Because the plasma membrane is one of the most affected regions of the cell in the freezing-thawing process, the viability of the samples were inferior to the ones obtained by morphology evaluation. The cryoprotectant agent that had the higher viability in terms of membrane integrity was the ethylene glycol (13.03%).

For last, trying to use the acrosome reaction to Ionophore challenge as a method to evaluate the viability of the sperm cells, it was made an assay that evaluate different concentrations of Ionophore A23187 (8, 24, 40 y 56 $\mu\text{l/ml}$) in fresh sperm suspensions with five minutes incubation time as described by Clark and co-workers (1981). In none of the concentrations evaluated were observed cells presenting the acrosome reaction in Decapods described by Clark and co-workers (1981). It is presume that this species needs a higher amount of Ionophore to induce the acrosome reaction and this could be because of the amount of calcium contained in the natural seawater.

INTRODUCCIÓN

La palabra criopreservación proviene del Griego *Kryos*, que significa frío, congelación; Simione (1998) la define como la estabilización de células a temperaturas criogénicas ($< 0^{\circ}\text{C}$) y aplica aspectos relacionados a la Criobiología, o el estudio de la vida a bajas temperaturas.

El principal propósito de la preservación artificial de una especie, es poder conservar su material genético, para reproducir posteriormente a un organismo entero. Debido a que un progenitor puede transmitir información genética a su descendencia a través de los gametos sexuales que al unirse con sus homólogos del sexo opuesto producen un nuevo individuo, se puede, de ésta forma dar continuidad a la especie (Standfield, 1992); los gametos sexuales criopreservados se emplean en la actualidad para mantener el material genético resguardado.

El material genético es la materia prima de la biodiversidad, su preservación permite el resguardo de genes codificadores de ciertas características, útiles en el cultivo de cualquier especie. Por ejemplo, genes actualmente considerados no deseables en programas de mejoramiento genético, a través de la descongelación de material criopreservado, se pueden llegar a recuperar y así recobran su importancia en fases posteriores del mejoramiento (Conget *et al.*, 1996). Por otro lado, en los cultivos y

cría selectiva se puede producir alta consanguinidad, homocigosis y degeneración por entrecruzamiento de los individuos (IFGB, 1996), lo cual, es aumentado por los cruces consecutivos, esto, disminuye el potencial cultivable de la especie, afecta la supervivencia de huevos, larvas y produce anormalidades en los adultos (Conget *et al.*, 1996). La degeneración se puede contrarrestar con cruces de individuos distantes genéticamente, produciendo un *vigor híbrido* entre estos dos individuos (Stoss y Donaldson, 1983). Esta tarea puede ser apoyada con bancos genéticos de material criopreservado (Stoss y Donaldson, 1983; Fabbroccini *et al.*, 2000). De esta forma, se preserva la información de las líneas mejoradas y se mantiene la información genética de generaciones pasadas. Adicional a lo anterior, la criopreservación de espermatozoides puede ayudar a la introducción de genes de poblaciones naturales a poblaciones de cultivo, aumentando su variabilidad genética y vigor híbrido (Conget *et al.*, 1996).

La aplicación de técnicas de congelación para la conservación de células sexuales en múltiples especies produce mejores resultados cuando se congelan espermatozoides o gametos masculinos que cuando se preservan óvulos o huevos, por ser estas células más delicadas, presentando tasas más bajas de sobrevivencia.

El almacenaje de semen a temperaturas bajas, fue revolucionado cincuenta años atrás, con el descubrimiento de la acción crioprotectora del glicerol en células espermáticas de mamíferos (Polge *et al.*, 1949 En: Holt, 2000). Posteriormente, se concluyó que las temperaturas bajas no eran necesariamente letales para embriones

de mamíferos como se pensaba, pero, era necesario perfeccionar un protocolo que permitiera un proceso exitoso (Smith, 1953 En: Denniston *et al.*, 2000). Las investigaciones continuaron y se logró criopreservar embriones de ratones a -196°C mediante un protocolo de congelación y descongelación lento (Wilmot, 1972 En: Denniston *et al.*, 2000; Whittingham *et al.*, 1972 En: Denniston *et al.*, 2000). En estos momentos existen muchos protocolos de criopreservación que han sido desarrollados con base a datos empíricos y no se han implementado formulaciones para entender realmente la criobiología de las diferentes células sometidas a estos procesos (Gao *et al.*, 1992), por tal razón, los nuevos esfuerzos se están encaminando a la creación de programas de modelamiento que ayudarán a entender mejor todos los acontecimientos que tienen lugar al emplear temperaturas criogénicas (Karlsson *et al.*, 1996). Por otro lado, a medida que las investigaciones crecen, se han encontrado problemas específicos para cada especie, los cuales son de igual forma, objeto de las actuales investigaciones a nivel mundial (Holt, 2000).

La criopreservación de espermatozoides ha sido utilizada en la biotecnología reproductiva de muchas especies y en la actualidad se está implementando en la acuicultura (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997), éstos estudios han tenido lugar en los últimos cuarenta años, obteniéndose los mejores avances en los últimos diez (Caffey y Tiersch, 2000). Debido a ventajas como: la reducción del peligro de transmisión de enfermedades; la posibilidad de producción de híbridos con características deseables (Gwo, 2000a); permite la posibilidad de mantener gametos sexuales disponibles en cualquier momento, sin importar la época del año; se puede

aumentar la variabilidad genética de la especie de cultivo y por ultimo, permite la aplicación de técnicas empleadas en la ingeniería genética de las especies investigadas (Fabbroccini *et al.*, 2000).

El empleo de semen criopreservado de individuos seleccionados evita la necesidad de adquirir reproductores costosos y delicados en su manejo, favoreciendo enormemente la relación costo-beneficio para el productor. La aplicación de esta técnica permite al sector productivo pecuario aprovechar al máximo los logros alcanzados con los programas de mejoramiento genético (CENIACUA, 1998).

La criopreservación en la acuicultura ha sido desarrollada principalmente en peces, donde inicia con las investigaciones de De Quatretages (1853) En: Erdahl *et al.*, (1984), obteniéndose bajos porcentajes de fertilidad. Brofeldt (1914) En: Buyukhatipoglu y Holtz, (1978) reconoció que el esperma de salmón se podría almacenar largamente en frío. Dorier (1949/1950,1951) En: Buyukhatipoglu y Holtz, (1978) realizó investigaciones para aumentar el tiempo de almacenaje adicionando soluciones de electrolitos o de fluido celómico de hembras, obteniendo resultados aceptables hasta ese momento.

En la mayoría de los casos se utilizó el medio "Cortland" sirviendo como base para el desarrollo de los posteriores diluyentes (Wolf, 1963 En: Buyukhatipoglu y Holtz, 1978). El medio " Cortland" empleaba sustancias como lactosa, fructosa, lecitina, manitol, glicina o yema de huevo. El primer diluyente con buenos resultados en

motilidad post-descongelación, fue basado en la composición del plasma espermático de salmónidos (Truscott y Idler, 1969 En: Buyukhatipoglu y Holtz, 1978).

Harvey (1983) En: Bernal y Uribe (1993) en estudios de criopreservación en *Sarotherodon mossambicus*, implementó la técnica de pajillas Francesas de 0.25-ml. (Massip *et al.*, 1979 En: Denniston *et al.*, 2000) proporcionando así una congelación más uniforme. Harvey *et al.*, (1982) trabajaron con criopreservación en nitrógeno líquido de semen en pez Cebra (*Danio rerio*) utilizando como agente crioprotector el metanol.

Alderson y Macneil (1984) En: Bernal y Uribe (1993) basados en sus buenos resultados con trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) propusieron usar dimetil sulfóxido (Me_2SO)-yema de huevo y glucosa como criopreservantes en semen de salmón del Atlántico *Salmo salar*, produciendo igualmente buenos resultados post-descongelación.

En 1988, Harvey y Kelley En: Bernal y Uribe 1993, publicaron la metodología para la criopreservación de semen de tilapia, *Sarotherodon mossambicus*, empleando hielo seco y nitrógeno líquido, así se ratificó la importancia de éste método para garantizar la preservación del patrimonio genético de las especies. Similares estudios han sido registrados en Colombia, sobre criopreservación de espermatozoides, tales como el realizado por Cortés (1991) en Cachama Blanca, *Piaractus brachipomus*, en donde se

demuestra la importancia y la viabilidad de aplicar esta técnica en un variado grupo de animales.

Wheeler y Thorgaard (1991), realizaron la criopreservación de semen de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, utilizando pajillas plásticas de 4 ml de capacidad, las cuales funcionaron adecuadamente para preservar semen y se abrió, la posibilidad de congelar un mayor volumen de esperma.

Por otra parte, Bernal y Uribe (1993) caracterizaron el semen de Bocachico, *Prochilodus reticulatus* y evaluaron la motilidad del esperma luego de haber sido sometido a un proceso de refrigeración en nevera a 4°C y de criopreservación en nitrógeno líquido a -196°C, encontrando que los espermatozoides permanecían viables y de buena calidad. González (1994), desarrolló ensayos con diferentes diluyentes reportados para la criopreservación de esperma de salmónidos, encontrando variados grados de efectividad de estos compuestos sobre la viabilidad final de los espermatozoides. Por último, la más reciente investigación en criopreservación de esperma es la realizada en Cachama (*Piaractus brachypomus*) y Bagre (*Pseudoplatystoma fasciatum*) (González y Fresneda, 2000) en donde se realizó la caracterización del semen y la evaluación de los crioprotectores Me₂SO-yema de huevo y metanol-leche en polvo a concentraciones de 5, 8 y 11% mediante un protocolo de congelación rápida. El mejor resultado fue obtenido con el 8% de metanol-leche en polvo, donde se obtuvo un 79.6% de motilidad post-descongelación y se obtuvieron larvas y alevinos en ambas especies.

Aunque la acuicultura en Colombia ha mostrado muy buenos índices de crecimiento, pasando de 1.256 toneladas en 1986 a 43.800 toneladas en 1997, la actividad se ha concentrado en muy pocas especies y tiene un bajo grado de diversificación (INPA, 1998). Las especies marinas han estado representadas solamente por el camarón (*Litopenaeus vannamei*) (6.907 t. en 1997), cuya producción creció rápidamente entre los años 1986 (250 t.) y 1992 (9.432 t.), declinando luego en 1993 (7.327 t.), para continuar hasta la fecha con comportamientos ascendentes y descendentes por variadas circunstancias (INPA, 1998). Durante la década de los noventa Colombia se ha posicionado a nivel Latinoamericano como uno de los mayores productores de camarón (Weidner *et al.*, 1992). De esta manera, Colombia en 1993 contaba con 2868 hectáreas de espejo de agua de los cuales 1.589 estaban en la Costa Atlántica, alcanzando una producción de 5.480 toneladas / año, correspondiendo a un 75% de la producción bajo cultivo (Weidner, 1992 En: Newmark y Vallejo, 1995).

Son escasos los trabajos sobre criopreservación de espermatozoides en crustáceos, entre ellos están: Behlmer y Brown (1984), quienes observaron la viabilidad del espermatozoide congelado rápidamente a $-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con 16% de glicerol en el cangrejo *Limulus polyphemus*, encontrando un 73% de espermatozoides viables mediante tinción con eosina, 40% de espermatozoides mostrando adhesión a ovocitos y un 17% de huevos fertilizados. Chow y colaboradores (1985), realizaron la criopreservación de espermatozoides en el camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* con protocolos de congelación rápida en vapores de nitrógeno líquido y empleando 10%

de glicerol como agente crioprotector, obtuvieron fertilización en ocho de quince tratamientos con mas de 70% de larvas que se desarrollaron bien hasta pos-tlarva. Anchordoguy y colaboradores (1988), trabajaron en la criopreservación espermática de *Sicyonia ingentis*, la evaluación de viabilidad se realizó mediante la reacción acrosómica por medio de la cual encontraron un 56% de viabilidad en el tratamiento que consistió en congelar el esperma a 1°C/min en una solución de 5% (v/v) de Me₂SO. Jeyalectumie y Subramoniam (1989), evaluaron la congelación rápida de los espermátóforos y el plasma seminal de *Scylla serrata*, obteniendo un 95% de viabilidad mediante tinción con eosina-nigrosina en las muestras congeladas con glicerol al 16% (v/v). Bhavanishankar y Subramoniam (1997), realizaron la criopreservación de espermatozoos de *Scylla serrata*, evaluaron la viabilidad mediante la reacción acrosómica debida al tratamiento con Ionofora A23187, encontrando que el tratamiento con 12.5% de glicerol a una curva de congelación de -5°C/min era el mas viable (52%). Ke y Cai (1996), estudiaron la criopreservación de esperma de *Penaeus chinensis* encontraron porcentajes de fertilidad de 59% con esperma congelado a -5°C/min con 10% de Me₂SO y 10% glicerol. No se han reportado hasta el momento estudios sobre criopreservación de esperma de camarón marino *Litopenaeus vannamei*.

Los otros estudios realizados en criopreservación corresponden a evaluaciones realizadas con estadios embrionarios entre los cuales se encuentran los estudios de Subramoniam y Newton (1993) quienes realizaron ensayos con embriones de camarones Penaeidos, obtuvieron un 82% de sobre vivencia post-descongelación al

emplear 15% de etilen glicol mediante protocolos de congelación rápida. Simon y colaboradores (1994) determinaron el óptimo medio criopreservante en embriones de *Penaeus indicus*, en donde encontraron que el metanol, Me_2SO , etilen glicol y 1,2-propanediol a concentraciones de 4 o 5% eran los crioprotectores de menor toxicidad. En 1996, Diwan y Kandasami, (1997), congelaron embriones y larvas de *Penaeus semisulcatus*, encontrando que el metanol y el Me_2SO a concentraciones entre 5 y 10% procuraban los mejores resultados en términos de sobre vivencia (63%) post-descongelación con protocolos de congelación rápida. Por último, Preston y Coman (1998), estudiaron los efectos de varios crioprotectores penetrantes y no penetrantes, en embriones y nauplios de *Penaeus esculentus*, pero no obtuvieron sobre vivencia de en ninguno de los protocolos de congelación rápida ni lenta.

Durante los últimos años la Corporación Centro de Investigaciones de la Acuicultura de Colombia (CENIACUA), ha realizado investigaciones para mejorar genéticamente la especie *L. vannamei*, cultivada en ciclo cerrado (cultivo sin la introducción de larvas del medio natural) actualmente en el país.

Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue el evaluar la técnica de criopreservación de espermátóforos, plasma seminal y suspensión espermática de camarón marino, mediante la utilización de agentes crioprotectores como metanol, etilen glicol, Me_2SO y glicerol, los cuales son ampliamente utilizados en criopreservación de esperma de humanos, bovinos y peces.

El presente trabajo, consistió en evaluar los diferentes aspectos relacionados con el desarrollo de un protocolo adecuado para la criopreservación espermática en *L. vannamei*, por lo tanto, se valoró en primer lugar, la toxicidad de diferentes soluciones con varios agentes crioprotectores internos (metanol, etilen glicol, glicerol y Me₂SO) a diferentes concentraciones (5, 10 y 30%) para encontrar las soluciones menos tóxicas en un período de tiempo de dos horas. Posteriormente, se evaluó la criopreservación de espermátóforo, masa seminal y suspensión espermática de *L. vannamei* con protocolos de congelación rápida (>5°C/min) y lenta (<5°C/min), para lo cual se determinó la viabilidad espermática mediante observaciones morfológicas de espermatozoides descongelados y la evaluación de la integridad de la membrana celular mediante citometría de flujo. Finalmente, se realizaron ensayos para determinar la concentración de Ionomix A23187 necesaria para activar la reacción acrosómica del espermatozoide y así emplear éste protocolo como un método evaluativo adicional de la viabilidad espermática. Aunque la fertilización de hembras sexualmente maduras inseminadas artificialmente con espermatozoides criopreservados, debiera ser el último criterio para la evaluación de la calidad espermática, en el presente caso fue de difícil metodología y requiere estudios más específicos para poder adelantar una metodología de inseminación o de fertilización artificial con muestras criopreservadas. Todos estos parámetros evaluados se utilizaron para determinar la calidad del espermatozoide descongelado y así concluir el mejor método para la criopreservación del material espermático del camarón marino *L. vannamei*.

La citometría de flujo es una técnica de evaluación celular que se empezó a emplear a finales de los años sesenta por Kamentsk y Melamed (1967), su interés fue la medición del ácido desoxirribonucleico (ADN) en cada una de las células, especialmente para el diagnóstico de células cancerígenas; posteriormente Gledhill y colaboradores (1983) En: Jhonson y Welch (1999) reportaron el uso de la citometría de flujo en la medición del ADN espermático para determinar los cambios que puedan ocurrir por daños genéticos en las células. Entre las investigaciones realizadas con la citometría de flujo en aspectos reproductivos en especies acuícolas, se encuentran los estudios de Ogier de Baulny y colaboradores (1997), quienes evaluaron la integridad de membrana y la actividad mitocondrial del espermatozoide criopreservado de la Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Dos años mas tarde, Ogier de Baulny y colaboradores (1999) realizaron ésta misma evaluación en el Bagre Europeo (*Silurus glanis*). Por último, en espermatozoide de bovinos Jhonson y Welch (1999) emplearon la citometría de flujo para realizar sexaje de cada espermatozoide de acuerdo a la diferencia de los cromosomas X y Y.

Este trabajo fue realizado como requisito para optar el título de Biólogo Marino de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Se ejecutó en las instalaciones de la Corporación Centro de Investigaciones de la Acuicultura de Colombia, CENIACUA, en la Costa Atlántica colombiana, en Punta Canoa, Bolívar. El laboratorio de CENIACUA se encuentra localizado en el distrito de Cartagena, en la denominada Zona Norte, específicamente a dos kilómetros al nor-occidente del corregimiento de Punta Canoa y a 11 kilómetros al norte de la carretera que comunica a Cartagena con Barranquilla

(Vía al Mar). El proyecto fue financiado por COLCIENCIAS, en el proyecto titulado "Desarrollo de la tecnología de criopreservación de esperma del camarón marino *Litopenaeus vannamei*, como estrategia en el mejoramiento genético y la maduración en ciclo cerrado" cuyo principal investigador es el Dr. Jorge Arturo Suárez, Biólogo Marino de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Características del esperma de Decápodos.

El esperma de los Decápodos está catalogado como atípico, con gametos no móviles. Se encuentra clasificado en: esperma multisatélite, (el de los *reptantia* cangrejos y langostas) y esperma unisatélite, (el de los *natantia*, camarones) (Lynn & Clark, 1983a).

El esperma presenta tres zonas: **(a)** un cuerpo esférico que contiene al núcleo que se observa en forma descondensada, **(b)** una cápsula cónica o región acrosómica, al parecer está separada del núcleo por una membrana doble en la región citoplasmática de la cápsula y **(c)** un apéndice radiado a manera de clavo (en ingles “spike”), localizado en la región convexa del cuerpo esférico (Clark *et al.*, 1981; Lynn & Clark, 1983b).

1.2 Agentes Crioprotectores.

Los agentes crioprotectores son aditivos empleados en las congelaciones para disminuir los daños celulares producidos por el proceso de congelación-descongelación. Este efecto ocurre al incrementar la fracción de líquido no congelado

a una temperatura criogénica específica, reduciendo la composición iónica de la solución (Morris, 2000).

La diferencia en los pesos moleculares de los crioprotectores (Tabla 1) varían el grado de penetración de éstos al interior celular (Parks y Graham, 1992) y en su acción crioprotectora. Además, cada uno tiene diferentes modos de interacción con los elementos celulares y en cierta forma, alteran de manera distinta las estructuras y funciones bioquímicas de las células (Edashige *et al.*, 1999).

El glicerol, el Me₂SO y la sacarosa, son compuestos conocidos como estabilizadores de la integridad de la bicapa lipídica y de la función proteica durante la congelación-descongelación (Anchordoguy *et al.*, 1988). Por otro lado, el glicerol aumenta la viscosidad, generando un gradiente menos fuerte en el momento de deshidratación celular (Fiser, 1986). El metanol, el etilen glicol y la glucosa han presentado éxito en otros protocolos de congelación en peces y mamíferos (Bernal y Uribe, 1993; Lahnsteiner *et al.*, 1997; Sommerfeld y Niemann, 1999).

TABLA 1. Pesos moleculares de los agentes crioprotectores evaluados.

Agente Crioprotector	Peso Molecular (g)
Etilen glicol	62.07
Me ₂ SO	78.13
Glicerol	92.09
Metanol	33.05
Glucosa ¹	180.2
Sacarosa ¹	342.2
⁽¹⁾ Crioprotector externo	

Los agentes crioprotectores pueden ser tóxicos a las células bajo determinadas condiciones, dependientes del tipo de agente crioprotector, concentración, tiempo de equilibrio y temperatura de adición a las células (Lin y Chao, 2000). Por tanto, la evaluación de dicha toxicidad es necesaria para el desarrollo de un protocolo de criopreservación para cualquier muestra biológica (Arun y Subramoniam, 1997).

1.3 Osmolaridad.

La mayoría de los eventos químicos asociados a la congelación, son el resultado de las propiedades osmóticas de las células. La célula está constituida por agua, organelos, sales disueltas, azúcares, proteínas y lípidos, todos rodeados por una membrana semi-permeable (Avers, 1991). Esta membrana permite que el agua fluya relativamente libre a través de ella, mientras que actúa como una barrera a grandes soluciones moleculares. El agua tiende a moverse a través de la membrana celular para mantener una concentración igual de solutos dentro y fuera de la célula. La concentración de solutos en una solución, se mide en unidades de osmolaridad, siendo éste un parámetro de gran importancia en el proceso de criopreservación (Denniston *et al.*, 2000).

Para diseñar sensatamente un protocolo de criopreservación se requiere la caracterización de las osmolaridades de los medios a emplear (Lin y Chao, 2000)

1.4 Principios de Criopreservación.

Básicamente, la congelación celular resulta de una competencia entre un proceso de transferencia de temperatura y del transporte de agua (Toner et al., 1991). Basado en lo anterior, el proceso de congelación se puede dividir en tres etapas: **1.** Las células son sometidas a una solución que contiene un agente crioprotector (metanol, etilen glicol, glicerol, Me₂SO, etc.), el cual penetra en la célula y reemplaza la mayor cantidad de agua del interior celular. **2.** Posteriormente, la célula debe regular la osmolaridad y obtener una iso-osmolaridad con el medio exterior, hecho que puede acarrear fenómenos de toxicidad e impactos osmóticos en las células (Arun y Subramoniam, 1997). **3.** En la última etapa se hace disminuir la temperatura pasando por el punto de congelación del agua y por el punto de congelación de la solución crioprotectora, en donde según la curva de congelación empleada se realiza de manera diferente la formación de cristales, los cuales pueden llegar a maltratar la célula (Ver Figura 1 A, B y C). Este fenómeno también es confirmado por Ishiguro y Rubinsky (1994) quienes emplearon glóbulos rojos para la observación de las células deformadas por los cristales de hielo a manera de puntas de aguja. De esta forma, se confirma otra manera de deterioro celular debido a la interacción célula-hielo.

Por otra parte, la formación de hielo extracelular, induce un gran número de cambios, tanto físicos como químicos, en donde, los daños celulares están relacionados con la naturaleza de la respuesta natural y cinética de la célula a las nuevas condiciones (Acker *et al.*, 1999).

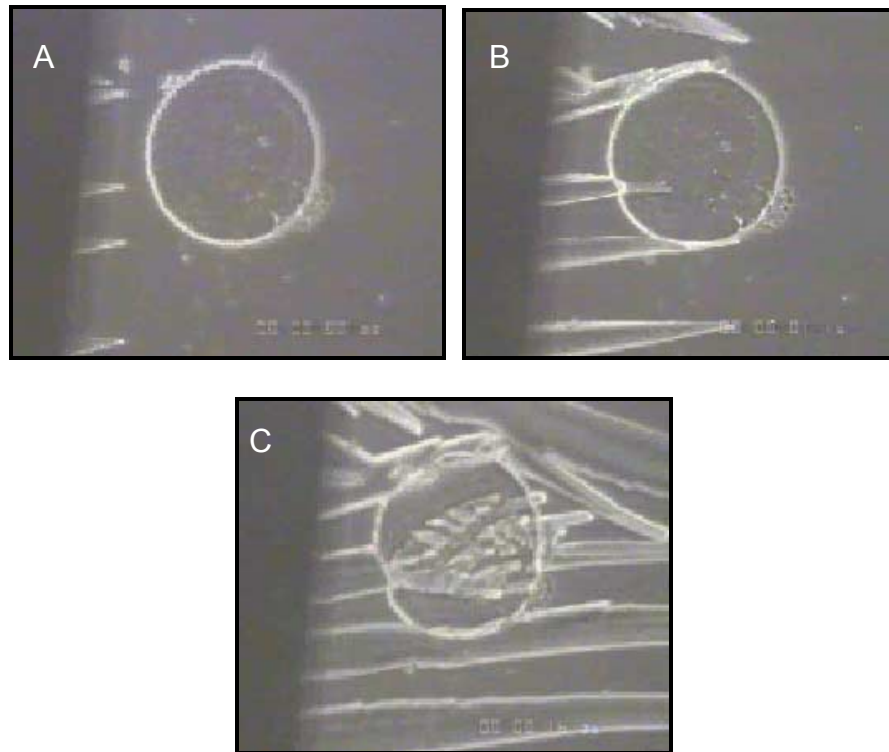


Figura 1. Propagación de cristales de hielo en la congelación de un ovocito humano (A) Se observa el ovocito intacto y los cristales de hielo formándose desde la periferia. (B) y (C) Se observan daños físicos en el ovocito (Tomado de Morris, 2000).

La temperatura desciende hasta -196°C , temperatura del nitrógeno líquido (NL_2), cuando éste es utilizado en la congelación y en donde teóricamente la viabilidad del material biológico es independiente del tiempo (Morris, 2000).

Principalmente, se conocen dos tipos de congelación, cuya diferencia radica esencialmente en la curva de congelación, considerado como uno de los factores mas importantes en el diseño y optimización de los protocolos de congelación (Lin *et al.*, 1999). El primer tipo de congelación emplea curvas de congelación rápidas y el

segundo, curvas de congelación lentas. Ambos son ampliamente utilizados actualmente en los diferentes sistemas biológicos criopreservados.

Al emplear curvas de congelación rápida, el daño celular más común es la formación de hielo intracelular (Acker, 1999), esto, debido a que la célula no ha tenido tiempo de perder una cantidad importante de agua, que es, en gran parte remplazada por el agente crioprotector interno empleado y por lo tanto, se forman cristales en el interior celular; este fenómeno está altamente relacionado con la permeabilidad de la membrana celular (Simione, 1998), específica para cada tipo de célula.

En la congelación lenta, la cristalización del medio externo comienza antes que la formación de cristales intracelulares, si éstos llegaran a constituirse. Al formarse los cristales, las partículas de soluto del medio externo se van desplazando y las células se acumulan en espacios reducidos (Figura 2), lo que aumenta la concentración de soluto por volumen, aumentando la osmolaridad del medio, por lo tanto, las células se ven inmersas en soluciones con altas osmolaridades que hacen deshidratar la célula (Janik *et al.*, 2000), pero, éstos espacios son posiblemente tóxicos tanto osmótica como químicamente (Morris, 2000), hecho que puede maltratar la célula sin haberse criopreservado aún. Sin embargo, en 1960 Nei y colaboradores (En: Takamatsu y Rubinsky, (1999) aseguraron que las células se ven lastimadas por el mecanismo de interacción entre la fase de crecimiento del hielo y el apiñamiento de las células entre los cristales extracelulares formados. Todos los anteriores

fenómenos son objeto de las investigaciones actuales en Criobiología (Takamatsu y Rubinsky, 1999).

Por otro lado, si persiste una gran cantidad de agua en el interior celular, entonces se producen daños celulares debido a la formación intracelular de cristales de hielo al momento de cristalización (fase de congelamiento) y al momento de recrystalización en la fase de descongelación (Simione, 1998).

Los protocolos de congelación lenta emplean generalmente equipos congeladores que permiten un mayor control y homogeneidad de las curvas congeladoras para cada muestra, disminuyendo en muchas ocasiones cuantiosos problemas (Conget *et al.*, 1996).

En la criopreservación de células más sensibles a cambios de temperatura, tales como las células de embriones bovinos (Sommerfeld y Niemann, 1999), biopsias de tejido ovárico (Newton *et al.*, 1996; Fabbri *et al.*, 1999), ovocitos de ratones (Cooper *et al.*, 1998) se emplean las curvas de congelamiento lento, las cuales presumiblemente acarrearán menos daños celulares (Pegg y Diaper, 1991). Dichas curvas de congelación, permiten unas condiciones fisicoquímicas de equilibrio más controladas dependientes de la permeabilidad de las células y así, éstas tendrán más tiempo de adecuarse. Además, las células pueden organizarse mejor entre en el líquido cristalizado, pues pueden ser desplazadas hasta pequeños compartimentos por donde no haya empezado la cristalización (ver Figura 2) (Morris, 2000). Si las

características intrínsecas de permeabilidad celular lo permiten, ésta soporta las nuevas condiciones que suceden en estos compartimentos (Parks y Graham, 1992).

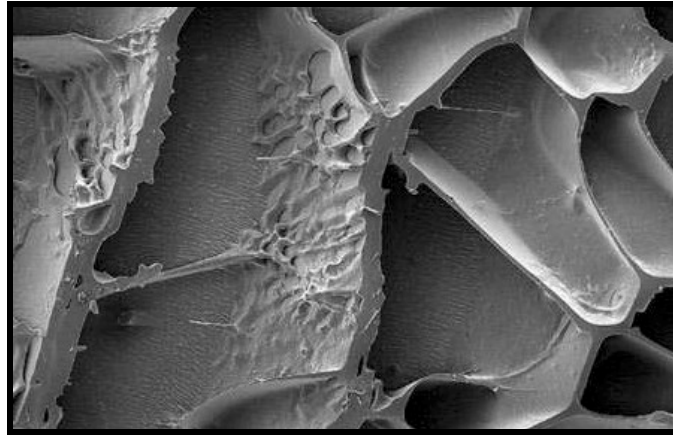


Figura 2. Corte transversal de una pajilla (0.25ml de capacidad) de esperma humano criopreservado en Glicerol. Se observan los compartimentos formados por la cristalización. Tomado de Morris (2000).

En conclusión, la curva de congelación debe ser lo suficientemente rápida para no causar daños tóxicos a la célula, ni dar lugar a la formación de cristales intracelulares, pero lo suficientemente lenta para permitir una óptima curva de permeabilidad en la célula, esto depende de las características intrínsecas de la célula y debe ser establecido para la criopreservación de cada tipo celular.

La descongelación también es un componente esencial en el protocolo, principalmente su velocidad. Los daños que se presentan en esta fase, pueden ser debidos a la formación de hielo al presentarse una recrystalización y a choques osmóticos (Fiser *et al.*, 1986).

1.5 Integridad de la Membrana Celular y su evaluación por Citometría de Flujo.

Las membranas celulares tienen que soportar un gran estrés, en donde se incluye la adición del crioprotector previa al congelamiento, cambios de volumen asociados a elongamientos y encogimientos de la membrana en respuesta a cambios hiperosmóticos debido a las soluciones crioprotectoras, deshidratación debido a la congelación, cambios de conformación de los lípidos y fosfolípidos, aumento de la concentración de solutos y la formación intracelular de hielo, lo cual es dependiente de la curva de congelación (Parks y Graham, 1992).

La pérdida de la integridad de membrana es un daño crítico normalmente ocasionado en las células durante la congelación-descongelación (Mazur, 1970 En: Anchordoguy *et al.*, 1988; Parks y Graham, 1992). La causa de éste daño es todavía incierto, pero a nivel físico se cree, es debido a un nuevo e incorrecto reordenamiento de los lípidos de la membrana celular, perdiéndose las propiedades de ésta y rompiéndose la protección que la membrana le brinda a la célula (Parks y Graham, 1992). En realidad, los daños letales producidos a las células se expresan generalmente en la pérdida de las propiedades de la membrana, independientemente de la causa y del sitio de la lesión inicial (McGann *et al.*, 1988).

La permeabilidad de la membrana en células muertas se confirmó en espermatozoides de mamíferos (Bishop y Walton, 1968 En: Jeyalektumie y

Subramoniam, 1989). Abriendo así la posibilidad de evaluar la viabilidad espermática contando la proporción de células que presenten integridad de la membrana celular.

El citómetro de flujo permite la caracterización de cada espermatozoide y la identificación de subgrupos con respecto a la totalidad de espermatozoides, inclusive en bajas cantidades celulares (Ricci *et al.*, 2000).

El objetivo de la tinción con yoduro de propidio es determinar la integridad de la membrana celular espermática. Al teñir con yoduro de propidio, el colorante entra cuando hay pérdida de la integridad de la membrana celular y se liga al ácido desoxirribonucleico (ADN) produciendo una fluorescencia roja solamente en los espermatozoides moribundos o muertos. (Evenson *et al.*, 1982; Ogier de Baulny *et al.*, 1997). Esta fluorescencia es medida por el fluorómetro del citómetro de flujo y así se obtiene datos en términos de tamaño, granularidad del citoplasma y de fluorescencia positiva o negativa de cada célula de la muestra.

1.6 Reacción Acrosómica.

Hacia comienzos del siglo veinte y gracias al microscopio óptico se detectó la eversión del espermatozoide en Brachiuros (Binford, 1913 En: Medina y Rodríguez, 1992), éste es el primer reporte de la observación de la reacción acrosómica. Mas recientemente se han efectuado una gran cantidad de investigaciones que han

revelado algunos aspectos de la reacción acrosómica y su intervención en la fertilización (Medina y Rodríguez, 1992).

El acrosoma según Avers (1991), es un lisosoma especializado que se encuentra en la cabeza del espermatozoide. Contiene una gran cantidad de enzimas, entre las más importantes se encuentra la acrosina, la cual hidroliza proteínas; un tipo especial de hialuronidasa, una hidrolasa ácida asociada solamente a los espermatozoides, la cual es solo liberada por espermatozoides viables, su función vital está relacionada con la penetración del espermatozoide a través de la pared celular; también existen algunas glicosidasas como neuraminidasa, acetilhexosaminidasa entre otras; en términos de lipasas el acrosoma contiene fosfolipasas A_2 y C las cuales son responsables en la fusión de la membranas del espermatozoide y del óvulo; finalmente, contiene diferentes fosfatasa alcalinas y ATPasas (Zaneveld y De Jonge, 1991).

Segundos después que un espermatozoide se ha adherido a la cubierta externa del óvulo, la membrana citoplásmica y la acrosómica del espermatozoide se fusionan, crean perforaciones a través de las cuales el contenido acrosómico es dispersado en el medio circundante. La cubierta externa del óvulo y las células foliculares adheridas a él son digeridas muy rápidamente, lo cual permite al espermatozoide alcanzar la membrana citoplasmática del óvulo y hacer contacto con ella. Cuando las dos membranas se fusionan, el núcleo del espermatozoide es rodeado por el citoplasma del óvulo y a continuación tienen lugar diferentes procesos que culminan con la fusión de los núcleos del óvulo y del espermatozoide (Avers, 1991).

La evaluación de la capacidad de un espermatozoide para realizar la reacción acrosómica en crustáceos se puede realizar principalmente de dos formas, la primera consiste en someter al espermatozoide a los activadores provenientes propiamente del ovocito, los cuales se pueden recolectar al lavar éstos en agua de mar y posteriormente adicionar este lavado al espermatozoide (Wang *et al.*, 1995), este procedimiento tiene sus problemas al no poder asegurar una dosis igual en diferentes evaluaciones.

La segunda forma es mediante la evaluación de la reacción acrosómica debida a la Ionófora A23187 (en Inglés, Acrosome Reaction to Ionophore Challenge, ARIC). Esta evaluación ha sido ampliamente utilizada en vertebrados e invertebrados (Clark *et al.*, 1981; Medina y Rodríguez, 1992; Bhavanishankar y Subramoniam, 1997; Januskauskas *et al.*, 2000), donde se ha encontrado una alta correlación entre la capacidad a la reacción acrosómica del espermatozoide y el potencial fertilizante de éste (Januskauskas *et al.*, 2000). El tratamiento mediante la Ionófora A23187 provoca el aumento del calcio (Ca) intracelular lo cual activa la reacción acrosómica. La Ionófora A23187 actúa de dos formas, ayuda la apertura de los canales celulares para la entrada del calcio y además transporta activamente el calcio extracelular al interior (Szabo, 1981 En: Bhavanishankar y Subramoniam, 1997).

2. METODOLOGÍA

2.1 Material Biológico.

Los reproductores empleados en el presente estudio, hacen parte del lote de reproductores del laboratorio de producción de CENIACUA en Punta Canoa, Bolívar. Son reproductores de ciclo cerrado con un peso promedio de treinta y cinco a cuarenta gramos, aclimatados a una salinidad promedio de 35 ppm. Presentaban más de once meses de vida, encontrándose maduros sexualmente.

2.2 Extracción del Material Espermático.

En el momento de la extracción del semen el individuo se encontraba en intermuda, se permitió un periodo de nueve días entre cada una de las recolecciones de esperma del mismo individuo, para permitir una maduración completa del esperma.

Para la obtención del esperma se extrajeron los espermatóforos (paquete espermático, (Subramoniam, 1993)) izquierdo y derecho, realizando presión en la región lateral del poro genital (Lin y Ting, 1986), como se indica en la Figura 3. Posteriormente, se retiraron cada uno de los espermatóforos (derecho e izquierdo) del individuo, con ayuda de unas pinzas, Figura 3.

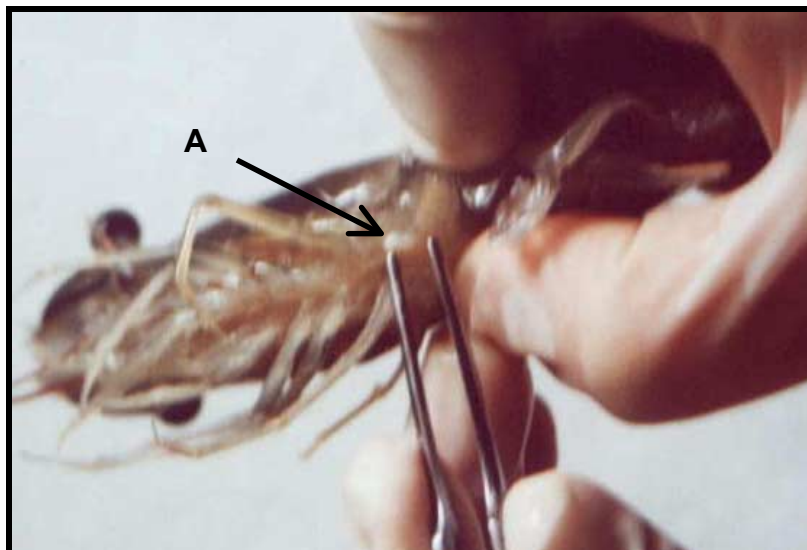


Figura 3. Extracción del espermatóforo derecho, se observa la masa espermática saliendo del poro genital. **(A)** Espermatóforos.

En toda la investigación se emplearon los espermatóforos extraídos de los machos en tres formas diferentes, **1.** Espermatóforo completo, sin manipulación adicional; **2.** Suspensión espermática mediante la agitación mecánica del espermatóforo (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997), en la solución a evaluar; **3.** Extracción de la masa espermática mediante leve presión en la región posterior del espermatóforo (Lin y Ting, 1986).

2.3 Agentes Crioprotectores Evaluados.

Se evaluó la eficacia de cuatro agentes crioprotectores internos con diferentes pesos moleculares (Tabla 1). Los cuales son Me₂SO (Carlo Erba Reagenti, Francia),

metanol (Mallinckrodt Baker S.A., México), glicerol (Mallinckrodt Baker S.A., México) y etilen glicol (Sigma Chemical Co., St Louis; MO).

Como agente crioprotector externo se evaluó la glucosa (Carlo Erba Reagenti, Francia). Para la preparación de la solución crioprotectora se utilizó cada uno de los agentes crioprotectores y agua de mar estéril (35 ppm), la cual fue empleada como diluyente.

2.4 Mediciones de Osmolaridad.

Se midió la osmolaridad de las siguientes soluciones, con un osmómetro Precision Systems μ OsmeteTM micro osmometer (Figura 4):

- a) Agua de mar estéril (35ppm) por ser el medio en donde se realiza la fertilización de los camarones naturalmente.
- b) Agua de mar estéril con 0.2M de glucosa, como crioprotector externo.
- c) Agua de mar estéril con 0.2M de sacarosa que al igual que la glucosa es un crioprotector externo.
- d) Agua de mar artificial libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987).
- e) Agua de mar artificial libre de calcio con 0.2M de glucosa.
- f) Agua de mar artificial libre de calcio con 0.2M de sacarosa.



Figura 4. Osmómetro Precision Systems.

La técnica de punto de congelación empleada por el osmómetro no permite la medición de las soluciones que contengan el agente crioprotector interno (metanol, glicerol, Me_2SO y etilen glicol), y por esto no se pudo realizar su medición.

2.5 Evaluación de la tolerancia de las células a la toxicidad de las soluciones de congelamiento a temperatura ambiente.

Para evaluar la tolerancia de las células a la relativa toxicidad de las soluciones crioprotectoras a temperatura ambiente ($18\text{-}20^\circ\text{C}$), se realizaron suspensiones espermáticas en dieciséis soluciones evaluadas (tratamientos, Tabla 2), midiendo cada media hora durante ciento veinte minutos la capacidad de las células espermáticas a permanecer sin sufrir cambios morfológicos radicales que sugieran

algún deterioro celular como lo es la pérdida del apéndice espermático no móvil “spike” (Subramoniam, 1993), o posteriormente la eversión de la célula (Wang *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1981; Bray y Lawrence, 1998), sugiriendo una reacción acrosómica bifásica, lo que involucra cambios dramáticos en la morfología (Anchordoguy *et al.*, 1988). Cada tratamiento tuvo cinco réplicas compuestas por diferentes individuos.

A cada una de estas, se adicionó trescientos microlitros de suspensión espermática y la misma cantidad de la solución experimental (ver Tabla 2), esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente (18-20°C). La evaluación espermática fue realizada mediante la observación de morfotipos, los cuales han sido utilizados por varios investigadores como el método más óptimo, fácil y económico para caracterizar la viabilidad espermática y el consiguiente potencial de fertilización de varias especies (Sukcharoen *et al.*, 1995) y de *L. vannamei* (Bray y Lawrence, 1998; Alfaro, 1993).

Para la identificación de morfotipos en las muestras, se observaron cien células (Alfaro, 1993; Alfaro y Lozano, 1993; Clark *et al.*, 1981) a 40X en un microscopio Olympus C-20, identificando el número de: **a)** células con “spike” **b)** células sin “spike” **c)** células evertidas o presentando signos de evaginación como indicación de la reacción acrosómica en Penaeidos descrita por Clark y colaboradores (1981). Estas últimas se consideran no viables para fertilizar ovocitos (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997).

No se emplearon tinciones vitales como la tinción con azul de tripan, debido a presentar relativamente bajos niveles de confianza en estas células (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997; Wang *et al.*, 1995), además estas técnicas tienden a sobreestimar la proporción de células viables (Wang *et al.*, 1995).

Tabla 2. Tratamientos para la evaluación de la toxicidad de las soluciones crioprotectores.

Tratamiento	Solución Diluyente	Agente Crioprotector Interno	Concentración del Agente Crioprotector (v/v)	Otros Aditivos
1	Agua de Mar estéril	Etilen Glicol	5	-
2	Agua de Mar estéril	Etilen Glicol	10	-
3	Agua de Mar estéril	Etilen Glicol	30	-
4	Agua de Mar estéril	Me ₂ SO	5	-
5	Agua de Mar estéril	Me ₂ SO	10	-
6	Agua de Mar estéril	Me ₂ SO	30	-
7	Agua de Mar estéril	Glicerol	5	-
8	Agua de Mar estéril	Glicerol	10	-
9	Agua de Mar estéril	Glicerol	30	-
10	Agua de Mar estéril	Metanol	5	-
11	Agua de Mar estéril	Metanol	10	-
12	Agua de Mar estéril	Metanol	30	-
13	Agua de Mar Artificial libre de Ca (29 ppm) ¹	-	-	-
14	Agua de Mar Artificial libre de Ca (29 ppm) ¹	-	-	20 % Yema de huevo y 0.4M Glucosa
15	Agua de Mar Artificial libre de Ca (29 ppm) ¹	-	-	50% Suero Fetal Bovino (SFB) y 0.6M Glucosa
16	Agua de Mar estéril (Tratamiento Control)	-	-	-

¹ Composición de la solución según Leung-Trujillo y Lawrence (1987).

2.6 Metodología de congelación rápida (>5°C/min).

Se evaluaron los tres tipos de material espermático (espermátforo completo, masa espermática y suspensión espermática) frente a cada uno de los cuatro crioprotectores internos (metanol, glicerol, Me₂SO y etilen glicol). El material espermático fue suspendido en seiscientos microlitros de la solución crioprotectora con 10% (v/v) del agente crioprotector interno respectivo para cada tratamiento (ver tabla 3), y se colocó en un criovial Corning® (Corning Costar Corporation, Cambrigde, MA. USA) de 1 ml. Cada tratamiento consistió en tres réplicas, comprendidas por individuos diferentes.

Cuando se empleó el espermátforo completo, éste fue suspendió en seiscientos microlitros de cada solución crioprotectora a 4°C por un período de contacto de una hora, debido a que su recubrimiento de quitina y polisacáridos estructurales (Subramoniam, 1993), pueden impedir y disminuir la velocidad de migración del agente crioprotector al interior del espermátforo para que se lleve acabo la primera y segunda etapa de la congelación.

Cuando se realizaron las congelaciones con masa espermática al igual que en el espermátforo completo se permitió un período de contacto de una hora, esto debido a que la masa también requiere un tiempo determinado para que el crioprotector migre hacia el interior del tejido y entre en contacto con las células espermáticas.

Cuando se congelaron suspensiones espermáticas el tiempo de contacto fue de quince minutos, tiempo estimado necesario para que el crioprotector entrara en las células y alcanzara el equilibrio osmótico, primera y segunda etapa.

Para disminuir la temperatura y realizar la tercera etapa de la congelación, los crioviales con las muestras se colocaron en los vapores de NL_2 a una altura de 5 cm de la superficie del líquido congelante por diez minutos, alcanzando una curva de congelación superior a $5^{\circ}C/min$ (apx. $10^{\circ}C/min$). Posteriormente, se sumergieron en NL_2 por veinticuatro horas, confirmando que se alcanzara una temperatura de $-196^{\circ}C$ (Fiser *et al.*, 1986).

Tabla 3. Tratamientos para la congelación rápida ($>5^{\circ}C/min$).

Tratamiento No.	Material espermático	Composición de la solución diluyente	Agente Crioprotector 10% (v/v)
1	Espermatóforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Glicerol
2	Espermatóforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Metanol
3	Espermatóforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Etilen Glicol
4	Espermatóforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Me_2SO
5	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Glicerol
6	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Metanol
7	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Etilen Glicol
8	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Me_2SO
9	Suspensión	Agua de mar estéril con	Glicerol

10	espermática Suspensión espermática	glucosa 0.2M Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Metanol
11	Suspensión espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Etilen Glicol
12	Suspensión espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Me ₂ SO

Nota: El tratamiento control consistió en agua de mar estéril (35 ppm).

2.6.1 Metodología de descongelación de las muestras de congelación rápida (>5°C/min).

Al término de veinticuatro horas en el NL₂ las muestras se descongelaron a 28°C por un minuto en un baño de maría, posteriormente se diluyó la concentración del agente crioprotector para que no se convirtiera en tóxico y se suspendió en dos mililitros de agua de mar con 0.2M de sacarosa para disminuir el choque osmótico producido por la salida del crioprotector y la entrada del agua nuevamente en la célula (Edashige *et al.*, 1999).

La evaluación se realizó mediante observación de morfotipos celulares al igual que lo indicado en el numeral 2.5.

2.7 Metodología de Congelación lenta (-0.5°C/min).

Se evaluó la metodología de congelación lenta utilizando los mismos cuatro agentes crioprotectores (metanol, glicerol, etilen glicol y Me₂SO) ensayados anteriormente

(numeral 2.6) a una concentración de 10% (v/v) frente a los tres tipos de material espermático (espermátforo completo, masa espermática y suspensión espermática) (Tratamientos, ver Tabla 4). El tratamiento control consistió en agua de mar estéril. En cada uno de los tratamientos se emplearon tres machos diferentes, correspondiendo cada uno a una replica.

Tabla 4. Tratamientos evaluados en la congelación lenta (-0.5°C/min).

Tratamiento No.	Material espermático	Composición de la solución diluyente	Agente Crioprotector
1	Espermátforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Glicerol
2	Espermátforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Metanol
3	Espermátforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Etilen Glicol
4	Espermátforo completo	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Me ₂ SO
5	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Glicerol
6	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Metanol
7	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Etilen Glicol
8	Masa Espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Me ₂ SO
9	Suspensión espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Glicerol
10	Suspensión espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Metanol
11	Suspensión espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Etilen Glicol
12	Suspensión espermática	Agua de mar estéril con glucosa 0.2M	Me ₂ SO

Nota: El tratamiento control consistió en agua de mar estéril (35 ppm).

Las suspensiones espermáticas, fueron concentradas en doscientos microlitros de agua de mar estéril centrifugando a 200 g por dos minutos (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997) sin causar daño alguno al potencial fertilizante del espermatozoide (Coetzee *et al.*, 1992). El espermatozoide completo y la masa espermática se colocaron en quinientos microlitros de la solución crioprotectora (agua de mar estéril con 0.2M de glucosa). Posteriormente, el agente crioprotector correspondiente a cada uno de los tratamientos, fue adicionado en dos pasos (5% cada vez, para un total de 10%(v/v)), permitiendo que se regularan las condiciones por cinco minutos entre cada paso (10 minutos en total) a una temperatura de 10°C (Ver Figura 5), de ésta forma se trata de disminuir el estrés ocasionado por la adición de los agentes crioprotectores (Gao *et al.*, 1992; Babiak *et al.*, 1997).

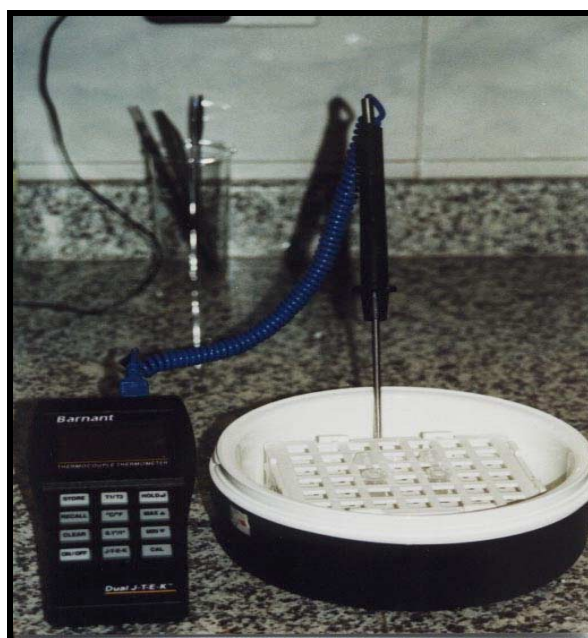


Figura 5. Monitoreo de la temperatura de las muestras durante el tiempo de contacto (10 min.) con el Agente Crioprotector.

Para congelar las muestras de masa espermática y de suspensión espermática se emplearon pajillas francesas de 0.5 ml. (Sommerfeld y Niemann, 1999) (Ver Figura 6B) que fueron selladas con polivinil alcohol (Sigma Chemical Co., St Louis; MO). Se utilizaron dos pajillas para cada macho y tres machos por tratamiento para un total de seis pajillas por cada tratamiento. Para las muestras con espermátforo completo se emplearon macrotubos de 2.5 ml. (Minitüb Abfüll-u, Labortechnik GMBH & Co. KG, Alemania) (Ver Figura 6A), sellados con balines en los extremos; se empleó un macrotubo por cada dos espermátforos de un mismo macho y tres machos en total.

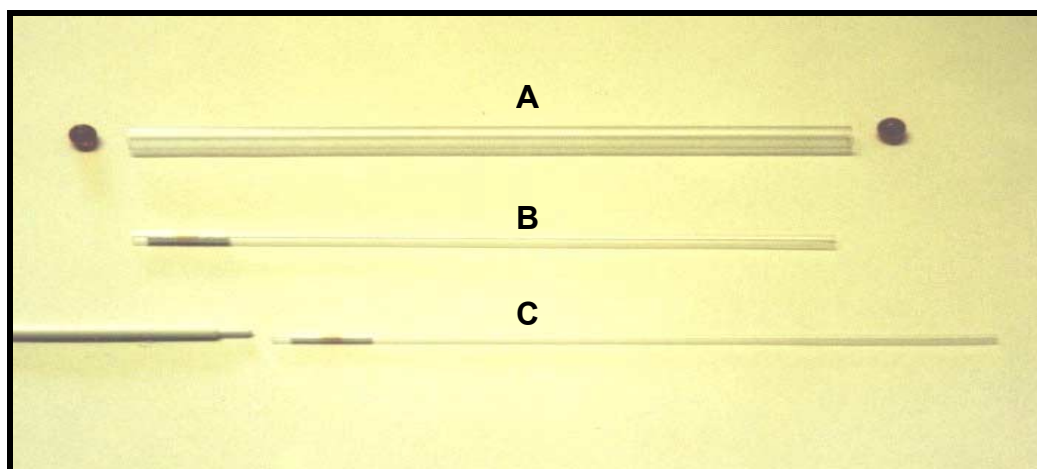


Figura 6. Macrotubo y Pajillas francesas, **(A)** macrotubo con sus selladores a los extremos **(B)** Pajilla francesa de 0.5 ml **(C)** Pajilla francesa de 0.25 con un sellador al extremo contrario.

Para la congelación se empleó un congelador programable (Cryologic CL2000) (Ver Figura 7). Se inició artificialmente la cristalización a -6.0°C (en ingles “seeding”) (Denniston *et al.*, 2000), la velocidad de congelación fue de $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. hasta

alcanzar una temperatura de -32.0°C . Posteriormente, se trasladaron las muestras directamente a NL_2 en donde se almacenaron por veinticuatro horas (Ver Figura 8).



Figura 7. Congelador programable Cryologic CL 2000.



Figura 8. Cargado del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido con las muestras congeladas.

2.7.1 Metodología de descongelación de las muestras de congelación lenta (-0.5°C/min).

Las pajillas con muestras de suspensión espermática se descongelaron a 20°C por diez segundos en un baño maría. Posteriormente, se diluyó el contenido de la pajilla en agua de mar estéril con 0.2M de sacarosa. Se centrifugó a 200 g por 2 min. (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997) y se tomó una alícuota de 10 microlitros para observar en el microscopio y realizar la respectiva clasificación celular de morfotipos (numeral 2.5) de cien células observadas aleatoriamente.

Los macrotubos con muestras de espermátforo completo se descongelaron a 25°C por 40 segundos al baño de maría y el contenido del macrotubo se colocó en cinco mililitros de agua de mar con 0.2M de sacarosa. Posteriormente, se agitó mecánicamente para realizar una suspensión espermática y así poder tomar una alícuota para evaluar la morfología de cien células descongeladas.

Las pajillas con muestras de masa espermática se descongelaron a 20°C por 10 segundos en un baño maría. Posteriormente, se diluyó el contenido de la pajilla en agua de mar estéril con 0.2M de sacarosa. Al igual que con el espermátforo completo, se agitó mecánicamente para obtener una suspensión espermática de la cual se tomó una alícuota y se evaluó la morfología de cien células.

2.8 Evaluación mediante Citometría de Flujo de la integridad de la membrana celular después de congelaciones lentas (-0.5°C/min).

El protocolo de evaluación descrito por Evenson y colaboradores (1982) el cual utiliza los marcadores rodamina 123 y yoduro de propidio, fue modificado, porque las mediciones con rodamina 123 arrojan resultados de la estimación de la actividad mitocondrial, como porcentaje de motilidad, etc. (Auger *et al.*, 1989). Dado que el esperma del camarón *L. vannamei* no presenta motilidad, no se estimó optimo realizar esta medición, por lo cual solo se empleó el yoduro de propidio.

Por medio de la citometría de flujo se comparó la calidad espermática de muestras sin congelar y congeladas. Dos muestras de esperma sin congelar fueron suspendidas en 500 microlitros de tampón FACS (Beckton & Dickinson) con 0.35 M de cloruro de sodio para ajustar a una osmolaridad superior a 1000 mOsmol/kg. Para establecer el parámetro de medición de cada muestra, se analizaron veinte mil eventos de una alícuota de 10 microlitros, en el citómetro de flujo (FacsSort de Beckton & Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA, USA, ver Figura 9), la muestra se caracterizó en términos de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de la población celular de la muestra.



Figura 9. Citómetro de flujo (FacsSort).

Posteriormente, se añadió 5 microgramos por mililitro de yoduro de propidio (Sigma Chemical Co., St Louis; MO), al resto de la muestra, incubándose a la oscuridad por 10 minutos, al cabo de los cuales la muestra fue estudiada en el citómetro para posterior análisis de los veinte mil eventos adquiridos mediante gráficas de Dot-Plot en términos de tamaño / granularidad y fluorescencia roja (ADN teñido).

Para la evaluación de las muestras congeladas, se emplearon los tratamientos de suspensión espermática de la congelación lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (Ver Tabla 4, Tratamientos 9 al 12) descrito en el numeral 2.7, se descongelaron a una temperatura de 20°C por 10 segundos a baño de maría y al igual que las muestras sin congelar se suspendieron en 500 microlitros del tampón FACS modificado, la marcación y lectura en el citómetro se realizó con el mismo protocolo descrito

anteriormente. Además de la evaluación de la integridad de la membrana celular por citometría, se evaluaron las mismas muestras mediante la observación al microscopio de cien células. Se emplearon cuatro replicas por cada tratamiento.

2.9 Estandarización de la concentración de Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica espermática.

Para determinar la concentración de Ionófora A23187 necesaria para inducir la reacción acrosómica del esperma en las muestras, y así poder implementar éste parámetro en la evaluación de la calidad espermática, se empleó la metodología descrita por Clark y colaboradores (1981) en donde se disolvió en Me₂SO 4 mg/ml de Ionófora A23187 (Sigma Chemical Co., St Louis; MO). En la evaluación de cada concentración, se adicionaron a suspensiones espermáticas de 2.5 ml, alícuotas de 5 a 35 microlitros (con incrementos de 10 microlitros, para cada tratamiento). Estas diluciones producían una concentración final de Ionófora de 8 a 56 microgramos por mililitro (con incrementos de 16 microgramos, ver tabla 5). Se incubó por un tiempo de cinco minutos. Se emplearon tres réplicas para cada concentración, observando cien células en cada muestra. El tratamiento control consistió en agua de mar estéril con 1% (v/v) de Me₂SO.

Tabla 5. Tratamientos para la evaluación de la concentración de Ionófora A23187 en la evaluación de la reacción acrosómica espermática.

Tratamiento	Concentración de Ionófora por muestra ($\mu\text{l/ml}$)
1	8
2	24
3	40
4	56

2.10 Análisis Estadístico.

Los datos de los conteos celulares en cada uno de los tratamientos evaluados en las pruebas de toxicidad y en los dos tipos de congelación (rápida y lenta) fueron recopilados en una matriz en donde las filas estuvieron constituidas por las replicas de cada tratamiento y las columnas por el número de células obtenido en la clasificación celular **a)** células con “spike” **b)** células sin “spike” **c)** células evertidas.

Para cada tratamiento de toxicidad, para los diferentes tipos de congelación (rápida y lenta) y para los datos de integridad de membrana celular de la citometría de flujo, se empleó la matriz mencionada anteriormente para determinar el promedio, desviación estándar y varianza de las células viables, ósea, la proporción de células que presenten “spike”,

En las evaluaciones de toxicidad se escogió entre las tres concentraciones (5, 10 y 30%) de cada agente crioprotector en el tiempo inicial ($t=0$), la concentración más

similar a los resultados de las muestras control (agua de mar estéril) mediante la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis. Posteriormente, se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Miller (Hollander y Wolfe, 1973) para comparar cada una de las mejores concentraciones de cada agente crioprotector en cada uno de los diferentes tiempos de cada observación (0, 30, 60, 90 y 120 minutos), por tal razón,

$$Z = Q \sqrt{(k(k+1)/12)}$$

donde Q es el valor obtenido de la tabla de percentiles A10 (Hollander y Wolfe, 1973).

$$Z = 4.69 = 3.633 \sqrt{(4 \times 5 / 12)}$$

Los tratamientos presentan diferencias significativas cuando la diferencia entre los rangos medios es mayor o igual que el estadístico anterior ($Z=4.69$). Para calcular los valores de rangos medios se empleó el paquete estadístico NCSS versión 6.0 (Jenry Hintze).

A los datos de las matrices de las congelaciones (lenta y rápida), se confirmó que presentarían una distribución binomial mediante los coeficientes de asimetría y de Kurtosis ($-2 \leq x \leq 2$). Posteriormente se confirmó la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Cochran, Bartlett y Hartley ($p>0.05$) (Steel y Torrie, 1988). Los datos que no presentarían homogeneidad de varianza se transformaron mediante raíz cuadrada de $Y + 3/8$ (Bray *et al*, 1985 En: Alfaro, 1993). Se realizó una ANOVA

con los datos de los conteos de células con “spike” para encontrar efectos independientes y/o acumulativos de los tratamientos. Las diferencias entre las proporciones de la clasificación celular de células con “spike” se realizó mediante una prueba de rangos múltiples (95% Fisher LSD). Se empleo el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS para Windows 2.0 (Statistical Graphics Corp.)

Para comparar las observaciones de morfotipos celulares con los resultados de viabilidad celular por integridad de membrana mediante la citometría de flujo se realizó una correlación de Spearman.

Los datos de los promedios de células con “spike” se graficaron para cada tratamiento denotándose las diferencias estadísticas con letras, basados en los resultados de la prueba de rangos múltiples, así como se denotan los resultados de los trabajos de Ogier de Baulny y colaboradores (1999).

3. RESULTADOS

3.1 Extracción del material espermático.

Los espermatoóforos empleados en todo el estudio presentaban las siguientes características macroscópicas: color blanco en total ausencia de necrosis, tamaño mínimo de diez milímetros de largo. La masa espermática tenía un color blanco perlado, aspecto brillante y de consistencia adhesiva.

Al manipular el espermatoóforo completo y la masa espermática, se observó que al término de cinco minutos de exposición a la solución crioprotectora, el material espermático se hidrataba ampliamente y por lo tanto el cambio del volumen era sustancial, por otro lado, la consistencia adhesiva se disminuía.

3.2 Mediciones de Osmolaridad

Se realizó la medición de osmolaridad de las soluciones empleadas en las congelaciones (sin adicionar el agente crioprotector interno) utilizando un osmómetro de punto de congelación. Las lecturas registradas para cada solución se encuentran en la Tabla 6. La osmolaridad del agua de mar estéril (35 ppm), la solución empleada en las congelaciones rápidas y lentas, fue superior a 1000 mOsmol/kg.

Al adicionar glucosa y sacarosa a las soluciones se le aumenta la osmolaridad en aproximadamente 200 mOsm/kg.

Tabla 6. Osmolaridad de cada uno de las soluciones empleadas en los ensayos de criopreservación.

Solución Crioprotectora	Osmolaridad (mOsm/kg)
Agua de mar estéril (35ppm)	1048
Agua de mar estéril con 0.2M de Glucosa	1245
Agua de mar estéril con 0.2M de Sacarosa	1259
Agua de mar artificial libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987)	739
Agua de mar artificial libre de calcio con 0.2M de Glucosa	930
Agua de mar artificial libre de calcio con 0.2M de Sacarosa.	943

3.3 Evaluación de la tolerancia de las células a la toxicidad de las soluciones de congelamiento a temperatura ambiente.

El morfotipo de las células presumidas como viables son aquellas a las cuales se les observaba la presencia del apéndice celular de Decápodos “spike” (ver Figura 10).

Los morfotipos de células sin “spike” (ver Figura 11A) y las células que presentaban signos eversión y consiguiente reacción acrosómica (ver Figura 11B) son células cuyo morfotipo es radicalmente diferente a las células con “spike”. Estos dos morfotipos se consideran no aptos para la fertilización.

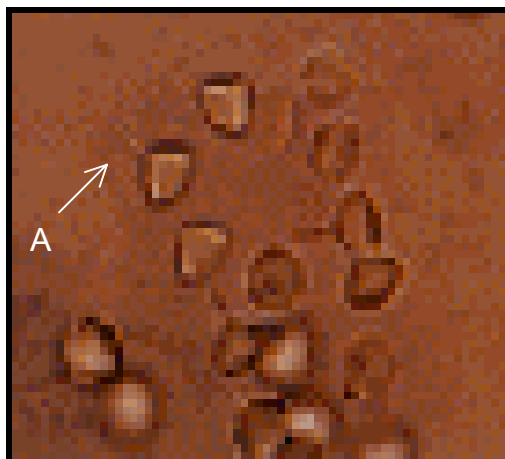


Figura 10. Morfotipo de célula con **(A)** "spike".

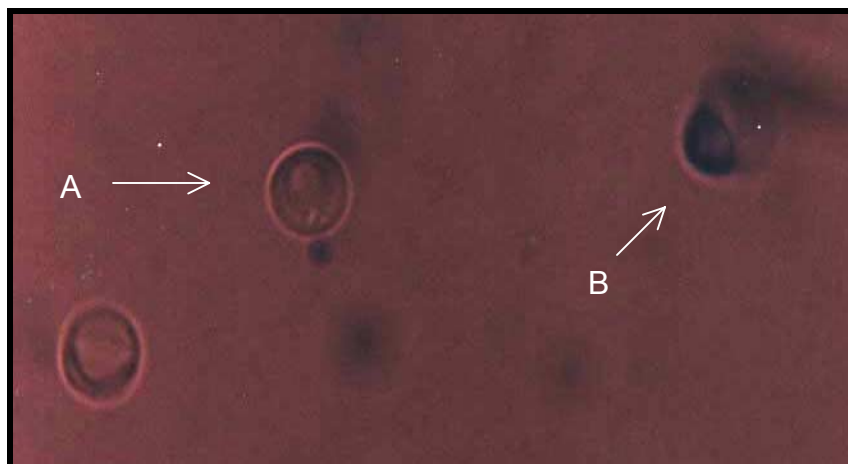


Figura 11. Morfotipos de células espermáticas **(A)** sin "spike" y **(B)** evertida, presentando signos de reacción acrosómica.

El tratamiento menos tóxico a lo largo de todo el período de observación de ciento veinte minutos fue el que contenía etilen glicol al 5% ($t=120$ min, 88.8 células con "spike"). El más tóxico el tratamiento que consistió en suspender el esperma en agua de mar artificial libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987), el 100% de las células se evertieron desde el tiempo inicial ($t=0$) (ver Tabla 7).

A una concentración de 10% el metanol, glicerol y Me₂SO son menos tóxicos que a concentraciones de 5 y 30%.

El 30% de todos los agentes crioprotectores es tóxico para las células desde los primeros treinta minutos. A los ciento veinte minutos la toxicidad mas elevada fue observada en el tratamiento con metanol al 30%, en promedio se observaron <10% de células con spike.

En ambos casos, la adición de 50% de suero fetal bovino y 20 % yema de huevo al agua de mar artificial libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987), mantiene la viabilidad espermática estable (t=120 min.; 84.0% y 78.6% células con “spike” respectivamente) por el tiempo evaluado.

Tabla 7. Promedio de células con “spike” en cada uno de los tratamientos de toxicidad a lo largo del periodo de observación de 120 minutos.

Tratamiento	Tiempo (minutos)				
	0	30	60	90	120
Agua de mar estéril Me ₂ SO 5%	86,0	65,2	64,2	64,0	58,6
Agua de mar estéril Me ₂ SO 10%	84,8	65,8	67,8	67,0	66,0
Agua de mar estéril Me ₂ SO 30%	68,6	65,8	48,6	49,2	45,2
Agua de mar estéril glicerol 5%	79,0	76,8	80,2	76,4	75,8
Agua de mar estéril glicerol 10%	89,0	88,0	81,6	86,0	86,2
Agua de mar estéril glicerol 30%	86,4	69,4	69,6	70,6	66,2
Agua de mar estéril metanol 5%	93,0	85,0	85,8	87,4	82,2
Agua de mar estéril metanol 10%	90,6	88,4	87,8	86,6	85,6

Agua de mar estéril metanol 30%	94,8	88,4	66,4	58,6	8,2
Agua de mar estéril Etilen Glicol 5%	90,8	90,4	89,8	89,8	88,8
Agua de mar estéril Etilen Glicol 10%	93,2	89,2	87,4	86,6	85,2
Agua de mar estéril Etilen Glicol 30%	90,4	52,0	41,8	37,2	33,4
Agua de Mar Artificial libre de Ca (29 ppm), 20 % Yema de huevo y 0.4M Glucosa	84,4	79,6	82,6	80,4	78,6
Agua de Mar Artificial libre de Ca (29 ppm), SFB 50% y 0.6M Glucosa	93,0	87,0	86,0	85,0	83,7
Agua de Mar Artificial libre de Ca (29 ppm)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Control Agua de Mar estéril	91,0	88,0	89,0	87,0	87,0

Al escoger mediante la prueba de Kruskal-Wallis la mejor concentración de cada tratamiento con respecto al tratamiento control en el tiempo inicial ($t=0$), se encontró ($Z < 1,9600$) que el metanol, glicerol y Me_2SO al 10% y el etilen glicol al 5% eran las mejores concentraciones, por lo tanto se tomaron los datos de estos tratamientos para compararlos entre si en los diferentes tiempos de evaluación (0, 30, 60, 90 y 120 minutos), en donde mediante la comparación de rangos medios (Tabla 8) de la prueba de Miller ($Z \geq 4.69$) se encontró que en el tiempo inicial ($t=0$) no hay diferencia entre las mejores concentraciones de los tratamientos; para el segundo tiempo ($t=30$) el tratamiento de 10% Me_2SO difiere con los otros tratamientos; para el tercer tiempo ($t=60$) no existe diferencia significativa entre los tratamientos de 10% Me_2SO y 10% glicerol ni entre 10% metanol y 5% etilen glicol; para el cuarto tiempo ($t=90$) el tratamiento de 10% Me_2SO difiere con los otros tratamientos y para el quinto

tiempo ($t=120$) al igual que el anterior, el tratamiento de 10% Me_2SO difiere con los otros tratamientos (ver Tabla 9).

Tabla 8. Rangos medios para las concentraciones mas semejantes al control (agua de mar estéril) en cada tiempo evaluado.

Tratamiento	Tiempo 0 min.	Tiempo 30 min.	Tiempo 60 min.	Tiempo 90 min.	Tiempo 120 min.
10% Me_2SO	7.90	4.40	3.70	4.10	3.70
10% Glicerol	10.00	11.70	8.00	10.90	12.10
10% Metanol	11.60	11.40	14.30	11.70	11.60
5% Etilen Glicol	12.50	14.50	16.00	15.30	14.60

Tabla 9. Diferencia entre las mejores concentraciones de cada agente crioprotector según la prueba de Miller.

Tratamiento	Tiempo 0 min.	Tiempo 30 min.	Tiempo 60 min.	Tiempo 90 min.	Tiempo 120 min.
10% Me_2SO	X	X	X	X	X
10% Glicerol	X	X	X	X	X
10% Metanol	X	X	X	X	X
5% Etilen Glicol	X	X	X	X	X

3.4 Congelación Rápida ($>5^\circ\text{C}/\text{min}$)

Se congelaron cinco replicas por cada tratamiento evaluando el material espermático (espermátforo completo, masa espermática y suspensión espermática) y el agente crioprotector (metanol, glicerol, Me_2SO y etilen glicol) a una concentración de 10% (v/v). En ninguno de los tratamientos se observaron células con “spike” (Figura 10). El total de las células se encontraban evertidas (Figura 11B) indicando un gran deterioro celular.

3.5 Congelación Lenta (-0.5°C/min).

Se congelaron cinco replicas por cada tratamiento evaluando el material espermático (espermátforo completo, masa espermática y suspensión espermática) y el agente crioprotector interno (metanol, glicerol, Me₂SO y etilen glicol) a una concentración de 10% (v/v), los resultados son descritos en los siguientes numerales.

3.5.1 Congelación Lenta (-0.5°C/min) del espermátforo completo.

En la congelación con el espermátforo completo y cada uno de los agentes crioprotectores los porcentajes de células con “spike”, células que morfológicamente son viables para la fertilización, en orden descendente fueron: metanol (25.00%), Me₂SO (15.66%), etilen glicol (12.33%) y glicerol (10.66%) (Tabla 10). El control que consistía en agua de mar estéril presentó un 10.66% de células con “spike” (Ver Figura 12).

Tabla 10. Promedio de células con “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con espermátforo completo.

Tratamiento (Agente Crioprotector)	Promedio	Desviación estándar	Varianza
Metanol	25.00	12.16	148.00
Glicerol	10.66	11.59	134.33
Me ₂ SO	15.66	19.85	394.33
Etilen Glicol	12.33	13.65	186.33
Control	10.66	18.47	341.33

El análisis de varianza (ANOVA) de los conteos de células con “spike” indicó que entre los tratamientos no hay diferencia estadística ($P>0.05$).

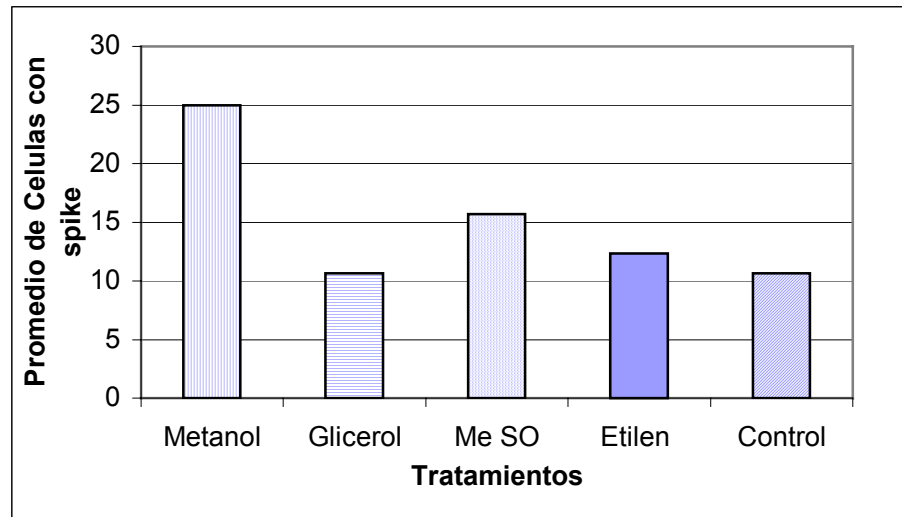


Figura 12. Promedio de células con “spike” en la congelación lenta con espermátóforo completo. No hay diferencia estadística entre los tratamientos.

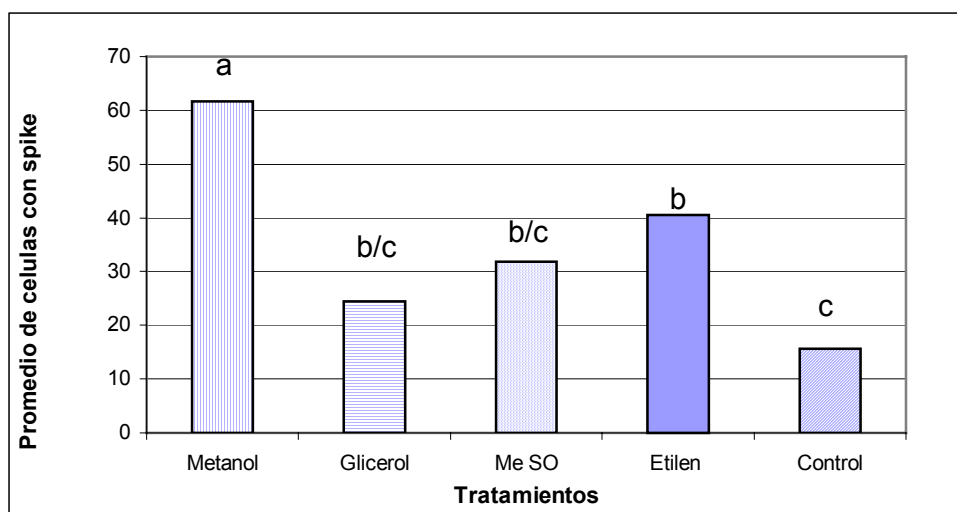
3.5.2 Congelación Lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de la masa espermática.

En la evaluación de la congelación con masa espermática y cada uno de los agentes crioprotectores se obtuvieron los siguientes promedios de células con “spike” que en orden descendente fueron: metanol (61.60), etilen glicol (40.50), Me_2SO (31.83) y glicerol (24.50). El control que consistía en solo agua de mar estéril presentó un 15.66 de células con “spike” (Ver Tabla 11). La varianza y la desviación estándar se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11. Promedio de células con “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con masa espermática.

Tratamiento (Agente Crioprotector)	Promedio	Desviación estándar	Varianza
Metanol	61.60	12.66	160.30
Glicerol	24.50	9.00	81.10
Me ₂ SO	31.83	21.16	447.76
Etilen Glicol	40.50	9.97	99.50
Control	15.66	9.66	93.60

El análisis de varianza (ANOVA) de los conteos de células con “spike” indicó que entre los tratamientos hay diferencia estadística ($P < 0.05$). Al realizar la prueba de rangos múltiples (95% Fisher LSD), se observó que el tratamiento con metanol 10% (v/v), masa espermática y congelación lenta presentaba mas células con “spike”, significativamente diferente a los otros tratamientos (Figura 13).

**Figura 13.** Promedio de células con “spike” en la congelación lenta con masa espermática. Diferente letra en la parte superior de cada barra denota diferencia estadística ($P > 0.05$).

3.5.3 Congelación Lenta (-0.5°C/min) de la suspensión espermática.

Los datos de la congelación con suspensión espermática y con cada uno de los agentes crioprotectores se transformaron mediante raíz cuadrada de $Y + (3/8)$; la desviación estándar y la varianza con los datos ya transformados se encuentran en la Tabla 12. El mayor porcentaje de células con “spike” se obtuvo con el metanol (44.33%), posteriormente le siguen etilen glicol (27.00%), Me₂SO (25.83%) y glicerol (4.83%). El control que consistía en solo agua de mar estéril presentó un 4.66% de células con “spike” (Ver Tabla 12).

Tabla 12. Promedio de células con “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con suspensión espermática.

Tratamiento (Agente Crioprotector)	Promedio	Desviación estándar de los datos transformados	Varianza de los datos transformados
Metanol	44.33	1.36	2.24
Glicerol	4.83	0.78	0.62
Me ₂ SO	25.83	1.59	2.54
Etilen Glicol	27.00	0.96	0.92
Control	4.66	0.79	0.62

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) de los conteos de células con “spike” se observó que entre los tratamientos hay diferencia estadística ($P < 0.05$). La prueba de rangos múltiples (95% Fisher LSD), indica que los tratamientos con metanol y con etilen glicol al 10% (v/v) presentaba mas células con “spike”, significativamente diferente a los otros tratamientos (Figura 14).

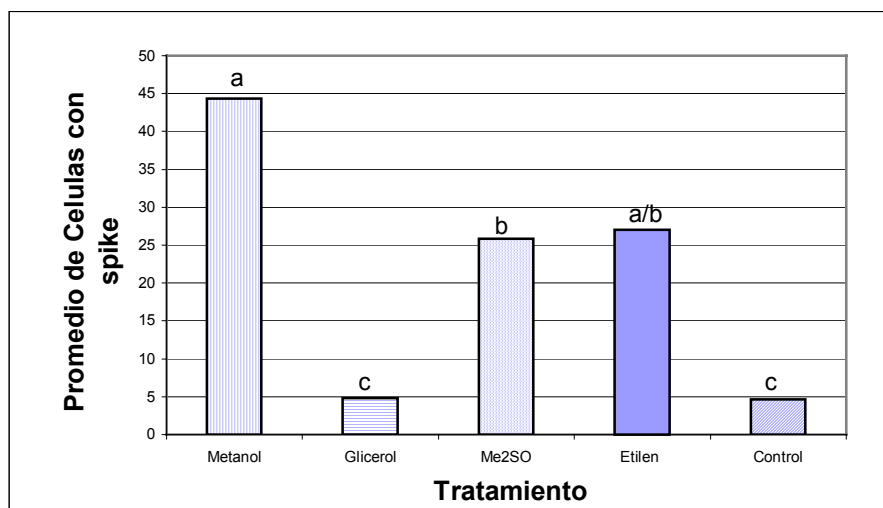


Figura 14. Promedio de células con “spike” en la congelación lenta con suspensión espermática. Diferente letra en la parte superior de cada barra denota diferencia estadística ($P > 0.05$).

3.6 Evaluación mediante Citometría de Flujo de la integridad de la membrana celular después de congelaciones lentas ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Al analizar en el citómetro de flujo la muestra sin congelar se identificó la población de espermatozoides de acuerdo al tamaño (SSC), granularidad (FSC) (Figura 15) y con respecto tamaño y fluorescencia roja (positiva o negativa) de las células (Figura 16).

Al analizar la muestra sin congelar y teñida con yoduro de propidio se observó un 80.33% del total de células analizadas presentaban integridad de membrana (Figura 16). Las figuras 17 a 20 representan un ejemplo de las lecturas de cada agente crioprotector.

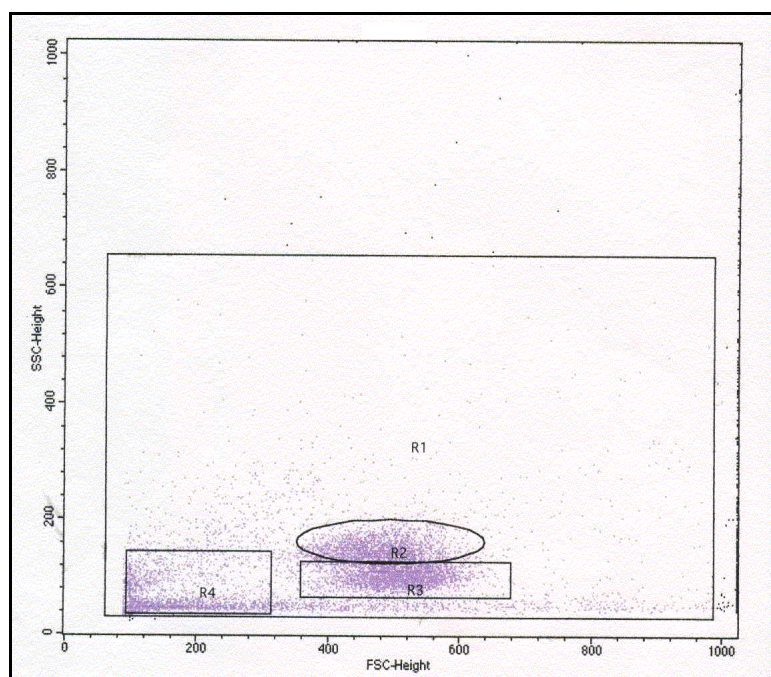


Figura 15. Grafica de Dot-plot de tamaño vs. granularidad de la población espermática de la muestra sin congelar. La región R1 representa toda la población muestreada, las regiones R2 y R3 representan dos poblaciones de células espermáticas y la región R4 representa al igual células espermáticas más pequeñas y posiblemente presentando la reacción acrosómica.

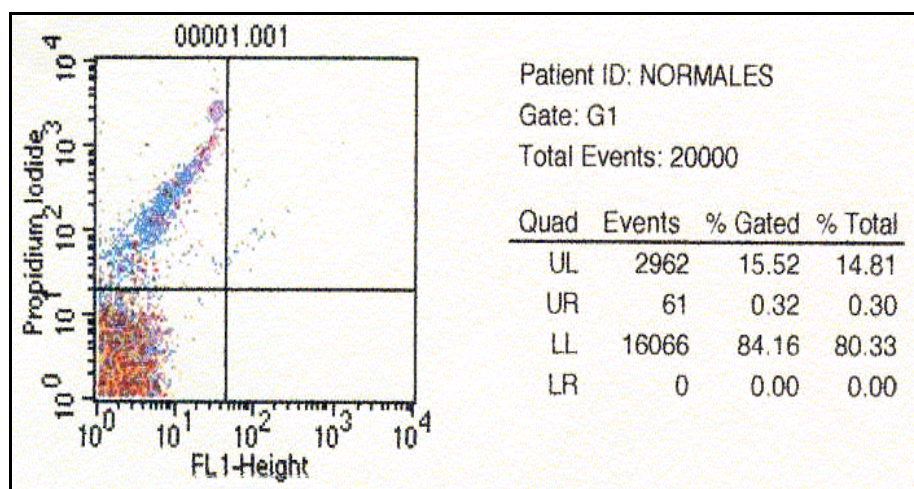


Figura 16. Grafica de Dot-plot de Fluorescencia de yoduro de propidio vs. tamaño de la muestra sin congelar. En el cuadrante izquierdo inferior (LL) se encuentran representadas las células que no se tiñeron con el marcador, células con integridad de membrana. Los distintos colores representan las siguientes regiones de la Figura 15: R1= morado, R2: roja, R3: amarillo, R4: azul.

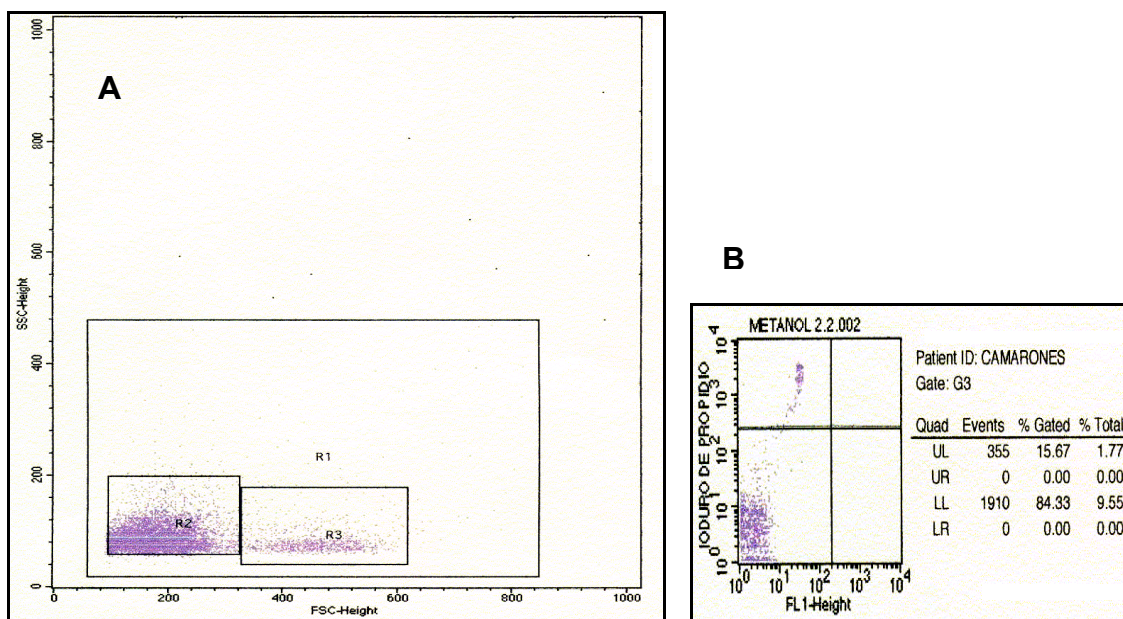


Figura 17. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con metanol al 10% en la congelación lenta. **(A)** tamaño vs. granularidad de la población total **(B)** fluorescencia de yoduro de propidio vs. tamaño espermático.

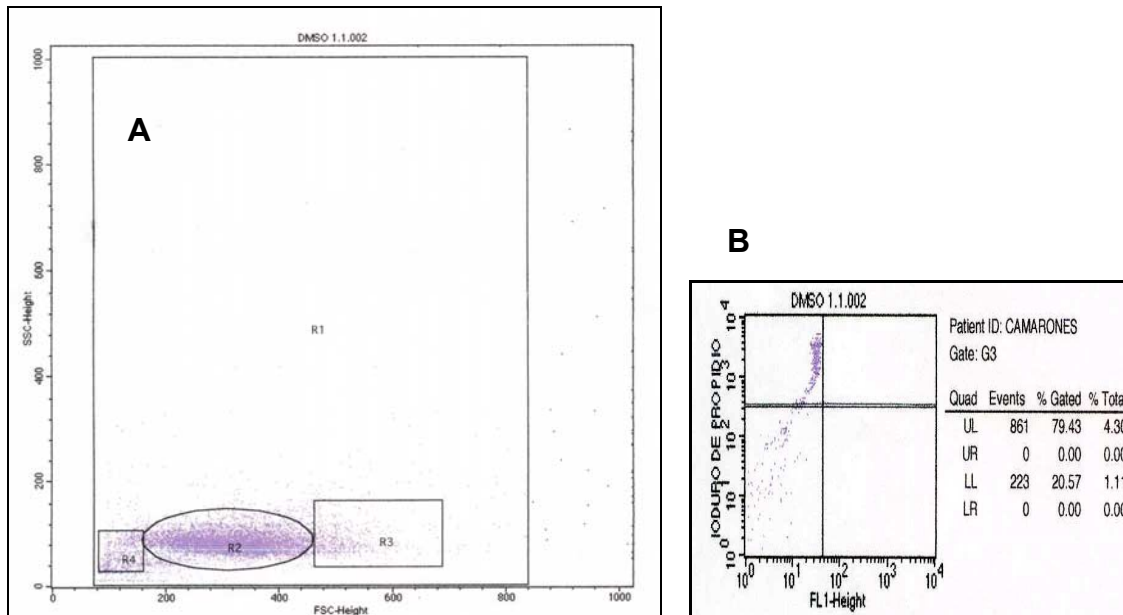


Figura 18. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con Me_2SO al 10% en la congelación lenta. **(A)** tamaño vs. granularidad de la población total **(B)** fluorescencia de yoduro de propidio vs. tamaño espermático.

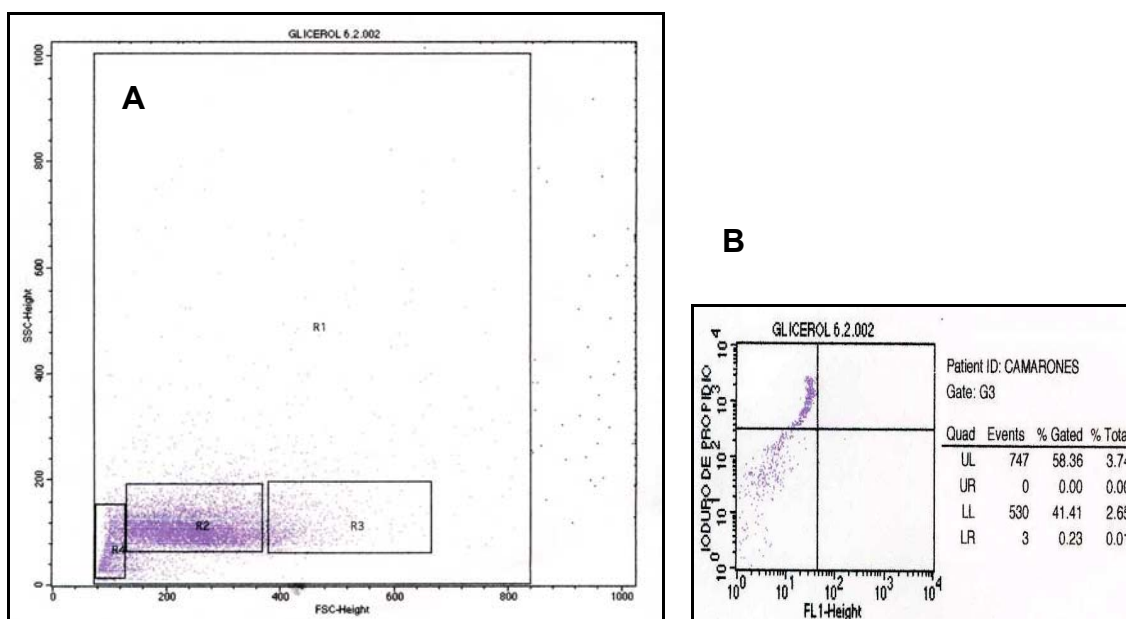


Figura 19. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con glicerol al 10% en la congelación lenta. **(A)** tamaño vs. granularidad de la población total **(B)** fluorescencia de yoduro de propidio vs. tamaño espermático.

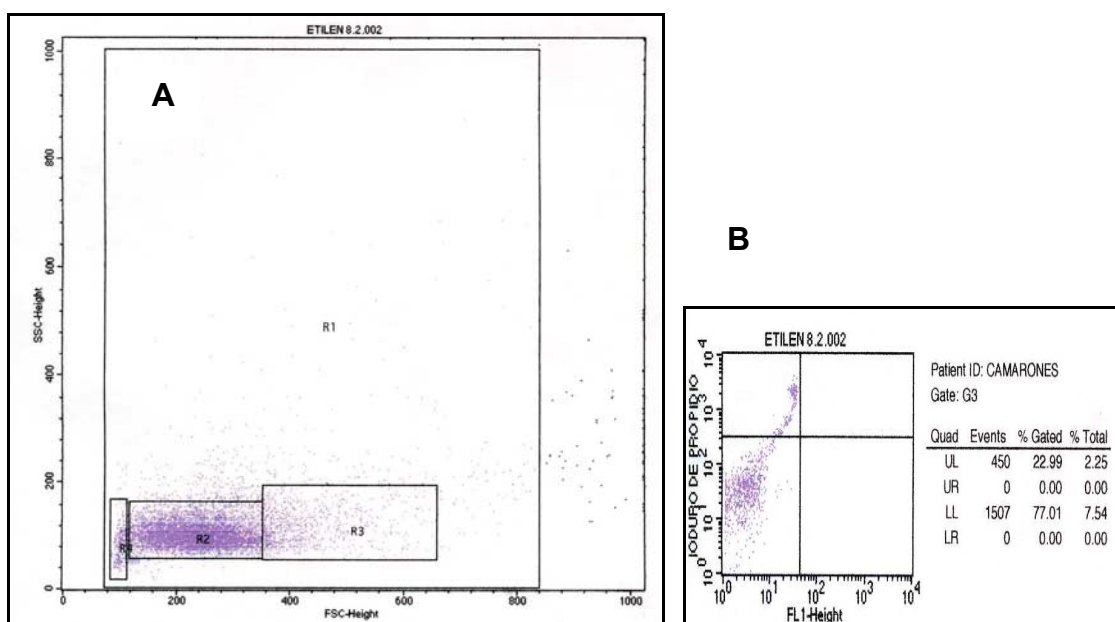


Figura 20. Graficas de Dot-plot de una muestra del tratamiento con etilen glicol al 10% en la congelación lenta. **(A)** tamaño vs. granularidad de la población total **(B)** fluorescencia de yoduro de propidio vs. tamaño espermático.

Los dos mejores agentes crioprotectores en términos de integridad de membrana fueron etilen glicol y metanol (13.03 y 7.90% respectivamente) (ver Figura 21), así mismo éstos dos agentes crioprotectores presentaron la mayor cantidad de células con “spike” al observar estas mismas muestras al microscopio y realizar la caracterización morfológica (ver Tabla 13).

Tabla 13. Promedio de células con integridad de membrana, células con “spike”, desviación estándar y varianza de la congelación lenta con suspensión espermática.

Tratamiento (Agente Crioprotector)	Promedio de Células con spike ¹	Promedio de Células con Integridad de Membrana (IM)	Desviación estándar (IM)	Varianza (IM)
Metanol	66.00	7.90	2.40	5.76
Glicerol	15.75	1.82	0.89	0.80
Me ₂ SO	38.25	1.11	0.62	0.38
Etilen Glicol	45.25	13.03	8.07	65.26
Control	0.25	1.04	0.03	0.00

¹ Observación óptica de morfotipos en la misma muestra para citometría.

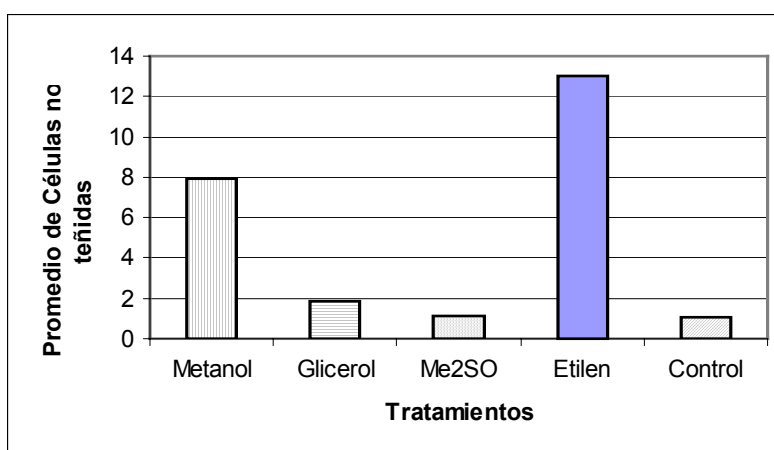


Figura 21. Promedio de células con integridad de membrana en la congelación lenta con suspensión espermática.

Al realizar la comparación estadística entre las observaciones de morfotipos y los resultados de integridad de membrana de las muestras sin congelar se encontró por medio de la correlación de Spearman que existe una correlación positiva igual a 0.65084 ($P=0.0019$).

3.7 Estandarización de la concentración de Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica espermática.

En ninguna de las muestras de las diferentes concentraciones de Ionófora se observó mas de 5% de células evertidas o con signos de haber incurrido en la reacción acrosómica (Figura 11 B) descrita por Clark y colaboradores (1981).

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Extracción del material espermático.

El aumento de tamaño en el espermatóforo y la masa espermática debido a la hidratación es un fenómeno que también se observa en los espermatóforos de *Macrobrachium rosenbergii* empleados por Chow y colaboradores (1985), esta hidratación hace que la sustancia adhesiva del material sea diluida y por lo tanto esta característica también se disminuye.

Al reducirse la adhesión del material espermático (masa espermática y espermatóforo) se dificulta la inseminación artificial ampliamente empleada en programas de mejoramiento genético y descrita en Ramos (1990), debido a que parte del éxito consiste en adherir el material espermático al télico de la hembra en el momento del desove, para así ser fertilizados los ovocitos al pasar por el espermatóforo (Wedler, 1988). Hasta el momento ningún grupo de investigadores ha podido sobrepasar este hecho en especies parecidas a *L. vannamei* (com. per. Subramanian Bhavanishankar¹).

¹ Universidad de Madras, India

Sin embargo, el proceso de fertilización en cualquier especie esta relacionado con muchos aspectos, no solamente dependientes del espermatozoide, sino de la hembra y del medio exterior en donde tenga lugar la fertilización, por tal razón, en mamíferos por ejemplo, se emplea un medio específico para realizar la fertilización artificial; al no estar sincronizados y en las mejores condiciones los aspectos anteriormente mencionados, el éxito es dudoso, por consiguiente, para inferir más adecuadamente la capacidad de fertilización del espermatozoide es necesario evaluar y correlacionar la mayor cantidad de parámetros posibles, por otro lado, Rana (1995) afirma que hasta el momento no existe verdaderamente una correlación positiva entre las técnicas de evaluación de viabilidad y realmente el potencial fertilizante del espermatozoide evaluado.

4.2 Mediciones de Osmolaridad

Los valores de osmolaridad de las soluciones empleadas como disolventes en la presente evaluación son bastante altos, mayores a 700 mOsmol/kg, (Tabla 6), comparados con los normalmente empleados en programas de congelación de especies de peces dulceacuícolas, bovinos y humanos en donde valores cercanos a 300 mOsmol/kg son los óptimos (Denniston *et al.*, 2000). En éstas mismas especies, osmolaridades de 800, 1000 y >1000 mOsmol/kg son perjudiciales y se disminuye seriamente la calidad espermática de la muestra (Conget *et al.*, 1996). Sin embargo, es importante tener en cuenta que *L. vannamei* es una especie marina donde el medio natural presenta gran cantidad de solutos, haciendo igualmente alta la osmolaridad a la cual el individuo y sus sistemas celulares se deben mantener.

4.3 Evaluación de la tolerancia de las células a la toxicidad de las soluciones de congelamiento a temperatura ambiente.

En el tratamiento con agua de mar artificial libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987), se encontraron todas las células evertidas desde el tiempo inicial ($t=0$), indicando una excesiva toxicidad debida a la osmolaridad del medio (739 mOsmol/kg). Al ser suspendidas las células en soluciones de bajas osmolaridades, el agua tiende a entrar en la célula produciendo la eversión celular similar a la ocurrida en la reacción acrosómica, el cual es un daño irreversible en el esperma de Decápodos (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997). Lo anterior concuerda con lo expuesto por Medina y Rodríguez (1992) en donde sugiere que la hidratación de los espermatozoides de *Uca tangeri* conlleva a la eversión celular. En este sentido, soluciones con osmolaridades menores a la del agua de mar 35 ppm (1048 mOsmol/kg) son perjudiciales para el esperma de *L. vannamei*. De gran importancia, es que los individuos de *Penaeus setiferus* empleados en el estudio que dio lugar a la formulación del agua de mar artificial libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987), se encontraban a una salinidad inferior a 34 ppm; mientras que los individuos empleados en el presente trabajo se encontraban a una salinidad promedio de 35 ppm.

Chow y colaboradores (1985) en la criopreservación de *Macrobrachium rosenbergii* emplean agua dulce filtrada o agua fisiológica como medio diluyente en la

composición de los medios crioprotectores, pero esta especie es un camarón de agua dulce, el cual está acostumbrado a desovar a niveles de salinidad bastante bajos, cerca de 14 ppm (Wedler, 1998), esto hace que la osmolaridad del medio natural sea al igual bajo, dando la posibilidad de emplear este tipo de diluyentes sin causar un daño osmótico a la célula. En *L. vannamei*, una especie marina, es necesario una osmolaridad mucho mas alta, cercana a los 1000 mOsmol/kg (osmolaridad del agua de mar 35 ppm) para no crear un daño irreversible en el esperma, esto, confirma lo expuesto por Bray y Lawrence (1998) en donde afirman que el agua de mar no acarrea daños morfológicos en el esperma.

En el esperma de mamíferos, generalmente los cambios de tamaño debido a diferencias osmóticas no son excesivamente perjudiciales (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997), habitualmente se observa, un ensanchamiento del apéndice espermático (Lomeo y Giambersio, 1991). Según Conget y colaboradores (1996) por el contrario, éstos cambios en el esperma de peces dulceacuícolas son críticos al observarse la disminución en la motilidad del mismo. Adicionalmente, en especies de peces marinos, los choques osmóticos, en especial los hypo-osmóticos generan cambios dramáticos en la morfología espermática, generalmente representados por ruptura de la membrana plasmática y mitocondrial (Gwo, 2000b). En Decápodos, estos cambios conllevan a daños irreversibles (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997), el principal fenómeno observado en esperma de *L. vannamei* cuando se sometió a soluciones de osmolaridades menores a 1000mOsmol/kg como lo es el agua de mar artificial libre de calcio descrita por (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987), es

la eversión del esperma, debido a la entrada excesiva de líquido a la célula para regular una situación hipotónica.

La toxicidad osmótica del agua de mar artificial libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987), puede ser disminuida al adicionar sustancias que aumenten la osmolaridad de los medios, como lo son, la de yema de huevo, el suero fetal bovino y la glucosa; que a su vez pueden ser crioprotectores externos, al adicionar éstas, se observó a los ciento veinte minutos que la cantidad de células con “spike” ligeramente había disminuido del 80%.

A los treinta minutos de exposición el Me_2SO en sus tres concentraciones (5, 10 y 30%) y los cuatro agentes crioprotectores (metanol, Me_2SO , glicerol y etilen glicol) a una concentración de 30%, presentan una seria disminución de las células con “spike”, esto según Arun y Subramoniam, (1997) sugiere una toxicidad tardía de los agentes crioprotectores debida a una interacción bioquímica en vez de una acción osmótica. Por otro lado, es bien conocida la toxicidad del Me_2SO a temperaturas fisiológicas (Lin y Chao, 2000) lo que puede dañar el acrosoma, pero ésta toxicidad se disminuye al adicionarlo a bajas temperaturas (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997), haciendo necesario que la temperatura de adición de los agentes crioprotectores a las células, sea monitoreada y de gran cuidado durante el proceso de congelación-descongelación. Al comparar los tratamientos en cada uno de los tiempos observados (0, 30, 60, 90 y 120 min.) se observa que la mejor concentración para Me_2SO (10%) es diferente a los otros tratamientos desde el segundo tiempo de

observación ($t=30$), este hecho es otro indicador de la importancia del manejo de las muestras que sean expuestas al Me_2SO .

La mejor concentración para metanol, Me_2SO y glicerol fue al 10%, con etilen glicol fue al 5%, confirmando lo expuesto por Bhavanishankar y Subramoniam (1997) en el espermatozoide de *Scylla serrata* donde los crioprotectores son menos tóxicos entre 5 y 15% pero a concentraciones mayores, se presentan daños en el morfotipo de la célula. Por tal razón, en la evaluación de las congelaciones rápidas y lentas se empleó el 10% de todos los agentes crioprotectores, pues era necesario tener un valor constante para así realizar con mayor confianza comparaciones entre los tratamientos.

La baja toxicidad del etilen glicol a concentraciones de 5 y 10% concuerda con lo expuesto por Sommerfel y Niemann (1999) quienes aseguran que el etilen glicol no es una sustancia tóxica para células como embriones bovinos.

La presencia de calcio en el medio circundante a las células espermáticas de *L. vannamei* no activa la reacción acrosómica como sí lo hace en otras especies como *Scylla serrata* (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997) al parecer, en *L. vannamei* la concentración de calcio debe ser bastante alta para que se induzca el ingreso del calcio activador de la reacción acrosómica o también puede ser que esta especie necesite otro tipo de activación.

4.4 Congelación Rápida (>5°C/min).

Las células espermáticas de *L. vannamei* fueron sensibles a las congelaciones rápidas (>5°C/min) al igual que el esperma de *Sicyonia ingentis* como lo descrito por Anchordoguy y colaboradores (1988). Con el protocolo evaluado de congelación rápida, en ninguno de los tratamientos evaluados (etilen glicol, glicerol, metanol y Me₂SO vs. masa espermática, espermátóforo y suspensión espermática) se encontraron células con “spike” post-descongelación.

Muchos autores sugieren que el problema de criopreservar sistemas celulares como la masa espermática y el espermátóforo, radica principalmente en dos factores, el primero propone la dificultad de penetración de los agentes crioprotectores antes de congelar y por lo tanto se sugiere que no todas las células se ven protegidas; el segundo expone la dificultad en la remoción de los agentes crioprotectores en el momento de la descongelación y por lo tanto puede existir una toxicidad de éstos al aumentar la temperatura. Sin embargo, vale la pena anotar que la hidratación de estos materiales espermáticos fue uno de los principales fenómenos encontrados, por lo tanto, no se puede atribuir la carencia de resultados a los fenómenos anteriormente descritos. Por otro lado, Arun y Subramoniam (1997), estima necesario para la congelación de células que no se encuentren en suspensión, un periodo de equilibrio entre 15 a 30 minutos, el cual fue cubierto completamente, pues el periodo de contacto previo a la congelación fue de una hora para estos dos tipos de material espermático.

Debido a que casi el 100% de las células observadas después de la descongelación se encontraban evertidas, se asume, que en el proceso de rápida congelación-descongelación altera las células de forma tal que se evierten durante el proceso. Una posible causa según Edashige y colaboradores (1999) puede ser la desestabilización del citoesqueleto haciéndolo mas débil a los choques osmóticos, propios de todo proceso de congelación-descongelación. Por otro lado, Bailey y Buhr (1993) atribuyen una mayor permeabilidad de las células después de los protocolos de congelación rápida, lo que ocasionaría una mayor entrada de líquidos a la célula y al no poder ésta regular su entrada por presentar daños en el citoesqueleto, se presenta fácilmente la eversión de las células.

Al parecer, la tasa de descongelación no tiene una importancia tan grande como lo es la tasa de congelación según Anchordoguy y colaboradores (1988), por lo tanto, en el presente trabajo no se evaluaron diferentes tasas de descongelación; solo se trató de emplear una tasa que en lo posible no permitiera la recrystalización (Fiser *et al.*, 1986).

4.5 Congelación Lenta (-0.5°C/min).

El empleo en la congelación de una solución altamente osmótica como el agua de mar estéril (>1000 mOsmol/kg) puede proporcionar mejores resultados durante el proceso de congelación, así lo aseguran Takamatsu y Rubinsky (1999) quienes

afirman que en soluciones de una alta osmolaridad inicial, posiblemente se cambie la morfología de los cristales de hielo, produciendo una interacción entre células-hielo mucho mas provechosa para las células.

Los resultados obtenidos con el protocolo de congelación lenta ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) confirman lo expuesto por Bhavanishankar y Subramoniam (1997), quienes encontraron en *Scylla serrata* tasas de congelación inferiores a $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ presentaban mejores resultados con los mismos agentes crioprotectores evaluados en el presente trabajo. Así mismo Behlmer y Brown (1984) encontraron a $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ un 17% de fertilización con semen criopreservado de *Limulus polyphemus*. Adicionalmente, según McGann y colaboradores (1988) existe un menor daño de la membrana celular en las congelaciones lentas que en las congelaciones rápidas, debido a la posibilidad en las congelaciones rápidas de la formación hielo intracelular el cual dañaría la célula irremediable.

En las tres congelaciones lentas con los tres tipos de material espermático, se encontró que el metanol al 10% es el agente crioprotector que mayor cantidad de células con “spike” presentaba después de la congelación-descongelación (61.6% en la congelación con masa espermática), sugiriendo una mejor protección celular comparada con los otros agentes crioprotectores evaluados. Así mismo, en la criopreservación espermática de Tilapia: (Rana y McAndrew, 1989), de Bocachico (Bernal y Uribe, 1993) y de Bagre y Cachama (González y Fresneda, 2000) el metanol también ha sido catalogado como el mejor crioprotector; en la

criopreservación de Salmónidos sus óptimos resultados dependen de la tasa de congelación empleada (Lahnsteiner *et al.*, 1997). Sin embargo, en el Brachiura *Scylla serrata* los resultados no fueron iguales, presentando el mas bajo porcentaje de células viables (Bhavanishankar y Subramoniam, 1997), siendo el glicerol el mejor crioprotector para esta especie (Jeyalectumie y Subramoniam, 1989). Este resultado con *L. vannamei* indica una acción específica relacionada con la especie (Holt, 2000), siendo para el Decápodo *L. vannamei* el metanol el agente crioprotector mas optimo.

La posible justificación del optimo resultado del metanol puede ser la baja osmolaridad de éste agente crioprotector, lo cual disminuye la posibilidad de un choque hiperosmótico durante el proceso de congelación lenta (Gwo y Lin, 1998).

Al observar los porcentajes de células con “spike” en las tres congelaciones con los tres tipos de material espermático se observa que al emplear glicerol 10% (v/v), éste no protegió las células como los otros crioprotectores (metanol, Me_2SO y etilen glicol), según Anchordoguy y colaboradores (1987) durante congelaciones lentas la interacción entre el glicerol y la bicapa fosfolipídica es desestabilizada y por lo tanto su acción protectora se ve disminuida. Por otro lado, según Parks y Graham (1992), existe evidencia que el glicerol interfiere en la configuración de las cabezas de los fosfolípidos de la membrana celular, reduciendo la fluidez de ésta. Adicionalmente éste interactúa con las proteínas y glicoproteínas causando un agrupamiento de las partículas intramembranas; por último, reduce la capacidad eléctrica de la

membrana y afecta la polimerización y depolimerización de los microtubos, afectando la membrana plasmática; todos estos fenómenos altamente dañinos para la célula. Finalmente Gao y colaboradores (1992) afirman que la temperatura y el tiempo de la adición y remoción (descongelación) del glicerol influyen en la toxicidad que pueda éste ocasionar, por lo cual se necesitaría la evaluación de éstos parámetros solo para el glicerol.

El tratamiento control no contenía ningún agente crioprotector, por lo tanto, el 4.66% de células con “spike” de dicho agente crioprotector en la congelación en suspensión espermática, indica la capacidad intrínseca de las células a soportar el protocolo evaluado de congelación-descongelación. Por otro lado, se observa que todos los valores de células con “spike” de los tratamientos con cada uno de los agentes crioprotectores en cada uno de los tipos de material espermático era mayor al obtenido mediante el tratamiento control correspondiente, lo cual ratifica la conveniencia de emplear agentes crioprotectores internos que aumenten la viabilidad espermática acompañando a ésta durante el proceso de congelación-descongelación.

Se encontró una mayor proporción de células con “spike” en las congelaciones con masa espermática, sugiriendo una protección natural de la masa espermática en las células, confirmándose lo expuesto por Bhavanishankar y Subramoniam (1997). Por otro lado, es de esperar que al manipular las células para realizar la suspensión espermática y al colocar la célula en un medio sin la contextura a la cual estaba

aconditionada, ésta entre en un mayor estrés y así su resistencia al proceso evaluado, se vea disminuida.

La diferencia entre los resultados de los tres tipos de material espermático evaluados, implican diferencias intrínsecas en los tres tipos de material. Los sistemas de tejidos celulares generalmente han sido catalogados como sistemas complicados de criopreservar (Acker *et al.*, 1999; Paynter *et al.*, 1999), debido a que se necesita una coordinación e interacción entre los constituyentes celulares, las células adyacentes y la matriz extracelular (Acker *et al.*, 1999). Uno de los fenómenos observados con mayor frecuencia en la criopreservación de estos sistemas es la formación de cristales intracelulares, hecho que es difícil de evitar debido a la complejidad del sistema (Acker *et al.*, 1999). Por otro lado, es mas fácil crear medios altamente osmóticos y tóxicos para las células en el momento de la penetración y remoción del agente crioprotector (Newton *et al.*, 1998). En términos de transmisión de la temperatura, generalmente se crea un gradiente de temperatura a lo ancho del sistema produciendo diferencias entre las células mas externas y las internas (Gook *et al.*, 1999). Por último, al estar las células muy cerca la una a la otra, la superficie de permeabilidad se ve disminuida. Sin embargo, dado los resultados obtenidos, estas células espermáticas de *L. vannamei* pueden adecuarse y sobrepasar todos los fenómenos anteriores.

4.6 Evaluación mediante Citometría de Flujo de la integridad de membrana celular después de congelaciones lentas (-0.5°C/min).

Al analizar con yoduro de propidio la muestra sin congelar y suspendida en tampón FACs modificado, se observó que el 80.33% del total de células analizadas presentaban integridad de membrana (Figura 16), indicando, que la manipulación de las células genera una disminución del número de células que presenten integridad de membrana. Lo anterior, ha sido previamente reportado en estudios de integridad de membrana por Fluorometría del espermatozoide de *O. niloticus* (Linhart *et al.*, 1993 En: Rana, 1995), en donde se observó que durante un periodo de equilibrio de 30 minutos, un 30% de las células perdían su integridad de membrana.

Al comparar entre los resultados de la observación de morfotipos y de integridad de membrana por citometría en las muestras sin congelar (Tabla 13) se observa que los promedios de viabilidad por citometría son muy inferiores a los obtenidos mediante la diferenciación de morfotipos. Este, era un resultado esperado, ya que la citometría es una técnica más sensible, dado que se puede diferenciar por tamaño, e integridad de membrana al marcar la muestra con yoduro de propidio. Este tipo de resultados también han sido analizados en los estudios de viabilidad celular por citometría en *O. mykiss* (Ogier de Baulny *et al.*, 1997) en donde la proporción de espermatozoide viable por motilidad es superior a la proporción de espermatozoide viable por integridad de membrana, por tal razón, se denomina a las evaluaciones por microscopio como subjetivas y a

las evaluaciones por citometría como objetivas (*com. per.*, Gerard Maisse¹). Sin embargo, al existir estadísticamente una correlación positiva se deduce que ambos métodos de evaluación de la viabilidad tienden a dar resultados que en términos generales se pueden considerar equivalentes, sin embargo para una mejor inferencia e interpretación de los datos, se debe complementar entre las dos evaluaciones.

Al comparar las graficas de tamaño vs. granularidad de las muestras sin congelar y las muestras congeladas, en todas se observa que las células viables post-descongelación presentan un menor tamaño que las células viables de la muestra sin congelar, este puede ser el indicio de una falta de rehidratación completa después de la descongelación y por lo tanto el tamaño celular es ligeramente mas pequeño que el tamaño previo a la congelación.

Analizada la región R4 (figura 15) de la muestra sin congelar, se observan células más pequeñas, presumiblemente, las mismas células espermáticas pero evertidas, pues al ocurrir la reacción acrosómica lo mas probable es que el núcleo quede aprisionado por el acrosoma y por lo tanto la región que es teñida es más pequeña y así mismo será observada mediante la citometría de flujo.

El mayor porcentaje de células con integridad de membrana se obtuvo al emplear 10% de etilen glicol (13.03%). Confirmando lo expuesto por McGann y colaboradores (1988) quienes afirman que mas del cincuenta por ciento de las células pierden su

¹ INRA, Francia

integridad de membrana durante el proceso congelación-descongelación, posiblemente debido a el estrés ocasionado por dicho proceso, que conlleva una mayor sensibilidad de los componentes y estructuras de la célula. Así mismo, en *O. mykiss*, una especie cuyos protocolos de criopreservación han sido ampliamente reportados y evaluados, el mayor porcentaje de células con integridad de membrana fue del 18% con 10% Me₂SO (Ogier de Baulny *et al.*, 1997). Al comparar estos dos porcentajes se confirma lo expuesto por McGann y colaboradores (1988) quienes afirman que la pérdida de integridad de membrana es el daño mas común independiente de la causa y del sitio de la lesión inicial en la célula congelada y descongelada.

4.7 Estandarización de la concentración de Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica espermática.

En ninguna de las concentraciones de Ionófora A23187 de los diferentes tratamientos se encontró un porcentaje mayor al 5% de células evertidas, por lo tanto, bajo el protocolo evaluado no se puede hacer una correcta inferencia de la capacidad de éstas células espermáticas a presentar la reacción acrosómica inducida por la Ionófora. Sin embargo, hay que tener en cuenta la cantidad de calcio del agua de mar, medio extracelular al que las células normalmente están acondicionadas, esto hace que la cantidad de calcio que tiene que entrar en la célula para activar la reacción acrosómica sea bastante alto y así mismo la cantidad de Ionófora disponible para ayudar al calcio a entrar en la célula es bastante alta. La

correlación entre la cantidad inicial de calcio intracelular y extracelular, la cantidad de lonófora suministrada y el tiempo de reacción se encuentran estrechamente relacionadas y así lo explican Bailey y Buhr (1993), quienes en el espermatozoide de bovinos encontraron que al adicionar 0.1 micromolar de lonófora se obtenían bajos porcentajes de células presentando la reacción acrosómica; mientras que al adicionar calcio al medio extracelular (1 mM de Ca) y 0.1 micromolar de lonófora se obtenían mayores porcentajes de células con reacción acrosómica a los quince segundos de adición de la lonófora ($P < 0.0177$), por lo tanto ellos concluyeron la importancia de la relación entre el calcio extracelular y la cantidad de lonófora empleada en la evaluación.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La pérdida de la adhesividad del material espermático durante su manipulación hacen que el proceso de fertilización de hembras con éste material criopreservado deba emplear un protocolo y un manejo distinto al normalmente empleado en los procesos de inseminación artificial, lo que hace necesario una mas amplia investigación para su optimización.

Los medios empleados para un adecuado mantenimiento del esperma de *L. vannamei* presentan grandes valores de osmolaridad, hecho que se le atribuye a la gran cantidad de sales presentes en el agua de mar; medio natural de desarrollo para esta especie. La disminución en la osmolaridad (<1000 mOsmol/kg) de los medios acarrear cambios significativos en el morfotipo del esperma.

Se comprobó la necesidad de emplear bajas concentraciones de los agentes crioprotectores en las células, dado su alta toxicidad a concentraciones cercanas al 30%.

El esperma de *L. vannamei* no es tan sensible a la concentración de calcio extracelular como lo son otras especies de Decápodos, lo que posibilita la utilización

de agua de mar estéril como solución empleada en la manipulación de éste tipo de células.

La curva de congelación de las células espermáticas de *L. vannamei* es muy importante en el éxito del proceso de criopreservación, dado que a curvas de congelación rápidas no se obtuvieron células morfológicamente viables, es posible presumir que las condiciones intrínsecas de las células no permiten que éstas sobrepasen un proceso de rápida congelación-descongelación.

Al presentarse mayores porcentajes de células morfológicamente viables post-descongelación en la criopreservación lenta de la masa espermática, se estima que para éstas células existe una crioprotección debida al material que conforma la envoltura de la masa gelatinosa en donde se encuentran las células en su forma natural.

Para la criopreservación de éstas células se estima que el metanol al 10%, protegerá mas adecuadamente la célula durante el proceso de congelación-descongelación.

La citometría de flujo es una técnica que diariamente está adquiriendo gran importancia en la evaluación de diferentes tipos de células, la importancia de ésta técnica radica en la facilidad de caracterizar diferentes parámetros evaluativos en muy corto tiempo, lo que permite una mayor eficacia en la caracterización celular;

pero, es menester la adecuada inferencia de los resultados que se obtienen por medio de ésta técnica.

Mediante la evaluación por citometría de flujo de la integridad de la membrana celular de las células sometidas a un protocolo de congelación lento, se observa que el mayor daño celular es localizado en la membrana celular. Por lo tanto, se hace necesario implementar las soluciones empleadas en la congelación con sustancias que procuren una mayor protección a la membrana celular, para lo cual se deberían realizar experimentos que empleen proteínas anticongelantes o sustancias que faciliten una elasticidad de la membrana como el ácido tetracético de etilen glicol (EGTA) o nuevas curvas de congelación que se pueden diseñar mediante programas de modelamiento criogénico teniendo en cuenta las características intrínsecas de éstas células.

El empleo de Ionófora A23187 para la determinación de la calidad espermática es de gran importancia en otras especies, por lo tanto es necesario continuar su evaluación en *L. vannamei*, pues la Ionófora no solo se emplea en la evaluación espermática sino también en otros muy importantes procesos de biotecnología reproductiva.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ACKER, J.P., A. LARESE, H. YANG, A. PETRENKO y L.E. McGANN. 1999. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology*. 38: 363-371.
- ALFARO, J. 1993. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a Grow-Out Pond. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24(1): 6-11.
- ALFARO, J. y X. LOZANO. 1993. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24(4): 522-529.
- ANCHORDOGUY, T., A. RUDOLPH, J.F. CARPENTER y J.H. CROWE. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*. 24: 324-331.
- ANCHORDOGUY, T., J.H. CROWE, F.J. GRIFFIN y W.H. CLARK. 1988. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology*. 25(3): 238-243.
- ARUN, R. y T. SUBRAMONIAM. 1997. Effect of freezing rates on the survival of Penaeid Prawn Larvae. *Cryo-Letters*. 18: 359-368.
- AUGER, J., X., R. NOT y J.P., DADOUNE. 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility. *J. Androl*. 10(6): 439-448.
- AVERS, C. 1991. *Biología celular*. Grupo Editorial Iberoamericana. Mexico. 8-26.
- BABIAK, I., J., GLOGOWSKI, E., BRZUSKA, E., SZUMIEC y J. ADAMEK. 1997. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture research*. 28: 567-571.
- BAILEY, J.L. y M.M. BUHR. 1993. Ca^{2+} regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187. *Cryobiology*. 30: 470-481.
- BEHLMER, S., y G. BROWN. 1984. Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. *Journal of Invertebrate Reproduction and Development*. 7: 193-199.

- BERNAL, W. y M. URIBE. 1993. Caracterización del semen de bocachico *Prochilodus reticulatus* (Steindachner, 1878) y evaluación de la mortalidad después de la conservación en frío. Tesis de Grado Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina. Santa Marta D.T.C.H: 109p.
- BHAVANISHANKAR, S. y T. SUBRAMONIAM. 1997. Cryopreservation of spermatozoa of the Edible Mud Crab *Scylla serrata* (Forsk.) The journal of experimental zoology. 277: 326-336.
- BRAY, W.A. y A.L. LAWRENCE. 1998. Male viability determinations in *Penaeus vannamei* evaluations of short term storage of spermatophores up to 36 hours and comparison of Ca-Free saline and seawater as sperm homogenate media. Aquaculture. 160: 63-67.
- BUYUKHATIPOGLU, S. y W. HOLTZ. 1978. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. Aquaculture. 14: 49-56.
- CAFFEY, R. y T. TIERSCH, 2000. Cost analysis for integrating cryopreservation into an existing fish Hatchery. Journal of the World Aquaculture Society. 31(1): 51-58.
- CENIACUA. 1998. Desarrollo de la tecnología de criopreservación de espermatozoides del camarón marino *Penaeus vannamei*, como estrategia en el mejoramiento genético y la maduración en ciclo cerrado. En: Programa de Mejoramiento de la semilla de camarón *Litopenaeus vannamei* "Variedad Colombia". Bogotá: 69p.
- CHOW, S., T. YASUHIKO y Y. OGASAWARA. 1985. Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol. Bull. 168: 471-475.
- COETZEE, K., D.R. FRANKEN, T.F. KRUGEN y C.J. LOMBARD. 1992. Effect of multiple centrifugations en the evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa. Andrologia. 24(6): 331-334.
- CONGET, P., M. FERNÁNDEZ, G. HERRERA y J.J. MINGUELL. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture. 143: 319-329.
- COOPER, A., S.J. POYNTER, E.J. FULLER, R.W. SHAW. 1998. differential effects of Cryopreservation an nuclear or cytoplasmic maturation *In vitro* in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. Hum Rep. 13(4): 971-978.

- CORTÉS, G.A., 1991. Caracterización del semen de cachama *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). Tesis de Grado Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina. Santa Marta D.T.C.H: 107p.
- CLARK, W.H., M. KLEVE y A. YUDIN. 1981. An acrosome reaction in natantian sperm. The journal of experimental zoology. 218: 279-291.
- DENNISTON, R.S., S. MICHELET y R.A. GODKE. 2000. Principles in Cryopreservation. En: Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana: 59-74.
- DIWAN, A.D. y K. KANDASAMI. 1997. Freezing of viable embryos and larvae of marine shrimp, *Penaeus semisulcatus* de Haan. Aquacult.-Res. 28(12): 947-950.
- EDASHIGE, K., A. ASANO, T. ZHU-AN y M. KASAI. 1999. Restoration of resistance to Osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. Cryobiology. 38: 273-280.
- ERDAHL, A.W., D.A. ERDAHL y E.F. GRAHAM. 1984. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. Aquaculture. 43: 341-350.
- EVENSON, D.P., Z. DARZYNKIEWICZ y M.R. MELAMED. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. J Histochem Cytochem. 30:279-280.
- FABBRI, R., M.R. PRIMAVERA, T. MARSELLA, E. PORCU, S. VENTORULI, C. FALINIGNI. 1999. Ovarian tissue Cryopreservation. Assisted Reprod. 9(1): 2-6.
- FABBROCCINI, A., S. LUBRANO-LAVADERA. S. RISPOLI y G. SANSOME. 2000. Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology. 40: 46-53.
- FISER, P.S., R.W. FAIRFULL y G.J. MARCUS. 1986. The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of Ram spermatozoa frozen at optimal and sub optimal rates in straws. Cryobiology. 23: 141-149.
- GAO, D.Y., P.MAZUR, W. KLEINHANS, P.F. WATSON, E.E. NOILES y J.K. CRITSER. 1992. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. Cryobiology. 29: 657-667.

- GONZÁLEZ, O. 1994. Refrigeración y criopreservación de esperma de trucha Arco Iris *Oncorhynchus mykiss* a corto y largo plazo. Tesis de grado Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina: 94p.
- GONZALEZ, O. y A. FRESNEDA. 2000. Criopreservación de semen en algunas especies de peces tropicales (*Piaractus brachypomus* y *Pseudoplatystoma fasciatum*) de importancia económica y comercial de la Orinoquía Colombiana. Centro de Investigaciones Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano – Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura: 73p.
- GOOK, D., D.H. EDGAR y C. STERN. 1999. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following Cryopreservation in 1,2-propanediol. Human Reproduction. 14(8): 2061-2068.
- GWO, J.C., y C.H. LIN. 1998. Preliminary experiments on the Cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. Theriogenology. 49: 1289-1299.
- GWO, J.C. 2000a. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen. Aquaculture Research. 31: 259-271.
- GWO, J.C. 2000b. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. En: Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana: 138-160.
- HARVEY, B., R., KELLEY y M.J. ASHWOOD. 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. Can. J. Zool. 60: 1867-1870.
- HOLLANDER, M. y WOLFE, D. 1973. Nonparametric Statistical Methods. John Wiley and Sons Editores. New York. 124p.
- HOLT, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology and individual differences. Theriogenology. 53: 47-58.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA (INPA), (1998). Boletín Estadístico Pesquero-1997. Grupo de Estadísticas. Bogotá. Colombia: 57p.
- INTERNATIONAL FISHERIES GENE BANK (IFGB), 1996, Conservación genética de peces. Victoria B.C. Canadá: 23p.
- ISHIGURO , H. y B. RUBINSKY. 1994. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. Cryobiology. 31: 483-500.

- JANIK, M.M F.W. KLEINHANS y M. HAGEDORN. 2000. Overcoming a permeability barrier by microinjection cryoprotectants into Zebrafish Embryos (*Brachydanio rerio*). Cryobiology. 41: 25-34.
- JANUSKAUSKAS, A., A. JOHANNISSON, L. SÖDESQUIST y H. RODRIGUEZ-MARTINEZ. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thawed and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. Theriogenology. 53(4):859-875.
- JEYALECTUMIE, C., y T. SUBRAMONIAM. 1989. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the Edible Crab *Scylla serrata*. Biol. Bull. 177: 247-253.
- JOHNSON, L.A. y G.R. WELCH. 1999. Sex preselection. Theriogenology. 32: 1323-1341.
- KAMENTSKY, L.A. y R.R. MELAMED. 1967. Spectrophotometric cell sorter. Science. 167: 1364-1365.
- KARLSSON, J.O.M., A. EROGLU, T.L. TOTH, E.G. CRAVALHO y M. TONER. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol. Human Reproduction 11:1296-1305.
- KE, Y y N. CAI. 1996. Cryopreservation of spermatozoa from the marine shrimp *Penaeus chinensis*, Oceanol.-Limnol.-Sin.-Haiyang-Yu-Huzhao. 27(3): 187-193.
- LAHNSTEINER, F., T. WEISMANN y R. PATZNER. 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). Aquaculture. 144: 256-274.
- LAHNSTEINER, F., T. WEISMANN y R. PATZNER. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straw for Cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research. 28: 471-479.
- LEUNG - TRUJILLO, J. y A. LAWRENCE. 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. Aquaculture. 65: 363-370.
- LIN, M.N. y Y.Y. TING. 1986. Spermatophore transplantation and artificial fertilization in Grass Shrimp. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 52(4): 585-589.
- LIN, T.T., N.H. CHAO y H.T. TUNG. 1999. Factors affecting survival of cryopreserved Oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Cryobiology. 39: 192-196.

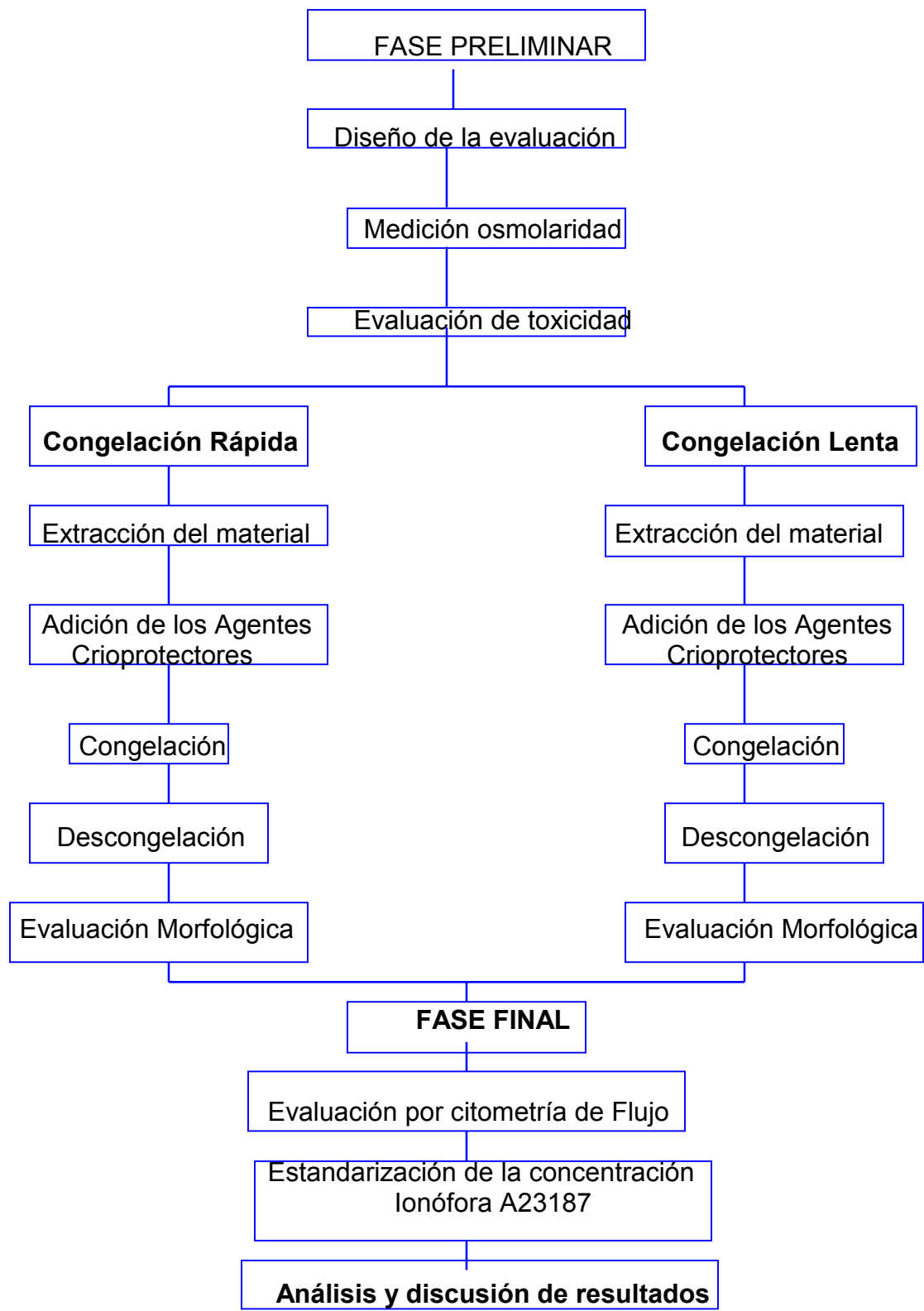
- LIN, T.T. y N.H. CHAO. 2000. Cryopreservation of eggs and embryos of shellfish. En: Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana: 240-250.
- LOMEO, A.M. y M. GIAMBERSIO. 1991. "Water test": a simple method to assess sperm-membrane integrity. International Journal of Andrology. 14: 278-282.
- LYNN, J.W. & W. H. CLARK, 1983a. A morfological examination of sperm-egg interaction in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol Bull. 164: 446-458.
- LYNN, J.W. & W. H. CLARK. 1983b. The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol. Bull. 164: 479-470.
- McGANN, L., H. YANG y M. WALTEROS. 1988. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. Cryobiology. 25: 178-185.
- MEDINA, A. y A. RODRÍGUEZ. 1992. Structural changes in sperm from the Fiddler Crab, *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), during the Acrosome Reaction. Molecular Reproduction and Development. 33: 195-201.
- MORRIS, J. 2000. Asymptote cool guide to Cryopreservation. Asymptote Ltd. Cambridge. Inglaterra: 49p.
- NEWMARK, F. y A. VALLEJO. 1995. Principales enfermedades de camarones - Penaeidos en cultivo. En: Fundamentos de Acuicultura Marina. Rodríguez, H., G. Polo y O. Mora (eds.) Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Santafé de Bogotá: 225p.
- NEWTON, H., Y. AUBARD, A. RUTHERFORD, V. SAHRMA y R. GOSDEN. 1996. Low temperature and grafting of human ovarian tissue. Human Reproduction. 11(7): 1487-1491
- NEWTON, H., J. FISHER, J.R.P. ARNOLD, D.E. PEGG, M.J. FADDY y R.G. GOSDEN. 1998. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for Cryopreservation. Human Reproduction. 13(2): 336-380.
- OGIER DE BAULNY, B., Y. LE VERN, D. KERBOEUF y G. MAISSE. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Cryobiology. 34: 141-149.

- OGIER DE BAULNY, B., C. LABBE, y G. MAISSE. 1999. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*. 39: 177-184.
- PAYNTER, S.J., A. COOPER, B.J. FULLER y R.W. SHAW. 1999. Cryopreservation of Bovine Ovarian tissue. *Cryobiology*. 38: 301-309.
- PARKS, J.E., y J.K. GRAHAM. 1992. Effects of the Cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209-222.
- PEGG, D.E. y M.P. DIAPER. 1991. The effect of initial tonicity on freeze/thaw injury to human red cells suspended in solutions of Sodium Chloride. *Cryobiology*. 28: 18-35.
- PRESTON, N.P. y F.E. COMAN. 1998. The effects of cryoprotectants, chilling and freezing on *Penaeus esculentus* embryos and nauplii, En: *Advances in shrimp biotechnology*. The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Thailand: 37-43.
- RAMOS, L. 1990. Fecundación artificial del camarón blanco *Peneus shmitti*. *Revista de Investigaciones Marinas*. 11(2): 157-168.
- RANA, K.J. y B.J. McANDREW. 1989. The viability of cryopreserved Tilapia spermatozoa. *Aquaculture*. 76: 335-345.
- RANA, K.J. 1995. Cryopreservation of aquatic gametes and embryos. En: *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. The University of Texas at Austin: 85-89.
- RICCI, G., G. PRESANI, S. GUASCHINO, R. SIMEONE y S. PERTICARARI. 2000. Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Human Reproduction*. 15(6): 1329-1337.
- SIMIONE, F.P. 1998. *Cryopreservation Manual*. Nalge Nuc International Corporation. Inglaterra: 1-2.
- SOMMERFELD, V. y H. NIEMANN. 1999. Cryopreservation of Bovine *in Vitro* Produced embryos using Ethylene Glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 38: 95-105.
- SIMON, C., P. DUMONT, F.X. CUENDE y A. DITER. 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos, *Cryobiology*. 31(3): 245-253.

- STANDFIELD, W., 1992. Genética. Tercera Edición. Academic Press Inc, Londres, Inglaterra: 2-15.
- STEEL, R. y J.H. TORRIE. 1988. Bioestadística. Segunda Edición, McGrawHill. U.S.A.: 622p.
- STOSS, J y E. DONALDSON. 1983. Studies on Cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and Coho salmo (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture. 31: 51-65.
- SUBRAMONIAM, T. 1993. Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. En: Advances in Marine Biology. Academic Press Limited. Inglaterra: 129-201.
- SUBRAMONIAM, T. y S.S. NEWTON. 1993. Cryopreservation of Penaeid prawn embryos. CURR.-SC, 65(2): 176-178.
- SUKCHAROEN, N., J. KEITH, D.S., IRVINE y R.J. AITKEN. 1995. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions *In vitro*. Fertil. Steril. 63(6): 1293-1300.
- TAKAMATSU, H. Y B. RUBINSKY. 1999. Viability of deformed cells. Cryobiology. 39: 243-251.
- TONER, M., E.G. CRAVALHO, M. KAREL y D.R. ARMANJ. 1991. Cryomicroscopic analysis of intracellular ice formation during freezing of mouse oocytes without cryoaditives. Cryobiology. 28: 55-71.
- WANG, Q., M. MISAMORE, C.Q. JIANG y C.L. BROWDY. 1995. Egg water induce reaction and biostain assay of sperm from Marine Shrimp *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 26(3): 261-271.
- WEIDNER, D., T. REVORDI, R. WELLS y A. MANSUR. 1992. World shrimp culture. U.S. Department of Commerce. National Marine Fisheries Service, National Oceanic and Atmospheric Administration. NOAA. 2 Latin America, Maryland: 231p.
- WEDLER, E. 1998. Introducción en la acuicultura. Ederhard Wedler Eds. Santa Marta. Colombia: 290-298.
- WHEELER, P.A. y G.H. THORGAARD. 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. Aquaculture. 93. 95-100.

- ZANEVELD, L y C.J. De JONGE. 1991. Mammalian sperm Acrosomal Enzymes and the Acrosome Reaction. En: A comparative Overview of Mammalian Fertilization. Plenum Press. Nueva York: 63-77.

ANEXOS

Anexo A: Diagrama de Flujo de la Metodología

Anexo B. Conteos celulares en cada tratamiento de la evaluación de toxicidad

Tratamiento		Tiempo de observación (minutos)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
		0						30						60						90						120																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
		sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas	spike	sin spike	eventidas																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
Crioprotector	Concentración	muestra	Me ₂ SO	5	1	89	10	1	62	37	1	64	32	4	70	29	1	63	36	1	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43	6	51	43	3	65	33	2	55	43

Glicerol	10	4	91	7	2	88	11	1	83	12	5	82	14	4	82	16	2
Glicerol	10	5	91	8	1	87	13	0	85	11	4	86	12	2	90	8	2
		promedio	89	8,4	2,6	88	10,8	1,2	81,6	14	4,4	86	11,6	2,4	86,2	11,4	2,4
Glicerol	30	1	88	10	2	75	25	0	77	20	3	77	21	2	64	27	9
Glicerol	30	2	74	19	7	69	30	1	70	26	4	72	26	2	71	25	4
Glicerol	30	3	87	13	0	60	36	4	59	41	0	62	38	0	61	37	2
Glicerol	30	4	91	7	2	60	39	1	66	31	3	68	31	1	64	32	4
Glicerol	30	5	92	4	4	83	16	1	76	23	1	74	23	3	71	24	5
		promedio	86,4	10,6	3	69,4	29,2	1,4	69,6	28,2	2,2	70,6	27,8	1,6	66,2	29	4,8
Metanol	5	1	87	13	0	80	20	0	82	17	1	84	16	0	78	21	1
Metanol	5	2	91	8	1	79	21	0	80	17	3	84	13	3	79	19	2
Metanol	5	3	95	3	2	80	18	2	80	19	1	85	15	0	75	22	3
Metanol	5	4	94	5	1	93	6	1	94	4	2	89	5	6	92	7	1
Metanol	5	5	98	2	0	93	5	2	93	6	1	95	3	2	87	12	1
		promedio	93	6,2	0,8	85	14	1	85,8	12,6	1,6	87,4	10,4	2,2	82,2	16,2	1,6
Metanol	10	1	93	7	0	93	4	3	84	12	4	83	13	4	83	13	4
Metanol	10	2	89	6	5	87	9	4	87	10	3	81	15	4	83	14	3
Metanol	10	3	90	8	2	86	9	5	94	5	1	95	4	1	89	6	5
Metanol	10	4	91	9	0	87	8	5	85	9	6	84	14	2	83	15	2
Metanol	10	5	90	7	3	89	8	3	89	9	2	90	8	2	90	8	2
		promedio	90,6	7,4	2	88,4	7,6	4	87,8	9	3,2	86,6	10,8	2,6	85,6	11,2	3,2
Metanol	30	1	94	6	0	90	9	1	47	23	30	39	30	31	7	55	38
Metanol	30	2	95	5	0	85	15	0	64	19	17	61	31	8	7	53	40
Metanol	30	3	94	6	0	85	15	0	67	16	17	38	43	19	2	73	25
Metanol	30	4	94	4	2	93	6	1	77	22	1	75	9	16	14	80	6
Metanol	30	5	97	2	1	89	8	3	77	13	10	80	6	14	11	72	17
		promedio	94,8	4,6	0,6	88,4	10,6	1	66,4	18,6	15	58,6	23,8	17,6	8,2	66,6	25,2
Etilen Glicol	5	1	91	8	1	93	6	1	93	6	1	92	7	1	90	8	2
Etilen Glicol	5	2	88	10	2	92	6	2	91	8	1	89	9	2	89	8	3
Etilen Glicol	5	3	93	6	1	85	15	0	84	16	0	89	10	1	89	7	4
Etilen Glicol	5	4	89	9	2	90	8	2	91	9	0	89	8	3	89	8	3
Etilen Glicol	5	5	93	7	0	92	7	1	90	8	2	90	5	5	87	9	4
		promedio	90,8	8	1,2	90,4	8,4	1,2	89,8	9,4	0,8	89,8	7,8	2,4	88,8	8	3,2

Etilen Glicol	10	1	94	4	2	90	9	1	86	11	3	88	8	4	86	11	3
Etilen Glicol	10	2	96	4	0	87	11	2	86	9	5	87	11	2	86	11	3
Etilen Glicol	10	3	94	6	0	90	9	1	89	6	5	85	12	3	85	11	4
Etilen Glicol	10	4	89	10	1	89	9	2	87	10	3	87	11	2	84	10	6
Etilen Glicol	10	5	93	7	0	90	8	2	89	8	3	86	10	4	85	10	5
		promedio	93,2	6,2	0,6	89,2	9,2	1,6	87,4	8,8	3,8	86,6	10,4	3	85,2	10,6	4,2
Etilen Glicol	30	1	94	4	2	56	40	4	58	36	6	44	56	0	43	53	4
Etilen Glicol	30	2	89	10	1	54	44	2	35	62	3	34	62	4	30	61	9
Etilen Glicol	30	3	90	9	1	49	48	3	30	67	3	30	64	6	25	68	7
Etilen Glicol	30	4	90	7	3	44	55	1	44	54	2	40	57	3	35	60	5
Etilen Glicol	30	5	89	10	1	57	43	0	42	50	8	38	54	8	34	59	7
		promedio	90,4	8	1,6	52	46	2	41,8	53,8	4,4	37,2	58,6	4,2	33,4	60,2	6,4
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 20% yema de huevo y 0,4M Glucosa		1	77	21	2	80	19	1	78	18	4	81	17	2	75	23	2
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 20% yema de huevo y 0,4M Glucosa		2	88	11	1	83	10	7	85	12	3	79	19	2	83	11	6
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 20% yema de huevo y 0,4M Glucosa		3	83	16	1	72	17	11	82	13	5	84	12	4	79	20	1
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 20% yema de huevo y 0,4M Glucosa		4	85	14	1	84	15	1	85	15	0	75	22	3	74	23	3
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 20% yema de huevo y 0,4M Glucosa		5	89	10	1	79	12	9	83	14	3	83	16	1	82	16	2
		promedio	84,4	14,4	1,2	79,6	14,6	5,8	82,6	14,4	3	80,4	17,2	2,4	78,6	18,6	2,8
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 50% SFB, 0.6M Glucosa		1	94	4	2	94	5	1	88	10	2	89	8	3	89	10	1
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 50% SFB, 0.6M Glucosa		2	90	8	2	82	15	3	83	12	5	81	12	7	82	10	8
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 50% SFB, 0.6M Glucosa		3	94	5	1	85	10	5	84	10	6	80	14	6	80	13	7
Agua de Mar Artificial libre de Ca, 50% SFB, 0.6M Glucosa		4	92	5	3	89	11	0	86	13	1	85	8	7	84	8	8

Agua de Mar Artificial libre de Ca, 50% SFB, 0.6M Glucosa	5	94	5	1	86	11	3	87	11	2	85	12	3	80	11	9
	promedio	92,8	5,4	1,8	87,2	10,4	2,4	85,6	11,2	3,2	84	10,8	5,2	83	10,4	6,6
Agua de Mar Artificial libre de Ca	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agua de Mar Artificial libre de Ca	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agua de Mar Artificial libre de Ca	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agua de Mar Artificial libre de Ca	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agua de Mar Artificial libre de Ca	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
control	1	95	5	0	90	9	1	84	15	1	84	14	2	87	12	1
control	2	80	16	4	86	12	2	85	15	0	80	17	3	86	14	0
control	3	94	1	5	86	10	4	90	9	1	90	5	5	88	8	4
control	4	93	7	0	87	8	5	92	8	0	90	6	4	86	9	5
control	5	93	7	0	91	7	2	94	6	0	91	5	4	88	9	3
	promedio	91	7,2	1,8	88	9,2	2,8	89	10,6	0,4	87	9,4	3,6	87	10,4	2,6

Anexo C. Conteos celulares en la congelación lenta con espermatóforo.

Tratamiento	Pajilla No.	Morfotipos		
		spike	sin spike	evertidas
Glicerol 10%	1	23	10	67
Glicerol 10%	2	0	0	100
Glicerol 10%	3	9	10	81
Me ₂ SO 10%	4	38	7	66
Me ₂ SO 10%	5	9	4	87
Me ₂ SO 10%	6	0	4	96
Etilen Glicol 10%	7	10	4	86
Etilen Glicol 10%	8	27	13	60
Etilen Glicol 10%	9	0	1	99
Metanol 10%	13	19	16	65
Metanol 10%	14	39	19	42
Metanol 10%	15	17	19	64
Control	10	0	0	100
Control	11	0	0	100
Control	12	32	12	56

Anexo D. Conteos celulares en la congelación lenta con masa espermática.

Tratamiento	Pajilla No.	Morfotipos		
		spike	sin spike	evertidas
Metanol 10%	1,1	75	7	18
Metanol 10%	1,2	74	12	14
Metanol 10%	2,1	59	20	21
Metanol 10%	2,2	54	10	36
Metanol 10%	3,1	46	15	39
Me ₂ SO 10%	4,1	72	20	8
Me ₂ SO 10%	4,2	15	6	79
Me ₂ SO 10%	5,1	27	13	60
Me ₂ SO 10%	5,2	14	10	76
Me ₂ SO 10%	6,1	31	24	45
Me ₂ SO 10%	6,2	32	15	53
Etilen Glicol 10%	7,1	41	30	29
Etilen Glicol 10%	7,2	40	13	47
Etilen Glicol 10%	8,1	33	21	46
Etilen Glicol 10%	8,2	29	14	57
Etilen Glicol 10%	9,1	58	15	27
Etilen Glicol 10%	9,2	42	20	38
Glicerol 10%	13,1	16	37	47
Glicerol 10%	13,2	34	38	28
Glicerol 10%	14,1	27	41	32
Glicerol 10%	14,2	11	54	35
Glicerol 10%	15,1	31	46	23
Glicerol 10%	15,2	28	48	24
control	10,1	7	42	51
control	10,2	26	9	65
control	11,1	29	33	38
control	11,2	7	10	83
control	12,1	10	29	61
control	12,2	15	12	73

Anexo E. Conteos celulares en la congelación lenta con suspensión espermática.

Tratamiento	Pajilla No.	Morfotipos		
		spike	sin	evertidos
Metanol 10%	1,1	54	20	26
Metanol 10%	1,2	59	20	21
Metanol 10%	2,1	28	9	63
Metanol 10%	2,2	72	7	21
Metanol 10%	3,1	29	14	57
Metanol 10%	3,2	24	5	71
Glicerol 10%	4,1	6	8	86
Glicerol 10%	4,2	6	5	89
Glicerol 10%	5,1	0	93	7
Glicerol 10%	5,2	4	21	75
Glicerol 10%	6,1	6	8	86
Glicerol 10%	6,2	7	11	82
Me ₂ SO 10%	7,1	10	9	81
Me ₂ SO 10%	7,2	15	11	74
Me ₂ SO 10%	8,1	59	37	4
Me ₂ SO 10%	8,2	16	10	74
Me ₂ SO 10%	9,1	29	10	61
Me ₂ SO 10%	9,2	26	15	59
Etilen Glicol 10%	10,1	32	12	56
Etilen Glicol 10%	10,2	20	12	68
Etilen Glicol 10%	11,1	22	32	46
Etilen Glicol 10%	11,2	47	18	35
Etilen Glicol 10%	12,1	19	26	55
Etilen Glicol 10%	12,2	22	26	52
control	13,1	8	24	68
control	13,2	4	15	81
control	14,1	1	1	98
control	14,2	2	7	91
control	15,1	3	7	90
control	15,2	10	4	86

Anexo F. Porcentajes de Integridad de Membrana y células con “spike” de la muestras de suspensión espermática congeladas lentamente.

Tratamiento	Replica 1		Replica 2	
	Porcentaje células con “spike” observación morfológica	Porcentaje células con integridad de membrana	Porcentaje células con “spike” observación morfológica	Porcentaje células con integridad de membrana
Me ₂ SO	56	1,11	48	0,46
Me ₂ SO	49	1,95	0	0,95
Metanol	61	6,08	56	9,55
Metanol	75	5,62	72	10,36
Glicerol	0	1,25	13	0,86
Glicerol	21	2,52	29	2,65
Etilen Glicol	64	19,66	59	20,24
Etilen Glicol	58	4,68	0	7,54
Control	0	1	0	1,08
Control	1	1,05	0	1,05

Anexo G. Conteos celulares de la estandarización de la Ionófora A23187 para la evaluación de la reacción acrosómica.

Tratamiento	Morfotipos		
	Spike	Sin spike	Evertidas
8	98	2	0
8	86	10	4
8	95	4	1
24	94	5	1
24	88	9	3
24	91	6	3
40	94	3	3
40	86	8	6
40	90	6	4
56	89	6	5
56	87	9	4
56	84	12	4
Promedio	90,17	6,67	3,17