

## Cryopreservation of Trans-Andean shovelnose catfish (*Sorubim cuspicaudus*) semen using dimethylacetamide<sup>1,2</sup>

*Criopreservación de semen de Bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*) con dimetilacetamida como crioprotector*

*Criopreservação de sêmen de Bagre branco (*Sorubim cuspicaudus*) com dimetilacetamida como crioprotetor*

Sandra Pardo-Carrasco<sup>1\*</sup>, MVZ, MSc, PhD; Juan Salas Villalva<sup>2</sup>, Profesional en Acuicultura; Lilian Reza Gaviria<sup>2</sup>, Profesional en Acuicultura; José Espinosa Araujo<sup>2</sup>, Profesional en Acuicultura, MSc; Víctor Atencio-García<sup>2</sup>, Ingeniero Pesquero, MSc

\*Autor para correspondencia: Sandra Pardo-Carrasco. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59ª #63-20 Bloque 50 Oficina 314 Colombia scpardoc@unal.edu.co

<sup>1</sup> Financiado: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia #2007U7723-401

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal, Grupo de Investigación en Biodiversidad y Genética Molecular - BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59ª #63-20 Bloque 50 Oficina 314 Colombia scpardoc@unal.edu.co; <sup>2</sup> Centro de Investigación Piscícola CINPIC, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento Ciencias Acuícolas, Universidad de Córdoba, Colombia. juanvillalba@gmail.com; lreza@gmail.com; joseespinosa86@gmail.com; vatencio@hotmail.com

(Recibido: 28 de noviembre, 2014; aceptado: 10 de abril, 2015)

### Abstract

Cryoprotectant solutions of dimethylacetamide (DMA) were used at three inclusion levels (8, 10, and 12%) to evaluate cryopreservation of Trans-Andean shovelnose catfish semen. The solutions also included 6% glucose and 5% skimmed milk powder. Osmolarity of the solutions was measured with an osmometer (Precision System, Osmomette III, USA). Semen was diluted at a 1:4 ratio (semen:solution) and frozen in nitrogen vapors using a dry shipper (MVE 4/2V, USA). Concentration, mobility, speed, and progressivity of cryopreserved and fresh semen (control) were assessed with the SCA<sup>®</sup> Sperm Class Analyzer (Microptic, Spain) computer-assisted program. Fertility and hatching were evaluated fertilizing one gram of oocytes with cryopreserved and fresh semen, which was then kept in 2L cylinder-conical incubators. The osmolarity of cryoprotective solutions was  $1233.3 \pm 23.1$  mOsm/Kg (8%DMA),  $1530 \pm 0.0$  mOsm/Kg (10% DMA), and  $1627.7 \pm 5.8$  mOsm/Kg (12% DMA). Fresh semen showed better total mobility ( $99.6 \pm 0.4\%$ ), percentage of rapid sperm ( $34.7 \pm 12.2\%$ ), and progressivity ( $48.2 \pm 12.8\%$ ), compared with cryopreserved semen ( $p < 0.05$ ). Cryopreserved semen with 8% DMA had the highest total mobility ( $55.4 \pm$

<sup>1</sup>Para citar este artículo: Pardo-Carrasco S, Salas Villalva J, Reza Gaviria L, Espinosa Araujo J, Atencio-García V. Criopreservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*) con dimetilacetamida como crioprotector. Rev CES Med Zootec. 2015; Vol 10 (2): 122-131.

13.6%) ( $p < 0.05$ ) as well as the highest percentage of rapid sperm (1.5-2.5%), total progressivity (1.9 to 10.1%), and curvilinear velocity (29,5-35,9  $\mu\text{m/s}$ ) without significant difference with the evaluated DMA percentages ( $p > 0.05$ ). Fertilization with fresh semen ( $19.5 \pm 4.4\%$ ) and 8% DMA cryopreserved semen ( $17.8 \pm 8.3\%$ ) were not different ( $p > 0.05$ ). A cryoprotective solution composed of 8% DMA, 6% glucose, and 5% skimmed milk powder is a viable alternative to cryopreserve Trans-Andean shovelnose catfish semen.

## Keywords:

*Cryopreservation, dimethylacetamide, milt, pimelodidae, reproduction, semen.*

## Resumen

Para evaluar la criopreservación de semen de bagre blanco utilizando dimetilacetamida (DMA) fueron preparadas soluciones crioprotectoras con DMA a tres porcentajes de inclusión (8, 10 y 12%), glucosa 6% y leche en polvo descremada 5%. La osmolaridad de las soluciones fue medida con osmómetro (Precision System, Osmomette III, Usa). El semen fue diluido a razón de 1:4 (semen:solución) y congelado con vapores de nitrógeno en *dry shipper* (MVE 4/2v, Usa). La concentración, movilidad total, velocidad y progresividad del semen criopreservado y fresco (control) fue evaluada con el programa asistido por computador Sperm Class Analyzer SCA<sup>®</sup> (Microptic, España). La fertilidad y eclosión se evaluaron fertilizando un gramo de ovocitos con semen criopreservado y fresco; mantenidos en incubadoras cilindro-cónicas de 2L. La osmolaridad de las soluciones crioprotectoras fue  $1233,3 \pm 23,1$  mOsm/kg (DMA 8%),  $1530 \pm 0,0$  mOsm/kg (DMA 10%) y  $1627,7 \pm 5,8$  mOsm/kg (DMA 12%). Semen fresco mostró la mejor movilidad total ( $99,6 \pm 0,4\%$ ), porcentaje de espermatozoides rápidos ( $34,7 \pm 12,2\%$ ) y progresividad ( $48,2 \pm 12,8\%$ ), valores estadísticamente diferentes a los obtenidos con semen criopreservado ( $p < 0,05$ ). La mayor movilidad total se registró con semen criopreservado con DMA 8% ( $55,4 \pm 13,6\%$ ) ( $p < 0,05$ ); así como los mayores porcentajes de espermatozoides rápidos (1,5-2,5%), progresividad total (1,9-10,1%) y velocidad curvilínea (29,5-35,9  $\mu\text{m/s}$ ) sin presentar diferencia significativa con los diferentes porcentajes de DMA evaluados ( $p > 0,05$ ). La fertilización con semen fresco ( $19,5 \pm 4,4\%$ ) y semen criopreservado con DMA 8% ( $17,8 \pm 8,3\%$ ) no presentó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). La solución crioprotectora compuesta por DMA 8%, glucosa 6% y leche en polvo descremada 5% es una alternativa viable para la criopreservación de semen de bagre blanco.

## Palabras clave:

*Criopreservación, dimetilacetamida, pimelodidae, reproducción, semen.*

## Resumo

Para avaliar a criopreservação de sêmen de bagre branco utilizando dimetilacetamida (DMA) foram preparadas soluções crioprotetoras com DMA a três porcentagens de inclusão (8, 10 e 12%), glucose 6% e leite em pó desnatada 5%. A osmolaridade das soluções foi medida com osmômetro (Precision System, Osmomette III, USA). O sêmen foi diluído em razão de 1:4 (sêmen: diluição) e congelado com vapores de nitrogênio em *dry shipper* (MVE 4/2v, USA). A concentração, mobilidade total, velocidade e progressividade do sêmen criopreservado e fresco (controle) foi avaliado com o programa assistido por computador *Sperm Class Analyzer SCA*<sup>®</sup> (Microptic, Espanha). A fertilidade e eclosão avaliaram-se fertilizando uma grama de ovócitos com sêmen criopreservado e fresco, mantidos em incubadoras cilindro-cônicas de 2L. A osmolaridade das soluções crioprotetoras foi de  $1233,3 \pm 23,1$  mOsm/kg (DMA 8%);  $1530 \pm 0,0$  mOsm/kg (DMA 10%) e  $1627,7 \pm 5,8$  mOsm/kg (DMA 12%). O sêmen fresco mostrou a melhor mobilidade total ( $99,6 \pm 0,4\%$ ), a porcentagem de espermatozoides rápidos ( $34,7 \pm 12,2\%$ ) e de progressividade ( $48,2 \pm 12,8\%$ ), esses valores com sêmen fresco são estatisticamente diferentes aos obtidos com sêmen criopreservado ( $p < 0,05$ ). A maior mobilidade total registrou-se com sêmen criopreservado com DMA 8% ( $55,4 \pm 13,6\%$ ) ( $p < 0,05$ ); assim como as maiores porcentagens de espermatozoides rápidos (1,5-2,5%), progressividade total (1,9-10,1%) e velocidade curvilínea (29,5-35,9  $\mu\text{m/s}$ ) sem apresentar diferença significativa com as diferentes porcentagens de DMA avaliados ( $p > 0,05$ ). A fertilização com sêmen fresco ( $19,5 \pm 4,4\%$ ) e sêmen criopreservado com DMA 8% ( $17,8 \pm 8,3\%$ ) não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). A solução crioprotetora composta por DMA 8%, glucose 6% e leite em pó desnatada 5% é uma alternativa viável para a criopreservação de sêmen de bagre branco.

## Palabras clave:

Criopreservación, dimetilacetamida, pimelodidae, reproducción, sêmen.

## Introducción

El Bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* es el bagre migrador de mayor tamaño de la cuenca del río Sinú; cuyas rutas migradoras y áreas de desoves fueron afectadas por la construcción de la hidroeléctrica Urrá (Atencio, 2000); aparece reportado en el Libro Rojo de Peces Dulceacuícolas de Colombia por la declinación de sus capturas y tallas en la cuenca magdalénica (Mojica *et al.*, 2012). A pesar de ser un bagre de hábito alimentario piscívoro (Villadiego *et al.*, 2004) es considerado como una opción para diversificar la piscicultura continental colombiana, debido a su alto valor comercial, excelente calidad de carne, buena adaptación al cautiverio, tolerancia al manejo y buena respuesta a protocolos de reproducción mediante inducción hormonal (Muñoz y Martínez, 2003; Prieto-Guevarra *et al.*, 2013).

Aunque se han logrado importantes avances en su reproducción hormonal con extracto hipofisario de carpa y Ovaprim® (Atencio *et al.*, 2003), aún persisten dificultades para su reproducción inducida, especialmente por la asincronía reproductiva entre machos y hembras, ocasionada por el cautiverio (Atencio, 2001). En estos casos la crioconservación de semen se convierte en una herramienta biotecnológica que facilita los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal asincrónica, ciclos reproductivos estacionales y permite la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Bobe y Labbé, 2009) mediante los bancos genéticos (Carosfeld *et al.*, 2003).

La crioconservación de semen consiste en la extracción y dilución del semen con diluyentes y sustancias protectoras (internas y externas) que mantienen la viabilidad del espermatozoide, la posterior congelación en nitrógeno líquido y su descongelación (Glogowski *et al.*, 1999). Esta práctica ha sido reportada en más de 200 especies de peces (Brown y Brown, 2011); y se considera que es un proceso especie-específico, cuyo éxito depende de la composición del diluyente, de la concentración del crioprotector y de las curvas de congelación y descongelación que se utilicen (Lim y Le, 2013).

Entre los crioprotectores más comunes utilizados en peces se encuentran: dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, propilenglicol (Routray *et al.*, 2007) y dimetilacetamida (DMA) (Morris *et al.*, 2003). Carmichaell *et al.* (2009) señalaron que los crioprotectores son frecuentemente

tóxicos en altas concentraciones, razón por la cual es necesario establecer los porcentajes de inclusión en los cuales protegen al espermatozoide sin causar toxicidad.

El DMA está clasificado como un crioprotector permeable, intracelular, contiene un grupo amida que le confiere alta solubilidad por lo que es considerado un muy buen solvente, presenta peso molecular de 87,12 g/mol y dos grupos metil hidrofóbicos, que pueden crear enlaces de hidrógeno con el agua, lo cual le proporciona su capacidad como crioprotector (Laffaldano *et al.*, 2012), ingresando al citoplasma, por medio del gradiente de concentración, el fluido intracelular puede ser superenfriado a temperaturas entre -5 y -15 °C, sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a la disminución del punto de congelación por medio de la reducción de las interacciones entre las moléculas de agua (Vincent *et al.*, 1998). De acuerdo con Ball y Vo (2001) el efecto crioprotector de las amidas se atribuye a su bajo peso molecular, a su viscosidad, los cuales incrementan la permeabilidad de la membrana, reduciendo el estrés osmótico y por tanto el daño celular. El DMA posee el más alto coeficiente de permeabilidad ( $14,7 \times 10^{-5}$  cm/s), cuando se le compara con metanol ( $11,4 \times 10^{-5}$  cm/seg), etilenglicol ( $3,4 \times 10^{-5}$  cm/seg), DMSO ( $1,3 \times 10^{-5}$  cm/seg) y glicerol ( $0,58 \times 10^{-5}$  cm/seg) (Naccache y Sha'afi, 1973). Adicionalmente, Baulny *et al.*, (1999) reportaron que la presencia de DMA en la solución crioprotectora ocasiona un incremento en el ATP de semen de catfish europeo *Silurus glanis*, efecto que consideraron favorable; debido a que la pérdida de ATP se traduce en una reducción de la movilidad del espermatozoide posdescongelación.

Los diluyentes juegan un papel importante en la regulación de la presión osmótica, pH y componentes iónicos y su objetivo es mantener vivos pero inmóviles los espermatozoides durante la congelación (Lim y Le, 2013). Entre los crioprotectores externos más usados en los peces colombianos están la yema de huevo y la leche en polvo (lipoproteínas), los cuales son conocidos por su actividad para estabilizar la membrana plasmática del espermatozoide, en combinación con diluyentes que contienen glucosa (Viveiros y Gondinho, 2009). Sin embargo, a pesar de los beneficios de la yema de huevo como crioprotector externo, puede presentar problemas de bioseguridad (transmisión de enfermedades) y no siempre es posible combinarla con algunos crioprotectores

permeables, aquellos que tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares (María *et al.*, 2006); además de una composición inconsistente (Yildiz *et al.*, 2013). Por estas razones, en el presente estudio se decidió usar leche en polvo descremada combinada con glucosa y DMA.

Los protocolos de crionconservación en pimelódidos (Siluriformes, Pimelodidae) americanos son escasos, destacándose: *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pinzón-Arciniegas *et al.*, 2005; Medina-Robles *et al.*, 2007); *Pseudoplatystoma metaense* (Ramírez-Merlano *et al.*, 2011); *Pseudoplatystoma corruscans* (Carosfeld *et al.*, 2003); y dentro de estos son pocos los reportes en los que se haya usado leche en polvo en pimelódidos (Carosfeld *et al.*, 2003) y más escasos aun los que combinan DMA y leche en polvo (Ramírez-Merlano *et al.*, 2011).

Por tanto el objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad seminal de bagre blanco utilizando como solución crioprotectora dimetilacetamida (DMA) a diferentes porcentajes de inclusión (8, 10 y 12%), leche en polvo descremada (5%) y glucosa (6%).

## Materiales y métodos

### Sitio de estudio y material biológico

El estudio se realizó en el Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba (CINPIC). Se utilizaron machos (n=16) con edad de dos a tres años, peso promedio de  $475 \pm 85,3$  g y  $47,1 \pm 3,3$  cm de longitud total (Lt); los cuales fueron seleccionados cuando al hacer ligera presión abdominal en sentido cráneo-caudal fluyó semen. Las hembras (n=7) con edad de dos años,  $662 \pm 106,9$  g de peso promedio y  $50,2 \pm 5,4$  cm de Lt fueron seleccionadas inicialmente, mediante diagnóstico presuntivo utilizando señales externas como abdomen abultado, papila genital roja y dilatada (Atencio, 2001) y posteriormente mediante biopsia ovárica se verificó el inicio de la maduración final mediante la posición de la vesícula germinal del ovocito.

Los reproductores seleccionados se mantuvieron en piletas circulares de  $2,1 \text{ m}^3$  con flujo constante (2 a 3 L/min). La reproducción se indujo con Ovaprim® (sGnRH $\alpha$  + domperidona, Syndel Lab, Canadá) en dosificación de 0,4 mL/kg de peso vivo, colocada en una sola aplicación en la base de la aleta pectoral (Atencio, 2001).

Después de 12 horas de aplicada la inducción hormonal (temperatura promedio del agua  $28 \pm 1$  °C), los machos fueron capturados, envueltos en toallas húmedas, secados suavemente en la región de la papila urogenital

con papel toalla y luego de expulsada la orina y heces para evitar contaminación, se realizó suave presión en la región ventral para la recolección del semen. El semen fue recolectado en tubos secos Eppendorf graduados de 2 mL y fue descartado el que registró contaminación con orina, sangre o heces.

### Evaluación seminal

Para analizar la movilidad, tanto en semen fresco como en descongelado, se utilizó una muestra de 0,25  $\mu\text{L}$  de semen y 75  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada (dilución 1:300); la cual se colocó en una cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments, Israel), y se analizó bajo un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa para análisis de semen asistido por computadora Sperm Class Analyzer SCA® (Microptic, España). En la misma muestra se analizó la velocidad espermática con ayuda del programa SCA®, considerándose espermatozoides rápidos (tipo a) a los que presentaron velocidades mayores de 100  $\mu\text{m/s}$ , medios (tipo b) a los que registraron velocidades entre 46 y 100  $\mu\text{m/s}$  y lentos (tipo c) entre 10 y 45  $\mu\text{m/s}$ ; también se estimó el porcentaje de espermatozoides estáticos (tipo d). Se estimaron las velocidades curvilínea (VCL) y lineal (VSL).

Para estimar la concentración espermática 1  $\mu\text{L}$  de semen se mezcló con 699  $\mu\text{L}$  de glucosa a 6% en un tubo Eppendorf de 2 ml (dilución 1:700), luego la mezcla se homogenizó durante cinco segundos en un vortex a 1200 rpm (Velp Scientifica, Zxclasic, China); luego se tomó una muestra de 10  $\mu\text{L}$ , se colocó en la cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments, Israel), se montó en un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y con el programa SCA® se determinó la concentración tomando entre 350 y 500 espermatozoides por campo. Este procedimiento se realizó tres veces para obtener un valor promedio de la concentración espermática del semen analizado.

El tiempo de activación se determinó solo en semen fresco desde el instante en que se adicionó la solución activadora (agua bidestilada) hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides dejaron de moverse.

### Tratamientos y diluyentes

Se utilizó como diluyente una solución en agua bidestilada estéril con 6% de glucosa (p/v, 0,33 M) (Protokimica, Col), 5% de leche en polvo descremada (p/v, Proleche, Col) y 8 (0,85 M), 10 (1,07 M) y 12% (1,29 M) de dimetilacetamida (v/v) (DMA, Sigma Chemical,

EUA). La osmolaridad de las soluciones crioprotectoras fueron medidas con un osmómetro (Precision System, Osmomette III, Usa). El semen fue diluido en proporción 1:4 (semen:solución), a temperatura de  $28 \pm 1$  °C, empacado en macrotubos de 5,0 ml (Steinberg *et al.*, 1995), sellados con polivinilo y esferas de acero inoxidable e introducidas en un tiempo aproximado de diez minutos desde que se diluyó hasta su congelación en vapores de nitrógeno en un *dry shipper* (MVE, SC 4/2v, USA). La curva de congelación en el *dry shipper* fue descrita por Cruz-Casallas *et al.* (2006) así: de 28 a -20 °C descendió a razón de 29,9 °C/min, de -20 a -100 °C a razón de 27,3 °C/min y de -100 a -196 °C a razón de 5,5 °C/min. Después de permanecer durante 30 minutos en el *dry shipper* los macrotubos fueron trasladados a un termo criogénico de almacenamiento (MVE XC 34/18, USA) sumergidos directamente en nitrógeno líquido hasta el momento de la descongelación.

#### Descongelación del semen

Quince días después los macrotubos fueron descongelados por inmersión directa en baño María (Memmert, WNB 7-45, Alemania) a 60 °C durante 45 segundos. La dosis inseminante utilizada en todos los casos fue de 160000 espermatozoides/ovocito (spz/ovocito). La fertilidad se evaluó inseminando 1 g de ovocitos con el volumen requerido de semen fresco y descongelado que contenía el número de espermatozoides. Previamente fue estimado el número promedio de ovocitos por cada gramo (1444 ovocitos).

El porcentaje de fertilidad se analizó a las seis horas post-fertilización (HPF) tomando una muestra de por lo menos 50 embriones, en fase final de gastrulación (cierre del blastoporo), con la ayuda de una pipeta de vidrio de 0,5 cm de diámetro y analizados bajo un estereoscopio óptico (Leica, EZ4, China, x20). La fertilidad se expresó como el porcentaje de embriones viables sobre el número total de embriones analizados, tomando como criterio de viabilidad los embriones de aspecto traslucido y sin desprendimiento de material celular. De igual forma fue estimado el porcentaje de eclosión a las 11 HPF con embriones en fase de faringulación.

#### Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. A todas las variables analizadas se les realizó prueba de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) y

homogeneidad de varianza (test de Levene's) y cuando fue necesario se realizó transformación mediante la función arcoseno. Las variables fueron analizadas mediante análisis de varianza (Anova) y cuando se encontró diferencia significativa se realizó la prueba de rango múltiple LSD (Least Significant Difference). En todos los casos  $p < 0,05$  fue utilizado como criterio estadístico para revelar diferencia significativa. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con ayuda del programa Statgraphics Plus 5.0 para Windows.

## Resultados

La osmolaridad de las soluciones crioprotectoras fue de  $1233,3 \pm 23,1$  mOsm/kg (DMA 8%),  $1530 \pm 0,0$  mOsm/kg (DMA 10%) y  $1627,7 \pm 5,8$  mOsm/kg (DMA 12%). El semen fresco de bagre blanco ( $n=16$ ) presentó color blanco, volumen seminal promedio de  $1,6 \pm 0,4$  ml, movilidad superior a 90%, tiempo de activación entre 36 y 46 s ( $41,0 \pm 4,0$  s) y una concentración espermática que osciló entre  $22219,7 \times 10^6$  y  $27414,2 \times 10^6$  espermatozoides (spz)/ml ( $24718,3 \times 10^6 \pm 1849,4$  spz/mL).

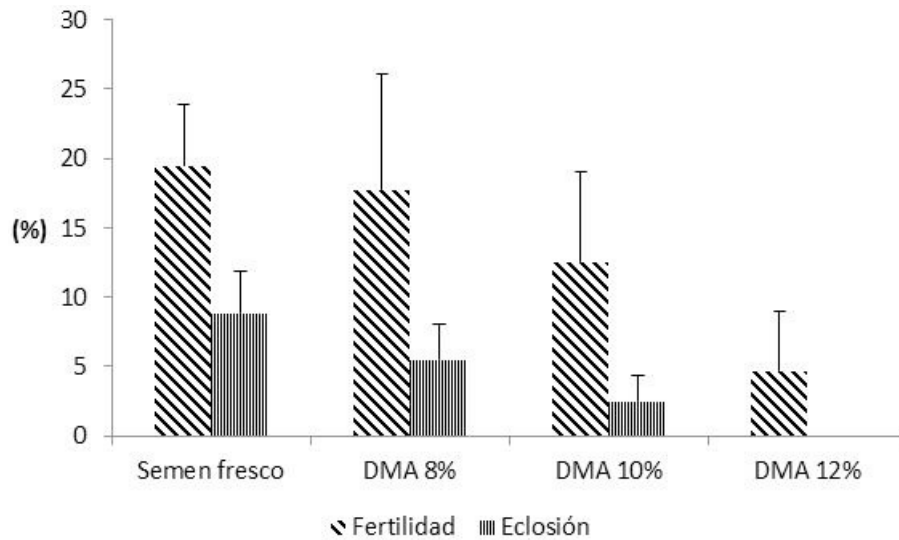
La tabla 1 registra los valores promedios de algunas características del semen fresco y crioconservado con DMA (8, 10 y 12%) y luego descongelado; mientras que la figura 1 presenta los porcentajes promedios de fertilidad y eclosión obtenidos con semen fresco y descongelado.

Los valores de movilidad total ( $99,6 \pm 0,4\%$ ), progresividad total ( $48,2 \pm 12,8\%$ ) así como las velocidades curvilínea ( $85,2 \pm 16,1$   $\mu$ m/s) y lineal ( $43,8 \pm 9,1$   $\mu$ m/s) fueron mayores en semen fresco, observándose diferencia significativa con los valores que registraron los tratamientos con semen crioconservado-descongelado ( $p < 0,05$ ). Del semen crioconservado la mayor movilidad total fue registrada con DMA 8% ( $55,4 \pm 13,6\%$ ), así como el menor valor de espermatozoides estáticos ( $44,6 \pm 13,6\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1).

La fertilidad tanto con semen fresco como con semen crioconservado registró valores menores de 20%. El semen fresco presentó la mayor tasa de fertilidad ( $19,5 \pm 4,4\%$ ) sin presentar diferencia estadística ( $p > 0,05$ ) con DMA 8% ( $17,8 \pm 8,3\%$ ); mientras que las menores fertilidades se registraron con DMA 10% ( $12,6 \pm 6,4\%$ ) y DMA 12% ( $4,7 \pm 4,3\%$ ). Semen fresco registró la mayor eclosión ( $8,9 \pm 3,0\%$ ) seguido por DMA 8% ( $5,5 \pm 2,5\%$ ); mientras que la menor eclosión fue registrada con DMA 10% ( $2,5 \pm 1,9\%$ ); observándose diferencia significativa entre esos valores promedios ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).

**Tabla 1.** Características seminales de semen fresco (control) y criopreservado de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus*. Valores expresados en promedio  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en una misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) ( $n = 16$ ).

Características	Semen fresco	DMA 8%	DMA 10%	DMA 12%
Rápidos (%)	34,7 $\pm$ 12,2 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	1,5 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
Medios (%)	43,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	14,4 $\pm$ 10,6 <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>	0,8 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>
Lentos (%)	21,2 $\pm$ 11,7 <sup>b</sup>	38,5 $\pm$ 8,1 <sup>a</sup>	24,8 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>	20,1 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
Estáticos (%)	0,5 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	44,6 $\pm$ 13,6 <sup>b</sup>	71,5 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	77,4 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>
Movilidad total (%)	99,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	55,4 $\pm$ 13,6 <sup>b</sup>	28,5 $\pm$ 5,7 <sup>c</sup>	22,6 $\pm$ 2,3 <sup>c</sup>
Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	85,2 $\pm$ 16,1 <sup>a</sup>	35,9 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>	29,5 $\pm$ 16,1 <sup>b</sup>	32,9 $\pm$ 26 <sup>b</sup>
Velocidad lineal ( $\mu\text{m/s}$ )	43,8 $\pm$ 9,1 <sup>a</sup>	16,6 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	8,9 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>	5,2 $\pm$ 4,6 <sup>c</sup>
Progresividad total (%)	48,2 $\pm$ 12,8 <sup>a</sup>	10,1 $\pm$ 6,7 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>	1,9 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
Progresividad tipo a (%)	13,4 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
Progresividad tipo b (%)	35,2 $\pm$ 10,8 <sup>a</sup>	9,2 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup>	2,9 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	1,9 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
Progresividad tipo c (%)	51,1 $\pm$ 12,9 <sup>a</sup>	45,3 $\pm$ 10,9 <sup>a</sup>	25,3 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>	20,8 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>
Progresividad tipo d (%)	0,5 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	44,6 $\pm$ 13,6 <sup>b</sup>	71,5 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	77,4 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>



**Figura 1.** Valores promedios de fertilidad y eclosión obtenidas con semen fresco (control) y semen criopreservado de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus*. Letras diferentes indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) ( $n = 16$ ).

## Discusión

La movilidad total del semen descongelado con DMA 8% se redujo a casi la mitad de la obtenida con semen fresco y a medida que se incrementó el porcentaje de inclusión del crioprotector (10 y 12%) se redujo a una cuarta o quinta parte del valor registrado en el semen fresco; el porcentaje de espermatozoides rápidos en el

semen descongelado (8, 10 y 12%) se redujo en más del 90% con relación al semen fresco y la VCL en el semen descongelado disminuyó a la dos terceras partes de la registrada en el semen fresco, observándose una tendencia a la reducción de la calidad seminal del semen descongelado en comparación con semen fresco luego

del proceso de crioconservación independientemente de la concentración de DMA.

La pérdida de movilidad, velocidad (VCL, VSL) y progresividad en el semen descongelado se ha asociado a los daños que sufre el espermatozoide en los procesos de dilución en la solución crioprotectora, congelación y descongelación. Baulny *et al.* (1999) señalaron que la disminución en la actividad de las mitocondrias provoca pérdidas de ATP durante la congelación-descongelación, lo que podría generar consecuencias en la movilidad de los espermatozoides. Kurland y Andersson (2000) señalaron que durante la crioconservación se pueden ocasionar dos tipos de daños a las mitocondrias que afectan la movilidad del espermatozoide: un daño directo sobre su DNA o su membrana y otro indirecto provocado por la fragmentación del DNA nuclear del cual depende la mitocondria para obtener algunas proteínas que no codifica su genoma. Según Martínez y Pardo (2010) los daños en el genoma impiden la replicación y la transcripción de genes mitocondriales o nucleares, imposibilitando la síntesis de proteínas claves en la producción energética, trayendo como consecuencia la disminución de la movilidad o la inmovilidad espermática.

En el presente estudio también se observó que la pérdida de movilidad total, VSL y porcentajes de espermatozoides estáticos fue mayor a medida que aumentó el porcentaje de inclusión del crioprotector, en particular cuando se incluyó a porcentajes de 10 y 12%; lo cual sugiere que DMA 8% ( $1233,3 \pm 23,1$  mOsm/kg) es menos tóxico para la célula espermática de bagre blanco que a 10 y 12% de inclusión ( $1530,0 \pm 0,0$  mOsm/kg y  $1627,7 \pm 5,8$  mOsm/kg). La toxicidad de un crioprotector depende de su concentración, tiempo de exposición y temperatura (Cuevas-Urbe, 2011) y según Yavin y Arav (2007) la mayoría de los crioprotectores cuando se utilizan a altas concentraciones tienen un efecto tóxico e hipertónico.

El espermatozoide de bagre blanco es inmóvil en los testículos y adquiere su movilidad, como la mayoría de los peces de agua dulce, por un choque hiposmótico (Alavi y Cosson, 2006). Atencio *et al.* (2014) encontraron que la osmolaridad del semen de bagre blanco es de 273,28 mOsmol/kg y se activa con soluciones con osmolaridades hasta de 266,8 mOsmol/kg pero a partir de osmolaridades de 324,5 mOsmol/kg conserva su viabilidad; por lo que los resultados del presente estudio muestran que todas las soluciones crioprotectoras usadas eran hiperosmóticas; pero los mayores daños se ocasionaron cuando se incluyó DMA a más de 8%; es decir con osmolaridades por encima de 1500 mOsmol/kg. Estos resultados sugieren la tolerancia del semen de bagre blanco

a medios hipertónicos hasta de 1223 mOsmol/kg (DMA 8%) y daños severos a la viabilidad del espermatozoides cuando se utilizan soluciones hipertónicas por encima de 1500 mOsmol/kg (DMA 10 y 12%).

El porcentaje de eclosión del semen descongelado fue menor al de semen fresco; sin embargo el porcentaje de fertilidad del semen crioconservado con DMA 8% no fue diferente al obtenido con semen fresco ( $p < 0,05$ ); lo cual sugiere que la inclusión de DMA 8% como crioprotector permeable es factible para la crioconservación de semen de bagre blanco. Varela Junior *et al.* (2012), evaluaron varios crioprotectores con base en amidas en semen de *Colosoma macropomum* y encontraron los mejores resultados cuando utilizaron dimetilformamida (DMF) 8 y 10% y metilformamida (MF) 8%, que los encontrados con DMA (2, 5, 8, 11%); sin embargo, todas las amidas presentaron mejores resultados comparadas con DMSO; según Cuevas-Urbe (2011) DMSO produce soluciones crioprotectoras más hipertónica que DMA.

La integridad del DNA espermático está asociado al éxito de la fertilización, el desarrollo normal de los embriones resultantes o su descendencia (Lopes *et al.*, 1998) convirtiéndose, entonces la fragmentación del DNA en un atributo indispensable para predecir el fracaso o éxito de la fertilización (Sakkas *et al.*, 2002; Sergerie *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008) y por tanto del proceso de crioconservación.

Según Morris *et al.* (2003) la leche en polvo, utilizada como crioprotector externo, puede contribuir a una baja capacidad de fertilización del semen descongelado por la alteración osmótica del ambiente del semen en la fase de precongelación; sin embargo el uso de la leche en polvo, como crioprotector no permeable ha sido sugerido para la crioconservación de bagres neotropicales como *Pseudoplatystoma corruscans* (Carolsfeld *et al.*, 2003) y *Pseudoplatystoma metaense* (Ramírez-Merlano *et al.*, 2011) con buenos resultados.

Los porcentajes de fertilidad y eclosión del semen crioconservado con DMA 8% fueron mayores a los obtenidos con inclusiones mayores de DMA (10 y 12%); lo cual permite sugerir que DMA a inclusiones de 10 y 12% disminuyen la calidad y capacidad fertilizante del semen de bagre blanco.

La fertilidad (menor del 20%) y eclosión (menor del 10%) con semen fresco fueron bajas si se le compara con la reportada por Atencio *et al.* (2003) quienes en reproducciones artificiales de esta especie, utilizando el mismo inductor hormonal (Ovaprim®) obtuvieron

fertilidad (70-88%) y eclosión (68-71%) altas; mientras que con semen criopreservado la mejor fertilidad ( $17,8 \pm 8,3\%$ ) y eclosión ( $5,5 \pm 2,5\%$ ) se obtuvo con DMA 8% lo cual sugiere que además de los daños ocasionados al espermatozoides en el proceso de criopreservación como daños en mitocondrias, membranas y fragmentación de DNA (Fraser y Strzezek, 2007; Li *et al.*, 2008); también se sugiere una pobre calidad de los ovocitos ya que con semen fresco (movilidad total= 99,6%) también se obtuvo baja tasa de eclosión, situación que puede ser explicada por la edad de las hembras (2 años). De acuerdo con Jerez *et al.* (2012) las hembras jóvenes de *Spaurus aurata* tuvieron menores tasas de fecundidad y de fertilización que las de mayores edades.

Basados en los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que la solución crioprotectora compuesta por DMA 8%, glucosa 6% y leche en polvo descremada 5% es una alternativa viable para la criopreservación de semen de bagre blanco.

## Referencias

- Alavi SMH, Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes II. Effects of ions and osmolality. *Cell Biol Int* 30, 1-14.
- Atencio VJ. 2000. Impactos de la Hidroeléctrica Urrá en los peces migratorios del Rio Sinú. *Rev Temas Agrarios* 8, 25-40.
- Atencio V. 2001. Producción de alevinos de especies nativas. *Rev MVZ Córdoba* 6 (1), 9-14.
- Atencio-García V, Cordero A, Martínez C, Pertuz V, Muñoz R, Cura E. 2003. Reproducción inducida del bocachico (*Prochilodus magdalenae*) y el blanquillo (*Sorubim cuspicaudus*) con Ovaprim®. Memorias 9a Jornada de Acuicultura; Villavicencio: IALL/ Universidad de los Llanos 2003.
- Atencio VJ, Dorado M, Navarro E, Pérez F, Rohatan T, Arias M, Espinosa JA. 2014. Effects of glucose concentration on the sperm motility of the catfish *Sorubim cuspicaudus*. *Proceeding of World Aquaculture Adelaide 2014*; 2014 jun 7-14; Adelaide (South Australia): World Aquaculture Society.
- Ball BA, Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 22, 1061-1069.
- Baulny BO, Labbe C, Maise G. 1999. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology* 39, 177-184.
- Bobé J, Labbé C. 2009. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165(3), 535-548.
- Brown G, Brown L. 2011. Cryopreservation of sperm of striped bass and white bass. In: TR Tiersch and C.C. Green, editors. *Cryopreservation in aquatic species*. 2 ed. Baton Rouge (Louisiana): World Aquaculture Society 430-438.
- Carmichael C, Westerfield M, Varga ZM. 2009. Cryopreservation and *in vitro* fertilization at the Zebrafish International Resource Center. *Methods Mol Biol* 546, 45-65.
- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey BJ. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish Conservation. *Journal of Fish Biology* 63, 472-489.
- Cuevas Uribe R. 2011. A general approach for vitrification of fish sperm. Tesis doctoral. Louisiana (Usa): Louisiana State University.
- Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco Santamaría Y. 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev Col Cienc Pecu* 19(2), 146-151.
- Fraser L, Strzezek J. 2007. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezingthawing. *Anim Reprod Sci* 99, 317-329.
- Glogowski J, Ciereszko A, Dabrowski K. 1999. Cryopreservation of Muskellunge and Yellow Perch Semen. *North American Journal of Aquaculture* 61, 258-262.
- Laffaldano N, Di Lorio M, Pina-Rosato M. 2012. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 78, 1381-1389.



17. Jerez S, Rodríguez C, Cejas JR, Martín MV, Bolaños A, Lorenzo A. 2012. Influence of age of female gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstock on spawning quality throughout the reproductive season. *Aquaculture* 350-353, 54-62
18. Kurland C, Andersson S. 2000. Origin and Evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 786-820.
19. Li P, Wei Q, Liu L. 2008. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *J Appl Ichthyol* 24, 121-125.
20. Lim HK, MH Le. 2013. Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm. *Theriogenology* 79, 867-871.
21. María AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbygnianus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260, 298-306.
22. Martínez JG, Pardo SC. 2010. Criopreservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biol Colomb* 15(2), 3-24
23. Medina-Robles V, Velasco-Santamaría J, Cruz Casallas P. 2005. Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleosteos. *Rev Col Cienc Pecu* 18(1), 34-38.
24. Mojica JI, JS Usma, Álvarez-León R, Lasso CA. 2012. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt/ Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia/WWF Colombia/Universidad de Manizales.
25. Morris JP, Berghmans S, Zahrieh D, Neuberger DS, Kanki JP, Look AT. 2003. Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide. *Biotechniques* 35(5), 956-968.
26. Muñoz R, Martínez C. 2003. Reproducción inducida del blanquillo (*Sorubim cuspicaudus* Littmann, Burr & Nass, 2000) con Ovaprim®. Trabajo de pregrado. Montería (Col): Universidad de Córdoba.
27. Naccache P, Sha'afi RI. 1973. Patterns of nonelectrolyte permeability in human red blood cell membrane. *J Gen Physiol* 62, 714-736.
28. Lopes S, Sun J, Jurisicova A, Meriano J, Casper R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in a cytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528-532.
29. Pinzón-Arciniegas SM, JE Mojica Rodríguez, PE Cruz Casallas. 2005. Ensayos preliminares sobre criopreservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766). *Rev Orinoquía* 9(2), 28-37.
30. Prieto-Guevara M, Hernández J, Gómez C, Pardo S, Atencio-García V, Rosa P. 2013. Efecto de tres tipos de presas vivas en la larvicultura de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*). *Rev MVZ Córdoba* 18(3), 3790-3798.
31. Ramírez-Merlano J, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. 2011. Criopreservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Arch Med Vet* 43, 135-144.
32. Routray P, Verma D, Sarkar S, Sarangi N. 2007. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. *Fish Physiol Biochem* 33, 413-427.
33. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi G, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod* 2002; 66: 1061-1070.
34. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum. Reprod* 2005; 20: 3446-3451.
35. Steinberg H, Hedder A, Baulain R, Holtz W. 1995. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws. Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas at Austin 147p.

36. Varela Junior AS, Corcinib CD, Ghellerb SMM, Jardima RD, Lucia T, Streit DP, Figueiredo MRC. 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* 78, 244–251.
37. Vincent C, Pruliere C, Pajot-Augy E, Campion E, Douzou P. 1998. Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophysical Chemistry* 29, 161-169.
38. Villadiego P, Ortiz E, Atencio-García V. 2004. Evaluación del régimen alimentario del bagre blanco, *Sorubim cuspicaudus* (Pisces: Siluriformes) en el bajo río Sinú. *Rev Dahlia Asoc Col Ictiol* 7, 13-21.
39. Viveiros ATM, Godinho HP. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 35,137–150.
40. Yavin S, Arav A. 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 67, 81-89.
41. Yildiz C, Bozkurt Y, Yavas I. 2013. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology* 67, 91–94.