



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

Desarrollo e implementación de técnicas para
la criopreservación de esperma de pejerrey
bonaerense *Odonstesthes bonariensis*

Nº 279

Gabriel Lichtenstein

Tutora: Silvia A. González

Departamento de Investigaciones
Noviembre 2009

Dedicación

A mi Familia.

Al pejerrey bonaerense.

Agradecimientos

- Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) CONICET-UNSAM:
- A mi Director, el Dr. Leandro Miranda.
- Al Dr. Gustavo Somoza, Director del Laboratorio de ictiofisiología y acuicultura.
- A mis compañeros y personal técnico del IIB- INTECH.

- Universidad de Belgrano:
- A mi tutora, la Dra. Silvia A. González.
- Al Dr. Máximo Barón.
- A mis compañeros de la facultad.

- Al Dr. Carlos Bonetto, del ILPA por su colaboración en el análisis iónico del líquido seminal.
- A todos los que colaboraron en la reparación del osmómetro.
- A mi madre.
- A mi padre.
- A mis hermanos.
- A mis compañeros de la facultad.
- A todos mis amigos.
- A Nadia.

- Esta tesis fue financiada por la ANPCYT-PICTR #2003-528, En el marco del proyecto: Desarrollo de la cría del pejerrey bonaerense y patagónico: Producción de semilla y crecimiento.

Índice

RESUMEN.....	5
1.1) ¿Por qué cultivar organismos acuáticos?	5
1.2) ¿Qué es la acuicultura?	5
1.3) ¿Por qué cultivar pejerrey bonaerense (Odontesthes bonariensis)?.....	6
1.4) ¿Cuáles son las principales características biológicas del pejerrey bonaerense?	7
1.5) Orígenes de la piscicultura del pejerrey bonaerense	7
1.6) ¿Por qué es importante controlar la reproducción del pejerrey bonaerense?	9
1.7) Qué es la criopreservación	10
1.8) ¿Cuáles son las ventajas de criopreservar el esperma de los peces?	11
1.9) ¿Qué factores hay que tener en cuenta para criopreservar esperma de pejerrey bonaerense?	13
2. OBJETIVO PRINCIPAL	14
2.1. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	15
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1) Material de estudio:.....	15

3.2.) Metodología de trabajo	16
3.3) Análisis de calidad del esperma de pejerrey:.....	18
3.4) Evaluación y desarrollo de diluyentes:.....	19
3.5) Evaluación de los diluyentes seleccionados para su uso en refrigeración y congelación de esperma:.....	20
3.6) Pruebas de refrigeración de esperma de pejerrey:.....	20
3.7) Evaluación y selección de crioprotectores para congelar esperma de pejerrey:.....	20
3.8) Pruebas de congelamiento:	20
1) Congelamiento en crioviales:.....	20
3.9) Pruebas de descongelamiento:.....	23
3.10) Macerados de testículo:.....	24
4. RESULTADOS	28
4.1) Evaluación y desarrollo de diluyentes:.....	28
4.2) Pruebas de refrigeración de esperma de pejerrey:.....	29
4.3) Evaluación y selección de crioprotectores para congelar esperma de pejerrey:.....	31
4.4) Pruebas de congelamiento:	32
Congelamiento en crioviales:	32
4.5) Macerados de testículo:	38
1) Congelamiento en crioviales:.....	39
2) Congelamiento en pajuelas:	42
5. DISCUSIÓN.....	45
5.1) Evaluación y desarrollo de diluyentes:.....	46
5.2) Pruebas de refrigeración de esperma de pejerrey:.....	47
5.3) Evaluación y selección de crioprotectores para congelar esperma de pejerrey:.....	47
1) Congelamiento en crioviales:.....	48
5.5) Macerados de testículo:	49
6. CONCLUSIONES.....	49
7. FUENTES DE INFORMACIÓN	50
8. ANEXOS.....	53

Resumen

El pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) se ha convertido en un pez emblemático y muy apreciado en la mayoría de las pesquerías de aguas continentales de nuestro país. En los últimos años, debido a la sobrepesca y a la contaminación de su hábitat natural, las poblaciones de pejerrey bonaerense han sufrido una marcada declinación y por estos motivos se han incrementado tanto los estudios básicos como los aplicados para desarrollar su cultivo. Poder controlar la reproducción es esencial para la acuicultura de cualquier especie. El desarrollo y aplicación de técnicas para el manejo del desove, la fecundación y la producción coordinada de juveniles es la condición primaria para lograr la instalación de granjas de producción de pejerrey bonaerense. De esta manera, para la obtención masiva de larvas y juveniles es necesario contar con un abastecimiento permanente de gametos. Por otra parte, se ha observado que en el pejerrey el volumen de esperma que puede obtenerse en condiciones naturales o en cautiverio resulta escaso (100-200 μ l). Con el fin de hacer más eficiente la reproducción artificial del pejerrey, en este trabajo de tesis, se han desarrollado e implementado técnicas de criopreservación de esperma para esta especie.

A partir de los resultados obtenidos se determinó que una buena solución para diluir esperma de pejerrey debe contener Na^+ en su composición, algún azúcar como sacarosa o trehalosa, poseer una osmolaridad entre 400-450 mOsm/Kg y un pH de 8. En este sentido los diluyentes Mm400, Na-Sac450 y Na-Tre450 han resultado efectivos. Se observó también que para la refrigeración de esperma a 8°C la solución de Mm400 resultó adecuada, pudiéndose activar muestras con capacidad fecundante hasta después de 8hs. Fue posible también criopreservar muestras de esperma (obtenidas mediante masajeo abdominal) combinadas con los diluyentes Mm400, Na-Sac450 y Na-Tre450 y con los crioprotectores DMSO, Metanol y Etilenglicol en una concentración del 10% v/v utilizando 6 métodos de congelamiento:

- -80°C.
- -80°C y posterior congelamiento en N_2 líquido.
- hielo seco.
- hielo y seco posterior congelamiento en N_2 líquido.
- Congelamiento rápido en vapores de N_2 líquido e inmersión en N_2 líquido.
- Congelamiento lento en vapores de N_2 líquido e inmersión en N_2 líquido.

Por otra parte, se determinó el tiempo de descongelamiento y la temperatura adecuada para muestras conservadas en crioviales de 1ml (35°C x 50seg.) o en pajuelas de 0,250ml (35°C x 10seg.). También se congelaron exitosamente muestras de esperma obtenidas de macerados de testículos utilizando los mismos diluyentes, crioprotectores y métodos de congelamiento descritos anteriormente y evaluados con esperma liberable.

Palabras clave:

Acuicultura, Criopreservación, Esperma, Pejerrey bonaerense, Reproducción.

1. Introducción

1.1) ¿Por qué cultivar organismos acuáticos?

En los últimos años, debido principalmente a la sobreexplotación de los recursos pesqueros, ha ocurrido una progresiva disminución en la cantidad, el tamaño y la calidad de los ejemplares extraídos de la naturaleza. Como consecuencia de este hecho los recursos pesqueros indefectiblemente tenderán a agotarse y resulta evidente que una declinación en las reservas pesqueras impactará de forma negativa sobre las industrias y las economías que de ellas dependen (Luchini, 2004). Estos inconvenientes presentan un desafío para los próximos años de investigación y desarrollo de políticas y tecnologías que permitan un aprovechamiento sustentable de los recursos ictícolas. En este contexto, la búsqueda de una alternativa económicamente rentable, capaz de suplir a las pesquerías tradicionales, ha llevado a la necesidad de implementar modernas técnicas para la cría de organismos acuáticos.

1.2) ¿Qué es la acuicultura?

La acuicultura puede definirse como el arte de cultivar cualquier organismo que esté relacionado con el agua, directa o indirectamente, por su reproducción. La cría de los organismos puede realizarse tanto en aguas dulces, salobres o marinas existiendo diferentes sistemas para su cultivo (**Fig. 1**). Según la densidad de cría, éstos pueden clasificarse como: extensivos (baja densidad, baja producción y sin aporte

externo de alimento); semi-intensivos (mayor densidad, mayor producción y con aporte complementario de alimento externo) o intensivos (alta densidad, alta producción y con ración totalmente externa).

La producción de organismos acuáticos en cautiverio se practica desde hace ya varios siglos, sin embargo la transición hacia la producción intensiva solo se aplica desde hace pocas décadas (Kirk, 1987). Para facilitar el paso a la cría intensiva es fundamental el conocimiento de las condiciones óptimas de cultivo. Actualmente, uno de los mayores problemas que enfrenta la industrialización de la acuicultura de nuevas especies es la necesidad de controlar la reproducción. La obtención de gametas a partir de reproductores salvajes, así como la captura de juveniles del medio natural genera una dependencia temporal que podría ser evitada a través de la manipulación de los organismos en cautiverio. Si se logra controlar la reproducción podrán obtenerse embriones, larvas y juveniles a lo largo de todo el año, incluso en las épocas en que los organismos no se reproducen en forma natural (Bromage & Roberts, 1995).



a) Jaulas para cría de salmón en Canadá



b) Estanques excavados para crías de camarones en EE.UU.

Figura 1. Distintos sistemas de cría utilizados en la acuicultura moderna

1.3) ¿Por qué cultivar pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*)?

La demanda del mercado es la que determina que especies son capturadas y cuales son discriminadas o descartadas para la explotación comercial. Entre éstas, se destaca el pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*). De importancia regional innegable, se ha convertido en un pez emblemático y muy apreciado en la mayoría de las pesquerías de aguas continentales de nuestro país (López *et al.*, 2001; **Fig. 2**). En los últimos años, debido a la sobrepesca y a la contaminación de su hábitat natural, las poblaciones de pejerrey bonaerense han sufrido una marcada declinación (Berasain *et al.*, 2005). Por estos motivos se han incrementado tanto los estudios básicos como los aplicados para desarrollar su cultivo (Strüssmann, 1989; Miranda & Somoza, 2001; Von Bernard *et al.*, 2002).



Figura 2) Captura de pejerreyes mediante redes de arrastre en la laguna de Chascomús.

1.4) ¿Cuáles son las principales características biológicas del pejerrey bonaerense?

El pejerrey bonaerense es un pez eurihalino de hábitos pelágicos que nada en cardúmenes buscando alimento y protección, siendo su hábitat natural los cuerpos de agua dulce de la Región Pampeana (López *et al.*, 2001). La mayoría de los integrantes de su familia (**Atherinidae**) son peces marinos, y probablemente ésta sea una de las razones por la que también habita en aguas salobres como en las lagunas del sudeste bonaerense y en las afueras del estuario del Río de la Plata (Tejedor, 2001). *Odontesthes bonariensis* (**Fig. 3**) es una especie plánctofaga, sin embargo en períodos de escasez se convierte en un consumidor generalista (Ringuelet & Escalante, 1980). Respecto de su morfología presenta un cuerpo hidrodinámico, alargado, fusiforme y totalmente cubierto de pequeñas escamas cicloides. De cabeza pequeña y triangular, con boca terminal y protráctil, presenta una aleta caudal ahorquillada y un par de aletas pectorales bien desarrolladas. Su coloración varía en una gama de verdes-azules en el lomo, un blanco perlado en el vientre y sus flancos vistosos y característicos poseen una inconfundible estola plateada e iridiscente a lo largo de la línea lateral (Dyer, 1998). Su máximo predador en la naturaleza es la tararira (*Hoplias malabaricus*).

Odontesthes bonariensis



Orden: Atheriniformes.

Familia: Atherinidae.

Talla máxima aproximada: 50cm de Longitud total.

Hábitos: Aguas abiertas y preferentemente despejadas de vegetación, donde tiende a agregarse en cardúmenes que se desplazan permanentemente en constante búsqueda de alimento y protección.

Clima: Templado.

Importancia: Pesca deportiva y comercial. Acuicultura.

Distribución: El Río de la Plata, las aguas continentales bonaerenses y de las provincias limítrofes, aunque actualmente se encuentra ampliamente difundido en todo el país, debido a la intervención del hombre.

1.5) Orígenes de la piscicultura del pejerrey bonaerense

Los primeros trabajos sobre piscicultura de una especie autóctona en la Argentina se realizaron en el pejerrey bonaerense a principios del siglo XX (Tulián, 1908). Se destacan los trabajos realizados por Ringuelet (1942) y por Gonzalez Regalado & Mastarrigo (1954) que fueron publicados bajo el nombre de "Piscicultura del pejerrey o Aterinicultura" y "Piscicultura: El Pejerrey", respectivamente. Desde el comienzo de esta actividad, el pejerrey bonaerense ha sido sembrado en una variedad de cuerpos de agua tanto naturales como artificiales, que abarcaban prácticamente todo el país. Cuando se intentó su introducción en Bélgica, Francia, Italia e Israel los resultados fueron negativos (Welcome, 1988). En cambio, hubo éxito en Chile y en el lago Titicaca de Perú y Bolivia (Bonetto & Castello, 1985; Loubens & Osorio, 1988). Cabe destacar que desde 1966 tanto el pejerrey bonaerense como el patagónico (*Odontesthes hatcheri*) fueron introducidos satisfactoriamente en Japón (**Fig. 4**). En la actualidad hay 8 provincias dedicadas a la cría del pejerrey en el país asiático, existiendo también poblaciones naturales como las del lago Kasumigaura (Mituta, 2001).

Por otra parte, en la Provincia de Buenos Aires se estima que hay más de 2.000.000 de hectáreas de cuerpos de agua aptos para la cría de pejerrey bonaerense (Reartes, 1995). Sin embargo, a pesar de ser considerada como una especie promisoriosa para acuicultura, aún no se ha desarrollado el cultivo comercial del pejerrey (Luchini *et al.*, 1984; Reartes, 1995).



a) Tanques internos de la estación

b) Lote de reproductores de pejerrey bonaerense.

Figura 4: Estación Experimental de Piscicultura de Kanagawa (Japón)

En la actualidad se han identificado algunos problemas que afectan al éxito de su cría: baja tasa de crecimiento, altas mortalidades en los estadios larvales y juveniles y maduración sexual antes de alcanzar tallas comerciales (Miranda & Somoza, 2001) A fines de resolver estos inconvenientes e impulsar la acuicultura del pejerrey bonaerense, en noviembre del año 2001 y en el marco del proyecto de cooperación internacional entre la JICA* (Japón), el CONICET** y el MAA*** : “Desarrollo de la acuicultura del pejerrey y su propagación en la Argentina”, se transportaron a nuestro país embriones provenientes de reproductores de *O. bonariensis* de la Estación Experimental de Piscicultura de Kanagawa (**Fig. 5**). Los ejemplares de Kanagawa son descendientes de embriones que fueron enviados desde la laguna de Chascomús a Japón en el año 1965-66 por acción de la Liga Argentino-Japonesa del pejerrey.

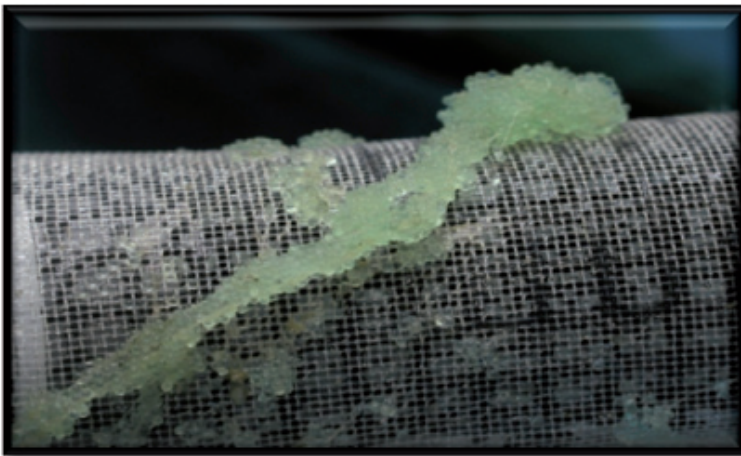


Figura 5: Embriones de pejerrey provenientes de la Estación Experimental de Piscicultura de Kanagawa.

Luego de su llegada a la Argentina los embriones fueron acondicionados en las instalaciones del IIB-INTECH (**Fig. 6**) y fueron criados en forma intensiva hasta la madurez sexual (Miranda *et al.*, 2006). Hoy en día, el instituto cuenta con tres generaciones de éstos pejerreyes (unos 2500 ejemplares), parte de los cuales han sido utilizados en el desarrollo de esta tesina.



a) Caja térmica donde se transportaron los embriones de pejerrey



b) Embriones de pejerrey en el interior de la caja térmica



c) Primeros juveniles de pejerrey nacidos en el instituto.



d) Tanques externos donde se mantienen reproductores de pejerrey

Figura 6: Embriones de pejerrey bonaerense provenientes de la Estación Experimental de Piscicultura de Kanagawa. Cría de juveniles y reproductores en el IIB-INTECH.

1.6) ¿Por qué es importante controlar la reproducción del pejerrey bonaerense?

En esta especie se han descrito dos períodos de actividad reproductiva, uno principal en primavera y uno menor en otoño (Calvo & Morriconi, 1972; Strüssmann, 1989). La actividad reproductiva se inicia cuando la temperatura del agua llega a los 15°C y alcanzará su máxima actividad cuando la temperatura se encuentre entre 18 y 20°C (Strüssmann, 1989; Toda *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2006).

Poder controlar la reproducción es esencial para la acuicultura de cualquier especie. El desarrollo y aplicación de técnicas para el manejo del desove, la fecundación y la producción coordinada de juveniles es la condición primaria para lograr la instalación de granjas de producción de pejerrey bonaerense (Miranda *et al.*, 2005). De esta manera, para la obtención masiva de larvas y juveniles es necesario contar con un abastecimiento permanente de gametos.

Se ha observado que en el pejerrey el volumen de esperma que puede obtenerse en condiciones naturales o en cautiverio resulta considerablemente escaso (100-200µl en el período de máxima actividad reproductiva) y, por lo tanto, es necesario disponer de varios machos para fecundar la totalidad de los huevos obtenidos de una sola hembra (Strüssmann, 1989; Miranda *et al.*, 2001). Recientemente se han realizado experimentos en machos de pejerrey donde se pudo incrementar significativamente el volumen de esperma liberable durante casi todo el año sin afectar la concentración de espermatozoides ni la motilidad de los mismos. Estos tratamientos incluyeron: el aumento de la fase lumínica o tratamientos hormonales mediante la inyección de gonadotrofina coriónica humana (HCG), extractos hipofisarios de carpa o salmón y análogos de la Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) (Miranda *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2005; Fig. 7).



Figura 7: Inyección de un pejerrey macho con gonadotropina coriónica humana (HCG)

También se ha observado que en cautiverio las hembras de pejerrey presentan un notable asincronismo en la maduración oocitaria y desovan varias veces dentro de la temporada reproductiva (Strüssmann, 1989; Miranda *et al.*, 2006).

En este sentido, la criopreservación de esperma de pejerrey es una moderna alternativa tecnológica que permitirá un aprovechamiento eficiente de sus gametos de manera que puedan ser utilizados para fecundación *in vitro* en diferentes épocas del año.

1.7) ¿Qué es la criopreservación?

La criopreservación puede definirse como un conjunto de técnicas y metodologías que permite preservar organismos vivos a temperaturas extremadamente bajas, que rondan entre -80°C y $-196,8^{\circ}\text{C}$. Mediante este procedimiento se puede lograr de forma reversible una disminución casi absoluta de los procesos metabólicos esenciales, lo que permite arrestar el decaimiento de los organismos por un periodo de tiempo largo e indefinido. Utilizando la técnica adecuada es posible preservar organismos de casi cualquier nivel de organización como: células, tejidos, órganos e incluso organismos completos sin afectar significativamente su integridad física y funcional (Toyoda, 1986; **Fig.8**).



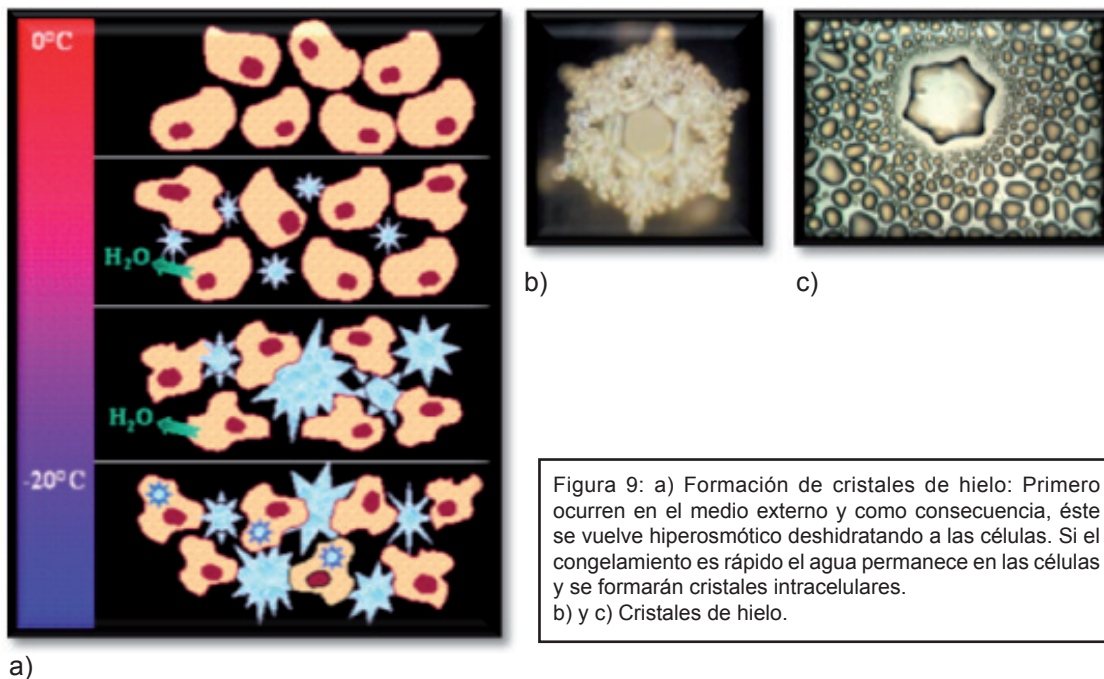
a) Criopreservación de microorganismos en un Termo con N_2 líquido.



b) Criovial con glóbulos blancos en vapores de N_2 líquido.

Figura 8: Criopreservación en N_2 líquido.

En este sentido, es importante mencionar que durante la criopreservación de un organismo vivo suelen formarse cristales de hielo durante el proceso de congelamiento lo que provoca deshidratación celular, estrés osmótico y daños mecánicos sobre la integridad física de las distintas organelas y membranas (Theodorescu, 2004; Fig.9).



Por lo tanto, resulta esencial para el éxito de este proceso utilizar soluciones crioprotectoras que eviten la formación de dichos cristales. La acción de éstas sustancias crioprotectoras puede clasificarse en dos grupos según la permeabilidad a la membrana celular. En el primero se encuentran las sustancias que poseen bajos pesos moleculares y que, por lo tanto, penetran al citoplasma celular, como por ejemplo, el glicerol, el metanol, el etilenglicol, el 1,2-propanodiol y el dimetil sulfóxido (DMSO; Holt, 2000). El segundo grupo reúne aquellas sustancias que no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular, entre las cuales se halla, la sacarosa, la trehalosa, el suero fetal bovino (FBS) y la albúmina sérica bovina (BSA; Mizukami, 1999). Los distintos crioprotectores afectan de manera distinta a cada organismo (Renard & Cochard, 1989). La elección del crioprotector ha sido un asunto de ensayo y error en la mayoría de las investigaciones, quizás porque aún no existe una explicación satisfactoria para la acción de los mismos sobre la célula espermática (Holt, 2000).

1.8) ¿Cuáles son las ventajas de criopreservar el esperma de los peces?

La criopreservación de esperma implica una serie de ventajas prácticas y económicas:

- Disponer de esperma de buena calidad y en el volumen necesario para fecundar ovas en cualquier periodo del año lo que permitirá independizarse de los machos y así superar el problema de la obtención simultánea de gametos.
- Establecer las bases para realizar un banco de esperma y adoptar así un programa de cría selectiva mediante programas de selección de reproductores y mejoramiento genético.
- Optimizar el intercambio de esperma con otras estaciones de cría de peces con el fin de evitar la endogamia en poblaciones cautivas.
- Incrementar la protección sanitaria, permitiendo la introducción de nuevas líneas genéticas con reducción del peligro de transmisión de patógenos desconocidos en los cultivos de peces.
- Suministro permanente de gametos para la óptima utilización en criaderos o en investigaciones.
- Economía para el mantenimiento de criaderos, lo que proporcionaría, un resguardo por pérdida de líneas genéticas.

Varios procedimientos para la criopreservación de esperma de peces han sido desarrollados durante los últimos 20 años (Leung, 1991; Ohta, *et al.*, 2001; Ritar, 2000). Los resultados son altamente variables, lo que indica que la sensibilidad a los procesos de criopreservación depende de varios factores y que, por lo tanto, es necesario realizar ajustes especie-específicos a los protocolos existentes (Medina-Robles *et al.*, 2005; **Tabla 1**).

Tabla 1. Resultados de experimentos de criopreservación en algunos peces teleósteos.

Espece	¹ Diluyente + Crioprotector. ² Tasa de dilución	¹ Osmolaridad ² pH ³ Sistema de envasado	¹ Tiempo de equilibrio ² Velocidad de enfriamiento	Condición de descongela- miento	¹ Resultados ² Referencias
<i>Brycon siebenthalae</i>	¹ 5.5% glucosa + 12% yema de huevo + 10% DMSO ² 1:4	¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.5 ml	¹ < 5 min. ² Vapores de NL por 15 min hasta -76°C y luego a NL	Baño de agua a 34°C por 30s.	¹ 63.1% motilidad 58.2% fertilidad ² Cruz-Casallas <i>et al.</i>
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	¹ 5.5% glucosa + 12% yema de huevo + 7.5% DMSO ² 1:4	¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.5 ml	¹ < 5 min ² 9.6°C/min hasta -120 °C. y luego a NL	Baño de agua a 35 °C por 30s.	¹ 35% motilidad ² Mojica y Pinzón
<i>Clarias gariepinus</i>	¹ Ginzburg Fish Ringer + 10% Metanol ² 1:20	¹ 244mOsm/kg ² 7.6 ³ Pajillas de 1 ml	¹ 5 min a -40°C ² 5 °C/min de -2 °C a -38 °C y luego a NL	Baño de agua a 27°C por 3min.	¹ >60% eclosión ² Viveiros <i>et al</i>
<i>Tunakia limbata</i>	¹ 90% Suero fetal bovino (FBS) + ² Glucosa 300mM + 10% Metanol 1:40	¹ ND ² ND ³ Tubos de 80ml	¹ 3-60min. ² 9.2 °C/min. hasta -40°C y luego a NL	Baño de agua a 20°C por 10s	¹ 30-40% motilidad ² Ohta <i>et al</i>
<i>Diplodus puntazzo</i>	¹ 0.17 M Clorhidra- to de Sodio + 15% DMSO (A) ¹ 0.1 M Citrato de Sodio + 10% DMSO (B) ² 1:10; 1:5	¹ 282 mOsm/Kg ¹ 234 mOsm/Kg ² ND ³ Pajillas de 0.5 ml	¹ 15 min ² 8°C/min de 4 °C a -80°C y luego a 360°C/min hasta NL	Baños de agua a 28°C por 20s (580 °C/ min. hasta -2°C y 133°C/min. hasta 20°C.)	¹ >50% de motilidad ² Taddei <i>et al</i>
<i>Macrozoarces americanus</i>	¹ Diluyente de semen de Ocean pout + 20% DMSO ² 1:3	¹ 302mOsm/kg ² 7.5 ³ Pajillas de 0.25 y 1.7 ml	¹ NR ² Directamente en vapores de NL a 9 °C/min hasta -95 °C, luego a NL	30°C por 7s.	¹ 50-70% motilidad ² Yao <i>et al</i>
<i>Cyprinus carpio</i>	¹ Medio Kurokura + 10% DMSO ² 1:5	¹ ND ² ND ³ Pajillas de 2 ml	¹ 4°C por 2 a 4hs ² 4°C/min. de 4 a -9°C, 11 °C/min. de -11 a -80°C, 6 min. a -80°C y luego a NL	Baños de agua a 35°C por 110s.	¹ 56% fertilidad 52% eclosión ² Linhart <i>et al</i>
Espece	¹ Diluyente + Crioprotector ² Tasa de dilución	¹ Osmolaridad ² pH ³ Sistema de envasado	¹ Tiempo de equilibrio ² Velocidad de enfriamiento	Condición de descongela- miento	¹ Resultados ² Referencias
<i>Esox masquinongy</i>	¹ Diluyente Erdahl y Graham + 10% DMSO + 10% Yema de huevo ² 1:4	¹ ND ² ND ³ Pellets de 0.1 ml	¹ NR ² Directamente en hielo seco (-79 °C) por 5 min. y luego a NL	En Tris-HCL 30 mM a temperatura ambiente por 5 a 7s.	¹ 46.2% eclosión ² Cierieszko

<i>Sparus aurata</i>	¹ 1% NaCl + 5% DMSO (A) ¹ 1% NaCl + 10% Etilen glicol (B) ¹ 1% NaCl + 10% Propilenglicol (C) ² 1:6	¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.25 ml	¹ 10 min. ² 10°C/min. de 0 a -150°C y luego a NL	Baños de agua a 30 °C (15 °C/ min.)	¹ (A) <65% motilidad (B y C) 50% motilidad ² Fabbrocini <i>et al</i>
<i>Pleuronectes ferrugineus</i>	¹ 0.137 M NaCl, 0.011 M KCL, 0.004 M Na ₂ HPO ₄ + 10% Propilenglicol ² ND	¹ 240 mOsM/kg ² 7.7 ³ Pajillas de 0.25 y 1.7ml	¹ ND ² 11.5 °C/min de -5 a -15 °C, 16.7 °C/min de -15 a -45 °C, luego hasta -95 °C y entonces a NL	Baños de agua a 30 °C por 7s	¹ 59.2% fertilidad 52.5% eclosión ² Richardson <i>et al</i>
<i>Esox lucius</i>	¹ 0.6 M Sacarosa + 15% DMSO + 10% Lipoproteínas de baja densidad (LDL) ² 1:3	¹ ND ² ND ³ Pellets de 0.08ml	¹ Mantenido entre 0 a 2°C por 40s. ² En hielo seco (-79°C) por 5 min y luego a NL	Rápidamente en solución de descongelación (120 mM NaCl + Diluyente de fertilización FD) a 30°C.	¹ 69.8% eclosión ² Babiak <i>et al</i> .
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	¹ Solución de sacarosa 0.6 M + 10% DMSO (A) ¹ Solución de sacarosa 0.6 M +20% DMSO (B) ² 1.5:2.5	¹ ND ² ND ³ Pajillas de 5ml	¹ ND ² Vapores de NL a -180°C y luego a NL	Baños de agua a 25 °C por 35s.	¹ 81% fertilidad (A) 83.8% fertilidad (B) ² Steinberg <i>et al</i>
<i>Acipenser fulvescens</i>	¹ Sacarosa 0.6 M + 10% DMSO ² 1:3	¹ Hipertónica con respecto al plasma seminal ² ND ³ Pellets de 0.1 ml	¹ 1min. ² Directamente a NL dentro de viales plásticos	ND	¹ 19.2% motilidad ² Ciereszko y Dabrowski

Abreviaturas de la Tabla 1:

ND= No determinado; NR= No realizado; NL= Nitrógeno líquido.

- Medio Kurokura= 1284 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 2.4 mM NaHCO₃.
- Diluyente Ocean Pout semen = 183 mM NaCl, 10.25 mM KHCO₃, 1.45 CaCl₂, 0.84 mM MgSO₄, 0.15 mM Glucosa.
- Solución salina de inhibición de motilidad espermática buferada (BSMIS)= 75 mmol/L NaCl, 70 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgSO₄, 20 mmol/L Tris.
- Diluyente Erdah y Graham= 0.29 g CaCl₂, 0.4 g MgCl₂, 0.5g Na₂HPO₄, 5.1 g KCl, 11.7 g NaCl, 0.2 g Acido cítrico, 20 g Glucosa, 20 ml de 1.27 g / 100 ml⁻¹ KOH, 20 ml de 5.3 g / 100 ml⁻¹ bicina, suplementada a 2 L de agua destilada.
- Diluyente Ginzburg fish Ringer= 123.2 mM NaCl, 3.75 mM KCl, 3.0 mM CaCl₂, 2.65 mMNaHCO₃.
- Diluyente de fertilización FD= 0.9% NaCl, 1 mM Ca, buferado a pH 9.0 con 20 mM Tris + 30 mM glicina.
- Solución salina balanceada Hanks HBSS= 8 g/l NaCl, 0.40 g/l KCl, 0.14 g/l CaCl₂, 0.20 g/l MgSO₄, 0.06 g/l Na₂HPO₄, 0.03 g/l KH₂PO₄, 0.17 g/l NaHCO₃, 1.0 g/l Glucosa.
- Solución salina balanceada Hanks libre de calcio CF-HBSS= 8 g/l NaCl, 0.40 g/l KCl, 0.20 g/l MgSO₄, 0.06 g/l Na₂HPO₄, 0.03 g/l KH₂PO₄, 0.17 g/l NaHCO₃, 1.0 g/l Glucosa.
- Diluyente Stein y Bayrle= 750 mg NaCl, 200 mg NaHCO₃, 38 mg KCl, 100 mg Glucosa, 20 ml Yema de huevo, 100 ml agua destilada.

1.9) ¿Qué factores hay que tener en cuenta para criopreservar espermatozoides de pejerrey bonaerense?

Los espermatozoides de los peces con fecundación externa permanecen inmóviles en la luz de los testículos y se activan según las características ambientales al ser liberados al medio (Morisawa *et al.*, 1985; **Fig.10**). En general, los espermatozoides de los peces de agua dulce se activan en un medio hiposmótico con respecto al líquido seminal y en los marinos en un medio hiperosmótico. También se ha observado que en el espermatozoides de los salmónidos una alta concentración del ion K⁺ inhibe la motilidad por completo (Morisawa *et al.*, 1985).

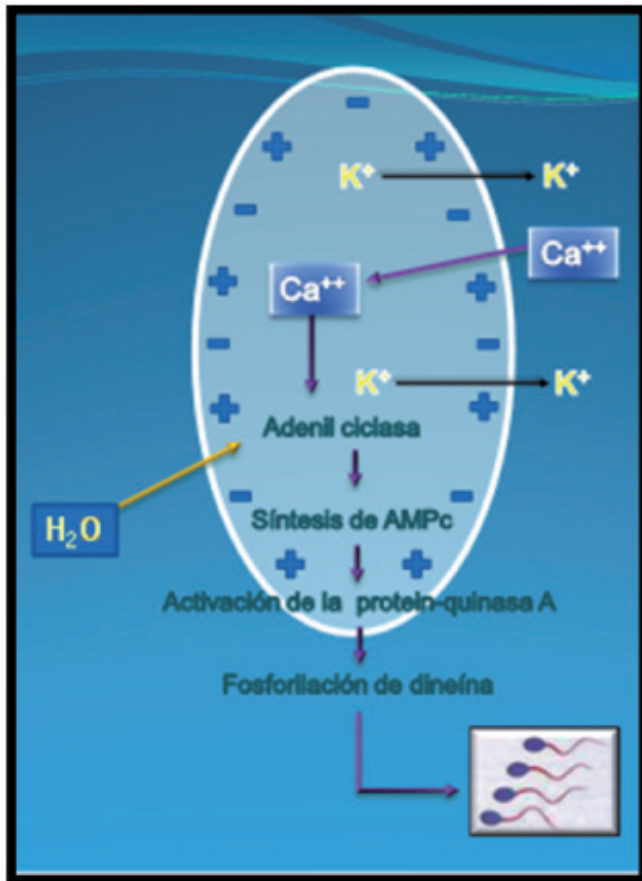


Figura 10: Activación de una célula espermática de un salmónido en un medio hiposmótico: se produce la despolarización de la membrana plasmática lo que favorece la entrada de Ca^{++} a la célula y, por consiguiente, se inicia una cascada de fosforilaciones que termina con la activación de la dineína (una proteína contráctil) que gatilla la motilidad flagelar.

La activación es un evento único y cuando un espermatozoide se activa su motilidad decae hasta agotarse en pocos minutos. Por lo tanto, si el espermatozoide ha sido activado o si presenta un alto porcentaje de motilidad no sería conveniente criopreservarlo ya que no podrá volver a activarse y por ende no tendrá capacidad fecundante (Leung *et al.*, 1991). Para superar este problema es necesario contar con diluyentes que no permitan la activación de los espermatozoides. El diluyente no sólo debe inhibir la activación, sino que también debe evitar la aglutinación de los espermatozoides. Algunas veces es posible adicionarles antibióticos y sustancias nutritivas para prolongar la viabilidad de los espermatozoides en el diluyente (Leung, 1991).

Estudios realizados sobre el pejerrey bonaerense determinaron que su espermatozoide se activa en soluciones hiposmóticas con respecto al líquido seminal (331mOsm/kg). Luego de la activación se pasa de movimientos muy rápidos a movimientos lentos y/o vibratorios en sólo 2 minutos y, al minuto 10, se observa un cese casi completo de la motilidad de los espermatozoides (Strüssmann *et al.*, 1994).

Por otra parte, y a diferencia de lo observado en salmónidos, el ion K^+ activa la motilidad de los espermatozoides del pejerrey bonaerense. A partir de estas observaciones, se desprende que una solución isosmótica o levemente hiperosmótica y carente de K^+ podría ser utilizada con éxito para la realización de un diluyente apropiado para el espermatozoide del pejerrey bonaerense (Renard *et al.*, 1994).

Otro factor a tener en cuenta es la velocidad de congelamiento y la de descongelamiento. La congelación de espermatozoides en vapores de nitrógeno líquido es la técnica más utilizada en peces teleósteos (Linhart *et al.*, 2000; Taddei, 2001; Yao *et al.*, 2000). No obstante, la congelación directa en hielo seco a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de una inmersión en nitrógeno líquido a $-196.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ también son utilizadas (Babiak, 1999; Babiak, 2002).

El rango de temperaturas de descongelación de espermatozoides criopreservados en peces es muy amplio, variando desde temperaturas cercanas a los 4°C hasta temperaturas superiores a 80°C (Holt, 2000).

2. Objetivo principal

El objetivo principal de esta tesina es desarrollar e implementar técnicas de criopreservación de espermatozoides, con el fin de hacer más eficiente la reproducción artificial del pejerrey bonaerense *Odontesthes bonariensis*.

2.1. Objetivos secundarios

- Desarrollar y analizar diluyentes adecuados para la criopreservación de esperma en hielo seco (-79°C) o freezer (-80 °C) y en N₂ líquido (-196 °C).
- Desarrollar y analizar diluyentes adecuados para la refrigeración de esperma a 8 °C.
- Evaluar diferentes tipos de crioprotectores y establecer la concentración adecuada.
- Determinar las temperaturas óptimas y los tiempos adecuados para el congelamiento y descongelamiento del esperma.
- Evaluar los beneficios y las desventajas de los distintos tipos de envases para criopreservación (crioviales, pajuelas).
- Criopreservar esperma a partir de macerados de testículos de pejerrey.

3. Materiales y métodos

3.1) Material de estudio:

Para la realización de este trabajo se utilizaron pejerreyes bonaerenses de entre 3 y 4 años de edad nacidos y criados en forma intensiva en las instalaciones de acuicultura del IIB-INTECH. Estos animales se obtuvieron a partir de ovas embrionadas transportadas desde la Estación Experimental de Piscicultura de Kanagawa (Japón).

En una etapa previa a los experimentos, fueron seleccionados 120 peces del plantel de reproductores mantenidos en tanques externos de 25.000lts del IIB-INTECH. Se escogieron animales homogéneos en tamaño (Longitud total: 30cm, Peso: 300g aprox.) que fueron distribuidos en 4 tanques internos de 3.000lts. ubicados en el bioterio experimental del Instituto (**Fig. 11**).



a) Tanques externos de 25.000 lts



b) Selección de reproductores



b) Selección de reproductores



d) Tanques internos de 3000 lts.

Se distribuyeron 15 machos y 15 hembras por tanque debido a que se ha observado que es necesario mantener peces de ambos sexos para que estos conserven su actividad reproductiva (Miranda, *Com. Pers.*). Los peces fueron aclimatados durante 30 días a las nuevas condiciones de cautiverio. La higiene y la calidad del agua de cultivo se mantuvieron mediante un sistema de circulación abierta y una limpieza semanal del fondo de los tanques. Se utilizó agua proveniente de napa subterránea que mantuvo durante todo el año una salinidad y una temperatura promedio de 1,5‰ y 18°C, respectivamente. En todos los casos, los peces fueron alimentados a saciedad, tres veces por día, con alimento balanceado y pelletizado para pejerrey y se mantuvo un fotoperíodo natural. Los experimentos se llevaron a cabo desde el mes de abril del año 2006, hasta el mes de mayo del año 2007. Cabe destacar que no fue posible obtener esperma por masaje abdominal en los meses de abril y mayo.

3.2) Metodología de trabajo:

Luego del período de aclimatación se prosiguió con el desarrollo experimental. Para la obtención y el procesamiento de las muestras de esperma se utilizó la metodología descrita por Miranda *et al.* (2001; 2005) y se prosiguió de la siguiente manera:

- a. Mediante el control de la emisión de esperma se seleccionaron los machos de cada tanque. Se evitó el muestreo de los mismos ejemplares a intervalos menores de 15 días (tiempo necesario para que emitan nuevamente suficiente esperma, **Fig. 12**).



Figura 12. Selección de machos de pejerrey

- b. Cada uno de los peces fue anestesiado en un baño de benzocaína (100ppm) (**Fig. 13**).



Figura 13. Recipiente amarillo: Peces a anestesiarse.
Recipiente rojo: Pez en anestesia;
Recipiente gris: Peces en recuperación.

c. Una vez anestesiado el pez fue colocado en una bandeja plástica sobre un trapo húmedo. La zona genital fue secada cuidadosamente con papel absorbente para evitar el contacto con el agua, la orina y las heces que son activadores de la motilidad espermática (Fig. 14).



Figura 14. Secado previo a la extracción de esperma.

d. El esperma se obtuvo presionando suavemente la región abdominal y se colectó con puntas para micropipeta ("tip") acopladas a una jeringa de 1ml. El uso de las jeringas con *tips* para recolectar el semen permitió con relativa facilidad descartar muestras de esperma contaminadas con orina, agua o heces (Fig. 15).



Figura 15. Extracción de esperma de pejerrey

e. Cada uno de los *tips* con esperma fue colocado dentro de un microtubo para centrifuga de 1,5ml para evitar que la humedad ambiental entre en contacto con la muestra (Fig. 16).



Figura 16. Tip con esperma de pejerrey.

- f. Los tubos fueron dispuestos en una gradilla sobre hielo granizado para preservar la integridad del espermatozoide hasta su utilización (Fig. 17).

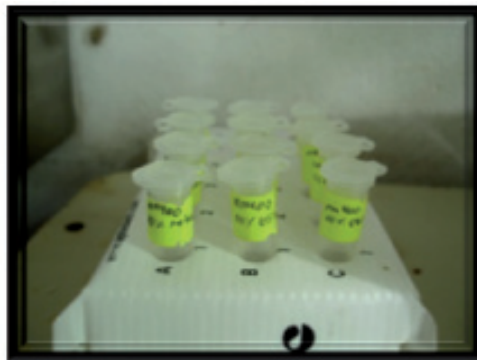


Figura 17. Microtubos con espermatozoide.

3.3) Análisis de calidad del espermatozoide de pejerrey:

Se analizó la calidad del espermatozoide obtenido, activándolo y observando el índice de motilidad siguiendo la tabla para pejerrey bonaerense confeccionada por Strüssmann *et al.* (1994):

Índice	Características
5	La mayor parte de los espermatozoides exhibe movimiento rápido; siendo imposible seguirle la trayectoria a ninguno.
4	La mayor parte de los espermatozoides exhibe movimiento rápido, el resto exhibe movimiento lento.
3	En números equivalentes podemos encontrar 3 clases de espermatozoides: aquellos que se mueven rápido, aquellos que vibran o se mueven lento y los que permanecen inmóviles.
2	La mayor parte de los espermatozoides vibra o está inmóvil, mientras el resto se propulsa lentamente.
1	La mayor parte de los espermatozoides se encuentra inmóvil, pero algunos presentan vibraciones laterales.
0	Todos los espermatozoides se encuentran inmóviles.

Tabla 2. Índice numérico para la evaluación de la motilidad espermática en el pejerrey bonaerense.

- Cabe mencionar que los espermatozoides que presentan un índice de motilidad entre 3 y 5 poseen capacidad fecundante (Miranda, *Com. Pers.*).
- La observación del índice de motilidad se realizó bajo microscopio óptico a 100x, utilizando la siguiente metodología (Fig.18):



Figura 18. Observación de 3µl espermatozoide de pejerrey bajo el microscopio.

- De cada pez se tomó una alícuota de 3 μ l de esperma y se determinó su índice de motilidad preactivación.
- A cada alícuota se le adicionó 9 μ l de agua de la canilla (40 mOsm/Kg) y se le determinó su índice de motilidad postactivación.
- Para el desarrollo de este trabajo sólo se utilizaron las muestras que presentaron un índice de motilidad de 0 ó 1 preactivación y un valor de 4 ó 5 postactivación.

Una vez obtenidas las muestras de buena calidad y debido al escaso volumen de esperma que emite cada pejerrey las muestras obtenidas de entre tres a cinco peces se juntaron en un microtubo para realizar las determinaciones posteriores.

3.4) Evaluación y desarrollo de diluyentes:

Después de haber adquirido la experiencia necesaria para la obtención de esperma, se prosiguió con el desarrollo y la evaluación de diluyentes apropiados para su congelamiento. Strüssmann *et al.* (1994) sugirió que un buen diluyente para el esperma de esta especie debería ser isosmótico o levemente hiperosmótico respecto al líquido seminal (331 mOsm/Kg), evitar el ion K⁺ en su composición y que el valor de pH se mantenga entre 7 y 8. En este mismo trabajo se recomendó la solución de Mounib modificada (donde se reemplaza el KHCO₃ por el NaHCO₃) como un diluyente adecuado para la criopreservación de esperma de pejerrey.

Como paso previo al desarrollo de los diluyentes que se utilizaron para este trabajo se analizaron las características y la composición iónica del líquido seminal de los pejerreyes experimentales. Se obtuvo semen de 3 ejemplares (como fue descrito en el punto 2) y se colocó en un microtubo, se centrifugó (200g por 2min. y luego a 2500g por 10min.), se tomó el sobrenadante (líquido seminal) y se lo guardó en el freezer hasta su utilización. Luego se midió la presión osmótica, el pH, la concentración y la composición iónica del líquido seminal (**Tabla 3**). Para estas determinaciones se utilizó un osmómetro de vapor (Wescor, Vapro® 5520), se midió el pH con cintas de papel tornasol (Universalindikator MERCK, pH 0-14) y se analizó el líquido seminal por espectrofotómetro de llama.

Solución	pH	Osmolaridad	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺
Líquido Seminal	8.0	350 mOsm/Kg	0,2 mM/ml	0,49 mM/ml	24,7 mM/ml	4,82 mM/ml

Tabla 3. Análisis del líquido seminal de pejerreyes del IIB-INTECH

En base a estos resultados se decidió desarrollar diluyentes con una presión osmótica entre 400 y 600 mOsm/kg, un valor de pH entre 7 y 8 y el catión Na⁺ como componente predominante. Por otra parte, también se probaron diluyentes de uso común en peces teleósteos, humanos y ovinos, realizando en cada caso ajustes especie-específicos. En la **tabla 4** se detallan el tipo, la composición, pH y presión osmótica (mOsm/kg) de los diluyentes utilizados.

3.6) Pruebas de refrigeración de esperma de pejerrey:

Se evaluó la capacidad de los diluyentes (Mm400, Na-Sac450, Na-Tre450, Na500) para mantener viable el esperma de pejerrey refrigerado a 8°C. Se obtuvo esperma según la metodología descrita en el punto 3.2), se lo colocó dentro de un microtubo con el diluyente correspondiente en una dilución 1:50 (Volumen final: 150µl) y se lo mantuvo en la heladera (Fig. 12). Cada 2hs se tomó una alícuota de las muestras, se las activó con agua de la canilla y de la misma forma, se prosiguió hasta que ya no pudo activarse la muestra. Como muestra control se utilizó esperma puro.



Figura 19. Criovales con esperma de pejerrey refrigerados a 8° C

3.7) Evaluación y selección de crioprotectores para congelar esperma de pejerrey:

Se evaluaron diferentes crioprotectores al 5, 10 y 15% v/v (Tabla 5) según lo publicado para otros peces teleósteos (Medina-Robles *et al.*, 2005) y se utilizaron los diluyentes previamente seleccionados (Mm400, Na-Sac450, Na-Tre450, Na500).

PENETRANTES	NO-PENETRANTES
Di-metil-sulfóxido (DMSO)	Glicerol
Di-metil-formamida (DMF)	Leche en polvo
Etilenglicol	Yema de Huevo
Metanol	Suero fetal bovino (FBS)
...	Albúmina sérica bovina (BSA)

Tabla 5. Crioprotectores utilizados.

Los crioprotectores fueron combinados con los 4 diluyentes en las tres concentraciones designadas. Para obtener y evaluar las muestras (esperma+diluyente+crioprotector) se empleó la metodología descrita en el punto 3.4). Los crioprotectores que resultaron efectivos en las tres concentraciones fueron: DMSO, Etilenglicol, Metanol, Glicerol, FBS y BSA (Ver resultados).

3.8) Pruebas de congelamiento:

1) Congelamiento en crioviales:

En relación a los resultados obtenidos las pruebas de congelamiento se realizaron con 4 diluyentes (Mm400, Na-Sac450, Na-Tre450 y Na500) y seis crioprotectores (DMSO, Metanol, Etilenglicol, BSA, FBS y Glicerol). Luego de la obtención de esperma las muestras se colocaron en crioviales de 1ml, se diluyeron en una proporción 1:50 con el diluyente designado (Volumen final: 150µl) y se le agregó crioprotector al 10%v/v. En todos los casos se observó el índice de motilidad del esperma antes del congelamiento (metodología descrita en el punto 3.3).

En un principio se evaluaron las muestras (esperma+diluyente+crioprotector) utilizando el método de congelamiento en *freezer* a -80°C según lo descrito en Medaka por Aoki (1997). A continuación se detallan las metodologías utilizadas para el congelamiento de las mismas:

- a. **Congelamiento a -80°C en freezer**: las muestras fueron colocadas dentro de una caja de telgopor por dos horas dentro de un "freezer" de -80°C hasta su evaluación (**Fig.20**). A partir de los resultados obtenidos en este método, se seleccionaron las soluciones de esperma+diluyente+crioprotector en las que se observó un índice de activación postcongelamiento entre 4 y 5: Mm400, Na-Sac450, Na-Tre450 + DMSO, Metanol y Etilenglicol (Ver resultados).



Figura 20. Crioviales en freezer a -80°C

- b. **Congelamiento a -80°C en freezer y posterior congelamiento a $-198,6^{\circ}\text{C}$ en N_2 líquido**: Se siguió el mismo protocolo descrito en el punto anterior pero luego de haber estado en el freezer a -80° los crioviales se sumergieron en N_2 líquido por 2 horas hasta su evaluación (**Fig.21**).

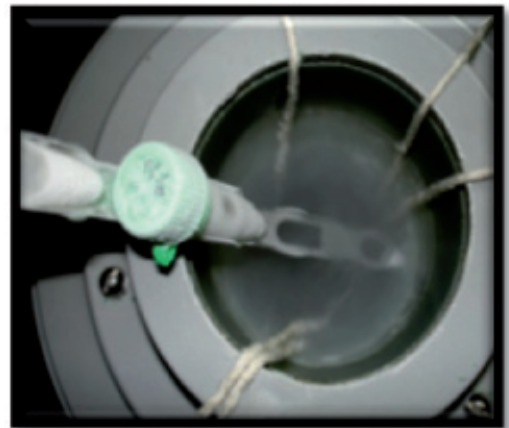


Figura 21. Crioviales sumergiéndose en N_2 líquido

- c. **Congelamiento en hielo seco a -79°C** : El congelamiento en hielo seco se realizó con el objetivo de ser empleado en lugares donde no hay disponibilidad de freezer a -80°C o N_2 líquido. Las muestras fueron congeladas en crioviales que se apoyaron directamente sobre la superficie del hielo seco (**Fig.22**) y se las mantuvo por dos horas hasta su evaluación.

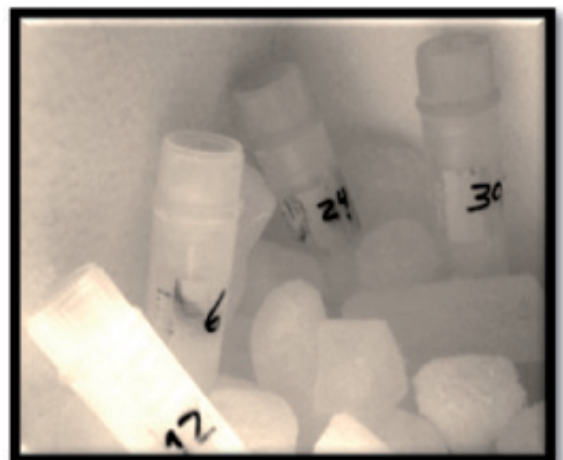


Figura 22. Crioviales apoyados en hielo seco

- d. **Congelamiento en hielo seco a -79°C y posterior congelamiento a -198,6°C en N₂ líquido:** Se siguió el mismo protocolo descrito en el punto anterior. pero luego de haber estado en hielo seco las muestras fueron sumergidas directamente en N₂ líquido por dos horas hasta su evaluación.
- e. **Congelamiento en Vapores de N₂ y posterior congelamiento a -198,6°C en N₂ líquido:** Se utilizaron dos tiempos de congelamiento (lento y rápido) las muestras se mantuvieron sobre la superficie del N₂ líquido a 3 y 6cm por 1,5 y 12 minutos, respectivamente según lo descrito para Atlantic Cod (*Gadus morhua*) por Rideout *et al.* (2004). Para llevar a cabo el congelamiento se fabricó una estructura de telgopor que mantuvo los crioviales en posición hasta ser sumergidos en el N₂ líquido. Al cabo de dos horas de inmersión se procedió a su evaluación (**Figs. 23 a y b**).

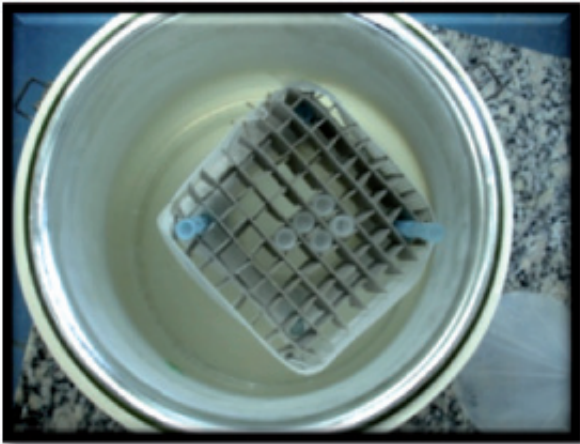


Figura 23a. Estructura de telgopor con gradilal acoplada, flotando dentro de un termo con N₂ líquido.

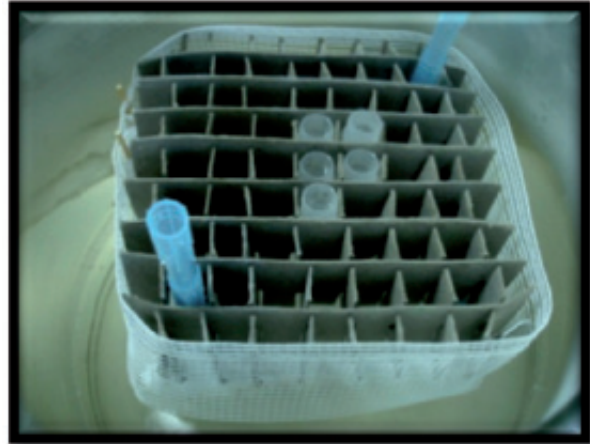


Figura 23b. Crioviales suspendidos a 6 cm de la superficie del N₂ líquido.

3.9) Pruebas de descongelamiento:

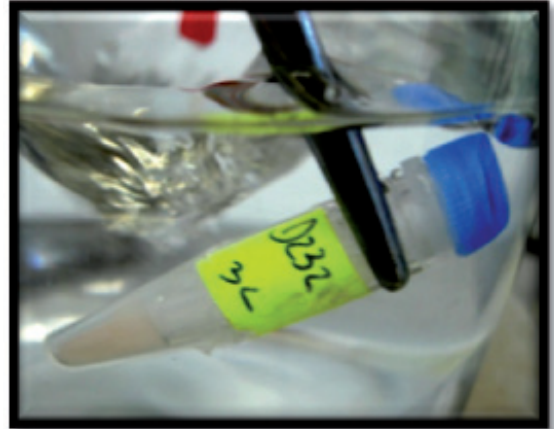
Se estableció la temperatura y el tiempo adecuado para el descongelamiento de esperma de pejerrey siguiendo valores publicados para peces teleósteos (Medina-Robles *et al.*, 2005). Los crioviales con las muestras fueron sumergidos en un baño térmico con agua a temperaturas que variaron entre 20-40°C (**Figs. 25 a y b**). Se registraron los tiempos de descongelamiento para cada temperatura (**Tabla 7**). En función de los resultados obtenidos se determinó que un tiempo de 50 segundos y una temperatura de 35°C serían apropiadas para descongelar las muestras de esperma de pejerrey.

Temperatura (°C)	Crioviales (1ml)
	Tiempo de descongelamiento (Segundos)
20	70
25	60
30	55
35	50
40	45

Tabla 7. Pruebas de descongelamiento en crioviales.



a) Criovial retirado del termo con N2 líquido tras 2 hs. de congelamiento.



b) Criovial descongelándose en baño término a 35° C

Figuras 25. Descongelamiento de crioviales.

3.10) Macerados de testículo:

Para el congelamiento y descongelamiento de las muestras se procedió de la manera descrita en el punto 3.8) utilizando los mismos diluyentes y crioprotectores seleccionados previamente. Para todas las evaluaciones se utilizaron tres concentraciones de crioprotector (5, 10 y 15%). En este caso el esperma se obtuvo a partir de macerados de testículos.

Los macerados se realizaron de la siguiente manera:

- Se seleccionaron machos por emisión de esperma del lote de reproductores.
- Los peces fueron anestesiados en benzocaína 100ppm durante 5 minutos, se los desmeduló y se retiró una porción rectangular del lateral del ejemplar y se procedió a la disección de los testículos (**Figs. 26 a y b**).



Figura 26a. Corte del lateral izquierdo de un macho de pejerrey.



Figura 26b. Testículos de pejerrey.

- c. Una vez retirados los testículos, se realizaron cortes de 1cm y cada uno se colocó en un mortero plástico con 4ml del diluyente correspondiente (Mm400, Na-Sac450 o Na-Tre450) y se maceraron con una pinza de disección (Figs. 27 a y b). Todos estos procedimientos se realizaron en hielo.

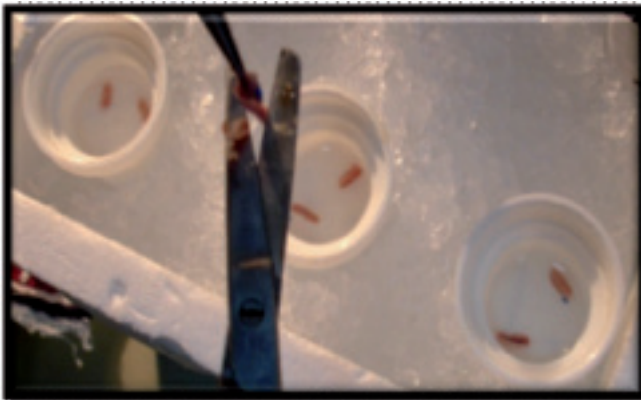


Figura 27a. Cortes de 1 cm de testículo de pejerrey.

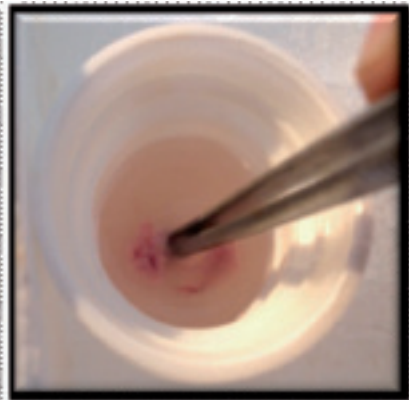


Figura 27b. Macerado de testículo con pinza de disección.

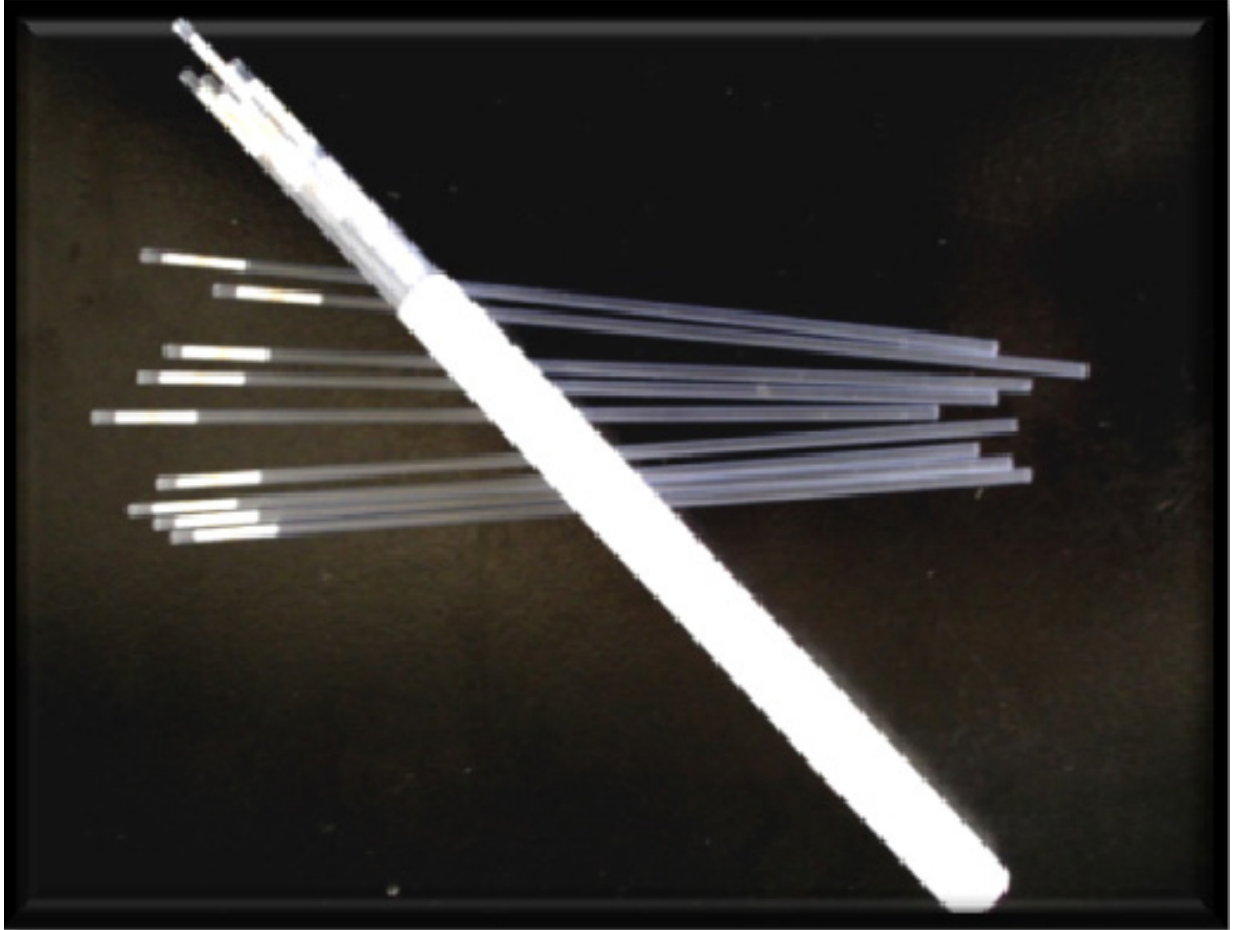
Las muestras fueron filtradas a través de una malla de *nylon* (Fig.28), se las colocó en tubos del tipo *falcon* de 25ml, se tomó una alícuota de cada una y se determinó el índice de motilidad del esperma previo al congelado. Luego se adicionaron los crioprotectores (DMSO, Metanol y Etilenglicol). Para todas las combinaciones de diluyentes, crioprotectores y una concentración de crioprotectores se utilizó el macerado de testículos proveniente de un pez. Por último, se procedió al envasado en crioviales de 1ml, congelado (según lo descrito en el punto 3.8), descongelado (según lo descrito en el punto 3.9) y se evaluó el índice de motilidad de las muestras (según lo descrito en punto 3.3).



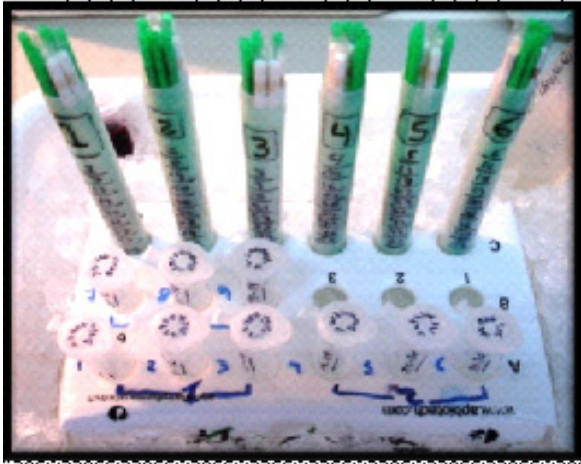
Figura 28. Macerado de testículo filtrado a través de una malla de nylon.

Congelamiento en pajuelas:

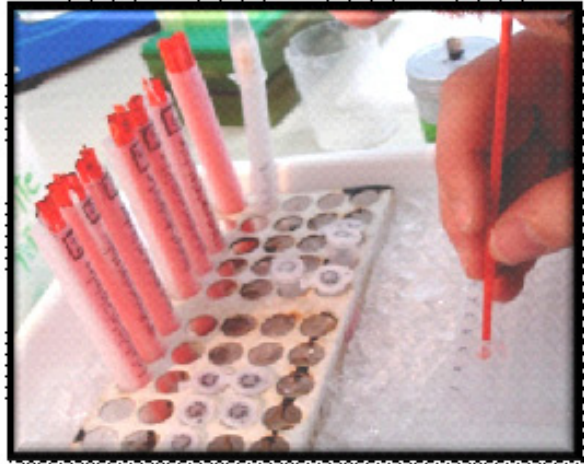
Se procedió de la misma manera descrita en los puntos anteriores. Las pajuelas (250 μ l) fueron llenadas con 150 μ l de la combinación macerado+diluyente+crioprotector por aspiración. Luego fueron selladas con la llama de un mechero y se las mantuvo en hielo hasta su congelamiento con los 6 métodos descritos en el punto 3.8 (Figs. 29 a-g).



a) Pajuelas de 250 μ l y portapajuelas.



b) Preparación de las muestras antes del llenado de las pajuelas.



c) Llenado de pajuelas por aspiración.



d) Sellado de pajuelas con la llama de un mechero.



e) Pajuela sellada



f) Estructura de telgopor con pajuelas en vapores de N₂ líquido.

Figuras 24 (a-g). Llenado, sellado y congelado de pajuelas con N₂ líquido.

Descongelamiento de pajuelas:

Se estableció la temperatura y el tiempo adecuado para el descongelamiento de pajuelas de 250 μ l siguiendo valores publicados para peces teleósteos (Medina-Robles *et al.*, 2005). Las pajuelas con las muestras fueron sumergidas en un baño térmico con agua a temperaturas que variaron entre 20-40°C. Se registraron los tiempos de descongelamiento para cada temperatura (**Tabla 8**). En función de los resultados obtenidos se determinó que un tiempo de 10 segundos y una temperatura de 35°C serían apropiadas para descongelar pajuelas con esperma de pejerrey. Foto

Pajuelas (0,25ml)	
Temperatura (°C)	Tiempo de descongelamiento (Segundos)
20	25
25	20
30	15
35	10
40	10

4. Resultados**4.1) Evaluación y desarrollo de diluyentes:**

Se evaluaron los diluyentes mencionados en la **Tabla 4** (entre 400-600mOsm/Kg). Las soluciones esperma+diluyente que presentaron un índice de motilidad postactivación= 5 fueron: **Mm400**, **Na500**, **Na-Sac450** y **Na-Tre450** (**Figs. 29-32**). El resto no demostró ser eficaz como diluyente para esperma de pejerrey bonaerense mostrando índices de motilidad postactivación entre 1 y 3 (resultados no presentados).

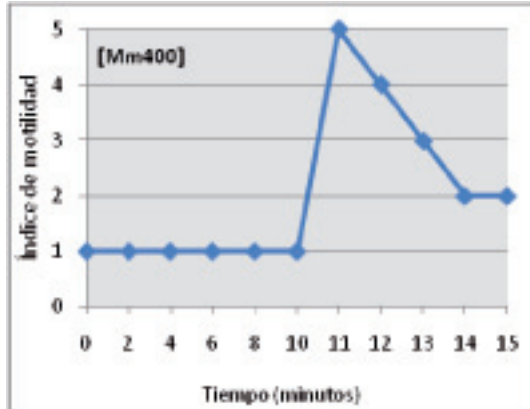


Figura 29. Esperma diluido en el diluyente Mounib modificado 400 mOsm/Kg. Al minuto 0 se realizó la dilución (1:50) y al minuto 10 se lo activó con agua de la canilla.

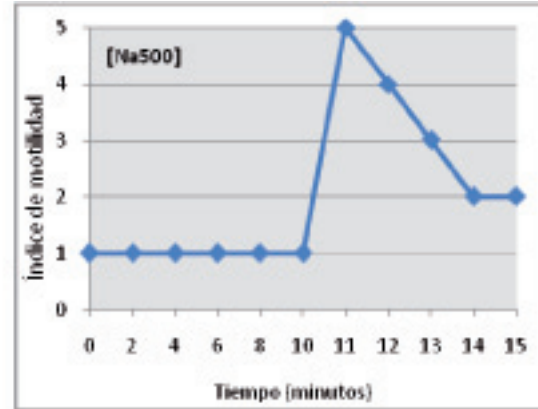


Figura 30. Esperma diluido en el diluyente NaHCO₃ 500mOsm/Kg. Al minuto 0 se realizó la dilución (1:50) y al minuto 10 se lo activó con agua de la canilla.

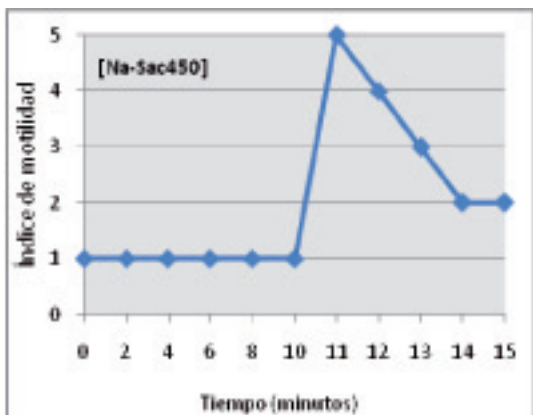


Figura 31. Esperma diluido en el diluyente NaHCO_3 y *sacarosa* 450 mOsm/Kg. Al minuto 0 se realizó la dilución (1:50) y al minuto 10 se lo activó con agua de la canilla.

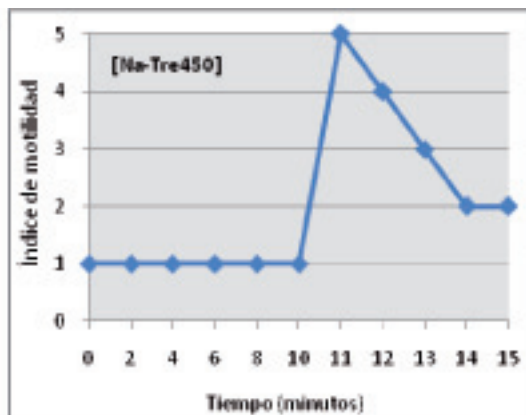


Figura 32. Esperma diluido en el diluyente NaHCO_3 y *Trehalosa* 450mOsm/Kg. Al minuto 0 se realizó la dilución (1:50) y al minuto 10 se lo activó con agua de la canilla.

4.2) Pruebas de refrigeración de esperma de pejerrey:

Se realizaron las pruebas de refrigeración de esperma de pejerrey a 8°C en heladera con los diluyentes seleccionados en el punto 4.1). Para el caso del diluyente Mm400 el esperma pudo activarse hasta después de 8hs de refrigerado donde se observó un índice de motilidad postactivación=3 (con capacidad fecundante) después de las 12hs se observó un índice de motilidad postactivación=2 (sin capacidad fecundante) (Fig. 33).

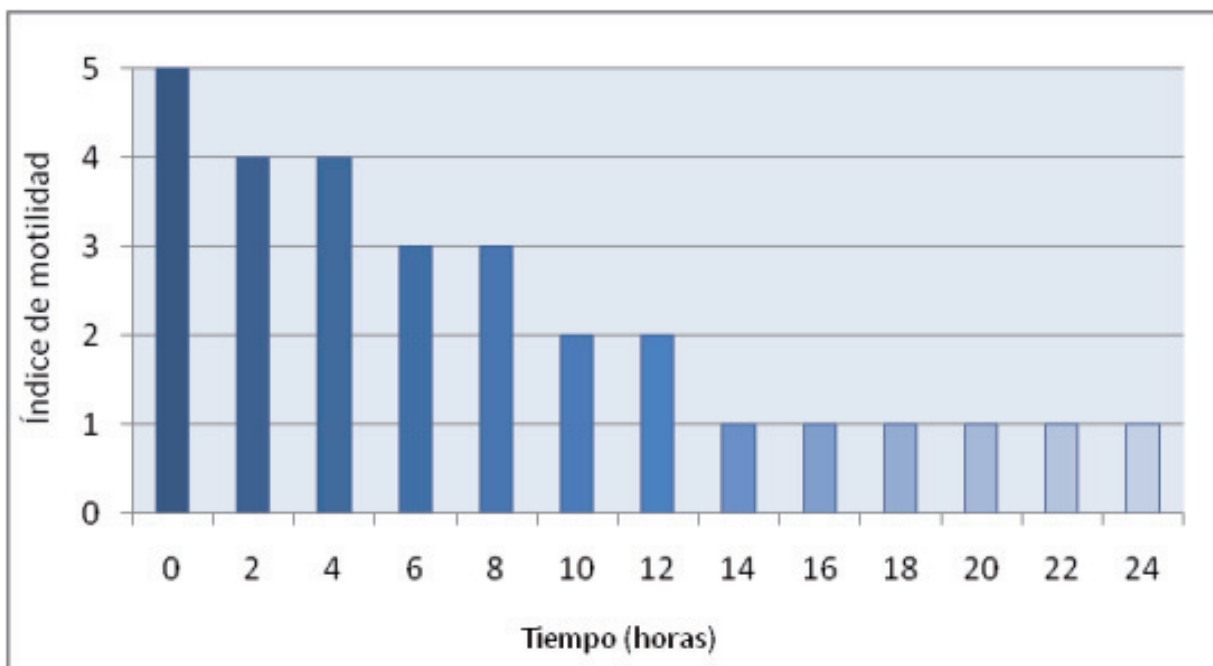


Figura 33. Refrigeración de esperma de pejerrey a 8°C utilizando el diluyente Mm400. Cada 2 hs. se evaluó el índice de motilidad postactivación hasta un total de 24 hs.

Para el caso de los diluyentes Na-Tre450 y Na-Sac450 el esperma pudo activarse hasta después de 2hs de refrigerado observándose un índice de motilidad postactivación=3, después de las 4hs se observó un índice de motilidad postactivación=2 (Figs. 34 y 35).

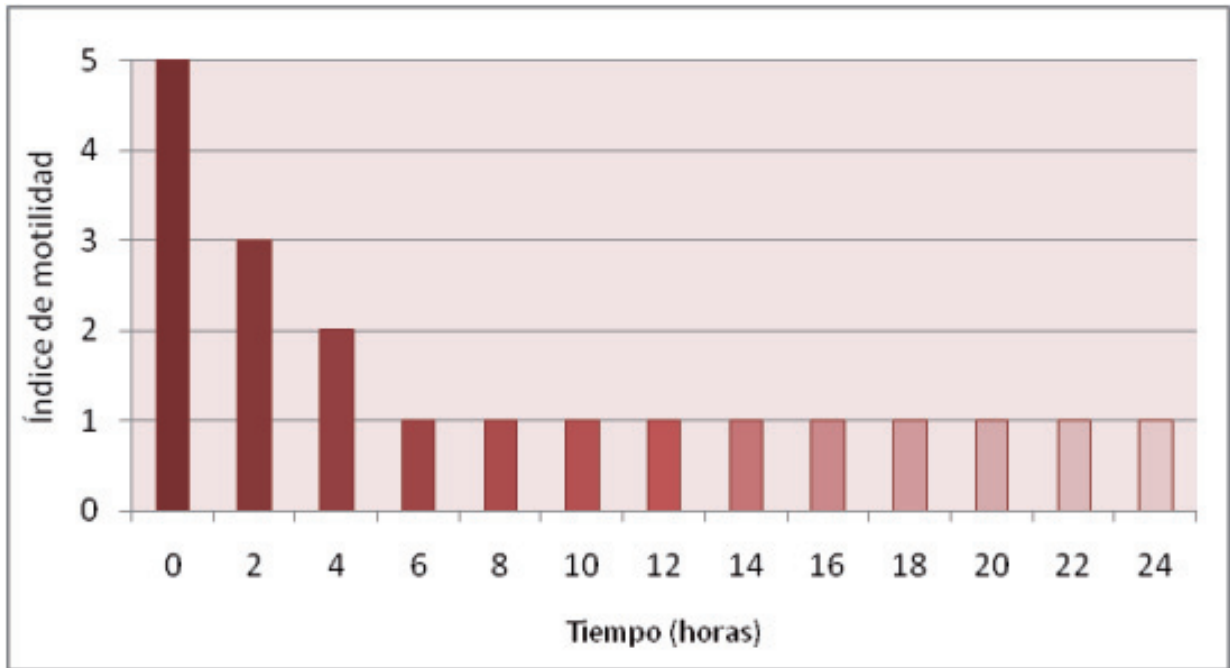


Figura 34. Refrigeración de esperma de pejerrey a 8°C utilizando el diluyente Na-Tre450. Cada 2 hs. se evaluó el índice de motilidad postactivación hasta un total de 24 hs.

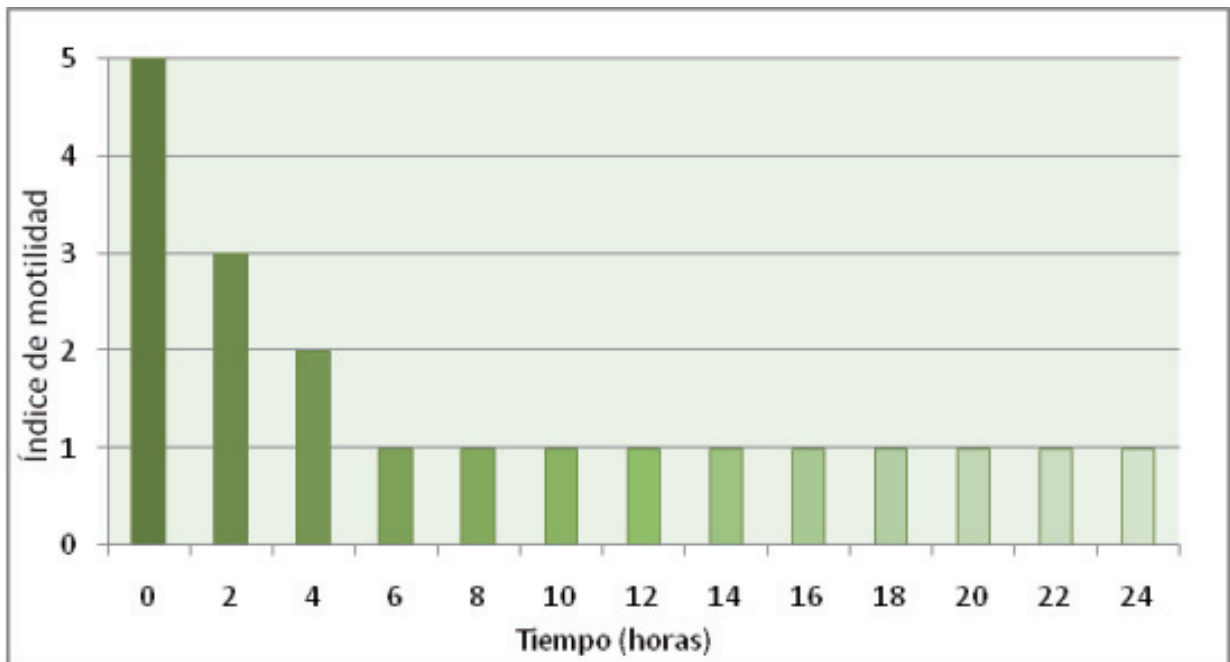


Figura 35. Refrigeración de esperma de pejerrey a 8°C utilizando el diluyente Na-Sac450. Cada 2 hs. se evaluó el índice de motilidad postactivación hasta un total de 24 hs.

Para el caso del diluyente Na500 el esperma pudo activarse hasta después de 2hs de refrigerado observándose un índice de motilidad postactivación=2 (**Fig. 36**).

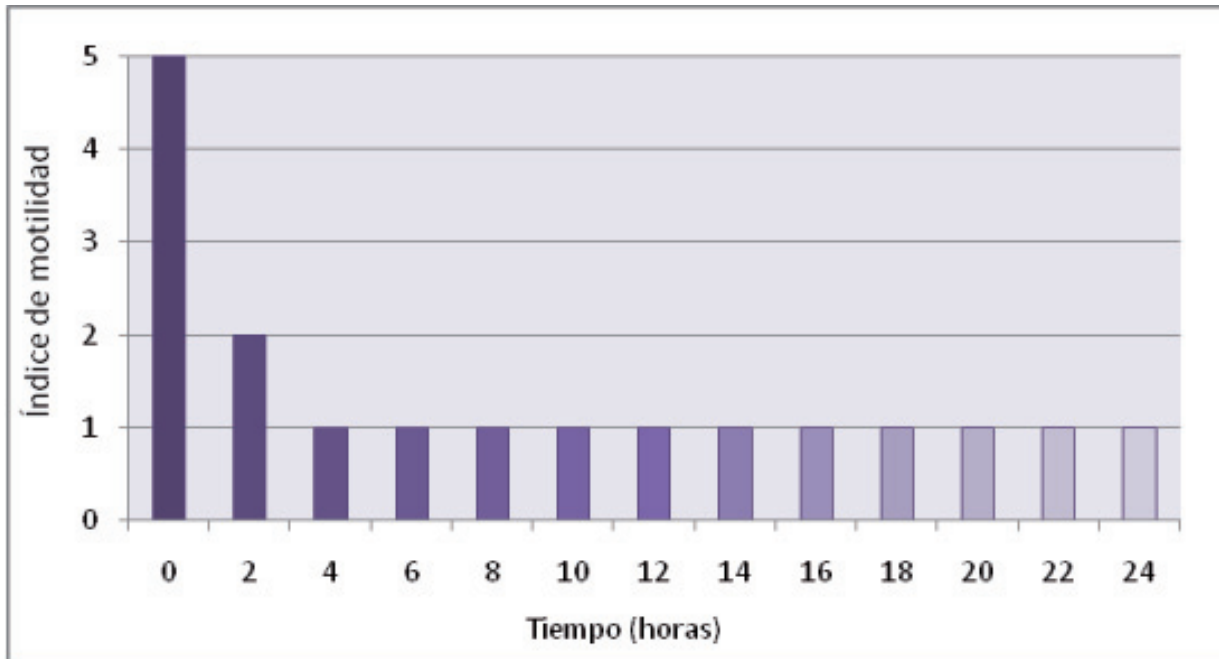


Figura 36. Refrigeración de espermatozoides de pejerrey a 8°C utilizando el diluyente Na500. Cada 2 hs. se evaluó el índice de motilidad postactivación hasta un total de 24 hs.

Como control se refrigeró espermatozoides sin diluir y se procedió de la misma manera que para los diluyentes anteriores. Después de 8hs de refrigeración se observó un índice de motilidad postactivación= 5, después de 10hs fue de 4, a las 14hs fue de 3 y a las 20hs fue de 2 (**Fig. 37**).

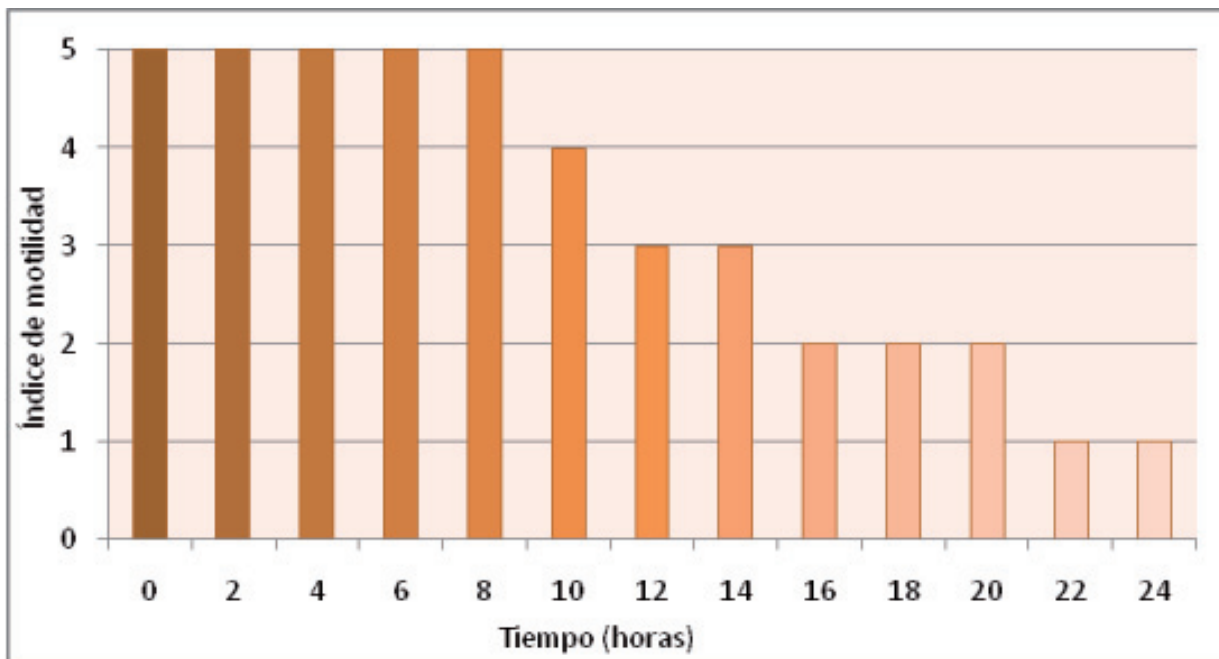


Figura 37. Refrigeración de espermatozoides de pejerrey sin diluir a 8°C. Cada 2 hs. se evaluó el índice de motilidad postactivación hasta un total de 24 hs.

4.3) Evaluación y selección de crioprotectores para congelar espermatozoides de pejerrey:

Se evaluaron los diluyentes que fueron seleccionados en el punto 4.1 (Mm400, Na500, Na-Sac450, Na-Tre450) combinados con los crioprotectores que se detallaron en la **Tabla 6** al 5, 10 y 15% v/v. El espermatozoides se activó a los 10 minutos de haber sido diluido y se pudo observar un índice de motilidad postactivación= 5 con los diluyentes que tenían los siguientes crioprotectores: **DMSO, Metanol, Etilenglicol, Glicerol, FBS y BSA**. En cambio, en las combinaciones con **DMF, Yema de huevo y Leche en polvo** no se pudo activar el espermatozoides. No hubo diferencias entre las 3 concentraciones de crioprotector por lo

que a modo de ejemplo solo se ilustran los resultados obtenidos con el esperma+Mm400+crioprotector al 10% (**Fig. 38**).

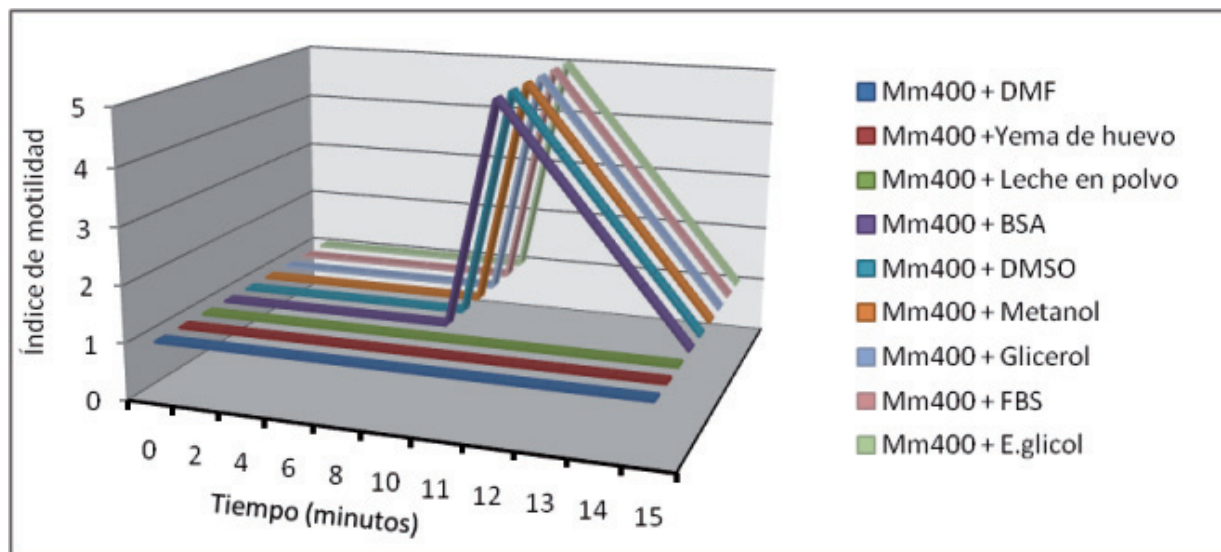


Figura 38. Esperma diluido con el diluyente Mm400 + crioprotectores al 10% v/v. Al minuto 0 se realizó la dilución (1:50) y a minuto 10 se activó con agua de la canilla.

4.4) Pruebas de congelamiento:

De acuerdo a los resultados obtenidos en el punto 4.3), se decidió utilizar para las pruebas de congelamiento sólo las soluciones que presentaron un índice de motilidad postactivación=5. Para todas las pruebas se utilizó crioprotector en una concentración del 10%.

Congelamiento en criviales:

Congelamiento a -80°C en freezer (Fig. 39): Luego de 2hs a -80°C las muestras fueron descongeladas y se observó que:

- El esperma diluido en **Mm400, Na-Tre450** o en **Na-Sac450** con: **DMSO** o **Etilenglicol** presentaron un índice de motilidad postactivación entre **3** y **4**. En el caso del diluyente **Na-Tre + Etilenglicol** se observó un índice de **2**.
- El esperma diluido en **Mm400, Na-Tre450** o en **Na-Sac450** con **Metanol** presentaron un índice de motilidad postactivación= **2**.
- Los diluyentes que fueron combinados con: **BSA, FBS, DMF** y **Glicerol** no permitieron activar el esperma. Este mismo resultado se observó con el esperma diluido en **Na500** con todos los crioprotectores.

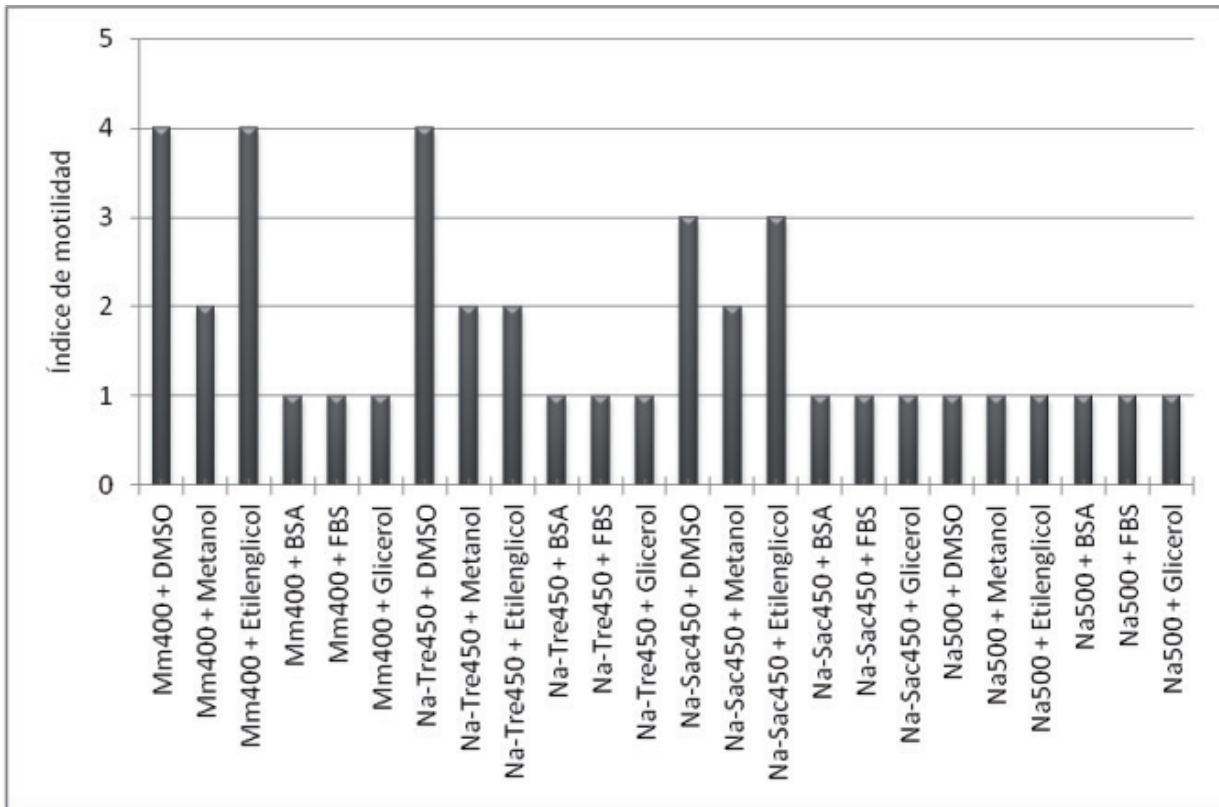


Figura 39. Activación de las muestras (esperma+diluyente+crioprotector 10%) después de haber sido congeladas a -80°C.

En relación a los resultados obtenidos en **a**, los diluyentes Mm400, Na-Tre450 y Na-Sac450 combinados con DMSO, Metanol o Etilenglicol fueron seleccionados para realizar los métodos de congelamiento siguientes.

b. Congelamiento a -80°C y posterior congelamiento a $-198,6^{\circ}\text{C}$ en N_2 líquido (Fig. 40): Después de permanecer 2hs a -80°C y luego de haber estado sumergidas 2hs en N_2 líquido. Las muestras fueron descongeladas, activadas y se observó que:

- Las muestras de esperma diluidas en **Mm400+DMSO**, **Mm400+Etilenglicol** o en **Na-Tre450+DMSO** presentaron un índice de motilidad postactivación=4.
- Las muestras de esperma diluidas en **Mm400+Metanol**, **Na-Tre450+Metanol**, **Na-Sac450+DMSO** o en **Na-Sac450+E.glicol** presentaron un índice de motilidad postactivación=3.
- Las muestras de esperma diluidas en **Na-Tre450+E.glicol** o en **Na-Sac450+Metanol** presentaron un índice de motilidad postactivación=2.

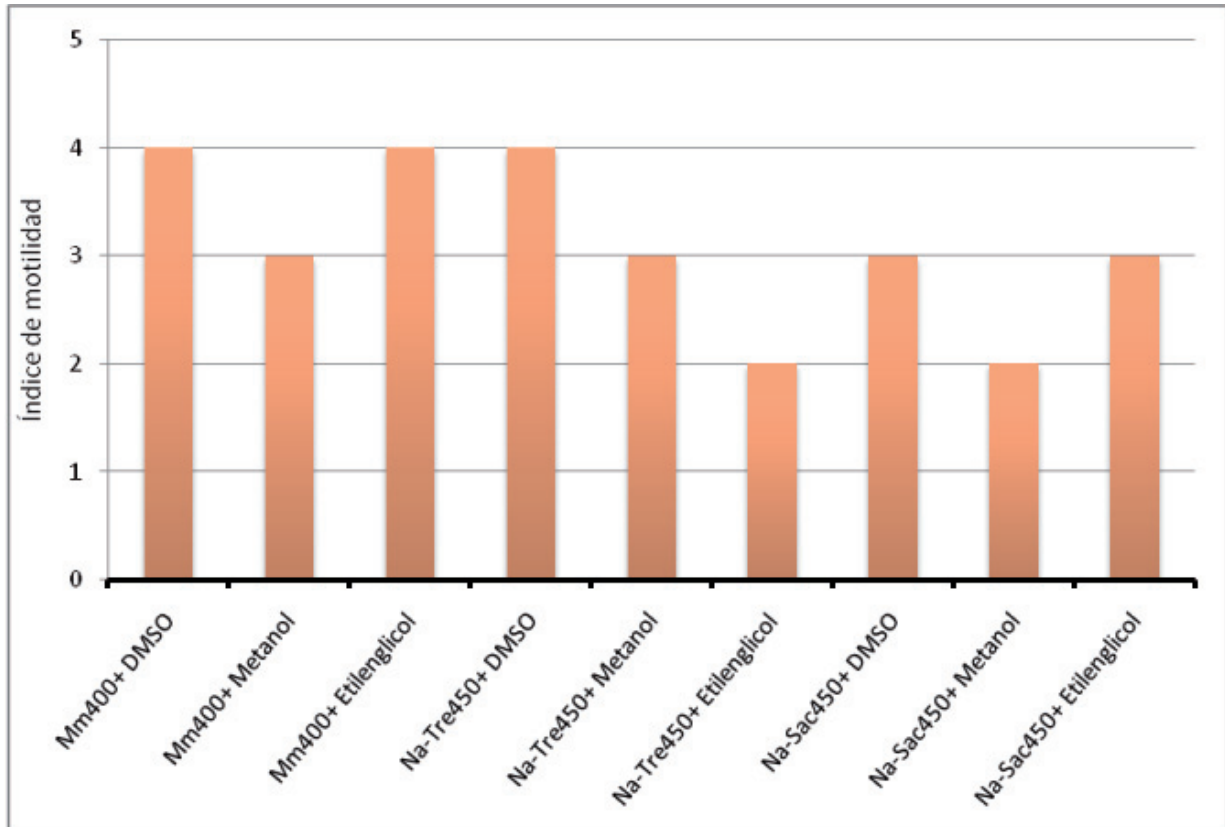


Figura 40. Activación de las muestras (esperma + diluyente + crioprotector) después de haber sido congeladas a -80°C y luego sumergidas en N_2 líquido.

c. Congelamiento en hielo seco a -79°C (Fig. 41): Los crioviales fueron descongelados tras haber estado 2hs en contacto con hielo seco. Los resultados obtenidos muestran que:

- Las muestras de espermatozoides diluidas en **Mm400+DMSO**, **Na-Tre450+DMSO** o en **Na-Sac450+DMSO** presentaron un índice de motilidad postactivación=4.
- Las muestras de espermatozoides diluidas en **Mm400+E.glicol**, **Na-Tre450+E.glicol**, **Na-Sac450+Metanol** o en **Na-Sac450+E.glicol** presentaron un índice de motilidad postactivación=3.
- Las muestras de espermatozoides diluidas en **Mm400+Metanol** o **Na-Tre450+Metanol** presentaron un índice de motilidad postactivación=2.

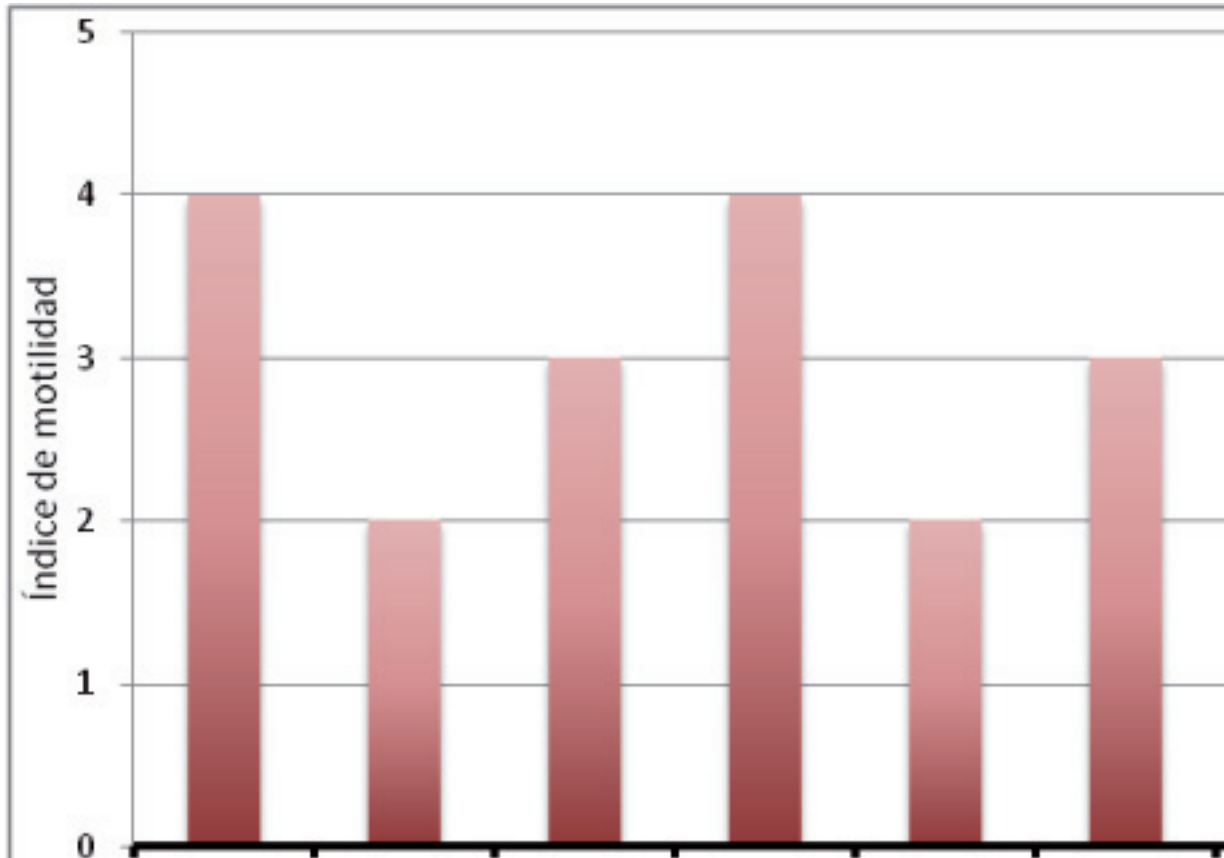


Figura 41. Activación de las muestras (esperma+diluyente+crioprotector) después de haber sido congeladas a -79°C en hielo seco.

- d. **Congelamiento en hielo seco y posterior congelamiento a $-198,6^{\circ}\text{C}$ en N_2 líquido (Fig. 42):** Los crioviales fueron descongelados tras haber estado 2hs en contacto con hielo seco y 2hs sumergidos en N_2 líquido. Luego de que las muestras fueron descongeladas se observó que:
- Las muestras de espermatozoides diluidas en **Mm400+E.glicol**, **Na-Tre450+DMSO**, **Na-Sac450+DMSO** o en **Na-Sac450+E.glicol** presentaron un índice de motilidad post-activación=4.
 - Las muestras de espermatozoides diluidas en **Mm400+DMSO** presentaron un índice de motilidad post-activación=3.
 - Las muestras de espermatozoides diluidas en **Mm400+Metanol**, **Na-Tre450+Metanol**, **Na-Tre450+E.glicol** o en **Na-Sac450+Metanol** presentaron un índice de motilidad post-activación=2.

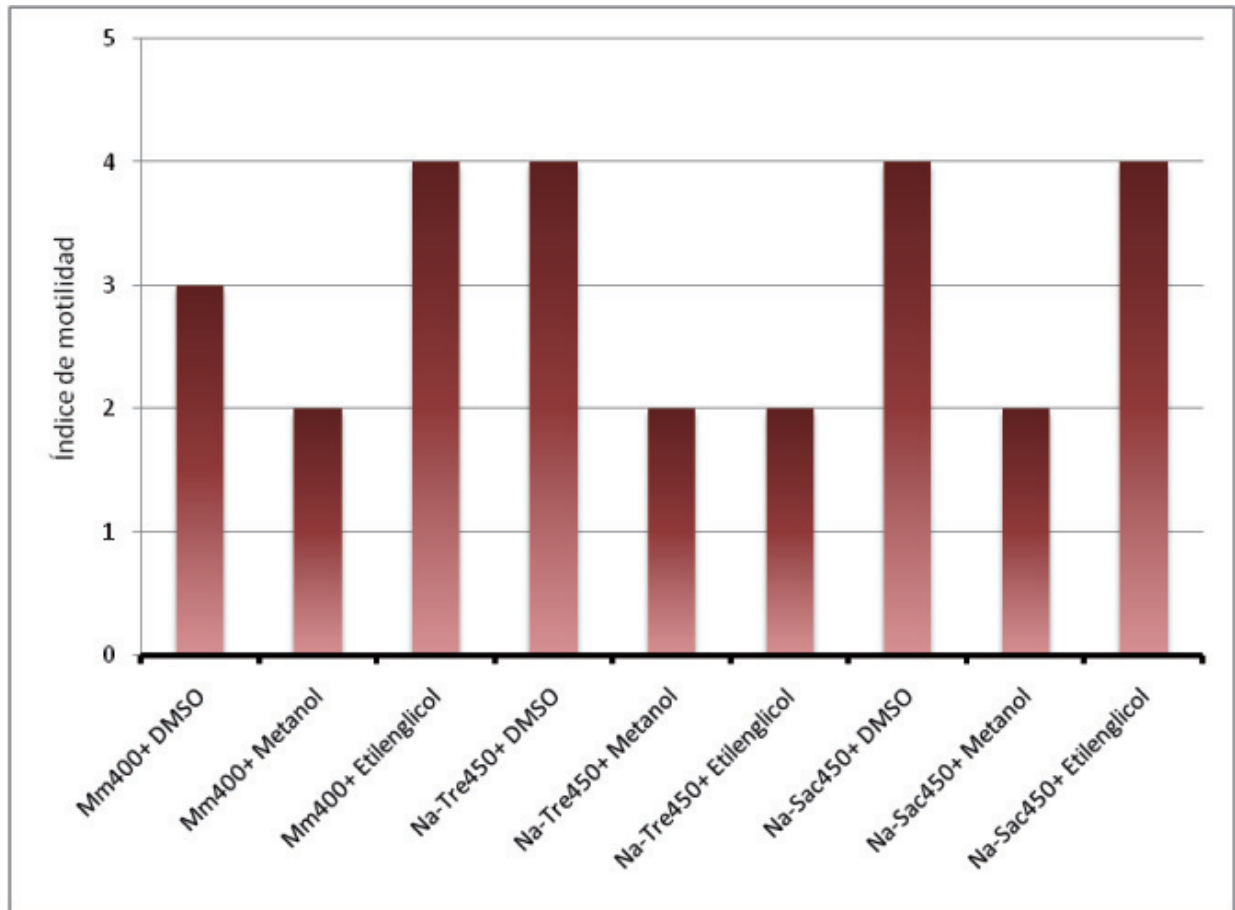


Figura 42. Activación de las muestras (espermatozoides+diluyente+crioprotector) después de haber sido congeladas a -79°C en hielo seco y posterior inmersión en N_2 líquido.

- e. **Congelamiento rápido en Vapores de N₂ líquido y posterior congelamiento a -198,6°C en N₂ líquido (Fig. 43):** Los crioviales fueron descongelados tras haber estado 1,5 minutos a 3cm de la superficie del N₂ líquido y 2hs sumergidos en N₂ líquido. Se observó que:
- Las muestras de esperma diluidas en **Mm400+DMSO, Na-Tre450+DMSO, Na-Tre450+E.glicol, Na-Sac450+E.glicol** presentaron un índice de motilidad post-activación=3.
 - Las muestras de esperma diluidas en **Mm400+Metanol, Mm400+E.glicol, Na-Tre450+Metanol o en Na-Sac450+Metanol** presentaron un índice de motilidad post-activación=2.

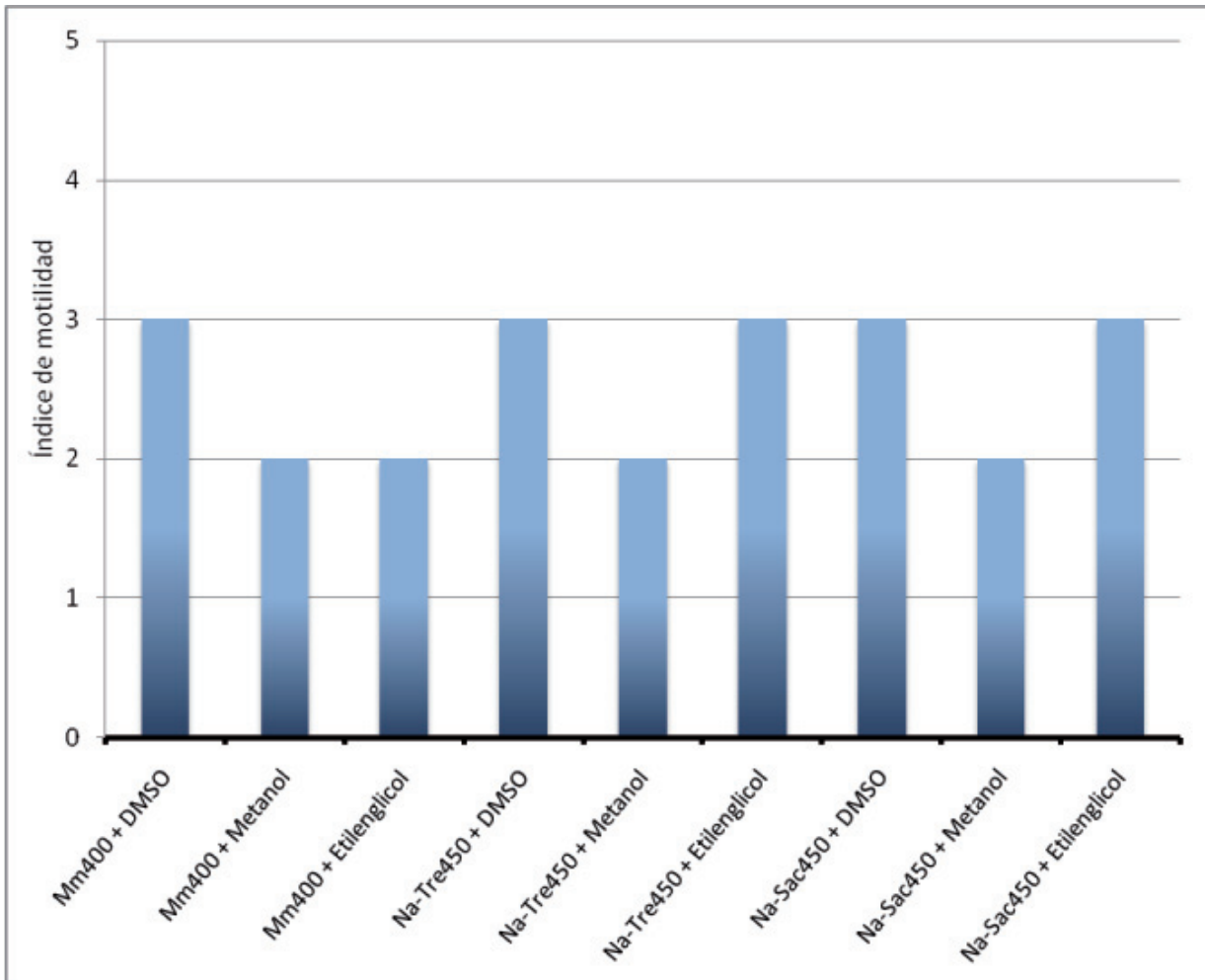


Figura 43. Activación de las muestras (esperma+diluyente+crioprotector) después de haber sido congeladas a 3 cm de la superficie del N₂ líquido y 2 hs. en N₂ líquido.

- f. **Congelamiento lento en Vapores de N₂ líquido y posterior congelamiento a -198,6°C en N₂ líquido (Fig. 44):** Los crioviales fueron descongelados tras haber estado 12 minutos a 6cm de la superficie del N₂ líquido y 2hs sumergidos en N₂ líquido.

Se observó que:

- Las muestras de espermia diluidas en **Mm400+DMSO**, **Mm400+E.glicol**, **Na-Sac450+DMSO** o en **Na-Sac450+E.glicol** presentaron un índice de motilidad post-activación=4.
- Las muestras de espermia diluidas en **Na-Tre450+DMSO** o en **Na-Tre+E.glicol** presentaron un índice de motilidad postactivación=3
- Las muestras de espermia diluidas en **Mm400+Metanol**, **Na-Tre450+Metanol** o en **Na-Sac450+Metanol** presentaron un índice de motilidad post-activación=2.

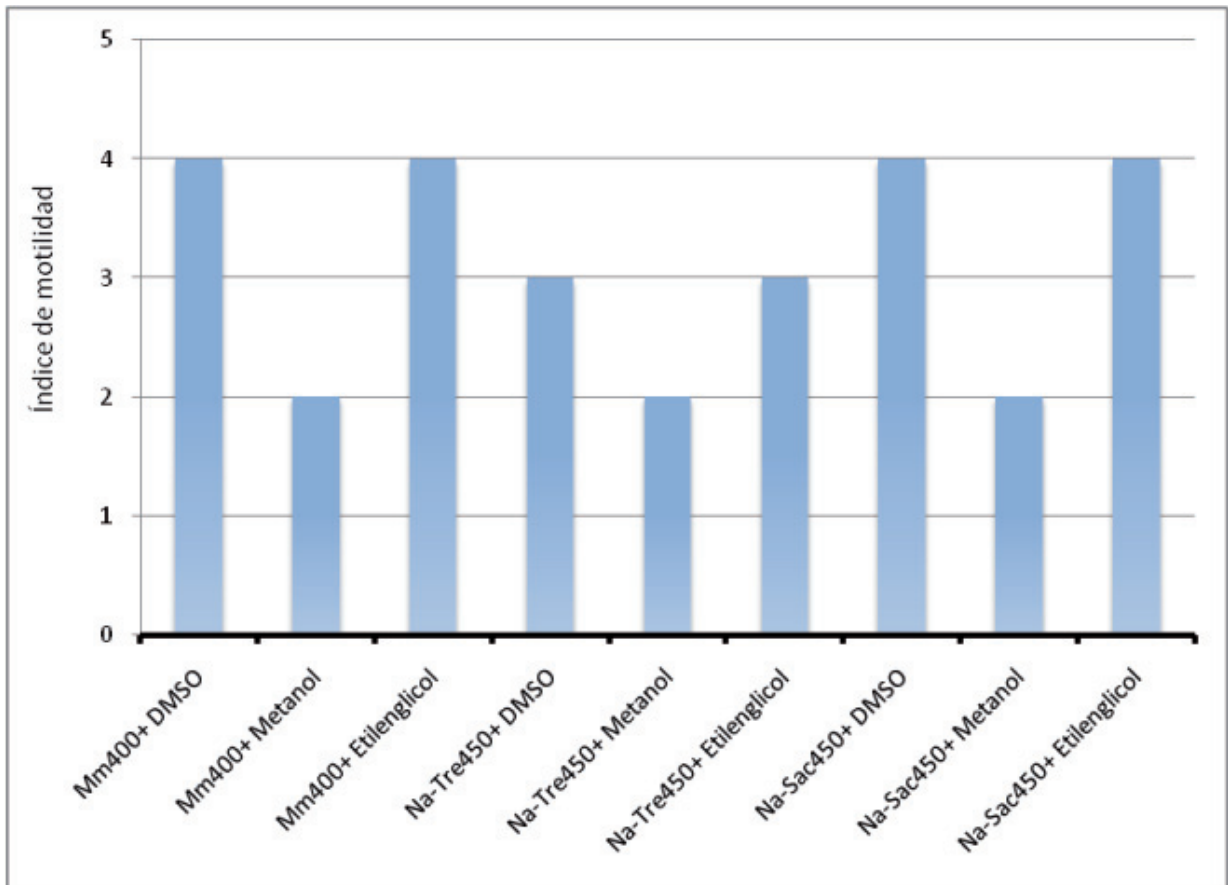


Figura 44. Activación de las muestras (esperma+diluyente+crioprotector) después de haber sido congeladas a 6 cm de la superficie del N₂ líquido y 2 hs en N₂ líquido.

4.5) Macerados de testículo:

En relación a los resultados obtenidos con espermia fresco (Ver punto 4.4.1.a), para las muestras obtenidas a partir de macerados de testículos se utilizaron los siguientes diluyentes: **mM400**, **Na-Tre450** y **Na-Sac450** combinados con **DMSO**, **Metanol** o **Etilenglicol** en tres concentraciones al **5**, al **10** y al **15%**. Se observó el índice de motilidad postactivación de las soluciones de macerado+diluyente previo al congelado y en todos los casos se obtuvo un índice de **3**. Se evaluaron todos los métodos de congelamiento utilizando dos tipos de envases: crioviales y pajuelas.

1) Congelamiento en crioviales:

a) Utilizando los crioprotectores al 5% se observó que para todos los métodos de congelamiento fue posible activar muestras (obteniéndose índices de motilidad= 3). A continuación se detallan cuales fueron estas soluciones (**Fig. 45**):

- Para el método a **-80°C**: NaTre450 + DMSO, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO.
- Para el método **-80°C + N₂ líquido**: Mm400 + DMSO y Na-Sac450 + Metanol.
- Para el método **hielo seco**: Mm400 + Etilenglicol, Na-Tre450 + DMSO, Na-Tre450 + Etilenglicol y con Na-Sac450 + DMSO.
- Para el método **hielo seco + N₂ líquido**: Mm400 + DMSO y con Na-Sac450 + DMSO.

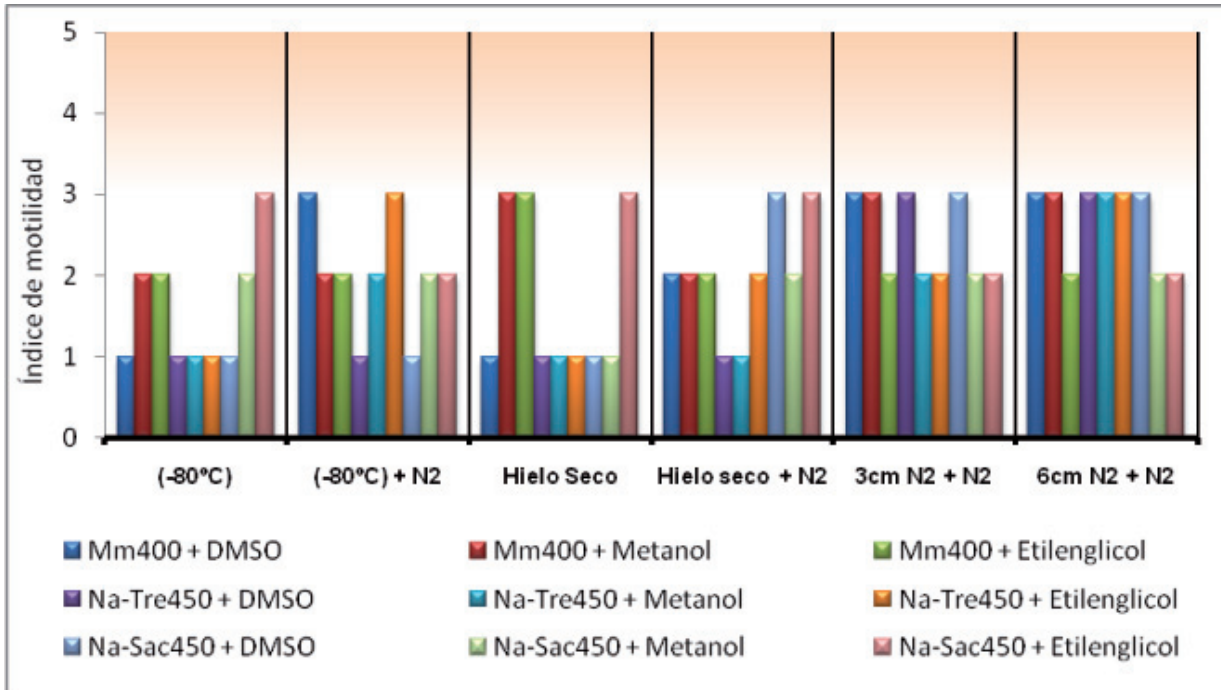


Figura 45. Activación de las muestras de macerado de testículos+diluyente+crioprotector al 5% después de haber sido congeladas a -80°C, -80°C + N₂ líquido, Hielo seco, Hielo seco + N₂ líquido, Vapores de N₂ líquido a 3 cm y Vapores de N₂ líquido a 6 cm.

b) Utilizando los crioprotectores al 10% se observó que para todos los métodos de congelamiento fue posible activar muestras (obteniéndose índices de motilidad= 3). A continuación se detallan cuales fueron estas soluciones (Fig. 46):

- Para el método a -80°C : Mm400+Metanol, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO.
- Para el método $-80^{\circ}\text{C} + \text{N}_2$ líquido:
- Para el método hielo seco: Mm400+DMSO, Mm400+Etilenglicol, Na-re450+DMSO, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO y Na-Sac450+Metanol.
- Para el método hielo seco + N_2 líquido:
- Para el método 3cm $\text{N}_2 + \text{N}_2$:
- Para el método 6cm $\text{N}_2 + \text{N}_2$: Na-Tre450+Metanol, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO, Na-Sac450+Metanol y Na-Sac450+Etilenglicol.

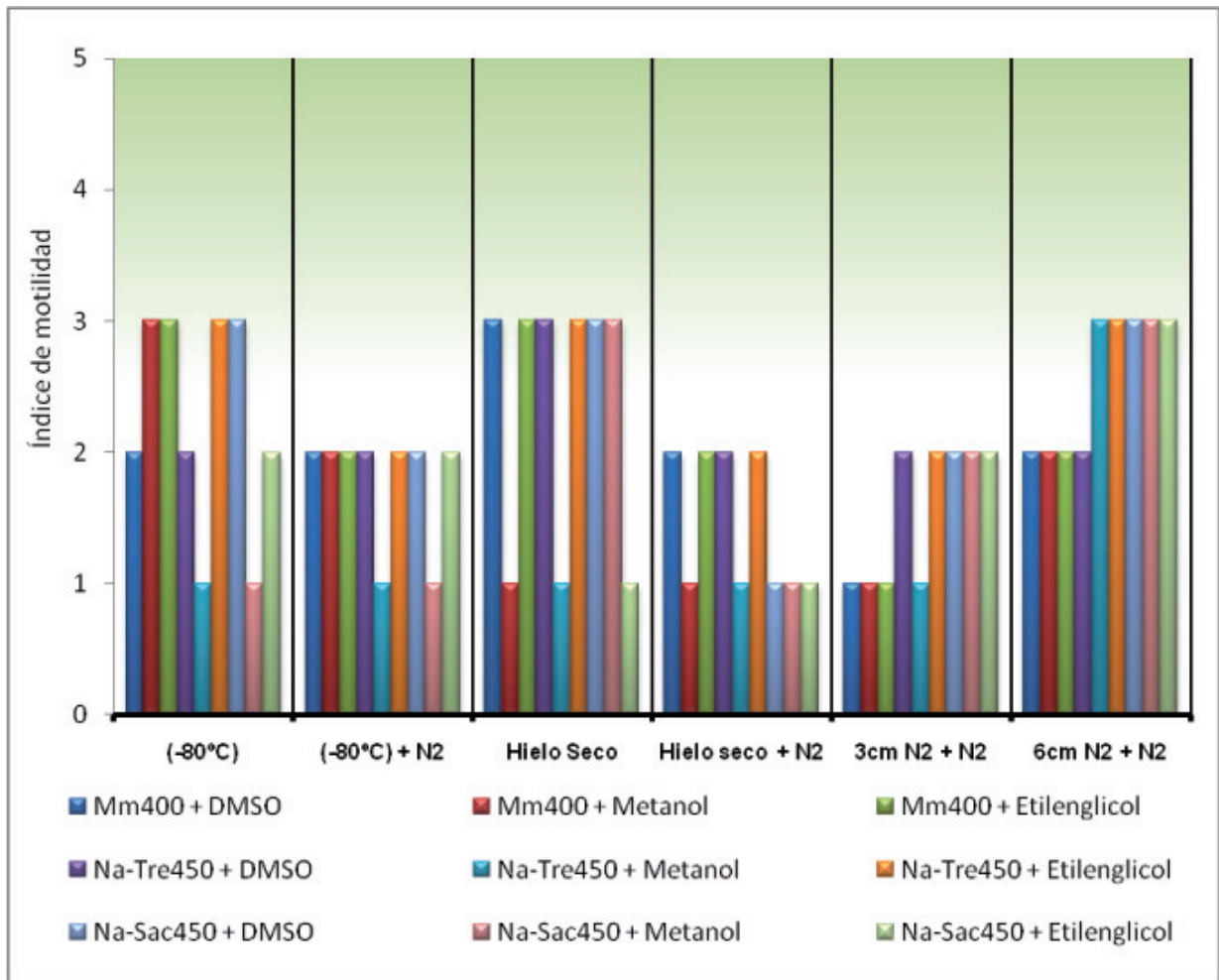


Figura 46. Activación de las muestras macerado de testículos+diluyente+crioprotector al 10% después de haber sido congeladas a -80°C , $-80^{\circ}\text{C} + \text{N}_2$ líquido, Hielo seco, Hielo sco + N_2 líquido, Vapores de N_2 líquido a 3 cm y Vapores de N_2 líquido a 6 cm.

c) Utilizando los crioprotectores al **15%** se observó que para todos los métodos de congelamiento fue posible activar muestras (obteniéndose índices de 3). A continuación se detallan cuales fueron estas soluciones (**Fig. 47**):

- **Para el método a -80°C:** Mm400+Metanol, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+Etilenglicol y Na-Sac450+DMSO.
- **Para el método -80°C + N₂ líquido:** Na-Tre450+DMSO, Na-Tre450+Etilenglicol y Na-Sac450+DMSO.
- **Para el método hielo seco:** Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+DMSO, Na-Tre450+Etilenglicol y Na-Sac450+DMSO.
- **Para el método hielo seco + N₂ líquido:** Mm400+DMSO y Na-Sac450+DMSO.
- **Para el método 3cm N₂ + N₂:** Na-Tre450+Metanol y Na-Sac450+DMSO.
- **Para el método 6cm N₂ + N₂:** Mm400+DMSO, Na-Tre450+DMSO, Na-Tre450+Metanol, Na-Tre450+Etilenglicol y Na-Sac450+DMSO.

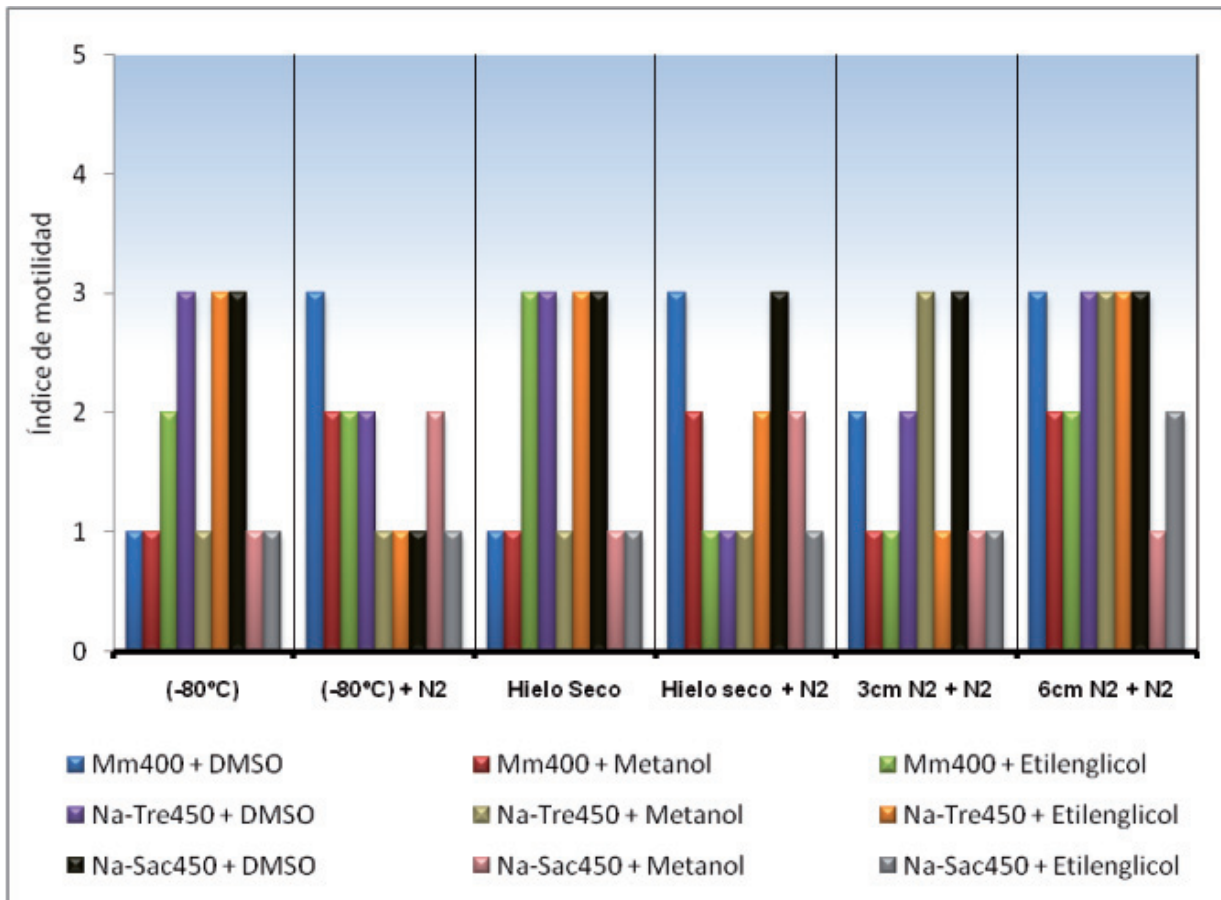


Figura 47. Activación de las muestras macerado de testículos+diluyente+crioprotector al 15% después de haber sido congeladas a -80°C + N₂ líquido, Hielo seco, Hielo seco + N₂ líquido, Vapores de N₂ líquido a 3 cm y Vapores de N₂ líquido a 6 cm.

2) Congelamiento en pajas:

a) Utilizando los crioprotectores al 5% solo fue posible activar muestras a un índice de tres en algunos de los métodos de congelamiento evaluados. A continuación se detallan cuales fueron estas muestras (Fig. 48):

- Para el método a **-80°C**: Na-Tre450+DMSO y Na-Sac450+Metanol.
- Para el método **hielo seco**: Mm400+Etilenglicol y Na-Sac450+Metanol.
- Para el método **3cm N₂ + N₂**: Na-Sac450+Metanol

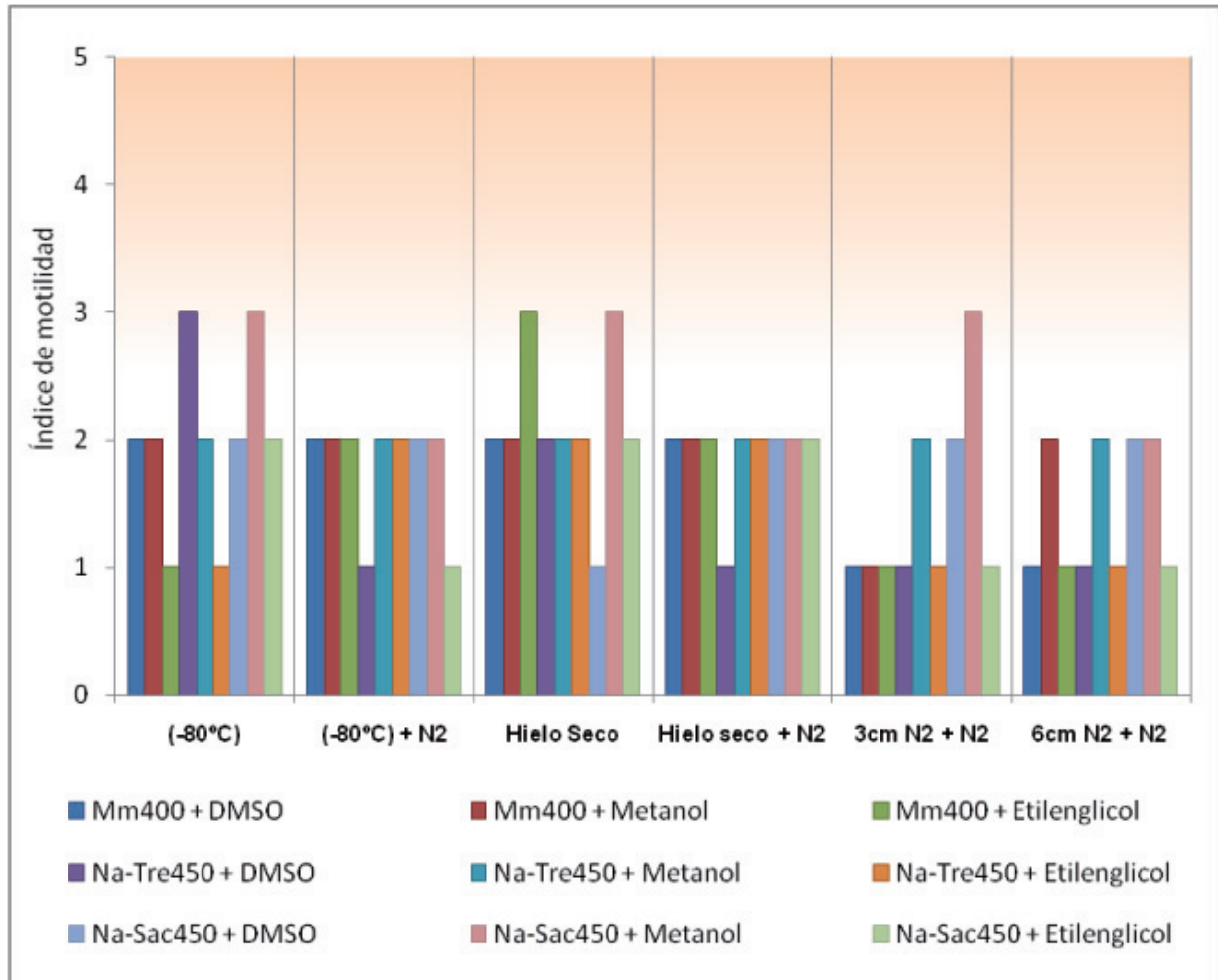


Figura 48. Activación de las muestras de macerado de testículos+diluyente+crioprotector al 5% después de haber sido congeladas a -80°C + N₂ líquido, Hielo seco, Hielo seco + N₂ líquido, Vapores de N₂ líquido a 3 cm y Vapores de N₂ líquido a 6 cm.

b) Utilizando los crioprotectores al **10%** solo fue activar muestras a un índice de tres en todos los métodos de congelamiento evaluados. A continuación se detallan cuales fueron estas muestras (**Fig. 49**):

- **Para el método a -80°C:** Mm400+DMSO, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+Etilenglicol y Na-Sac450+DMSO.
- **Para el método -80°C + N₂ líquido:** Mm400+DMSO, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+DMSO, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO y Na-Sac450+Etilenglicol.
- **Para el método hielo seco:** Mm400+DMSO, Mm400+Metanol, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO, Na-Sac450+Metanol y Na-Sac450+Etilenglicol.
- **Para el método hielo seco + N₂ líquido:** Mm400+DMSO, Mm400+Metanol, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+DMSO, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO, Na-Sac450+Metanol y Na-Sac450+Etilenglicol.
- **Para el método 3cm N₂ + N₂:** Mm400+DMSO y Mm400+Metanol.
- **Para el método 6cm N₂ + N₂:** Mm400+Metanol, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO.

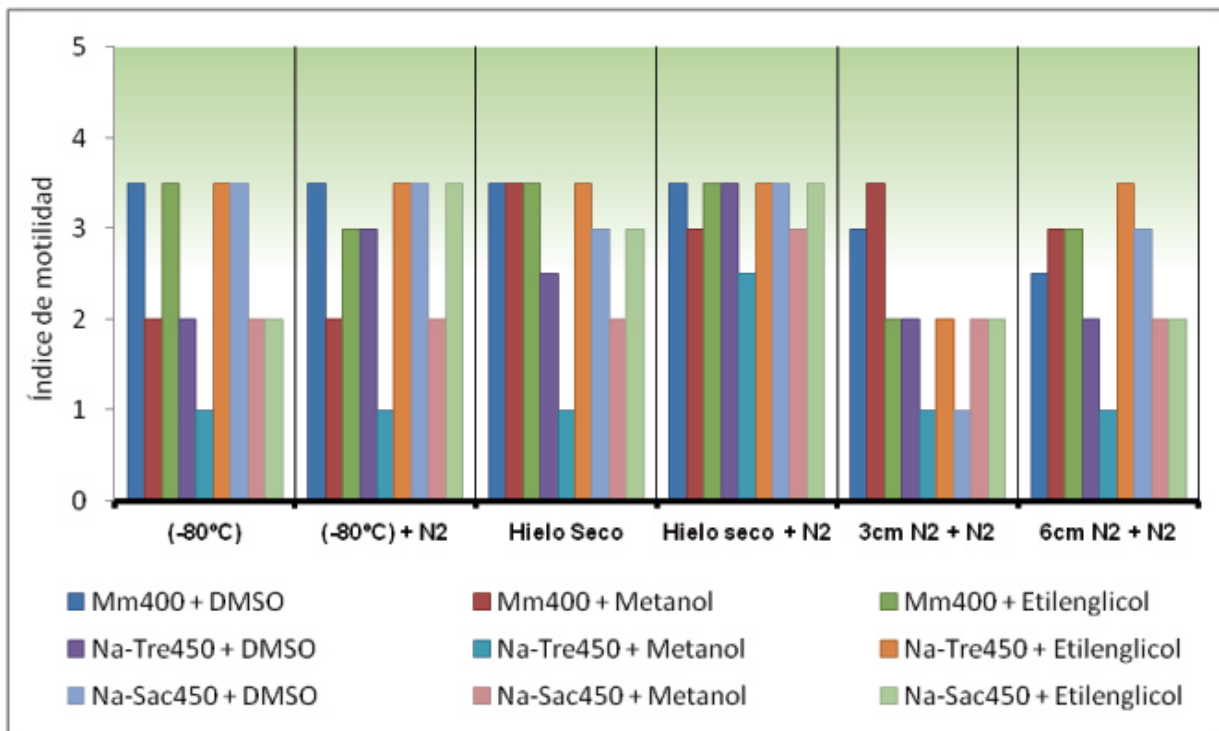


Figura 49. Activación de las muestras de macerados de testículos+diluyente+crioprotector al 10% después de haber sido congeladas a -80°C, -80°C + N₂ líquido, Hielo seco, Hielo seco + N₂ líquido, Vapores de N₂ líquido a 3 cm y Vapores de N₂ líquido a 6 cm.

c) Utilizando los crioprotectores al 15% solo fue posible activar muestras a un índice de tres en todos los métodos de congelamiento evaluados. A continuación se detallan cuales fueron estas muestras (**Fig. 50**):

- Para el método a -80°C : Mm400+DMSO, Mm400+Etilenglicol, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO y Na-Sac450+Etilenglicol.
- Para el método $-80^{\circ}\text{C} + \text{N}_2$ líquido: Mm400+DMSO y Na-Sac450+Etilenglicol.
- Para el método hielo seco: Mm400+DMSO, Na-Tre450+DMSO, Na-Tre450+Metanol, Na-Tre450+Etilenglicol, Na-Sac450+DMSO y Na-Sac450+Etilenglicol.
- Para el método hielo seco + N_2 líquido: Mm400+DMSO, Na-Tre450+DMSO, Na-Sac450+DMSO y Na-Sac450+Etilenglicol.
- Para el método 3cm $\text{N}_2 + \text{N}_2$: Na-Sac450+DMSO y Na-Sac450+Etilenglicol.
- Para el método 6cm $\text{N}_2 + \text{N}_2$: Na-Tre450+Etilenglicol y Na-Sac450+Etilenglicol (**Fig. 50**).

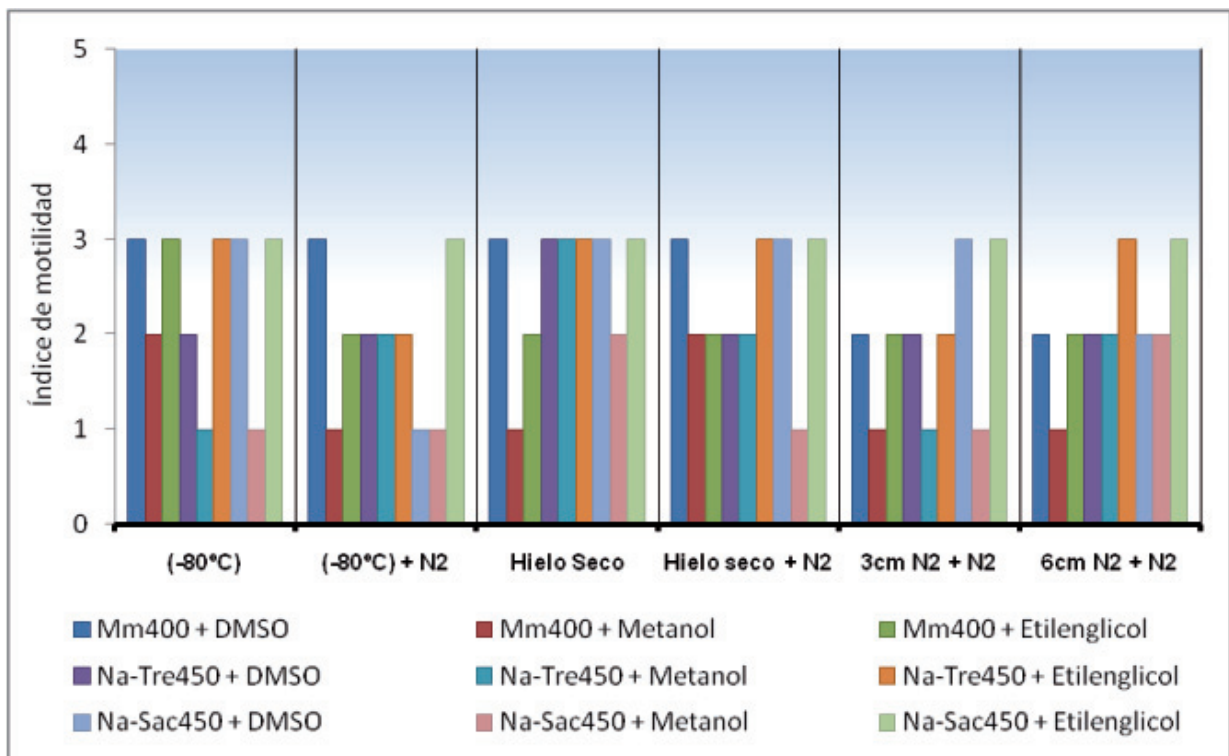


Figura 50. Activación de las muestras de macerados de testículos+diluyente+crioprotector al 15% después de haber sido congeladas a -80°C y N_2 líquido, Hielo seco, Hielo seco + N_2 líquido, Vapores de N_2 líquido a 3 cm y Vapores de N_2 líquido a 6 cm.

5. Discusión

Como se explicó anteriormente, el desarrollo de la inseminación artificial basada en gametos criopreservados ha permitido cambios trascendentales en la industria pecuaria. El semen congelado es usado mundialmente como una herramienta fundamental en los programas de mejoramiento animal. Por lo tanto, es de esperar que puedan obtenerse beneficios similares en su aplicación para la industria piscícola. El uso de espermatozoides congelados es un medio práctico para aumentar el tamaño genéticamente efectivo de las poblaciones y mantener su diversidad genética, especialmente de aquellas mantenidas en cautiverio (Phronen, 1994). Además, aumenta la posibilidad de reproducción fuera de la estación reproductiva, facilita el movimiento e intercambio de material genético entre productores, mejora la eficiencia en la utilización de los parentales y contribuye a disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores en procura de nuevos reproductores (Medina-Robles *et al.*, 2005).

Los procesos de criopreservación de espermatozoides de peces han sido estudiados especialmente en las especies en la que su cría está más desarrollada: salmónidos y ciprínidos (Lahnsteiner *et al.*, 1995; Linhart *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayoría de los resultados difieren con respecto a los diferentes protocolos de congelación utilizados y no son de fácil aplicación para nuevas especies. Los intereses de investigación han sido dirigidos principalmente a tres tópicos: la estandarización de los protocolos de congelación que permitan alcanzar tasas de fertilización cercanas a las obtenidas con espermatozoides frescos; la evaluación de sustancias crioprotectoras que disminuyan los efectos tóxicos y de criodañó sobre la célula espermática y la extrapolación de resultados entre las diferentes especies ícticas para encontrar puntos de similitud (Medina-Robles *et al.*, 2005).

Como ya fue mencionado, el pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) representa una especie de gran interés socioeconómico para la provincia de Buenos Aires debido a la importancia de su pesca deportiva, comercial y su potencial para la acuicultura. En los últimos años, debido a la sobrepesca y a la contaminación de su hábitat natural, las poblaciones de pejerrey han sufrido una marcada declinación en algunos cuerpos de agua como, por ejemplo, las Encadenas del partido de Chascomús (Berasain *et al.*, 2005). Por estos motivos, en los últimos años se han incrementado tanto los estudios básicos como los aplicados para desarrollar su cultivo (Strüssmann, 1989; Miranda & Somoza, 2001; Von Bernard *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2005; 2006).

Poder controlar la reproducción es esencial para la acuicultura de cualquier especie (Bromage & Roberts, 1995). El desarrollo y aplicación de técnicas para el manejo del desove, la fecundación y la producción coordinada de juveniles es la condición primaria para lograr la instalación de granjas de producción de pejerrey bonaerense (Miranda *et al.*, 2005). De esta manera, para lograr una producción masiva, es necesario contar con un abastecimiento permanente de gametos. Sin embargo, y a pesar de lo mencionado, la implementación de herramientas biotecnológicas como la criopreservación de espermatozoides no se habían desarrollado para la especie en estudio hasta el presente.

Como un primer paso para el desarrollo de diluyentes apropiados para congelar semen de pejerrey se analizó la composición iónica del líquido seminal y se ha determinado que el Na^+ es el componente predominante y que tanto el Ca^{++} como el K^+ serían iones implicados en la activación de la motilidad espermática. También se determinó el pH y la presión osmótica (pH 8; 360mOsm/Kg encontrándose valores similares a los obtenidos por Renard *et al.* (1994). A partir de estas observaciones y como parte de los experimentos llevados a cabo durante esta tesina, se desarrollaron y evaluaron diluyentes apropiados para inhibir reversiblemente la motilidad del espermatozoides de pejerrey que combinados con crioprotectores utilizados en peces teleósteos, permitieron la realización de las primeras pruebas de criopreservación de espermatozoides en esta especie.

Es sabido que en algunas especies de peces teleósteos ha sido posible mantener el espermatozoides refrigerado entre 0 y 8°C por algunas horas e incluso varios días. Esta técnica es ampliamente utilizada en la piscicultura de *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Acipenser oxyrhynchus* para resolver problemas reproductivos a corto plazo como la asincronía en la maduración y las dificultades del transporte de gametos (Di Lauro *et al.*, 1994). Por otra parte el congelamiento y almacenamiento de espermatozoides a temperaturas de -198,6 °C, en nitrógeno líquido brinda la posibilidad de mantener espermatozoides congelados teóricamente por un tiempo indefinido (Ashwood-Smith, 1980).

De esta manera en este trabajo se intentó evaluar el tiempo que puede mantenerse viable el espermatozoides diluido de pejerrey, refrigerándolo a -8°C (heladera doméstica). Por otra parte, también se evaluaron seis métodos de congelamiento, donde se tuvo en cuenta el equipamiento disponible según se trabaje con espermatozoides obtenidos de peces mantenidos en cautiverio (Instituto de Investigación, Estación de piscicultura, etc.) o de poblaciones silvestres (lagunas, embalses, etc.). Cabe mencionar, por ejemplo, que no todas las Instituciones de investigación poseen un freezer a -80°C y que en la mayoría de las ciudades de nuestro

país no es fácil contar con hielo seco o N_2 líquido. Se desprende de los resultados obtenidos, que todos estos métodos han resultado efectivos y que se han logrado desarrollar protocolos de congelamiento para cada caso. De todos ellos el método más práctico, seguro y económico demostró ser el que utiliza hielo seco ya que se puede transportar y manipular fácilmente. En cambio, en el caso del congelamiento en vapores de N_2 líquido resulta necesario contar con un envase adecuado y una estructura que permita mantener las muestras sobre la superficie y además se debe tener en cuenta que es más riesgoso manipular y/o transportar N_2 líquido. En este sentido el congelamiento en freezer a -80°C ha resultado ser una alternativa sencilla para el congelamiento de las muestras en el caso de que se posea este equipamiento. Para todos los métodos las muestras fueron envasadas en dos envases de uso corriente en criopreservación de esperma de peces: crioviales de 1ml y pajuelas de 0,250ml. Ambos envases resultaron ser efectivos para el congelamiento de esperma de pejerrey. También se han determinado las mejores temperaturas y tiempos para el descongelamiento de muestras: $35^\circ\text{C} \times 50''$ para crioviales y $35^\circ\text{C} \times 10''$, valores similares a los publicados para otros peces Medina-Robles *et al.*, 2005).

Además de los ensayos realizados con esperma liberable y debido principalmente al escaso volumen que se obtiene y a las diferencias en las distintas épocas del año, se ha trabajado también en muestras de esperma obtenidas a partir de macerados de testículos. Esta metodología ha resultado ser efectiva en otros peces fundamentalmente en los que es muy difícil obtener esperma liberable debido a su pequeño tamaño (Aoki, 1997). Los resultados obtenidos para el pejerrey han mostrado ser alentadores ya que se obtuvieron resultados positivos para distintos diluyentes, métodos de congelamiento, crioprotectores y envases. Esta metodología podría usarse también para obtener muestras a partir de peces moribundos o de muerte reciente, situaciones en las que no es posible obtener esperma liberable, y que ocurren frecuentemente cuando se realizan trabajos a campo y se pescan reproductores con red de enmalle.

Es importante destacar, que para el desarrollo de esta tesina un factor limitante ha sido la disponibilidad de esperma de buena calidad. Los experimentos se han llevado a cabo desde el mes de abril del año 2006 hasta el mes de mayo del año 2007 y se ha podido comprobar que en la plenitud de la época reproductiva (agosto-octubre) el volumen de esperma que puede obtenerse de un macho de pejerrey en cautiverio no supera los $200\mu\text{l}$ (Miranda *et al.*, 2005). Durante el desarrollo de este trabajo, no fue posible obtener esperma liberable durante los meses de abril y mayo. Por otra parte y debido a que el esperma de pejerrey se activa en un medio hiposmótico como el agua de cultivo, la orina o las heces, la obtención de muestras de calidad requiere de mucha práctica y experiencia. Por lo que si bien se utilizaron cerca de 60 ejemplares de pejerrey durante casi un año no se pudieron realizar todas las pruebas programadas con esperma liberable debido a que ha sido necesario descartar gran parte de las muestras antes del comienzo de cada experimento. La dificultad radica en que los orificios anal, urinario y genital se encuentran muy próximos entre sí y el masaje abdominal promueve la emisión de heces, orina y esperma al mismo tiempo lo que provoca que las muestras se activan con relativa facilidad impidiendo que puedan ser utilizadas para los distintos experimentos.

Por otra parte y a pesar de que el pejerrey es un animal sensible a la manipulación es importante resaltar que a lo largo de los experimentos se registró una mortalidad menor al 10 % destacando que los animales fueron anestesiados y sometidos a masaje abdominal aproximadamente 20 veces.

5.1) Evaluación y desarrollo de diluyentes:

Para el desarrollo de algunos de los diluyentes que permitieron inhibir de forma reversible la motilidad del esperma de pejerrey, se han seguido los lineamientos propuestos en los trabajos de Strüssmann *et al.* (1994) y Renard *et al.* (1994) donde se analizó por primera vez la presión osmótica del líquido seminal de esta especie (331mOsm/Kg), el pH (8) y se probaron algunos diluyentes utilizados en otros peces teleósteos. Estos autores han sugerido que la solución de Mounib modificada 400 (400mOsm/Kg), donde se reemplaza el ión K^+ por el ión Na^+ , podría utilizarse para la refrigeración y congelamiento de esperma de pejerrey. En esta tesina se analizó también la composición iónica del líquido seminal del pejerrey donde se observó que el Na^+ es el componente principal del mismo mientras que el Ca^{++} y el K^+ son los minoritarios. Se realizaron pruebas con soluciones que contenían estos cationes y pudo observarse que estarían implicados en la activación de la motilidad, probablemente debido a un rol en la despolarización de la membrana plasmática de las células espermáticas.

En base a estos resultados se decidió emplear diluyentes con Na^+ en su composición mezclados con sacarosa y/o trehalosa, observándose que soluciones que contenían $NaHCO_3$ resultaron más efectivas que soluciones que contenían $NaCl$. También se evaluaron otros diluyentes, como el utilizado en el aterínido Medaka descrito por Aoki. (1997) el cual está compuesto básicamente por FBS y trehalosa y también se emplearon dos diluyentes comerciales usados en semen humano y de carnero. Ninguno de estos resultó efectivo y una posible explicación para este resultado es que en su composición original estos diluyentes presentaron una osmolaridad de 710, 2160 y 1170 mOsm/Kg , respectivamente.

Todos los diluyentes se probaron en un rango de osmolaridad que varió entre 400-600 mOsm/Kg (isosmótico o levemente hiperosmótico con respecto al líquido seminal del pejerrey) y a un pH 8, pudiéndose observar que un buen diluyente debe tener una osmolaridad de entre 450 a 500 mOsm/Kg. Los mejores diluyentes fueron: Mm400, Na-Sac450, Na-Tre450 y Na500.

5.2) Pruebas de refrigeración de esperma de pejerrey:

Esta metodología se ha llevado a cabo con éxito en algunas especies de peces donde ha sido posible mantener esperma refrigerado entre 0 y 8 °C por algunas horas e incluso varios días (Ashwood-Smith, 1980; Di Lauro et al., 1994; Christensen & Tiersch 2005). En este trabajo se diluyó esperma de pejerrey en los diluyentes que habían resultado efectivos en el punto anterior y se refrigeraron muestras a 8 °C (heladera). Estas pruebas podrían ser de gran utilidad debido a que en la época reproductiva es común observar asincronía en el desarrollo oocitario de las hembras, obteniéndose huevos maduros en diferentes momentos. En relación a esta observación es posible mantener huevos maduros de pejerrey después del desove en un ambiente adecuado hasta 24hs antes de ser fecundados artificialmente (Miranda, *Com. Pers.*), por lo tanto si fuera posible mantener esperma refrigerado por varias horas podrían obtenerse embriones de una forma más eficiente mediante la fecundación artificial.

Nuestros resultados mostraron que las muestras diluidas en Mm400 fueron las más efectivas, pudiéndose activar esperma a un índice de motilidad de 3 tras 8hs de refrigerado, mientras que las muestras diluidas en Na-Sac450 y Na-Tre450 solo se pudieron activar a un índice de motilidad de 3 tras 2hs y a un índice de 2 en la solución Na500. Estos resultados difieren de los obtenidos por Renard *et al.* (1994) en donde el esperma diluido en Mm400 y refrigerado a 8 °C pudo activarse a 3 después de 22hs. Las diferencias podrían explicarse en parte a que la calidad del semen con que se realizaron estas pruebas no era óptima. Se utilizó esperma fuera de la época reproductiva (febrero – marzo), época en donde se obtiene muy poco esperma liberable y de un color blanco traslúcido comparado con el semen de color blanco intenso y en mayor volumen que puede obtenerse en plena época reproductiva (septiembre - octubre). Cabe destacar que el esperma refrigerado sin diluir que se utilizó como control pudo activarse a un índice de motilidad de 3 tras 14hs de refrigerado, mientras que en el trabajo de Renard et al (1994) se activó a un índice de 4 luego de 22hs.

5.3) Evaluación y selección de crioprotectores para congelar esperma de pejerrey:

Para la evaluación y selección de crioprotectores fue necesario tener en cuenta el efecto de la temperatura y la osmolaridad en el ambiente celular. El proceso de criopreservación de esperma involucra diferentes cambios intracelulares que pueden originar una disminución en la supervivencia espermática. El control de la velocidad del cambio de la temperatura, la osmolaridad y la formación de cristales de hielo en el medio intra y extracelular son los aspectos más relevantes para optimizar la viabilidad celular (Medina-Robles *et al.*, 2005).

Los cristales de hielo se separan de la solución acuosa durante la congelación y su proporción incrementa progresivamente a medida que decrece la temperatura. En medios que no contienen crioprotectores, la fracción de agua no congelada en la célula decrece a medida que disminuye la temperatura, como resultado de la deshidratación y concentración de solutos intracelulares. En cambio, si el medio tiene un crioprotector, la respuesta de la célula depende entonces de la permeabilidad de éste. Si no es permeable, aumenta la osmolaridad fuera de la célula, pero si penetró totalmente, reemplaza el agua intracelular y decrece la fracción congelada, evitando la concentración de solutos (Mazur, 1980).

Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de criopreservación, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular durante un período determinado. Estas sustancias cumplen funciones como incrementar el volumen del esperma, proteger a los espermatozoides de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura. Los diluyentes utilizados en peces han sido formulados simulando la composición y osmolaridad del plasma seminal de cada especie, con el propósito de no activar la motilidad, ya que soluciones no isosmóticas conducen a cambios iónicos membranales produciendo la activación espermática (Medina-Robles *et al.*, 2005).

Los mecanismos de acción específicos de los agentes crioprotectores a nivel celular no están aún muy bien dilucidados. Uno de los más utilizados es el DMSO, que se ha empleado con éxito en el congelamiento de esperma de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* en N₂ líquido donde se obtuvo un 80% de fecundidad (Steinberg *et al.*, 1995) y en *Cyprinus carpio* donde se obtuvo un 56% de fecundidad tras haber congelado el esperma a -80°C y posterior inmersión en N₂ líquido (Linhart, *et al.*, 2000) En este sentido y en lo que se refiere a su mecanismo de acción, se ha sugerido que existe una interacción electrostática entre el grupo sulfóxido polar del DMSO y la bicapa lipídica. Esta interacción podría darse

entre la molécula de colina de los grupos cabeza de la fosfatidilcolina o por una interacción entre el oxígeno sulfóxido del DMSO y un grupo fosfato de la cabeza de fosfolípidos por medio de un enlace de hidrógeno con una molécula de agua (Anchordoguy, 1991). Sin embargo, durante el proceso de criopreservación no sólo es importante establecer como interactúa el crioprotector con la célula, sino que también se hace necesario determinar el efecto tóxico de éstos, que es finalmente el evento de mayor importancia a controlar durante la exposición de los espermatozoides a estas sustancias.

Aparentemente, la toxicidad del DMSO está dirigida al estado bioenergético del espermatozoide, interfiriendo con el balance entre síntesis y utilización de ATP. Frente a una deficiencia de ATP, por ejemplo durante la congelación, el control metabólico sobre los procesos celulares dependientes de iones podría verse afectado, ocasionando una inapropiada activación de fosfolipasas y proteasas y un daño celular irreversible (Holt, 2000). También ha sido postulado que los crioprotectores, como el glicerol, tienen la capacidad de modificar la bicapa lipídica por su habilidad de insertarse entre otros fosfolípidos, llegando a afectar las vías de metabolismo intermedio; de igual manera se ha asociado su acción sobre el citoesqueleto y las proteínas microtubulares (Hammerstedt, 1992). El glicerol ha sido utilizado con éxito en especies como el lenguado (*Paralichthys olivaceous*) donde se obtuvo un índice de fecundidad del 80% y además se reporta que el glicerol resulto mejor que el DMSO y el metanol tras haber criopreservado el esperma mediante vapores de N₂ líquido y posterior inmersión en N₂ líquido (Zhang *et al.*, 2004). El metanol fue utilizado con éxito en el *japanese bitterling* (*Tanakia limbata*) en la criopreservación de esperma a -40°C y posterior inmersión en N₂ líquido (Ohta *et al.*, 2004) y en el bagre *Ictalurus punctatus* (Christensen & Tiersch, 2005). Por otra parte con etilenglicol se han obtenido resultados favorables para la criopreservación de esperma de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) consiguiendo un 40% de fecundidad (Navarro *et al.*, 2004).

En este trabajo, se evaluaron una serie de diluyentes que habían demostrado ser efectivos (Mm400, Na-Sac450, Na-Tre450 y Na500) y se los combinó con una serie de crioprotectores utilizados en peces teleósteos (DMSO, Metanol, Etilenglicol, BSA, FBS, Glicerol, DMF, Yema de Huevo y Leche en Polvo) al 5, 10 o 15%.

Como se pudo observar de los resultados, se obtuvo un índice de motilidad postactivación=5 con los diluyentes que tenían los crioprotectores: DMSO, Metanol, Etilenglicol, Glicerol, FBS o BSA en las tres concentraciones probadas.

5.4) Pruebas de congelamiento:

Congelamiento en crioviales:

Los métodos de congelamiento utilizados en este trabajo se han basado en el equipamiento que se puede disponer según se trabaje en un laboratorio de investigación, en una estación de cría o en trabajos con poblaciones silvestres de forma directa en lagunas o cuerpos de agua. Estos métodos también fueron basados en los resultados publicados para otras especies de peces (Aoki, 1997; Rideout *et al.* 2004; Medina-Robles *et al.*, 2005).

El primer método elegido fue el de congelamiento a -80°C (*freezer*) siguiendo lo reportado por Aoki (1997) para Medaka. Los 4 diluyentes seleccionados para pejerrey se combinaron con los crioprotectores más usados para peces en una única concentración (10 %). De los resultados obtenidos se desprende que es necesario usar algún azúcar en la composición de los diluyentes para congelar esperma de pejerrey, ya que las pruebas realizadas con el diluyente Na500 mostraron en todas las combinaciones con crioprotectores resultados negativos post-congelación, por lo que fue descartado como diluyente para las pruebas con los métodos de congelamiento restantes. Probablemente, azúcares como la sacarosa y la trehalosa ejercen un efecto crioprotector, como fue reportado para salmónidos y Medaka (Lahnsteiner *et al.*, 1995; Aoki, 1997). Por otro lado se observó que las diluciones con los crioprotectores BSA, DMF, FBS y Glicerol tampoco permitieron activar el esperma, probablemente debido a su toxicidad en el caso de DMF y a que el resto son crioprotectores del tipo no penetrante. Sin embargo, estos crioprotectores fueron usados con éxito en otros peces (Medina-Robles *et al.*, 2005).

Para el resto de las pruebas de criopreservación se decidió utilizar aquellos diluyentes y crioprotectores que resultaron exitosos en las pruebas de congelamiento a -80°C: Mm400, Na-Sac450 y Na-Tre450 combinadas con DMSO, Metanol o Etilenglicol.

Para el método de congelamiento a -80°C seguido de una inmersión en N₂ líquido, los resultados indican que el DMSO y el Etilenglicol serian los crioprotectores más apropiados y siendo menos eficaz el metanol. Cuando las muestras fueron congeladas en hielo seco el crioprotector más adecuado resultó ser el DMSO seguido por el Etilenglicol y el Metanol. En este mismo método seguido de una inmersión en N₂ líquido los mejores crioprotectores fueron DMSO y Etilenglicol. En el congelamiento realizado en

vapores de N₂ líquido los crioprotectores más efectivos fueron el DMSO y el Etilenglicol; sin embargo se observó que el congelamiento lento a 6cm arrojó resultados más efectivos que el método rápido a 3cm. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rideout *et al.* (2004) para el *Atlantic cod* y para el bagre *Ictalurus furcatus* (Bart, *et al.*, 1998) y utilizando también al DMSO como crioprotector. Por otra parte, en base a los resultados obtenidos, podemos concluir que el DMSO ha sido el crioprotector más adecuado para criopreservar muestras de esperma de pejerrey.

5.5) Macerados de testículo:

Como fue explicado anteriormente las muestras de esperma fueron obtenidas a partir de macerados de testículos de pejerrey y se ensayaron todos los métodos de congelamiento mencionados anteriormente utilizando los diluyentes combinados con los crioprotectores al 5, 10 y 15%. Cabe destacar que la motilidad obtenida después de realizar los macerados de testículos fue de tres y que después de realizar las pruebas de congelamiento en muchos de los tratamientos se pudo obtener índices de motilidad similares a los iniciales, lo que demuestra que esta metodología podría utilizarse con éxito para criopreservar semen de pejerrey.

Congelamiento en crioviales y en pajuelas:

En el caso del congelamiento en crioviales y utilizando los crioprotectores al 5% se observó que el congelamiento lento en vapores de N₂ líquido (6cm) fue el más efectivo seguido del método rápido a 3cm. Combinando crioprotectores al 10% se observó que el congelamiento en hielo seco resultó ser el más adecuado, seguido del congelamiento lento en vapores de N₂ líquido y siendo menos efectivo a -80°C. Por último para una concentración del 15% el congelamiento lento en vapores de N₂ líquido (6cm) resultó ser el más eficaz seguido por el congelamiento a hielo seco y a -80°C.

Para el método de envasado en pajuelas los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó una concentración de crioprotector del 10%. Siendo el hielo seco y posterior inmersión en N₂ líquido el método más eficaz de congelamiento, seguido por el método del hielo seco. En cambio cuando se utilizó una concentración de crioprotector del 15% el método más efectivo fue el congelamiento en hielo seco, seguido del método de hielo seco y posterior inmersión en N₂ líquido.

Si bien estos resultados son preliminares podemos inferir que el congelamiento en vapores de N₂ líquido es el más efectivo cuando las muestras son envasadas en crioviales y el método de congelamiento en hielo seco cuando éstas son envasadas en pajuelas.

6. Conclusiones

En resumen este trabajo demuestra que es posible criopreservar esperma de pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) utilizando diferentes métodos de congelamiento.

Se determinó que una buena solución para diluir esperma de pejerrey debe contener sodio en su composición, algún azúcar como sacarosa o trehalosa, poseer una osmolaridad entre 400-450 mOsm/Kg y un pH de 8. En este sentido los diluyentes Mm400, Na-Sac450 y Na-Tre450 han resultado efectivos.

El diluyente más adecuado para la refrigeración de esperma a 8°C fue la solución de Mm400, pudiéndose activar las muestras con capacidad fecundante hasta después de 8hs.

Muestras de esperma obtenidas mediante masajeo abdominal combinadas con los diluyentes Mm400, Na-Sac450 y Na-Tre450 y los crioprotectores DMSO, Metanol y Etilenglicol a una concentración del 10% pudieron ser activadas con éxito después de haber sido congeladas mediante los siguientes métodos:

- -80°C.
- -80°C y posterior congelamiento en N₂ líquido.
- hielo seco.
- hielo y seco posterior congelamiento en N₂ líquido.
- vapores de N₂ líquido (3cm de la superficie del N₂ líquido) y posterior congelamiento en N₂ líquido.
- vapores de N₂ líquido (6cm de la superficie del N₂ líquido) y posterior congelamiento en N₂ líquido.

De todos los métodos probados el más exitoso fue el congelamiento lento realizado en vapores de N₂ líquido (6cm de la superficie del N₂ líquido) y posterior inmersión en N₂ líquido, siendo el DMSO el crioprotector más eficaz.

Fue posible criopreservar muestras de esperma de pejerrey y descongelarlas con éxito utilizando como envases crioviales de 1ml y pajuelas de 0,250ml.

Se determinó el tiempo de descongelamiento y la temperatura adecuada para muestras conservadas en crioviales (35°C x 50seg.) o en pajuelas (35°C x 10seg.).

Fue posible congelar muestras de esperma obtenidas de macerados de testículos utilizando los diluyentes, crioprotectores y métodos de congelamiento anteriores evaluados para esperma liberable.

7. Fuentes de información

- Anchorvorguy, T. J. (1991). Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulphoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiol.* 28: 467-473.
- Ashwood-Smith M. J. (1980). Low temperature preservation of cells, tissues, and organs. *In: M. Ashwood-Smith, J. & Farrant, J. (Eds.). Low temperature preservation in medicine and biology.* Pittman Medical, Tunbridge Wells, Kent, UK. Pp. 19-44
- Babiak, I., Glogowski, J., Dobosz, S., Kuzminski, H., & Goryczko, K. (2002). Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation. *J. Fish Biol.* 60: 561-570.
- Babiak, I., Glogowski, J., Luczynski, M.J., Luczynski, M., & Demianowicz, W. (1999). The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of Northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenol.* 52: 473-479.
- Baigún, C., & Delfino, R. L. (1994). Relación entre factores ambientales y biomasa relativa del pejerrey en lagos y embalses templado-cálidos de la Argentina. *Acta Biol. Venez.* 15: 47-57.
- Bart, A.N., Wolfe, D.F., & Dunham, R.A. (1998). Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. *Trans. Am. Fish Soc.* 127: 819- 824.
- Berasain, G.; Colautti, D., & Velasco, C. (2000). Experiencias de cría de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, durante su primer año de vida. *Rev. Ictiol.* 8: 1-7
- Berasain, G.E., Colautti, D.C., Remes Lenicov, M. & Velasco, M. (2005). Variaciones estacionales e históricas de las especies ícticas de la laguna de Chascomús. *Biol. Acuát.* 22: 47-58.
- Bonetto, A.A. & Castello H.P. (1985). Pesca y piscicultura en aguas continentales de América Latina. *Progr. Des. Cient. y Téc. OEA, Ser. Biol.* 31: 1-114.
- Bromage, N.R. (1995). Broodstock management and seed quality – General considerations. *In: Bromage, N.R., & Roberts R.J., (Eds.): Broodstock management and egg and larval quality.* Blackwell, Oxford, Pp.424.
- Calvo, J., & Morriconi, E.R. (1972). Fenómenos reproductivos en el pejerrey "*Basilichthys bonariensis*". III. Estudio de la fecundidad, época y número de desoves. *Anal. Soc. Cient. Ar.* 193: 75-84.
- Christensen J.M. & Tiersch, T.R. (1996). Refrigerated storage of channel catfish sperm. *J. World Aquacult. Soc.* 27:340-6.
- Ciereszko, A., & Dabrowski, K. (1993) Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109: 367-373.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Lin, F., Christ, S.A., & Toth, G.P. (1999) Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved Muskellunge spermatozoa. *Trans. Am. Fish Soc.* 128: 542-548.
- Cruz-Casallas A., Pardo-Carrasco, P.E., & Arias-Castellanos, J.A., (2004) Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *J. World Aquac. Soc.* 35: 529-535
- Del Valle, A. (1991). Informe Técnico de Beca a Japón. 3. Cría de pejerrey en Japón. Centro de Ecología Aplicada del Neuquén. Dpto. Acuicultura. Dir. Gen. Bosques y Parques Provinciales. Subsecr. A.A, Neuquén-Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Pp. 45-51.
- Di Lauro M.N., Krise W.F., Hendrix M.A. & Baker S.E. (1994) Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. *The Progressive Fish-Culturist* 56: 143-144
- Espinach Ros, A., Dománico, A., & Seigneur, G. (1998). Piscicultura extensiva del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). En: 1er taller integral sobre el recurso pejerrey en la provincia de Buenos aires. Editado por Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires. Pp. 51-52.
- Gonzales Regalado, T., & Mastrarrigo, V. (1954). Piscicultura. El Pejerrey. Ministerio de Agricultura y Ganadería (Rep. Arg.) Dirección de Piscicultura y Pesca Interior. Publ. Misc. 268: 1-55.
- Gow, J.C., Kurokura, H., & Hirano, R. (1993). Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and Marine Puffer. *Nippon suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 59: 777-782.
- Hammerstedt, R.H. & Graham J.K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiol.* 29: 26-38.

- Holt, W.V.(2000). Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 3-22.
- Kirk, R. (1987). A history of marine fish culture in Europe and North America. Fishing News Books Pp. 192.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., & Patzner, R. (1995). A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris*, *Coregonus* sp). Aquaculture Res. 26: 801-807.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., & Patzner, R. (1996). Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). Aquaculture 144: 265-274.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvarth, A., Urbanyi, B., Weismann, T. (2000) Criopreservación of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenol. 54: 1477-1498.
- Leung, L.K. (1991). Principles of biological cryopreservation. In: B.G. Jamieson, (Ed.): Fish evolution and systematic: Evidence from spermatozoa. Cambridge Univ. Press, Cambridge Pp. 231-244.
- Leung, L.K., & Jamieson, B.G. (1991). Live preservation of fish gametes. In: Jamiesson BGM. editor. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press Pp. 245-269.
- Linhart, O., Rodina, M., & Cosson, J. (2000). Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiol. 41: 241-250.
- López, H., Baigún, C., Iwaskiw J., Delfino, R. & Padín, O. (2001). La cuenca del Salado: uso y posibilidades de sus recursos pesqueros. Ed. Univ. de La Plata Pp. 60.
- López, H. L., & García, M. L. (2001). Aspectos históricos e importancia regional del pejerrey bonaerense. En: "Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey". Editado por F. Grosman. Editorial Astyanax, Buenos Aires 1: 15-26.
- Loubens, G., & Osorio, F. (1988). Observations sur les poissons de la partie bolivienn du lac Titicaca. III. *Basilichthys bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Pisces, Atherinidae). Rev. Hydrobiol. Trop. 21: 153-177.
- Luchini, L., Quiros, R. & Avedaño, T. (1984). Cultivo del pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) en estanques. Mem. Asoc. Latinoamer. Acuicult. 5: 581-587.
- Luchini, L. (2004). Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. SAGPyA. Subsec. Pesca y Acuicultura. Dir. de Acuicultura. Argentina. Pp. 54
- Mazur, P. (1980). Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: ninth International congress on animal reproduction and artificial insemination. Pp. 99-114.
- Medina-Robles, V.M., Velasco-Santamaría Y.M. & Cruz-Casallas P.E. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática em peces teleósteos. Rev. Col. Cienc. Pec. 18: 34-48
- Mituta, T. (2001). La historia del pejerrey en Japón. En: "Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey". Editado por F. Grosman. Editorial Astyanax, Buenos Aires 2: 23-26.
- Miranda, L.A., Escaray, R.U., Bustingorry, J.F. & Somoza, G.M. (2001). Effects of photoperiod and human chorionic gonadotropin (hCG) administration on spermiation in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Revista Argentina de Producción Animal 21: 95-105.
- Miranda, L.A., & Somoza, G.M. (2001). Biología reproductiva del pejerrey *Odontesthes bonariensis*: Diferenciación sexual y endocrinología de la reproducción. Aspectos básicos y su potencial aplicación en acuicultura. En: "Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey". Editado por F. Grosman. Editorial Astyanax, Buenos Aires 5: 41-45
- Miranda, L.A., Cassará, M.C. & Somoza, G.M. (2002). Inducción hormonal de la espermiación en el pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Revista Argentina de Producción Animal 22: 430-431
- Miranda, L.A., Cassará, M.C. & Somoza, G.M. (2005). Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835). Aquaculture Res. 36: 1473-1479
- Miranda, L. A., Berasain, G.E., Velasco, C. M., Shirojo, Y., & Somoza, G. M. (2006). Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. Biocell 30: 89-95.
- Mizukami, A., Carrell, D.T., & Peterson, C.M. (1999). Cryopreservation of embryos. Encyclopedia of reproduction. Vol 1. Utah: Academic Press Pp. 765-772.
- Morisawa, M. (1985). Initiation mechanisms of sperm motility at spawning in teleosts. Zoolog. Scien. 2: 605-615.
- Navarro, O. J., Yohana, V.S., & Cruz-Casallas, P. E. (2004). Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachipomus*). Rev. Col. Cienc. Pec. Vol. 17.
- Ohta, H., Kawamura, K., Unuma, T., & Takegoshi, Y. (2001). Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. J. Fish Biol. 58: 670-681.
- Phronen, J. (1994). Composition and cryopreservation of sperm from some Finnish teleost fish. Finnish

- Fish Res. 15: 27-48.
- Rana, K. (1995). Preservation of gametes. En: "Broodstock management and egg and larval quality". Editado por Bromage, N.R. y Roberts, R.J. Blackwell, Oxford Pp. 53-75.
 - Reartes, J.L. (1995). El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): Métodos de cría y cultivo masivo. CO-PESCAL Documento ocasional N° 9. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Pp.35.
 - Renard, P. & Cochard, J. (1989). Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Reeve and King scallop *Pecten maximus* (L) embryos: Influence of the biochemical and effects. Cryo-Letters 10: 169-180.
 - Renard, P.; Strüssmann, C.A.; Ling, H. & Takashima, F. (1994). Evaluation of extenders for pejerrey *Odontesthes bonariensis* sperm. Fish. Scie. 60 :661-666.
 - Ringuelet, R. (1943). Piscicultura del pejerrey o atherinicultura. Colección Agro, Editorial Suelo Argentino. Buenos Aires Pp. 162.
 - Ringuelet, R.A., Iriart R. & Escalante A.H. (1980). Alimentación del pejerrey (*Basilichthys bonariensis bonariensis*, *Atherinidae*) en la laguna de Chascomús (Buenos Aires, Argentina). Relaciones ecológicas de complementación y eficiencia trófica del plancton. Limnobiología 10: 447-460.
 - Ritar, A.J., & Campet, M. (2000). Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from Striped Trumpeter (*Latris lineata*). Theriogenol. 4: 467-480.
 - 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 Pp.145.
 - Strüssmann, C.A. (1989). Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Doctoral Thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo. Pp. 351.
 - Strüssmann, C.A., Chon, N.B., Takashima, F. & Oshiro, T. (1993). Triploidy induction in an atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). The progressive fish-culturist 55: 83-89.
 - Strüssmann, C.A., Renard, P., Ling, H. & Takashima, F. (1994). Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. Fisheries Science 60: 9-13.
 - Taddei, A. R., Barbato, F., Abelli, L., Canese, S., Moretti, F., Rana, K.J., Fausto, A.M., & Mazzini, M. (2001). Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, pre-freezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). Cryobiol. 12:244-255.
 - Tejedor, D. (2001). El Pejerrey como recurso genético. En: "Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey". Editado por F. Grosman. Editorial Astyanax, Buenos Aires 3: 27-31.
 - Theodorescu, D. (2004). Cancer cryotherapy: evolution and biology. Rev. Urol. 4: 9-19
 - Thorgaard, G.H. (1995). Biotechnological approaches to broodstock management. In: Bromage, N.R., & Roberts R.J., (Eds.): Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell, Oxford, Pp.424.
 - Tiersch, T.R., Chestern, R. Figiel Jr, William, W., Holt W. J., Carmichael, G.J., & Gorman, O.T. (1998). Cryopreservation of sperm of the endangered Razorback sucker. Trans. Am. Fish. Soc. 127:95-104.
 - Toyoda, Y. (1986). Principios de criopreservación de oocitos y embriones de mamíferos. Compendio del curso de criopreservación de embriones de mamíferos 1986. Universidad Austral de Chile Pp. 52-66.
 - Viveiros, A.T.M., Lock, E.J., Woelders, H., & Komen, J., (2001). Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. Cryobiol. 43:276-287.
 - Von Bernard, H., Petracchi, C., Rosso, J.J. & Quirós, R. (2002). Análisis de fortalezas, debilidades, oportunidades y amenazas, FODA, para el cultivo del pejerrey en pequeñas lagunas pampeanas. Rev. Arg. Prod. An. 22: 427-428.
 - Welcome, R.L. (1988). International introductions of inland aquatic species. FAO Fish Tec. Paper 294: 1-318.
 - Yao, Z., Crim, L.W., Richardson, G.F., & Emerson, C. J. (2000). Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. Aquaculture 181: 361-375.

8. Anexos

IONICOS	COMPOSICIÓN	mMol/ml ó %v/v	± 10 mOsm/kg
Na-BSA	NaHCO ₃	159	400
	BSA	5%	
Na-BSA	NaHCO ₄	159	450
	BSA	10%	
Na-BSA	NaHCO ₅	159	500
	BSA	15%	
Na-BSA	NaHCO ₆	159	550
	BSA	20%	
Na-BSA	NaHCO ₇	159	600
	BSA	25%	
Na-FBS	NaHCO ₃	200	400
	FBS	100	
Na-FBS	NaHCO ₄	250	450
	FBS	100	
Na-FBS	NaHCO ₅	300	500
	FBS	100	
Na-FBS	NaHCO ₆	350	550
	FBS	100	
Na-FBS	NaHCO ₇	400	600
	FBS	100	
Na-Yema de huevo	NaHCO ₃	159	400
	Yema de Huevo	5%	
Na-Yema de huevo	NaHCO ₄	159	450
	Yema de Huevo	10%	
Na-Yema de huevo	NaHCO ₅	159	500
	Yema de Huevo	15%	
Na-Yema de huevo	NaHCO ₆	159	550
	Yema de Huevo	20%	
Na-Yema de huevo	NaHCO ₇	159	600
	Yema de Huevo	25%	
Na-Leche	NaHCO ₃	159	400
	Leche en polvo	5%	
Na-Leche	NaHCO ₄	159	450
	Leche en polvo	10%	
Na-Leche	NaHCO ₅	159	500
	Leche en polvo	15%	
Na-Leche	NaHCO ₆	159	550
	Leche en polvo	20%	
Na-Leche	NaHCO ₇	159	600
	Leche en polvo	25%	

IONICOS	COMPOSICIÓN	mMol/ml ó %v/v	± 10 mOsm/kg
Mounib modificado	NaHCO ₃	127	400
	Sacarosa	159	
	Glutación reducido	8	
Mounib modificado	NaHCO ₄	145	450
	Sacarosa	159	
	Glutación reducido		
Mounib modificado	NaHCO ₅	157	500
	Sacarosa	196	
	Glutación reducido		
Mounib modificado	NaHCO ₆	163	550
	Sacarosa	196	
	Glutación reducido		
Mounib modificado	NaHCO ₇	187	600
	Sacarosa	196	
	Glutación reducido		
Na	NaHCO ₃	250	400
Na	NaHCO ₄	300	450
Na	NaHCO ₅	350	500
Na	NaHCO ₆	400	550
Na	NaHCO ₇	450	600
Na-Tre	NaHCO ₃	200	400
	Trehalosa	100	
Na-Tre	NaHCO ₄	250	450
	Trehalosa	100	
Na-Tre	NaHCO ₅	300	500
	Trehalosa	100	
Na-Tre	NaHCO ₆	350	550
	Trehalosa	100	
Na-Tre	NaHCO ₇	400	600
	Trehalosa	100	
Na-Sac	NaHCO ₃	150	400
	Sacarosa	100	
Na-Sac	NaHCO ₄	200	450
	Sacarosa	100	
Na-Sac	NaHCO ₅	250	500
	Sacarosa	100	
Na-Sac	NaHCO ₆	270	550
	Sacarosa	100	
Na-Sac	NaHCO ₇	290	600
	Sacarosa	100	

Anexo 1. Composición y presión osmótica de los diluyentes desarrollados (continuación)

NO-IONICOS	COMPOSICIÓN	mMol/ml ó %v/v	± 10 mOsm/kg
Medaka fish extender	FBS	200	400
	Trehalosa	50	
Medaka fish extender	FBS	200	450
	Trehalosa	60	
Medaka fish extender	FBS	200	500
	Trehalosa	100	
Medaka fish extender	FBS	200	550
	Trehalosa	120	
Medaka fish extender	FBS	200	600
	Trehalosa	200	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> extender	Sacarosa	400	400
<i>Oncorhynchus mykiss</i> extender	Sacarosa	450	450
<i>Oncorhynchus mykiss</i> extender	Sacarosa	500	500
<i>Oncorhynchus mykiss</i> extender	Sacarosa	550	550
<i>Oncorhynchus mykiss</i> extender	Sacarosa	600	600
FBS-Sac	FBS	200	400
	Sacarosa	50	
FBS-Sac	FBS	200	450
	Sacarosa	60	
FBS-Sac	FBS	200	500
	Sacarosa	100	
FBS-Sac	FBS	200	550
	Sacarosa	150	
FBS-Sac	FBS	200	600
	Sacarosa	200	

