

T
922

AGENCIAS SERVICIOS DE INFORMACION

218

#



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO Y
CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMA DE LENGUADO
DE CALIFORNIA *Paralichthys californicus***

T E S I S

(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener en grado de

Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

BIÓL. GLADIS PARROQUÍN HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR: DR. ALEJANDRO CÓRDOVA IZQUIERDO

CO-DIRECTOR: DRA. CARMEN GUADALUPE PANIAGUA CHÁVEZ

ASESOR: DR. BENJAMÍN BARÓN SEVILLA

MÉXICO, D. F. A 15 DE OCTUBRE DE 2009

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez por haber estado presente en cada acierto y tropiezo y ser siempre un apoyo inigualable tanto a nivel personal como profesional. Gracias por compartir sus conocimientos.

Agradezco el apoyo al Dr. Benjamín Barón Sevilla porque siempre se mostró dispuesto y entusiasta al realizar comentarios y observaciones que aportaron mucho en esta investigación.

Muchísimas gracias al Dr. Héctor Castillo Juárez por las observaciones realizadas a esta tesis.

Infinitas gracias al Dr. Luis Arturo García Hernández por haber sido en todo momento un facilitador y apoyo invaluable así como un punto clave para la conclusión de esta tesis.

Un sincero agradecimiento al Biól. Mar. Adrián Celaya Ortega por haber participado activamente en la colecta y transporte de organismos.

Agradezco francamente al Oceanólogo Jesús Mariscal Medina por haberme ayudado en la obtención de la muestra de los reproductores.

Eternas gracias al Biól. José Alberto Ramírez Torrez por su apoyo incondicional, por los comentarios positivos, además de todas las invaluable observaciones hechas durante toda la investigación.

A mis queridas instituciones UAM y CICESE por haberme cobijado y tenido un lugar para mí, primero en la licenciatura y después en la maestría.

Al CONACyT por el apoyo económico a través de una beca durante la realización de este trabajo.

Gracias al Dr. Alejandro Córdova Izquierdo por el apoyo prestado.

Quiero externar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en mi formación y para la culminación de esta tesis.

Hay hombres que trabajan un día y son buenos...
Otros trabajan un año y son mejores...
Los que trabajan muchos años son excelentes...
Pero los que trabajan toda la vida son imprescindibles.

Bertolt Brecht

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi Mamá y hermana por ser siempre una fuente de motivación e inspiración inagotable.

A Jesús García por haber sido como un padre para mí, brindándome siempre su afecto de forma sincera y desinteresada.

A José Ángel Romero Santiago por todo su apoyo, amor y dedicación. Va por nuestra Némesis.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. Planteamiento del problema y justificación:	7
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVOS DEL PROYECTO	9
5. ANTECEDENTES	10
5.1. Información general del lenguado de California	10
5.2. Criopreservación de esperma de peces marinos	12
5.3. Criopreservación del esperma en las especies del orden pleuronectiformes (peces planos)	13
6. METODOLOGÍA	14
6.1. Obtención de los organismos	14
6.2. Obtención de la muestra espermática del lenguado de California	15
6.3. Medición de la densidad espermática	15
6.4. Evaluación de la calidad del esperma	16
6.5. Experimento 1: Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California	16
6.6. Experimento 2: Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo	17
6.7. Experimento 3: Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California	17
6.8. Experimento 4: Criopreservación del esperma de lenguado de California	18
6.9. Análisis de datos	20
6.9.1. Experimento 1: Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California	21
6.9.2. Experimento 2. Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo	21
6.9.3. Experimento 3. Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California	22
6.9.4. Experimento 4. Criopreservación del esperma de lenguado de California	22
7. RESULTADOS	22

7.1. Medición de la densidad celular	22
7.2. Experimento 1. Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California	23
7.3. Experimento 2: Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo	25
7.4. Experimento 3: Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California	26
7.5. Experimento 4: Criopreservación del esperma de lenguado de California	28
8. Discusión	30
8.1. Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California	30
8.2. Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo	31
8.3. Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California	35
8.4. Criopreservación del esperma de lenguado de California	37
9. CONCLUSIONES	41
10. Bibliografía	42
11. APÉNDICES	50
APÉNDICE A. Definiciones	50
APÉNDICE B. Procedimiento Estándar Operacional (PEO)	51
PEO-1. Obtención de la muestra espermática del lenguado de California	51
PEO-2. Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California	51
PEO-3. Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo	53
PEO-4. Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California	54
PEO-5. Criopreservación del esperma de lenguado de California	56
PEO-6. Descongelación del esperma de lenguado de California	58

RESUMEN

Debido a la sobreexplotación del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) en su forma silvestre, se han reportado reducciones en las poblaciones superiores a 80% en las costas de Baja California. Este organismo es considerado como un recurso pesquero de gran importancia biológica y económica en las costas del Pacífico mexicano y del sur de California en los Estados Unidos. Por su función biológica y el impacto económico es considerado un producto altamente rentable. En este contexto, el desarrollo de un protocolo de almacenamiento a corto y largo plazo del esperma del lenguado de California, resulta importante porque es una herramienta para el mejoramiento genético, mediante programas de cruces selectivas, producción de híbridos. La criopreservación también puede ayudar en la reducción de los costos de mantenimiento de reproductores, en la sincronización y repetición de los desoves, en el manejo de muestras de un lugar a otro y la posibilidad de conservar el material genético en los bancos de germoplasma. En este trabajo, antes de realizar los experimentos a corto y largo plazo, se evaluó la solución fisiológica óptima para mantener viable el esperma y se encontró que la solución de Richardson a 300 mOsm/kg permaneció inmóvil el esperma. Se realizó el almacenamiento del esperma a corto plazo fue suspendido en la solución de Richardson (300 mOsm/kg) y se guardó a 4°C hasta por 4 días. Se encontró que el esperma de lenguado puede ser almacenado en esta condición hasta por dos días con buen porcentaje de motilidad ($65 \pm 5\%$) e integridad de membrana ($80 \pm 6\%$). Para la criopreservación se realizaron varios experimentos preliminares. Finalmente, se escogió el siguiente protocolo: el esperma se suspendió en la solución fisiológica de Richardson (300 mOsm/kg) que contenía 10% G o 10% DMSO. Posteriormente, se procedió a llenar los popotes franceses (0.25 ml) los cuales fueron inmediatamente enfriados en una caja de unicel (poliestireno expandido), que contenía nitrógeno líquido (N_2L). Las muestras se colocaron sobre una malla de plástico a 6 cm de la superficie de N_2L por 10 minutos, posteriormente descendió la malla a 1 cm sobre la superficie de N_2L por 5 minutos, inmediatamente se sumergieron las muestras en N_2L y se depositaron en el tanque de almacenamiento (a una temperatura de $-196^\circ C$) por una semana. La descongelación se realizó a $37^\circ C$ por 3 segundos. Los parámetros monitoreados fueron la motilidad y la integridad de la membrana. Se encontró que el mayor porcentaje de motilidad se obtuvo en los organismos aclimatados en el laboratorio ($43 \pm 14\%$) y la mejor integridad de membrana ($54 \pm 12\%$) fue obtenido cuando las muestras se congelaron con 10% G.

Palabras claves: Almacenamiento a corto plazo, Criopreservación, Esperma, Lenguado de California, *Paralichthys californicus*.

Abstract

The overexploitation of the California halibut (*Paralichthys californicus*) in the wild, have reported reductions in populations of more than 80% on the coast of Baja California. The California halibut is regarded as a fishing resource of great biological and economic importance in the Mexican Pacific coast and southern California in the United States. The development of protocols for short and long-term storage of sperm of California halibut can help in genetic improvement programs such as cross breeding and production of hybrids. Also, it can help to reduce cost of broodstock management and in other reproduction procedures such as spawning synchronization, sample transportation. The storage of halibut sperm can help greatly in programs related to banking genetic resources. In this work, before short and long-term storage, optimum physiological solutions were determined. Were evaluated the optimal physiological solution to maintain viable sperm and found that the Richardson solution to 300 mOsm/kg remained immotile sperm. For short-term storage, sperm was suspended in Richardson solution (300 mOsmol/kg) and stored at 4°C for 4 days. It was found that the halibut sperm can be stored for 2 days with good percentage of motility ($65 \pm 5\%$) and membrane integrity ($80 \pm 6\%$). For long-term storage, different preliminary protocols were performed. The best protocol to cryopreserved California halibut sperm was as followed: the sperm was suspended in Richardson solution (300 mOsmol/kg) that contained 10% G or 10% DMSO. After suspension, the sperm was placed in 0.25 ml French straws and cooled immediately in a Styrofoam box (polystyrene), first equilibrated for 10 min at 6 cm above the liquid nitrogen surface approximately -180°C , and then equilibrated for 5 min on the surface of liquid nitrogen, and finally plunged into liquid nitrogen). Then, the samples were storage in liquid nitrogen (-196°C) for a week. The samples were thawed in a water bath (37°C) for 3 seconds. Motility and membrane integrity was recorded after and before cryopreservation. The high motility ($43 \pm 14\%$) and membrane integrity ($54 \pm 12\%$) was found when sperm was cryopreserved with 10% G.

Key words: Short term, cryopreservation, sperm, California halibut, *Paralichthys californicus*.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es uno de los principales proveedores de pescado y marisco en los mercados mundiales. A nivel mundial la acuicultura ha crecido anualmente en 7% superando cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal y se estima que seguirá creciendo según aumenten los ingresos económicos y el crecimiento urbano mundial (SOFIA-FAO, 2008).

La acuicultura representa una fuente adicional de proteína, contribuye a la seguridad alimentaria, a la generación de divisas, al fomento del desarrollo regional, a la creación de nuevas fuentes de empleo y a la reducción de la presión sobre los recursos naturales, particularmente en áreas costeras (SOFIA-FAO, 2008). Las exportaciones de pescado para consumo humano se han incrementado en un 57% desde 1996. En el año 2006, las exportaciones mundiales de pescado y productos pesqueros alcanzaron los 85,900 millones de dólares y para el 2007 el crecimiento fue de 92,000 millones de dólares. Hay una tendencia positiva para el comercio de pescado a largo plazo, debido a que cada vez es más frecuente que la producción de los países desarrollados y en vías de desarrollo llegue al mercado internacional (SOFIA-FAO, 2008).

En lo que corresponde a la producción a nivel mundial de peces planos, se reportó en 2002 una producción de 35,513 toneladas que mostró un notable incremento en 2004 de 109,342 toneladas (SOFIA-FAO, 2006). En México hay poca información acerca de las capturas del lenguado de California. Los reportes existentes mencionan que a mediados de los noventa, hubo reducciones superiores a 80% en las capturas totales multiespecíficas (*Citharichthys sordidus*, *C. stigmaeus*, *C. xanthostigma*, *Hippoglossina stomata*, *Paralichthys californicus*, *Hypsopsetta guttulata* y *Parophrys vetulus*) de lenguados en las costas de Baja California (Secretaría de Desarrollo Económico, S.F.). Sin embargo en Estados Unidos, en la región de California, los registros existentes desde 1916 son más precisos e incluyen las capturas que las flotas estadounidenses realizaban en aguas mexicanas durante el periodo de 1916 a 1967 (Ish y Stroman, 2006) (Figura 1).

El volumen de las capturas en California ha disminuido con el paso de los años de una producción de 2.13 millones de kg (4.7 millones de libras) en 1919 a una producción aproximada de 43,000 TM (1 millón de libras) a partir de 1995. Desde entonces, la producción se ha mantenido constante (Ish y Stroman, 2006).

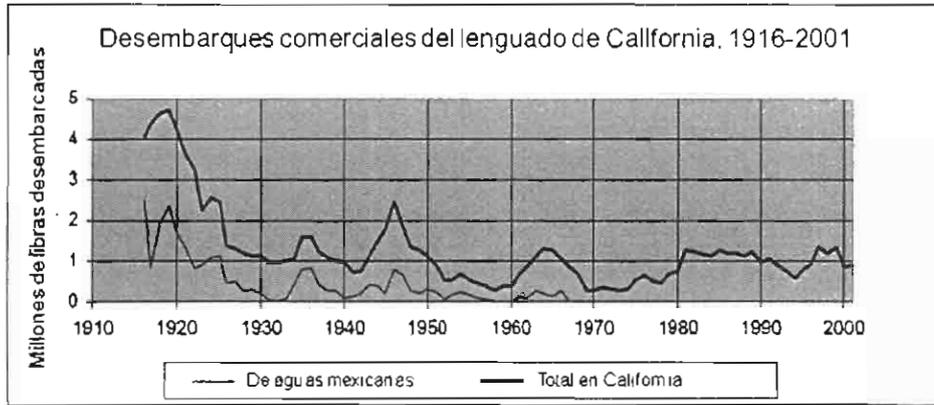


Figura 1. Desembarques anuales (libras) de la pesca comercial del lenguado de California, *Paralichthys californicus*, de 1916 al 2001 (Tomado y modificado de Ish y Stroman, 2006).

En general, a lo largo del tiempo se han registrado fluctuaciones y descensos importantes en las capturas del lenguado de California, lo que probablemente se puede deber a las presiones de pesca con fines recreativos y comerciales, a la degradación del hábitat por efecto antropogénico y al desconocimiento de la dinámica poblacional del lenguado (Plummer *et al.*, 1983; Caddell *et al.*, 1990). Además, no son claras las evaluaciones de degradación e impacto ambiental o la presión de la pesca sobre la abundancia de los lenguados (Ish y Stroman, 2006).

Una alternativa para aumentar la producción de juveniles en los cultivos de lenguado es la criopreservación de esperma, ya que se podría incrementar la disponibilidad de esperma de calidad por tiempo indefinido (Blaxter *et al.*, 1953).

La criopreservación consiste en congelar células, tejidos u otro material biológico a temperaturas muy bajas (-79°C a -196°C) manteniéndolos genéticamente estables y metabólicamente inertes.

Antes de que se lleve a cabo la congelación, convencionalmente se le añadan crioprotectores a la solución fisiológica en la que se suspenden las células, porque ayudan a conservar su integridad (Denniston *et al.*, 2000). Comúnmente se utilizan crioprotectores que penetran a través de la membrana como el glicerol, DMSO, metanol y *n, n*-dimetil acetamida, en diferentes concentraciones y tiempos de equilibrio, que es tiempo de exposición de las células en los crioprotectores (Suquet *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2000; Dreanno *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1999).

Cuando las células se exponen a temperaturas inferiores a 0°C , el modo en que recuperan el equilibrio depende del ritmo de enfriamiento y de su permeabilidad al agua. Si la tasa de enfriamiento es lenta o si la permeabilidad al agua es elevada, las células se equilibran por la transferencia del agua intracelular hacia el hielo externo, se equilibran por deshidratación; pero si son enfriadas rápidamente o si su permeabilidad al agua es baja, éstas se van a equilibrar, en parte, por congelación intracelular (Mazur, 1970).

La presencia de hielo extracelular, aunque puede deformar las células, no causa ruptura de la membrana plasmática ni tampoco daños irreversibles. Por el contrario, la formación intracelular de cristales de hielo provoca lesión y muerte de la célula (Bromage y Roberts, 1995). Dado que la formación de hielo intracelular es dependiente del ritmo de congelación y descongelación, el estricto control de la tasa de descenso y aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intracelular. Sin embargo, si el ritmo de congelación es extremadamente rápido el hielo intracelular está constituido por microcristales de hielo que al descongelar las células se unen entre sí y forman cristales de mayor tamaño (Mazur, 1984).

En general, en las especies de agua dulce, aproximadamente entre el 40 y el 90% de los espermatozoides se dañan después de la criopreservación, mientras que para las especies marinas sólo entre el 10 y el 20% de los espermatozoides se dañan (Tiersch y Mazik, 2003; Kopeika *et al.*, 2007). Es probablemente que la diferencia entre estos dos grupos sea el resultado de la evolución de sus propiedades celulares, desarrolladas bajo la presión de su entorno de nicho. Una posible explicación es que los espermatozoides de las especies marinas no son dañados por el aumento de la osmolaridad y lo pueden tolerar fácilmente durante el tratamiento con los crioprotectores y la criopreservación. Mientras que el espermatozoides de los peces de agua dulce no están adaptados al aumento de la osmolaridad y por lo tanto el estrés al que están sujetos durante el equilibrio de los crioprotectores y la criopreservación ocasiona daños (Kopeika *et al.*, 2007). Se ha reportado después del descongelamiento una alta variabilidad entre especies de peces y entre organismos dentro de la misma especie (Babiak *et al.*, 1997).

Hasta la fecha, se han desarrollado protocolos de criopreservación en alrededor de 200 teleósteos (Suquet *et al.*, 2000), de los cuales 32 son para especies marinas (Tiersch, 2000, Ritar y Campet, 2000). En las que se incluye algunas especies de lenguados como el lenguado del Japón *Paralichthys olivaceus* (Zhang *et al.*, 2003), el lenguado manchado *Verasper variegatus* (Tian *et al.*, 2008), el lenguado de Brasil *Paralichthys orbignyanus* (Lanes *et al.*, 2008) y el lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus* L (Babiak *et al.*, 2008). Sin embargo, los protocolos de criopreservación varían con cada especie y actualmente no se dispone de un protocolo específico para la criopreservación del lenguado de California. Por lo que es importante desarrollar estos protocolos para disponer de espermatozoides de lenguado de California a corto y largo plazo.

2. Planteamiento del problema y justificación:

El lenguado de California es un recurso aprovechado por la pesca deportiva y comercial de los Estados Unidos y México. Esta es la especie más importante para el Pacífico mexicano (Gadomski *et al.*, 1990; Hammann y Ramirez, 1990). Su carne es muy apreciada por los restaurantes gourmets debido a su textura y sabor (Biennial Report, 2004); además, contiene proteínas y lípidos de gran calidad. En Ensenada, B. C., el kilogramo de lenguado oscila entre 5 y 10 dólares (Com. Per. Vendedores del mercado negro, Ensenada). Mientras que en el comercio internacional su precio fluctúa entre 10 y 30 dólares, dependiendo de la presentación y de la época del año (Cervantes-Trujano *et al.*, 2002). El lenguado de California es también un excelente candidato para cultivo porque cuando son adultos, se mantienen en el fondo del lecho marino o de los tanques, lo que les permite tener una alta tasa de conversión de alimento. Otra característica ventajosa es que son muy tolerantes a altas densidades en los cultivos (Biennial Report, 2004).

A pesar de las ventajas que confiere este pez, en México, las capturas de lenguado han disminuido en 33% en los últimos diez años (Secretaría de Desarrollo Económico, S.F.). En Estados Unidos, para controlar esta disminución, se ha reglamentado la talla mínima de captura que es de 2 kg y 56 cm (Ish y Stroman, 2006). Sin embargo, en México no hay ningún tipo de restricción que proteja la pesquería multiespecífica de los peces planos.

Actualmente, la disponibilidad de gametos para realizar el cultivo de esta especie está sujeta a su ciclo reproductivo natural que es de febrero a agosto con un pico reproductivo en mayo (Allen, 1990). Una opción para obtener gametos, es la extracción de organismos maduros del medio natural o del cultivo en cautiverio.

Una alternativa para obtener juveniles del lenguado (semilla) en cualquier época de año es el incorporar la criopreservación como una herramienta para disponer de esperma de calidad en cualquier temporada del año, lo que a su vez contribuirá a lograr avances en el campo de la producción y de la investigación, ya que se podrían efectuar programas de selección genética que faciliten así la conservación de la variabilidad genética en las poblaciones cultivadas (Herzka *et al.*, 2003). También se facilitaría el transportarte del esperma a nivel nacional e internacional (Suquet *et al.*, 2000).

Para que se dé la incorporación de estas tecnologías en el sector acuícola se deben optimizar los protocolos a fin de de que se obtengan tasas de sobrevivencia adecuadas y un desarrollo normal de las larvas, en comparación con las obtenidas en los sistemas intensivos y en caso de ser necesario, contribuir al repoblamiento del lenguado.

Si se lograra incorporar esta tecnología en la producción y reproducción del lenguado, los costos de operación se reducirían, lo que resultaría en un impacto positivo y directo en el sector acuícola y en la generación de nuevos empleos que beneficien a la región de Baja California y a otros estados de la Republica Mexicana, generando mayores inversiones en el sector productivo. Asimismo, contribuiría a disminuir el impacto de la extracción de estos organismos de su ambiente natural.

3. HIPÓTESIS

- Una vez encontrados los parámetros óptimos (la solución fisiológica, el tipo y concentración del crioprotector, la tasa de congelación y la tasa de descongelación) se conseguirá criopreservar el esperma de lenguado de California.

4. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivos Generales:

- Conservar el esperma de lenguado de California a corto plazo para la fertilización artificial.
- Criopreservar el esperma del lenguado de California para tener disponibilidad de este recurso genético durante todo el año.

Objetivos particulares:

- Definir la solución fisiológica óptima para mantener viable el esperma del lenguado de California *P. californicus*.
- Conocer el tiempo máximo de almacenamiento para el esperma del lenguado de California *P. californicus* a corto plazo.
- Evaluar el efecto citotóxico de dos crioprotectantes (glicerol, DMSO) en tres concentraciones diferentes (5%, 10%, 15%) sobre el esperma del lenguado de California *P. californicus*.
- Establecer un protocolo óptimo para la criopreservación de esperma de lenguado de California *P. californicus*.

5. Antecedentes

5.1. Información general del lenguado de California

Desde el punto de vista taxonómico, los peces planos se han agrupado en el orden Pleuronectiformes. Se reconocen 15 familias, con 121 géneros y 716 especies (Munroe, 2005). La familia Paralichthyidae cuenta con 11 géneros y 95 especies, entre las que se ubica el lenguado de California, *Paralichthys californicus*.

Los peces planos (Pleuronectiformes) se distribuyen a nivel mundial y toleran amplios intervalos ambientales, desde hábitats dulceacuícolas, estuarinos y en los bordes continentales de todos los océanos (Munroe, 2005).

El lenguado de California *Paralichthys californicus* se distribuye en el Pacífico oriental, desde Bahía Magdalena, Baja California, hasta el Río Quillayute en Washington (Kukas y Hassler, 1986).

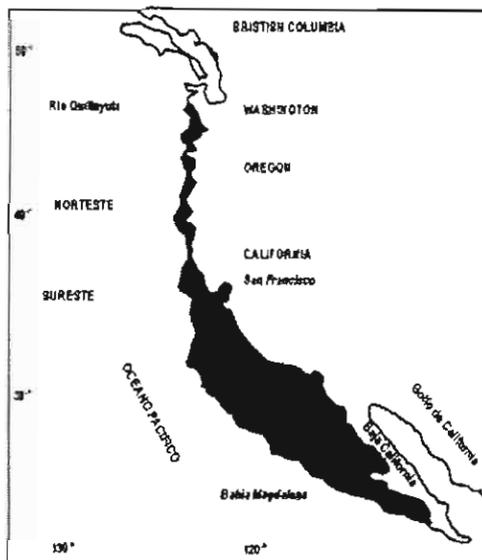


Figura 2. Distribución del lenguado *Paralichthys californicus* (Tomado y modificado de Kukas y Hassler, 1986).

Las principales zonas de desove para el lenguado de California son desconocidas. En primavera, los lenguados emigran de las aguas relativamente profundas en alta mar a las aguas costeras someras (Kukas y Hassler, 1986). Los desoves se dan de febrero a julio (Ginsburg, 1952) a una profundidad de 5 a 18 m (Young, 1960) y la fertilización de los óvulos es externa. Después del desove el adulto regresa a profundidades entre 40 y 100 m (Ginsburg, 1952).

En la primera etapa de vida, antes de la metamorfosis, los lenguados son muy similares al resto de los teleósteos en el tamaño y en las características anatómicas. El desarrollo de los peces planos incluye una metamorfosis singular con características morfológicas y fisiológicas asociadas con migración del ojo, la rotación de algunos órganos a 90°, la postura y pigmentación asimétrica. Estas larvas tienen cambios de comportamiento asociados con la transición de la vida pelágica a la bentónica (Gisbert *et al.*, 2002).

La mayoría de las hembras se encuentran sexualmente maduras a los 430 mm de longitud total (Frey, 1971) y a la edad de 2 a 3 años (Ish y Stroman, 2006), mientras que los machos maduran cuando tienen una longitud total de 230 mm o cuando tienen de 4 a 5 años de edad (Figura 3). Todos los organismos están maduros a los 7 años de edad (Ish y Stroman, 2006). Allen, (1990) reportó que el lenguado de California llega a vivir hasta 30 años, alcanzando una longitud de total 152 cm y un peso de 33 kg.

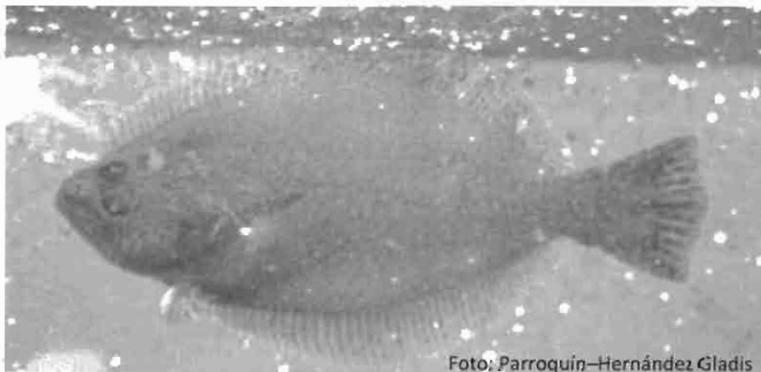


Figura 3. Adulto macho del lenguado de California *Paralichthys californicus* de ~ 30 cm.

5.2. Criopreservación de esperma de peces marinos

Se ha documentado la criopreservación del esperma de al menos 200 especies de peces (Suquet *et al.*, 2000). El primer reporte de criopreservación fue hecho en el arenque (Blaxter, 1953), conforme se expande el cultivo de peces marinos se ha incrementado el conocimiento de la biología del esperma y con ello una creciente necesidad de aplicar los protocolos de criopreservación del material genético para aumentar la disponibilidad de gametos más tiempo (Billard *et al.*, 1995).

He y Woods III (2004) en la lobina estriada (*Morone saxatilis*) encontraron que la membrana plasmática intacta y la función mitocondrial son atributos importantes en la capacidad de fecundación en esta especie. También investigaron el efecto de estos parámetros a diferentes concentraciones de DMSO (2.5, 5 o 10%), hallando que la función mitocondrial decreció ($P < 0.05$) con el incremento del DMSO.

Jodun *et al.* (2006) criopreservaron esperma de salmón (*Salmon salar*) incorporando yema de huevo en metanol al 10% en el diluyente para obtener una protección adicional durante los procesos de descongelación, y observaron un incremento en la tasa de sobrevivencia de 72.9% a 83.5%.

Wayman *et al.* (1998) criopreservaron esperma de la curvina (*Sciaenops ocellatus* L) y observaron que no hay diferencias significativas en la motilidad después de la descongelación, cuando utilizaron diferentes concentraciones de DMSO. Las temperaturas de congelación-descongelación son específicas, aunque la curvina tiene con un amplio intervalo de tolerancia, ya que no se encontró un efecto significativo en la motilidad.

5.3. Criopreservación del esperma en las especies del orden pleuronectiformes (peces planos)

Pullin (1972), criopreservó esperma de *Pleuronectes plateas*, empleó una temperatura de congelamiento de -79 y -196 °C. La motilidad fue de 39% y la media de fertilización fue de 20%, mientras que para el esperma fresco la motilidad fue de 41% y la media de fertilización fue de 25%.

Richardson *et al.* (1999) no encontraron diferencias significativas entre la tasa de eclosión cuando utilizaron esperma fresco de lenguado cola amarilla *Pleuronectes ferrugineus* en comparación con el esperma criopreservado en popotes de 1.7 ml.

Rideout *et al.* (2003) diluyeron el esperma de *Pseudopleuronectes americanus* en solución fisiológica en una proporción 1:3, lo combinaron con diferentes crioprotectores y encontraron que la mejor combinación fue con glicol propileno, ya que se observó una alta motilidad del esperma descongelado, en contraste con las muestras de esperma que contenían DMSO y glicerol. Por otra parte, también realizaron pruebas con dos diluyentes (base sucrosa y base salina) y con tres crioprotectores, la mejor combinación fue obtenida con DMSO base sucrosa, mientras que entre las otras combinaciones no encontraron diferencias en la motilidad después de la descongelación.

Zhang *et al.* (2003) criopreservaron esperma del lenguado japonés, *Paralichthys olivaceus*, en los crioprotectores DMSO, Glicerol (G) y metanol, en concentraciones de 12% y obtuvieron los mejores resultados con 12% de G, ya que se cuantificaron las mejores tasas de fecundación 48.18 ± 25.7 .

Lanes *et al.* (2008) evaluaron la eficiencia de dos diferentes criosoluciones para criopreservar esperma del lenguado de Brasil, *Paralichthys orbignyanus* y después de descongelar el esperma cuantificaron altos porcentajes de espermatozoides vivos en la muestras con glicerol-salino. Además de una correlación positiva entre el esperma motil y el porcentaje de esperma vivo.

Tian *et al* (2008), criopreservaron esperma del lenguado manchado, *Verasper variegatus*, utilizando la solución fisiológica TS-2 con 13.3 % de DMSO y TS-2 con 13.3% de glicol propileno. No encontraron diferencias significativas entre el esperma fresco y el descongelado, los porcentajes de fertilización y de eclosión fueron 34.52 ± 10.92 y 23.53 ± 11.80 respectivamente.

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de los organismos

La presente investigación se realizó en dos periodos, de mayo a julio de 2008 y de mayo a julio de 2009, en el Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Los experimentos se llevaron a cabo con organismos del medio natural y organismos aclimatados previamente en el laboratorio de Reproducción de Peces Marinos. Mientras que el procesamiento de las muestras se efectuó en el Banco de Germoplasma de Especies Acuáticas.

Las muestras de esperma se obtuvieron de organismos capturados por pescadores riverieños en el Ejido Erendira y de organismos previamente recolectados y aclimatados en el laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del CICESE. El procesamiento de las muestras se efectuó en el Banco de Germoplasma de Especies Acuáticas.

Los organismos del medio natural fueron capturados con redes agalleras con una luz de malla de 8 pugadas en el ejido Erendira, B.C. ($31^{\circ} 16' 24.6''$ N y $116^{\circ} 22' 43.8''$ W). Para la colecta de los organismos los pescadores tendieron las redes un día antes de ser extraídos y transportados al laboratorio de Reproducción de Peces Marinos, en el CICESE. Una vez que los organismos llegaron a la playa se procedió a medirlos y valorar sus condiciones de salud y fueron seleccionados los organismos que

presentaban las mejores condiciones. Para el transporte, los organismos se colocaron en un estanque de 1000 l que contenía 250 l de agua de mar y aireación. Posteriormente se obtuvo la muestra de esperma como se describe en el apartado 6.2.

Los organismos aclimatados en el laboratorio, primero se capturaron con redes de prueba para camarón, en el estero de Punta Banda (31° 41' 44.91" N y 116° 37' 39.65 "W), posteriormente fueron transportados (en un tanque de 500 l provisto de oxígeno) al laboratorio de Reproducción de Peces Marinos del CICESE. Se mantuvieron un año en el sistema de recirculación de 17600 l, a una temperatura promedio de 20°C, la concentración de oxígeno disuelto en el agua fue de 8 mg/l y salinidad de 34 ‰. Se alimentaron cada tres días con una ración equivalente al 1% de su masa corporal, se utilizó alimento para el trucha (steel head, Silver Cup) con 45% de proteínas y 16 % de lípidos. Se procedió a realizar la obtención de la muestra como se describe en el punto 6.2.

6.2. Obtención de la muestra espermática del lenguado de California

La muestra de esperma se obtuvo por presión abdominal, para evitar la contaminación con orina o heces, la región abdominal y el poro genital de los organismos fueron secada con papel absorbente y algodón (Apéndice B, PEO-1). Posteriormente se aplicó presión abdominal e inmediatamente el esperma fue aspirado con una jeringa de 3 ml y se almacenó a 4°C, para ser utilizado posteriormente.

6.3. Medición de la densidad espermática

Para realizar la medición de la densidad celular se suspendió el esperma en la solución de Richardson 300 mOsm/kg en una proporción 1:1000 volumen:volumen y se realizó un conteo en una cámara de Neubauer con un microscopio Nikon, Eclipse 80-i con un aumento de 400X. Los conteos se realizaron por duplicado.

6.4. Evaluación de la calidad del esperma

La motilidad del esperma se definió como el porcentaje de espermatozoides que se desplazan activamente hacia adelante.

La viabilidad espermática se definió como el porcentaje de células que tenían la membrana citoplasmática íntegra. Para realizar esta evaluación, se utilizó el kit de tinción fluorescente dual LIVE/DEAD® (Molecular Probes, USA). Se tomó una alícuota de cada tratamiento y se aforó a 500 μ l. Posteriormente se le añadió 2.5 μ l de SYBR 14 (concentración final de 10 nM) y se incubó por 10 min en la oscuridad. Después se le agregó 2.5 μ l de yoduro de propidio (concentración final de 12 μ M) y se dejó incubar por otros 10 min en la oscuridad. Se tomó una alícuota de 10 μ l y se colocó en un portaobjeto e inmediatamente se cubrió con un cubreobjetos para ser observada en el microscopio de fluorescencia. Las observaciones se realizaron con un aumento de 1000X, con ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 80-i) equipado con una lámpara de mercurio de alta presión (modelo LH-M100C-1) y un filtro de excitación de 450-490 nm. Se tomaron fotografías de las muestras con una cámara digital (EVOLUTION® VF, Media Cybernetics). Se contaron por duplicado 100 células por organismo para evaluar el porcentaje de células viables (las células con la membrana citoplasmática intacta serán teñidas de verde por el colorante SYBR 14) y células no viables (las células con la membrana citoplasmática rota serán teñidas de rojo por el colorante yoduro de propidio). El principio de la tinción se describe en el Apéndice B, PEO-7.

6.5. Experimento 1: Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California

Para definir la mejor solución desactivadora, se utilizaron las soluciones propuestas por Richardson *et al.*, 1999 y Zhang *et al.*, 2003. Las soluciones se prepararon a diez osmolaridades (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mOsmol/kg). La

osmolaridad de las soluciones fue valorada con un osmómetro de presión de vapor (Wescor 5500). Cada medición se realizó por duplicado. Las soluciones fueron guardadas a 4°C antes de ser utilizadas en los experimentos. (Apéndice B, PEO-2).

La movilidad del esperma se registró en muestras de esperma sin suspender (control), en muestras suspendidas en las soluciones desactivadoras y en muestras reactivadas con la solución activadora (agua de mar filtrada 1000 mOsmol/kg, 35 ‰). La motilidad se evaluó de la siguiente manera: en un portaobjeto se colocaron 2 µl de esperma fresco y se mezclaron con 4 µl de una de las soluciones desactivadoras. Inmediatamente se observó en el microscopio la actividad. Después se agregaron 8 µl de agua de mar filtrada para activar la movilidad del esperma. Este procedimiento se repitió con todas las soluciones y se eligió la solución que mantuvo al esperma desactivado, pero que al ser reactivado con agua de mar se observara motilidades > 50%.

6.6. Experimento 2: Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo

El esperma fue colocado en una solución desactivadora (1:2) y se almacenó a 4°C dentro de tubos de 1.5 ml por 4 días. La motilidad se evaluó en días alternos tomando una alícuota con 0.5 µl de esperma y 10 µl de agua de mar. La viabilidad del esperma se evaluó siguiendo los procedimientos descritos en 7.4 (Apéndice B, PEO-3). Cada medición se realizó por duplicado.

6.7. Experimento 3: Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California

Para definir el mejor crioprotector, se seleccionaron dos reactivos: sulfóxido de metilo (DMSO) y glicerol (G) en tres concentraciones diferentes (5, 10 y 15%). Previo al experimento, se prepararon los crioprotectores en una solución desactivadora elegida

previamente en el experimento anterior (Apéndice B, PEO-4). Las soluciones crioprotectoras se guardaron en un refrigerador a 4° C antes de ser utilizadas en los experimentos.

Uno de los principales problemas para evaluar la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California, es que todas las soluciones crioprotectoras alcanzaron > 1000 mOsm/kg lo cual activa el esperma y no permite evaluar el efecto citotóxico de éstos en la motilidad inicial. De tal manera que para valorar el efecto de los crioprotectores en la motilidad del esperma, se decidió encontrar el tiempo en que el esperma, ya activado por el crioprotector, pierde el 50% de su actividad. Previo a la experimentación, se evaluó el tiempo que tarda el esperma fresco en perder motilidad cuando este es activado con agua de mar.

De tal manera que para los experimentos, el esperma se suspendió en cada uno de las soluciones crioprotectoras y se tomó una alícuota (10 µl) de cada tratamiento para ser observada en el microscopio Nikon, Eclipse 80-i con un aumento de 400X. Inmediatamente, se procedió a evaluar la motilidad inicial (motilidad del esperma al momento de haberse agregado la solución crioprotectora) y el tiempo en el que el esperma activado pierde el 50% de su motilidad inicial. La viabilidad del esperma se evaluó siguiendo los procedimientos descritos anteriormente y en el Apéndice B, PEO-3. Cada medición se realizó por duplicado.

6.8. Experimento 4: Criopreservación del esperma de lenguado de California

Inicialmente se empleó el protocolo propuesto por Zhang *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Se suspendió el esperma en la solución fisiológica de Zhang valorada a 900 mOsm/kg ó 100 mOsm/kg. Para ambas soluciones se emplearon ambos crioprotectores 10% G y 10% DMSO enfriadas previamente a 4° C. Posteriormente los popotes franceses se llenaron con 0.25 ml y se incubaron por 10 minutos e inmediatamente se realizó el congelamiento en el tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido (Taylor-Wharton, HC-35) a una temperatura de -15, -40, -80, -110 y

-160°C manteniéndolos por 2 min en cada temperatura. Posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido (N₂L, -196°C). Las muestras fueron almacenadas por 2 semanas a -196°C. Transcurrido este periodo la descongelación se realizó a 35°C por 30 s y a 28°C por 15 s.

El segundo protocolo que se empleó fue el propuesto por Lanes *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Primeramente, se suspendió el esperma en la solución fisiológica de Richardson preparada y valorada a 900 mOsm/kg ó 100 mOsm/k. Para ambas soluciones se emplearon los crioprotectores 10% G y 10% DMSO enfriados previamente a 4°C. Posteriormente se llenaron los popotes franceses con 0.25 ml e inmediatamente se procedió a realizar la congelación en una cámara manual (caja de poliestireno). La caja contenía N₂L en su interior, y las muestras se colocaron a 6 cm sobre la superficie de N₂L por 10 minutos y posteriormente las muestras fueron colocadas a 1 cm sobre la superficie de N₂L manteniéndolos por 5 minutos. Después las muestras fueron sumergidas inmediatamente en N₂L para finalmente depositarlas en el tanque de almacenamiento (Taylor-Wharton, HC-35) por 2 semanas a -196°C. La descongelación de las muestras se realizó a 37°C por 30 s (Apéndice B, PEO-6).

Se utilizó un tercer protocolo para la congelación. El esperma se suspendió en la solución fisiológica de Richardson, preparada y valorada a 300 mOsm/kg y con los crioprotectores 10% G y DMSO. Posteriormente, se procedió a llenar los popotes franceses con 0.25 ml y sin tiempo de equilibrio, usando el método de los tres pasos (Apéndice B, PEO-5), propuesto por Chen *et al.*, 2004. La congelación de las muestras se llevó a cabo en una caja de poliestireno (29.5 x 20 x 19 cm). La caja se llenó con 7.5 cm de nitrógeno líquido (N₂L) y los popotes se colocaron sobre una malla de plástico a 6 cm de la superficie de N₂L por 10 minutos (aproximadamente -180°C) y fueron enfriadas con el vapor de N₂L (Figura 4). Posteriormente la malla se colocó a 1 cm sobre la superficie de N₂L por 5 minutos y finalmente se sumergieron en N₂L. Después de 5 minutos de mantener las muestras en N₂L, los popotes fueron colocados en contenedores plásticos e insertados en cañas, para finalmente depositarlos en el tanque de almacenamiento (-196°C) (Taylor-Wharton modelo HC-35) por un periodo

aproximado de 1 semana. Los popotes se descongelaron sumergiéndolos en un baño de agua a 37°C por 3 segundos o hasta ver que los cristales de hielo desaparecieron (Apéndice B, PEO-6).

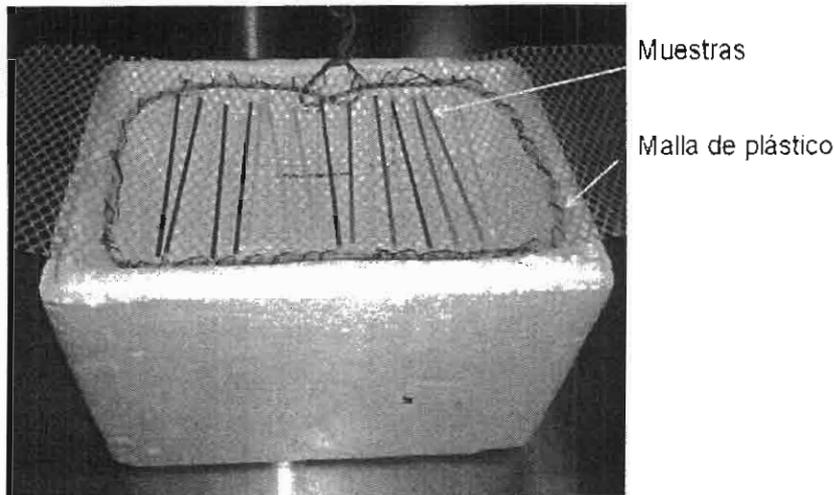


Figura 4. Congelación del esperma de lenguado en una caja de poliestireno expandido (cámara manual).

Se registro la motilidad del esperma sin suspender (control) y las muestras descongeladas, de la siguiente manera en un portaobjetos se colocó 0.5 μ l de esperma y 10 μ l de agua de mar. Inmediatamente se observó en el microscopio Nikon, Eclipse 80-i con un aumento de 400X para ver el porcentaje de esperma activado. La integridad de la membrana del esperma congelado y descongelado se evaluó siguiendo los procedimientos descritos en 6.4. Cada medición se realizó por duplicado.

6.9. Análisis de datos

Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimentos fueron normalizados utilizando la transformación arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción (Zar, 1996). Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad y homoscedasticidad utilizando el paquete estadístico Statistica 8 (Statsoft, 2007), y una vez cumplidos estos supuestos,

se realizó el análisis de varianza correspondiente ($p \leq 0.05$). Posteriormente, para detectar diferencias significativas entre los tratamientos se efectuó la prueba de comparación de medias de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$).

Sin embargo para la variable independiente del tiempo en que decreció la motilidad en un 50%, no se realizó la transformación de los datos, ya que los resultados se dan en segundos y no en proporción. Una vez cumplidos los supuestos de normalidad y homocedasticidad se realizó el análisis de varianza correspondiente ($p \leq 0.05$).

6.9.1. Experimento 1: Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California

Para definir la mejor solución desactivadora, se realizó un análisis de varianza de dos vías, en donde la variable independiente fue las soluciones fisiológicas (Zhang y Richardson) con once niveles (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mOsm/kg), y la variable dependiente fue la motilidad. Para detectar diferencias significativas se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$). Estos análisis se efectuaron cuando el esperma se suspendió en las soluciones desactivadoras y posteriormente que el esperma fue resuspendido en agua de mar.

6.9.2. Experimento 2. Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo

Se realizó un análisis de varianza de tres vías; en donde las variables independientes fueron el lugar de procedencia, los días de almacenamiento y las diluciones, mientras

que la variable dependiente fue la motilidad. Para el análisis estadístico de la viabilidad se consideraron las mismas variables independientes.

6.9.3. Experimento 3. Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California

Se realizó un análisis de varianza de dos vías; en donde las variables independientes fueron los crioprotectores y las concentraciones de los crioprotectores mientras que la variable dependiente fue la motilidad. Para el análisis estadístico del tiempo en que decreció la motilidad en un 50% se consideraron las mismas variables independientes.

6.9.4. Experimento 4. Criopreservación del esperma de lenguado de California

Se realizó un análisis de varianza de dos vías; en donde las variables independientes fueron el lugar de procedencia y los crioprotectores. Mientras que la variable dependiente fue la motilidad. Para el análisis estadístico de la viabilidad se consideraron las mismas variables independientes.

7. RESULTADOS

7.1. Medición de la densidad espermática

Se obtuvo de 100 a 1700 μl de esperma del lenguado por muestra con una concentración del semen de 8×10^9 a 20×10^9 espermatozoides/ml.

7.2. Experimento 1. Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del espermatozoide del lenguado de California

No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de desactivación del espermatozoide del lenguado de California con las soluciones de Zhang o Richardson a 300 mOsm/kg ($P > 0.05$). El espermatozoide suspendido en las concentraciones de 100 a 300 mOsm/kg se mantuvo 100% desactivado (Figura 5). Las concentraciones > 300 mOsm/kg provocaron la activación de los espermatozoides en una relación creciente con respecto al incremento en la concentración osmótica, aunque esta relación no fue proporcional. Los espermatozoides activados se movieron vigorosamente.

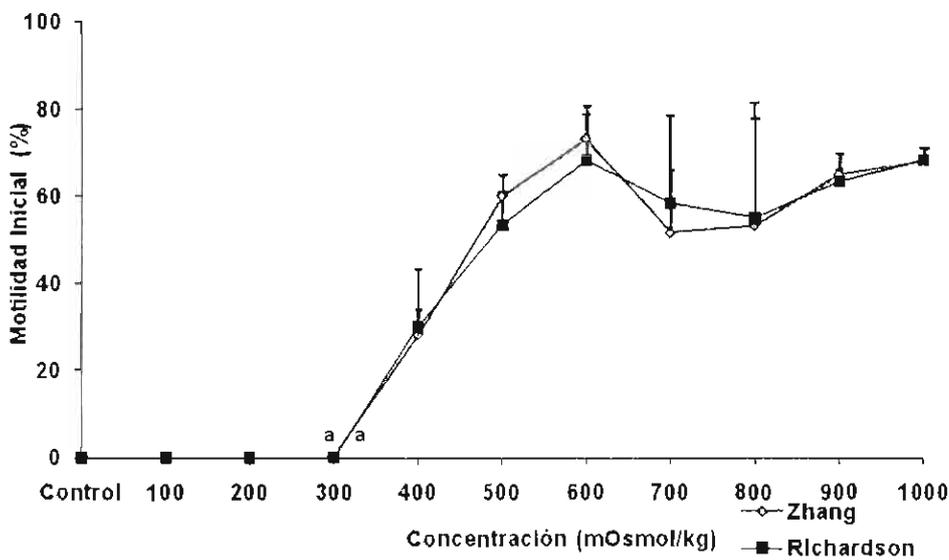


Figura 5. Porcentaje de motilidad promedio del espermatozoide de lenguado de California después de la exposición a las soluciones fisiológicas de Zhang o Richardson, preparadas a diferentes concentraciones osmóticas. El control representa espermatozoide concentrado no activo, $n = 3$. Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significan que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

La motilidad fue activada al momento de resuspender el esperma en agua de mar (Figura 6). El esperma suspendido en las soluciones fisiológicas a 100 mOsmol/kg tuvo las más bajas motilidades (< 20%) al momento de ser reactivados. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la motilidad del esperma suspendido en la solución de Zhang o Richardson (300 mOsm/kg) después de haberlo activado con agua de mar. Por lo que para los siguientes experimentos se utilizó la solución de Richardson a 300 mOsm/kg.

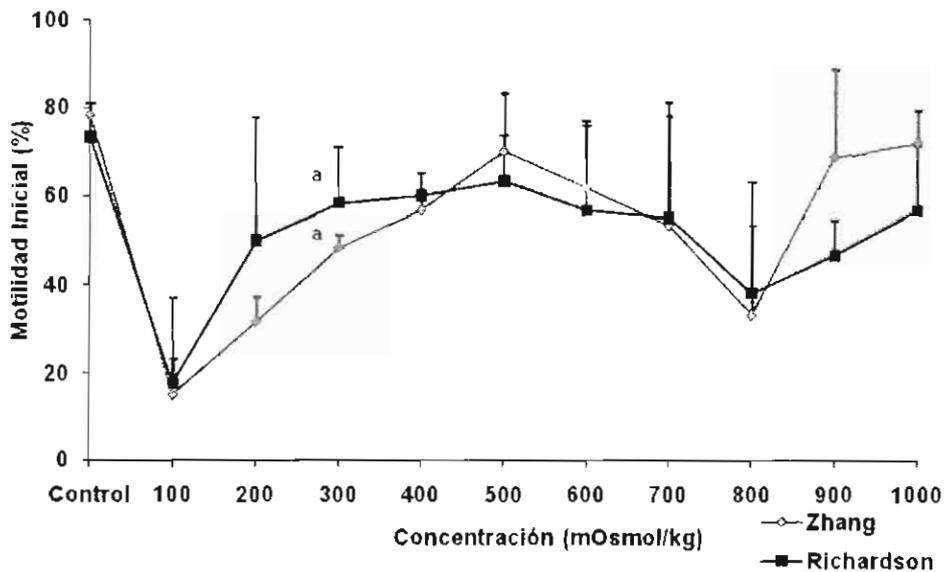


Figura 6. Porcentaje de motilidad promedio del esperma de lenguado de California, después de la reactivación con agua de mar filtrada. $n = 3$. Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

7.3. Experimento 2: Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo

Se encontraron diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento del esperma ($P < 0.05$). Para los organismos del medio natural, se pudo almacenar el esperma hasta por dos días ya sea concentrado o suspendido (Figura 7). Sin embargo, el esperma de los organismos aclimatados en el laboratorio sólo se pudo almacenar por

dos días si fue suspendido. El mayor porcentaje de motilidad en las muestras concentradas ($83\% \pm 10$) y en las suspendidas ($53\% \pm 8$) se obtuvo en el día 0. Mientras que la mínima motilidad ($24\% \pm 5$) fue registrada al día 4 el espermatozoos suspendido proveniente de organismos del medio natural.

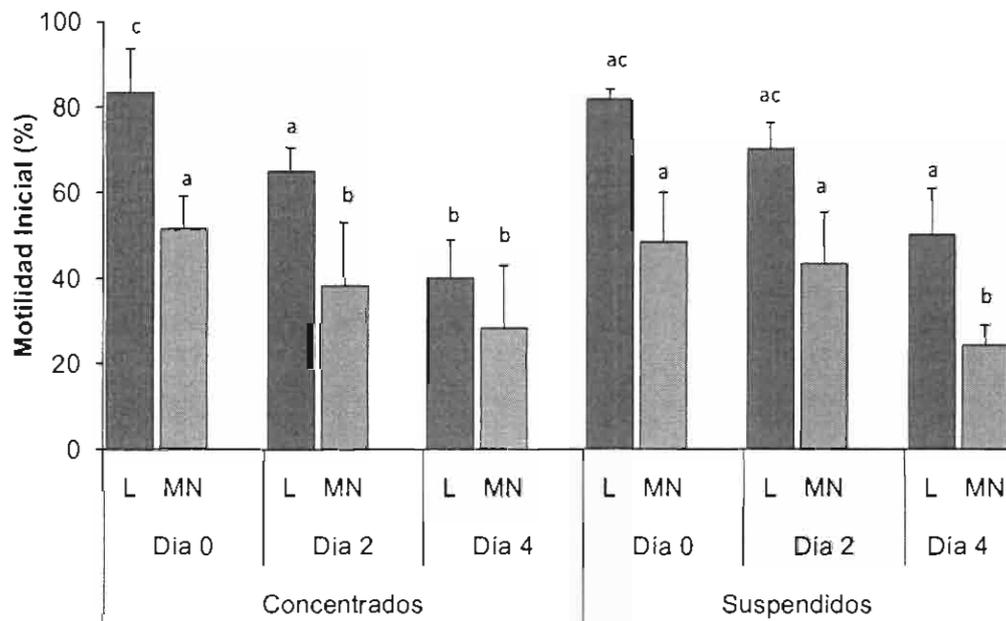


Figura 7. Porcentaje de motilidad registrada en espermatozoos almacenado por 4 días a 4°C. El espermatozoos fue suspendido en solución Richardson (300 mOsm/kg), n = 3. L= organismos previamente aclimatados en el laboratorio. MN= organismos del Medio Natural (Ejido Eréndira, B. C). Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas en la integridad de la membrana del espermatozoos de los organismos provenientes del medio natural ($P > 0.05$) al comparar los diferentes tiempos de almacenamiento. Indicando que la integridad de la membrana no se perdió durante los 4 días que se mantuvo el espermatozoos almacenado (Figura 8). Sin embargo, para el espermatozoos de los organismos aclimatados en el laboratorio la integridad de la membrana se mantuvo intacta por sólo 2 días. La mayor integridad de membrana se registró en los organismos del laboratorio en el día 0 ($89\% \pm 3$). Mientras que la

minima ($57\% \pm 8$) se registró el día 4 para el esperma suspendido proveniente de los organismos del laboratorio.

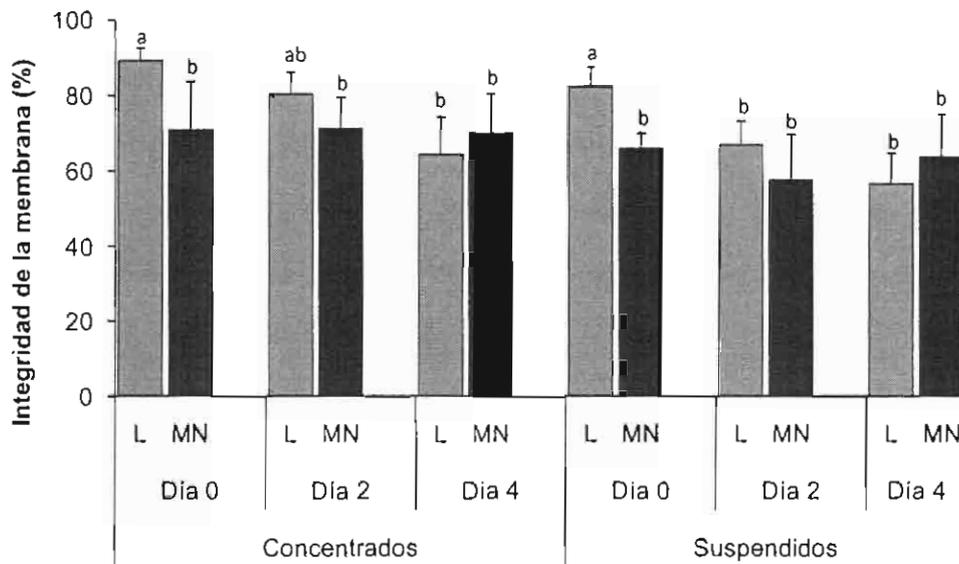


Figura 8. Integridad de la membrana (%) de los espermatozoides de lenguado de California almacenados por 4 días a 4° C. El esperma fue suspendido en solución Richardson (300 mOsm/kg) (n=3). L= organismos previamente aclimatados en el laboratorio. MN= organismos del Medio Natural (Eljido Eréndira, Eréndira, B. C). Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (P > 0.05).

7.4. Experimento 3: Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California

No se encontraron diferencias significativas entre la motilidad inicial del esperma expuesto a DMSO o G en las diferentes concentraciones utilizadas (5, 10 y 15%) (P > 0.05) (Figura 9). El porcentaje de motilidad osciló entre $52\% \pm 17$ con 10% DMSO y $43\% \pm 8$ con 5% G.

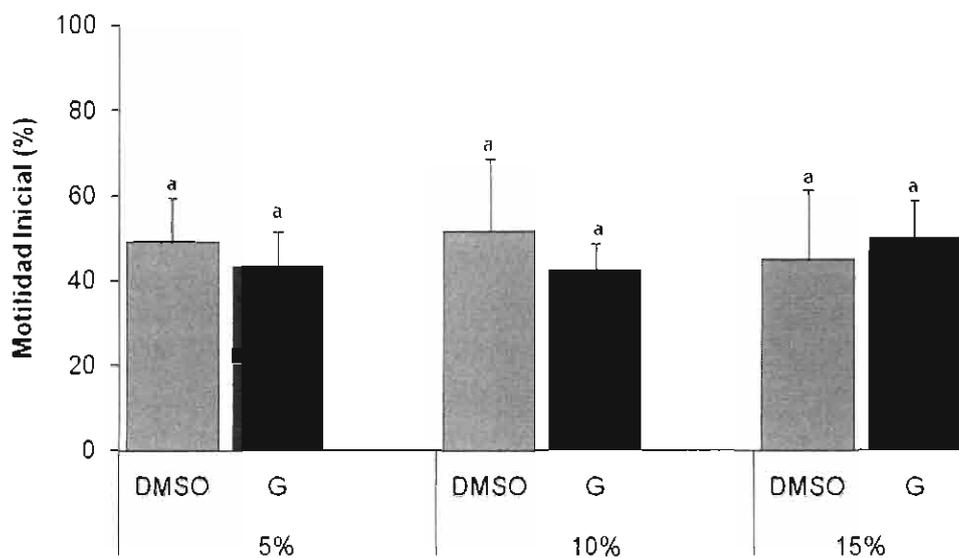


Figura 9. Porcentaje de motilidad del esperma del lenguado de California expuesto a Sulfóxido de metilo (DMSO) o glicerol (G) en tres concentraciones (5, 10 y 15%). $n = 3$. Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Se encontraron diferencias significativas en el tiempo medio de pérdida de la motilidad inicial en un 50% en el tratamiento que se utilizó 15% DMSO y 15% G ($P < 0.001$). El esperma que tardó más tiempo en perder la motilidad inicial a un 50% fue el expuesto a 5% DMSO (36 ± 4 s). Mientras que el esperma expuesto a 15% DMSO fue el que perdió más rápidamente la motilidad en un 50% de (15 ± 8 s) (Figura 10).

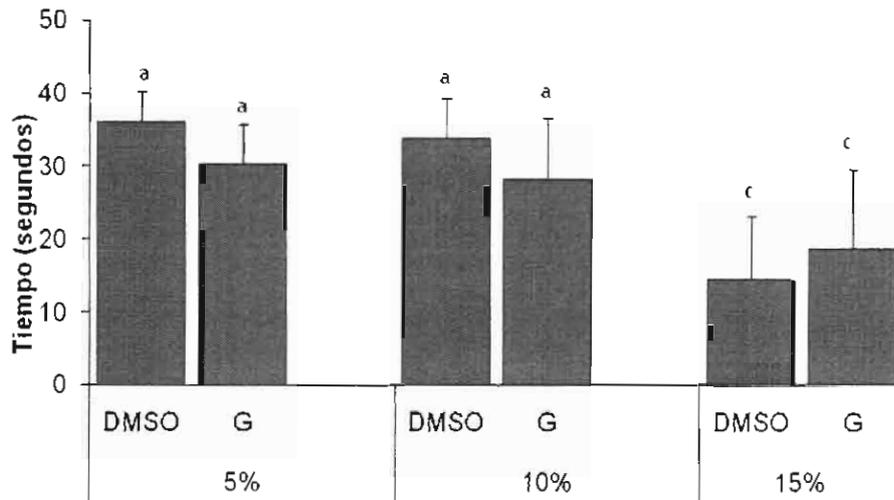


Figura 10. Tiempo medio de pérdida de la motilidad del esperma. El esperma fue expuesto a sulfóxido de metilo (DMSO) o glicerol (G) en tres concentraciones (5, 10 y 15%). $n = 3$. Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

7.5. Experimento 4: Criopreservación del esperma de lenguado de California

Se encontró que el esperma de lenguado tuvo una motilidad $< 5\%$ y también una integridad de membrana $< 10\%$ cuando se utilizaron los protocolos de Zhang *et al.* (2003) y Lanes *et al.* (2008).

El mejor protocolo para la criopreservación de esperma de lenguado de California fue el de Chen *et al.* (2004) con algunas modificaciones. No se encontraron diferencias significativas en la motilidad inicial del esperma descongelado entre los organismos provenientes del medio natural o aclimatados en el laboratorio ($P > 0.05$) (Figura 11). Sin embargo, se encontraron diferencias altamente significativas entre los tipos de crioprotectores utilizados ($P < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas entre el control (esperma fresco) y el esperma criopreservado con 10% glicerol ($P > 0.05$). El

mayor porcentaje de motilidad ($43\% \pm 14$) se obtuvo en muestras criopreservadas con 10% G provenientes de organismos aclimatados. El menor porcentaje ($15\% \pm 16$) de motilidad se obtuvo de muestras las criopreservadas en 10% DMSO provenientes de organismos aclimatados.

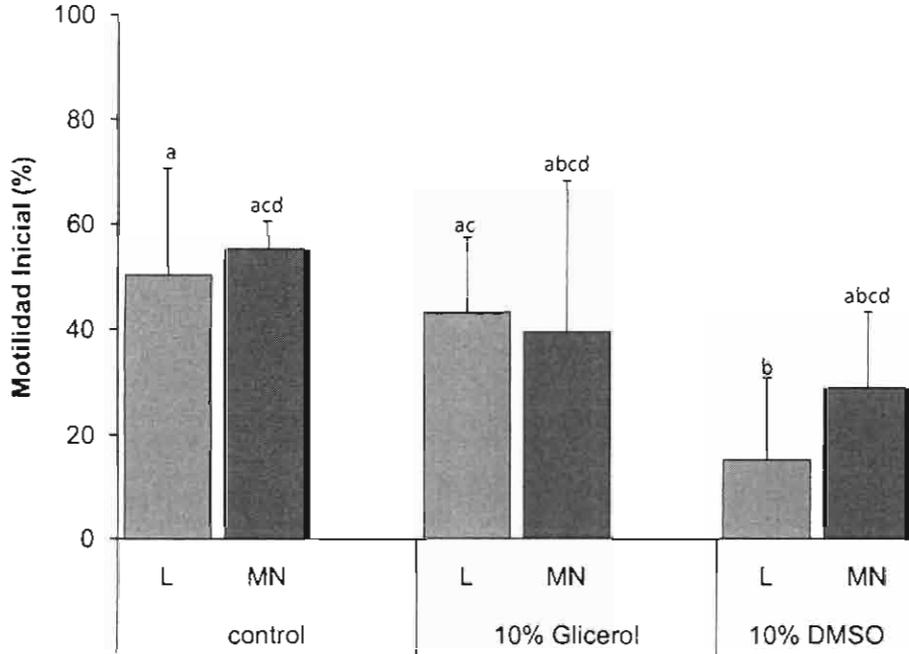


Figura 11. Motilidad del espermatozoides del lenguado de California. Control (fresco) y suspendido en solución Richardson (300 mOsmol/kg) previa criopreservación en 10% sulfóxido de metilo (DMSO) o 10% glicerol ($n = 3$). L = organismos previamente aclimatados en el laboratorio. MN = organismos del Medio Natural (Ejido Eréndira, B. C.). Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

En lo que respecta a la integridad de la membrana del espermatozoides descongelado, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los organismos provenientes del medio natural o aclimatados en el laboratorio. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la integridad de la membrana del espermatozoides en las muestras control y las descongeladas con 10% glicerol (Figura 12).

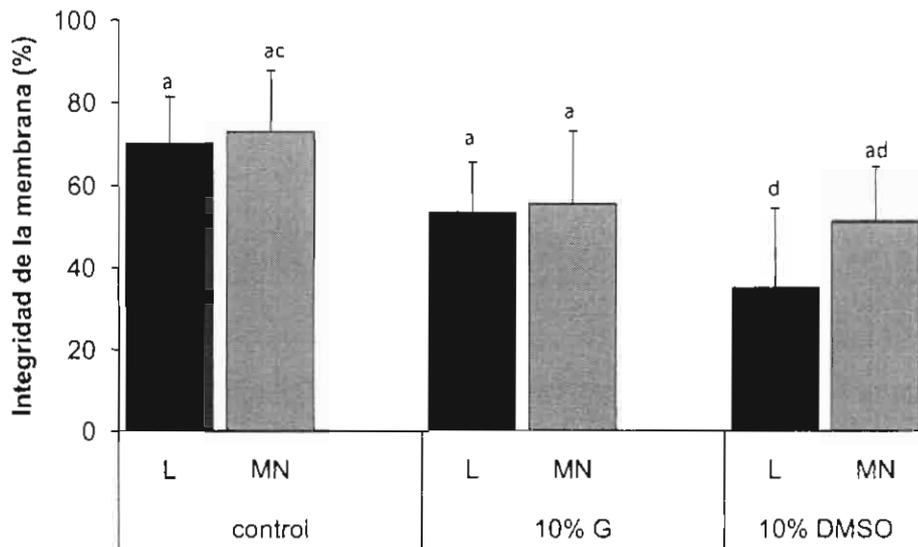


Figura 12. Porcentaje de viabilidad del esperma control (fresco) y suspendido en solución Richardson (300 mOsmol/kg) previa criopreservación en 10% sulfóxido de metilo (DMSO) o 10% glicerol $n = 3$. L = organismos previamente aclimatados en el laboratorio. MN = organismos del Medio Natural (Ejido Eréndira, B. C). Las líneas verticales indican la desviación estándar. Letras iguales significa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

8. Discusión

8.1. Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California

En muchas especies de peces que tienen fertilización externa los espermatozoides permanecen inmóviles en el plasma seminal cuando se encuentran en el interior de la gónada (medio isotónico). La motilidad inicia cuando los espermatozoides son liberados en el agua (Inoda y Morisawa, 1987). Los cambios iónicos y osmóticos son dos factores críticos que pueden ser responsables de la activación (Cosson, 2004; Tabares y

Tarazona, 2005). En los teleósteos de agua dulce la motilidad se inicia cuando son expuestos a un ambiente hipotónico, mientras en los teleósteos marinos la motilidad inicia en un ambiente hipertónico (Alavi y Cosson, 2006; Suquet *et al.*, 1993; Linhart *et al.*, 1999).

La motilidad de los espermatozoides es uno de los indicadores más comunes de la funcionalidad espermática, que involucra el flagelo, el complejo axonema y la maquinaria energética (mitocondrias) (Tabares y Tarazona, 2005).

En el caso del lenguado de California se emplearon las soluciones fisiológicas de Richardon y Zhang a diferentes osmolaridades y se observó que en ambas soluciones el esperma permaneció inmóvil cuando era colocado a < 300 mOsm/kg y que al aumentar la osmolaridad el esperma se activó vigorosamente. Este resultado indica que la osmolaridad puede ser el factor clave para que se inicie la motilidad espermática en esta especie y concuerda con las observaciones realizadas en el esperma del lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus*, donde la motilidad se inicia en el intervalo de concentraciones de 380-1150 mOsm/kg (Billard *et al.*, 1993), lo mismo se observó en el lenguado *Psetta máxima*, donde la motilidad también se inicio con concentraciones superiores a los 300 mOsm/kg (Dreanno *et al.*, 1998).

8.2. Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo

El semen de peces se puede almacenar por períodos cortos de tiempo en soluciones fisiológicas (preservación a corto plazo) o conservarse por períodos indefinidos mediante la criopreservación (Billard *et al.*, 1995). Una vez que el esperma de los peces es removido de los testículos, puede ser suspendido en soluciones fisiológicas que pueden prolongar la viabilidad de las células espermáticas mediante la supresión de su motilidad, lo que mantiene una tasa metabólica baja y previene la muerte de las células espermáticas por desecación e hipoxia (Riley *et al.*, 2004).

Las soluciones fisiológicas son específicas de especie y deben tener una composición iónica y una presión osmótica similar a la del plasma seminal y sanguíneo de la especie elegida (Morisawa y Suzuki, 1980). Entre las soluciones fisiológicas empleadas destacan las de Mounib, Ringer, Kurokuras (DeGraaf y Berlinsky, 2004); MPRS y D-15 (Ji *et al.*, 2008); solución balanceada de Hanks (Wayman y Tiersch, 2000); suero de albumina de bovino (Peñaranda *et al.*, 2009); KCl (Lahsteiner *et al.*, 1996); D-sorbitol, Tris-Sucrosa-Potasio (Daly *et al.*, 2008). En algunos casos es necesario hacer modificaciones a la composición de estas soluciones, de tal manera que se llegue a una optimización, ya que en el almacenamiento a corto plazo y en la criopreservación del esperma de peces, el éxito depende en gran medida de la selección apropiada de la solución fisiológica (Tian *et al.*, 2008).

El almacenamiento a corto plazo permite que el semen de un organismo pueda ser utilizado para fertilizar diferentes hembras en diferentes días, disminuyendo los problemas de asincronía en la liberación de gametos. Además de eliminar este inconveniente, en la preservación de semen, la elección de una buena solución fisiológica permite un fácil manejo de las muestras al momento del desove. Por otra parte, las soluciones fisiológicas son frecuentemente utilizadas como herramientas en el mejoramiento genético, ya que facilita el intercambio de gametos entre las granjas y la producción de híbridos y el empleo masivo de animales genéticamente superiores (Saad *et al.*, 1988).

La integridad de la membrana así como la motilidad del esperma son algunos parámetros que permiten conocer el efecto del almacenamiento a corto plazo y así valorar el tiempo de almacenamiento óptimo, ya que tiempo de almacenamiento del esperma varía de especie a especie.

La evaluación de la integridad de membrana también es un indicador de la calidad y viabilidad del esperma de varias especies. En 1996 Cloud utilizó el kit live/dead® de Molecular Probes conocer su utilidad en la evaluación de la viabilidad del esperma de la trucha *Onchorhynchus mykiss* y encontró que en el esperma fresco la viabilidad fue de 98.25%. Sin embargo, esta técnica fluorescente se ha empleado en pocas especies de peces (Flajšhans *et al.*, 2004), entre las que podemos encontrar a la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Segovia *et al.*, 2000), el bacalao, *Maccullochella peellii peellii* (Daly *et al.*, 2008) y el lenguado de Brasil, *Paralichthys orbignyanus* (Lanes *et al.*, 2008).

Se ha encontrado en el esperma de *O. niloticus*, la integridad de la membrana y la motilidad decrecen gradualmente con el tiempo (días) de almacenamiento (Segovia *et al.*, 2000). Mientras que en el esperma del pez zebra la motilidad fue de ~60% después de 10 horas de almacenamiento y 24 h después la motilidad fue nula (Jing *et al.*, 2009). La motilidad del esperma del pez trompetero, *Latris lineata*, se mantiene ~60% hasta por dos días. Sin embargo, al día 4, la motilidad se reduce hasta ~20%. (Ritar y Campet, 2000). La motilidad del esperma de la carpa, *Cyprinus carpio*, tiene un comportamiento parecido al pez trompetero. Al día 2 de almacenamiento la motilidad fue ~80% decreciendo a ~40%, para el día 4, hasta llegar a una motilidad nula al día 8 (Saad *et al.*, 1988). En el caso del lenguado de California se encontró que el esperma sólo se puede almacenar por 2 días con buenos porcentajes de motilidad, con un decremento gradual a través del tiempo. Uno de los posibles factores responsables del reducido tiempo de almacenamiento, es el crecimiento bacteriano en las muestras. Por lo que será importante evaluar la carga bacteriana de las muestras del esperma e investigar la posible utilización de antibióticos. La utilización de antibióticos en el esperma de *C. carpio* prolongó el tiempo de almacenaje hasta por 20 días (Saad *et al.*, 1988) un resultado similar se obtuvo con el esperma del salmón del Atlántico, *Salmo salar*, donde se observó que mantuvo su fertilidad después de 22 días de almacenamiento (Stoss y Refstie, 1983). En el caso del lenguado de California, como en otras especies, la integridad de la membrana se mantuvo hasta el día 4, aunque

para este momento, la motilidad había decrecido hasta un ~24%, esto podría indicar que se puedan obtener buenas tasas de fertilización aun cuando el esperma no sea motil.

Otro factor importante para un almacenamiento exitoso del esperma a corto plazo, es evitar la contaminación con agua, orina o heces durante la extracción del esperma, ya que estos fluidos activan los espermatozoides y pueden contener bacterias (Kopeika *et al.*, 2007). Este tipo de contaminación es frecuente en los peces, debido a la proximidad del ducto espermático, el recto y la uretra, o porque los productos sexuales y la orina son expulsados por un orificio común, el poro urogenital (Rurangwa *et al.*, 2004). De tal manera que mucha de la variación interindividual de la motilidad se le ha atribuido a la contaminación por orina o heces (Saad *et al.*, 1988). El contacto de la orina con el esperma desencadena la motilidad en la carpa común *C. carpio* (Billard, 1998), el lenguado *Psetta maxima* (Dreanno *et al.*, 1998) y la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Linhart *et al.*, 1999) entre otros. En el caso del lenguado de California, para evitar la contaminación por orina se no fue posible la introducción de un catéter en el poro urogenital porque es muy pequeño. Este inconveniente también se presentó en *P. maxima* (Dreanno *et al.*, 1998). Por lo que el mejor método fue tratar de vaciar la vejiga del pez mediante masaje abdominal. Sin embargo, fue evidente que cuando el esperma se había contaminado con orina o heces y se intentaba reactivar con agua de mar después de ~2 horas de haber obtenido la muestra, había poca o nula motilidad espermática. Por lo tanto se concluyó que debido a que la motilidad del esperma tiene una duración < 50 segundos, por efecto de la contaminación, después de 2 horas el esperma se había inactivado totalmente. La diferencia en la calidad del esperma entre organismos del medio natural y los aclimatados puede deberse a que en los organismos del medio natural la posibilidad de contaminarse era mayor ya que salía más orina al momento de la presión abdominal, en comparación con los organismos aclimatados.

8.3. Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California

Se emplean diferentes soluciones químicas con el fin de proteger a las células del daño producido por la formación de cristales de hielo durante los procesos de congelación y descongelación. La eficiencia de estas soluciones crioprotectoras depende de la permeabilidad de la membrana plasmática y de la toxicidad que los componentes de la solución producen al penetrar a la célula tratada (Tian *et al.*, 2008). Regularmente se evalúa la citotoxicidad de los crioprotectores de la siguiente manera: se suspende el esperma en la solución fisiológica y posteriormente se agrega el crioprotector en diferentes concentraciones, a continuación, esta mezcla se incuba a temperatura ambiente en diferentes periodos (tiempo de equilibrio) y finalmente se registra la motilidad (Joo y Dupré, 2002). Sin embargo, en el lenguado de California no fue posible aplicar este procedimiento, ya que al agregarle el crioprotector al esperma, se activó, porque la solución que contenía la menor concentración (5%), tenía una presión osmótica lo suficientemente alta para activar los espermatozoides. Este efecto se conoce como activación por el crioprotector (Morisawa y Susuki, 1980). Por lo tanto, se tuvo que cambiar la metodología para evaluar la citotoxicidad de los crioprotectores.

La activación por los crioprotectores también se observó en lenguado *P. maxima* (Dreanno *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2004), en el robalo rayado (He y Woods III, 2004) y en el lenguado manchado *Verasper variegatus* (Tian *et al.*, 2008). En estas especies, tal como en el lenguado de California, la activación de los espermatozoides por los crioprotectores pudo ser el resultado del incremento en la presión osmótica. Sin embargo, el esperma del lenguado de Brasil, *Paralichthys orbinyanus*, no fue activado como se reportó en los demás organismos (Lanes *et al.*, 2008). Por lo es posible que haya otros factores que hacen que el esperma permanezca inmóvil, como la composición iónica, CO₂, temperatura, salinidad, pH y factores dependientes de AMPc y Ca₂⁺ (Billard *et al.*, 1992; Tabares y Tarazona, 2005).

En los peces de agua dulce, no se ha observado la activación por crioprotector, debido a que el esperma permanece inmóvil en un medio hipertónico (> 300 mOsm/kg), como en el Bacalao *Maccullochella peellii peellii* (Daly *et al.*, 2008), el bagre *Ictalurus punctatus* (Tiersch *et al.*, 1994) y en el pez zebra, *Danio rerio* (Jing *et al.*, 2009).

En los peces marinos es posible inhibir la motilidad producida por el crioprotector. En la anguila europea *Anguilla anguilla* Peñaranda *et al.* (2009), observaron la activación del esperma por el crioprotector, pero al adicionar altas concentraciones de NaHCO_3 a la solución fisiológica, se puede suprimir la motilidad, ya que en un medio acuoso el NaHCO_3 se disocia en varios productos (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- y CO_3^{2-}), cuya concentración es afectada por el pH. Si el medio es ácido, el HCO_3^- puede ser convertido CO_2 libre que a su vez podría inhibir la motilidad (Bencic *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior, se sugiere que en el futuro se estudie el efecto de diferentes soluciones fisiológicas crioprotectoras para evitar que el esperma se active por la alta presión osmótica.

En el caso del esperma del lenguado de California, la motilidad inicial decrece a los 40 segundos. En el esperma del pez trompetero *Latris lineata*, a los 60 segundos la motilidad decreció en un 50% (Ritar y Campet, 2000). Una vez activado el esperma del pez zebra con agua desionizada se observó que la motilidad decreció en un 50% a los 2 min (Jing *et al.*, 2009). Estas diferencias en la duración de la motilidad Billard y Cosson (1986) las atribuyen al escaso número de mitocondrias (1 a 5) que presenta el espermatozoide, lo que reduce rápidamente los niveles de ATP intracelular. Por otra parte, Ginzburg (1972) señala que el periodo de motilidad también puede ser afectado por otras variables, particularmente por la concentración de espermatozoides en suspensión; a una mayor concentración se observa un menor tiempo de motilidad, esto debido a cambios en la presión parcial de oxígeno, CO_2 y del pH en el medio.

En el esperma de lenguado de California no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la motilidad inicial del esperma expuesto a DMSO o G en las diferentes concentraciones utilizadas 5, 10 y 15%, lo que puede significar que la célula tolera estas sustancias. Sin embargo, si hubo diferencias significativas ($P > 0.001$) entre el tiempo en que la motilidad decreció en un 50% con el 15% Glicerol y DMSO. Al realizar la prueba de citotoxicidad en esperma de pargo del Golfo *Lutjanus campechanus*, se observó que cuando aumentaba la concentración y el tiempo de exposición a los crioprotectores, la motilidad descendía en comparación con el control (Stoss y Holtz, 1983). En el esperma del salmón y de la trucha arcoiris, Ott y Horton, (1971) el tiempo de equilibrio de los crioprotectores puede reducir la tasa de fertilización y en caso de la trucha arcoiris, también decreció la fertilidad del esperma mantenido por 1 min en 5 y 7.5% de DMSO. Por el contrario, Stein y Bayle (1978) encontraron que el esperma de la trucha arcoiris debe ser mantenida en el crioprotector por 15 min antes de la congelación, para obtener una fertilización exitosa. La discrepancia en los resultados obtenidos entre las diferentes especies se puede deber a la interacción entre el tiempo de equilibrio del esperma y particularmente a los métodos de criopreservación empleados (Stoss y Holtz, 1983).

8.4. Criopreservación del esperma de lenguado de California

En general existen dos métodos para la congelación del esperma en peces, el congelamiento rápido con vapor de nitrógeno líquido (método de congelación manual) y la congelación lenta empleando una cámara de congelación programable (Ji *et al.*, 2004). La cámara de congelación programable puede ser más precisa y confiable pero es económicamente más costosa por lo que no todos los laboratorios pueden contar con esta tecnología. El empleo de una cámara manual puede ser una excelente alternativa, ya que el método manual es muy conveniente por ser económico (Salinas-Flores *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2008). Otra ventaja es que se puede emplear en campo o *in situ* y también se pueden criopreservar grandes cantidades de esperma (Ji *et al.*, 2004). En este trabajo se utilizó una cámara manual para congelar el esperma del

lenguado de California, con la metodología de tres pasos que es ampliamente empleada para la congelación del esperma en peces y con la que se han obtenido resultados exitosos (Chen *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2004; Lanes *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2008).

La calidad del esperma se puede definir como la capacidad del esperma de ésta para fertilizar exitosamente al óvulo. La calidad del esperma en los peces cultivados puede afectarse por diferentes factores, durante la colecta y el almacenamiento del esperma o durante el proceso de fertilización. La calidad del esperma también puede afectar la producción de larvas o juveniles saludables (Rurangwa *et al.*, 2004).

La motilidad puede ser otra medida para validar la calidad espermática, por ejemplo, en la trucha arcoíris (Lahnsteiner *et al.*, 1996), en carpa (Magyary *et al.*, 1996) y el lenguado del Atlántico (Tvedt *et al.*, 2001), hay una correlación entre la motilidad del esperma y la capacidad de fertilización cuando se comparan el esperma frescos con el descongelado. Con el 10% de DMSO se obtuvieron mejores porcentaje de motilidad en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Stoss y Holtz, 1983), dorada *Spaurus aurata* (Chambeyron y Zohar, 1990), corvina roja *Scianops ocellatus* (Wayman *et al.*, 1998), puede ser confiable como es el caso del lenguado *Psetta maxima* (Dreanno *et al.*, 1998), del lenguado amarillo *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999), perca de mar (Ji *et al.*, 2004). En el pez mandíbula *Varicorhinus macrolepis* se obtuvieron las mejores tasas de fertilización y eclosión (Ji *et al.*, 2008), mientras que con 10% metanol fue el mejor crioprotector para el bacalao *Maccullochella peelii peelii* con una integridad de la membrana de $63.8 \pm 2.0\%$ (Daly *et al.*, 2008). Para el lenguado *Pseudopleuronectes americanus* los mejores resultados fueron obtenidos con 13.3% DMSO y 13.3% Glicol Propileno (Rideout *et al.*, 2003). Para el lenguado del Japón *Paralichthys olivaceus* (Zhang *et al.*, 2003) la solución con 10% de Glicerol fue el mejor crioprotector, también para el lenguado de California el mejor resultado se obtuvo con 10% de G ya que al contrastar estos resultados con los obtenidos en esperma fresco,

no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la motilidad y la integridad de la membrana. Todo lo anterior confirma que los crioprotectores son especie específicos. Por otro lado, estos resultados corroboran que la congelación por el método manual es viable y adecuado para la criopreservación del esperma de lenguado.

Para el lenguado de Brasil (Lanes *et al.*, 2008) se ha encontrado que hay una correlación entre la integridad de la membrana y la motilidad. Otros autores encontraron una correlación positiva entre la motilidad y la capacidad de fertilización, en la trucha arcoíris (Lahnsteiner *et al.*, 1996), en la carpa (Magyary *et al.*, 1996), en el pez gato africano (Rurangwa *et al.*, 2001) y en el lenguado de Atlántico (Tvedt *et al.*, 2001). En contraste, después de la descongelación del esperma del siluro, *Silurus glanis*, no encontró correlación entre la tasa de eclosión y la motilidad del esperma (Linhart *et al.*, 2005). Aunque no se realizó fertilización con el esperma del lenguado de California, es posible que se obtengan altas tasas de fecundación debido al alto porcentaje de motilidad e integridad de la membrana del esperma después de la descongelación.

Esto indica que los protocolos de criopreservación son específicos de especie y se deben diseñar protocolos adecuados para cada una. Otro factor que afecta la viabilidad del esperma es la tasa de descongelación. Si la tasa de descongelación es demasiado baja se pueden dañar los organelos y las membranas de la célula (Medeiros *et al.*, 2002; Kopeika *et al.*, 2007). Para descongelar el esperma de lenguado de California la exposición a 35°C por 3 s resultó adecuada y se observó que si la exposición a la temperatura es más prolongada la motilidad obtenida era nula. Otros autores emplean tasas de descongelación diferentes, 30°C por 7 s en el lenguado amarillo, *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999), 37°C por 30 s en el lenguado de Brasil *Paralichthys orbignuanus* (Lanes *et al.*, 2008), 20°C por 15 s para la anguila europea *Anguila anguila* (Peñaranda *et al.*, 20009), y 50°C por 300 s en el pez gato *Mystus*

nemurus (Muchlisin *et al.*, 2004). Lo anterior demuestra que la tasa de descongelación es especie-específica. Y además, el tipo de contenedor en que se congela el esperma juega también un papel importante en la congelación ya que se debe de ajustar la tasa de descongelación dependiendo del volumen de cada contenedor, por ejemplo, si es mucho volumen del esperma o está muy grueso el contenedor tardara más tiempo la descongelación.

Cuando se aplican los protocolos preliminares de Zhang *et al.* (2003) y Lanes *et al.* (2008) para criopreservar el esperma del lenguado de California, se deben seguir los siguientes pasos, que son vitales para la criopreservación exitosa de su semen: 1. Evitar la contaminación del esperma; 2. Elegir adecuadamente la solución fisiológica 300 mOsm/kg de la solución de Richardson; 3. La temperatura de congelación debe de realizarse a 6 cm de la superficie de N₂L y se mantiene por 10 minutos (aproximadamente -180°C), a continuación se coloca a 1 cm sobre la superficie de N₂L por 5 minutos y finalmente se sumen las muestras en N₂L; 4. La descongelación se debe realizar a 37°C por 3 segundos. Si se cuidan los pasos críticos en la optimización del protocolo de criopreservación del esperma de de lenguado de California, se pueden obtener elevados porcentajes de motilidad e integridad de la membrana. Lo anterior comprueba la necesidad de realizar protocolos específicos para cada especie y tejido ya que requieren condiciones adecuadas, antes, durante y después de la criopreservación (Medeiros *et al.*, 2002; Kopeika *et al.*, 2007).

Recomendaciones para trabajos posteriores:

- Es conveniente buscar otra solución fisiológica u otro crioprotector que no active el esperma del lenguado de California
- Se recomienda realizar fertilización artificial con el esperma descongelado y con ovocitos recién extraídos del lenguado de California para evaluar el éxito este protocolo.

9. CONCLUSIONES:

- La solución de Richardson desactivó el esperma del lenguado de California a 300 mOsm/kg.
- Se puede almacenar el esperma de lenguado de California en la solución fisiológica de Richardson a 300 mOsm/kg hasta por dos días con buen porcentaje de motilidad y viabilidad.
- La congelación manual por la técnica de tres pasos propuesta por Chen *et al.* (2004) es confiable para el lenguado de California.
- La congelación del esperma por la técnica manual es económica en comparación con la cámara programable.
- La solución de Glicerol al 10% fue el mejor crioprotector para el lenguado de California.

10. Bibliografía

- Alavi, S.M.H. y Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes (II). Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* 30, 1-14.
- Allen, J.M. 1990. The biological environment of the California halibut, *Paralichthys californicus*. *Fish Bulletin* 174:7-30.
- Babiak, I., Glogowski, J., Luczynski, M. J. y Luczynski, M. 1997. Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox kicius* L., sperm. *Aquaculture research*. 28, 191-197.
- Babiak, I., Bolla, S. y Ottesen, O. 2008. Suitable methods for cryopreservation of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquacult Int.* 16:561-572.
- Bencic, D.C., Ingermann, R.L. y Cloud, J.G. 2001. Does CO₂ enhance short-term storage success of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) milt?. *Therionology*. 56: 157-166.
- Biennial Report 2003 & 2004. 2004. California Sea grant halibut aquaculture: sea grant supports an emerging industry. University of California. 18-20 p.
- Billard, R. 1998. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*. 160. 317-328.
- Billard, R. y Cosson, M.P. 1986. Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo mykiss*; effects of pH and temperature. *Reprod Fish* 44, 10-12.
- Billard, R. y Cosson, M.P. 1992. Some problem related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. exp. Zool.* 261, 122-131.
- Billard, R., Cosson, J y Crim, L.W. 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquat. Living Resour.* 6. 67-75.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L. W., Suquet, M. 1995. Sperm physiology and quality. In Bromage NR, Roberts RJ (Eds), *Broodstock management and Egg and larval quality*. Oxford Blackwell science. 25-52.
- Blaxter, J.H.S., 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172. 1189-1190.
- Bromage y Roberts (1995). In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (eds N.R. Bromage and R.J. Roberts). Blackwell Science, Ltd, Oxford.

- Caddell S.M., Gadomski D.M. y Abbott L.R. 1990. Induced spawning of the California halibut, *Paralichthys californicus*, (Pisces: Paralichthyidae) under artificial and natural conditions. Fish Bulletin 174:175-198.
- Cervantes-Trujano, M., Merino, G.E., Muguét, J.B., Gisbert, E., Bush, D.E., Piedrahita, R.H. y Conklin, D.E. 2002. Avances en el cultivo del Lenguado de California *Paralichthys californicus*. Panorama Acuícola Online. http://www.panoramaacuicola.net/noticia.php?art_clave=58. Consultada el 25 de marzo de 2009.
- Chambeyron, F. y Zohar, Y. 1990. A diluent for sperm criopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture 90. 345-352.
- Chen, S-L., Ji X-S., Yu G-C, Tian Y-S. y Sha Z-X. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. Aquaculture 236: 557-556.
- Cloud, J.G. 1996 julio 14-18. Use of flow cytometry and molecular probes to assess sperm quality prior to cryopreservation. Aquacultures biotechnology symposium proceedings. International congress on the biology of fishes, San Francisco State University. 9-12.
- Cosson J. 2004. Review and experimental paper, The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture Internacional. 12: 69-89.
- Daly, J., Galloway, D., Bravington, W., Holland, M. y Ingram, B. 2008. Cryopreservation of sperm from Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. Aquacultura 285. 117-122.
- DeGraaf J.D. y Berlinsky D.L. 2004. Cryopogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. Aquaculture 234. 527-540.
- Denniston, R.S., Michelet, S. y Godke R. A. 2000. Principles of cryopreservation, in: T.R. Tiersch, P.M. Mazik (Eds.). Criopresevation in aquatic species, World Aquaculture Society, Bt. Rouge, LA. pp 59-74.
- Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyeres, E., Cosson, J., Delliou, H. y Billard, R., 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture 169, 247-262.

- Flajšhans, M., Cosson, J., Rodina, M. y Linhart, O. 2004. Short communication. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biology International*. 28. 955-959.
- Frey, H. W. 1971. California's Living Marine Resources and their Utilization, Department of Fish and Game: 62-63.
- Gadomski, D., Caddell, S., Abbott, L. y Caro, T. 1990. Growth and development of larval and juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. In: Haugen, C. (Ed.), *The California Halibut, Paralichthys californicus, Resource and Fisheries*. Fish Bulletin, vol. 174. State of California. The Resources Agency, Department of Fish and Game, pp. 85-98.
- Ginsburg, I. 1952. flounders of the genus *paralichthys* and related genera in american waters, Fish and Wildlife Service: 267-367.
- Ginzburg, A. 1972. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Academy of Sciences of the URSS, Moscu, URSS.
- Gisbert, E. Merino, G. Muguet, J.B, Bush, D., Piedrahita, R.H. y Conklin, D.E. 2002. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. *Journal of fish Biology*. 61. 1217-1229.
- Hammann, M. y Ramirez, A., 1990. California halibut, *Paralichthys californicus*, in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. In: Haugen, C. (Ed.), *The California Halibut, Paralichthys californicus, Resource and Fisheries*. Fish Bulletin, vol. 174. State of California. The Resources Agency, Department of Fish and Game, pp. 127-144.
- He, S. y Woods III, C. 2004 Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. 48: 254-262.
- Herzka, S.H., Conklin, D., Piedrahita, R., Fodrie, J. y Lazo, J. P. 2003. Current research efforts on California halibut focus on aquaculture practices and utilization of nursery habitat. *Bight Bulletin*. 7:2-7.
- Inoda, T. y Morisawa, M. 1987. Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A (3): 539-542.
- Ish, T. y Stroman, F. 2006. Suitable fishery asvocates seafood report, California halibut *Paralichthys californicus*. 1-30.

- Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. y Zhang, S.C. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture*. 517-528.
- Ji, X.S., Zhao, Y., Chen, S.L., Jiang, Y.L., Wang, H., Song, J.Y., Ding, L. y Chen, H.J. 2008. Successful fertilization of *Varicorhinus macrolepsis* eggs with sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*. 69. 793-797.
- Jing, R., Huang, C., Bai, C., Tanguay, R. y Dong, Q. 2009. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. *Aquaculture*. 290. 165-171.
- Jodun, W. A., King, K. y Farrell, P. 2006. Methanol and egg yolk and cryoprotectants for Atlantic salmon spermatozoa. *North American Journal of aquaculture*. 69: 36-40.
- Joo, R. y Dupré, E. 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la mancha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalva). *Investigaciones marinas*. 30 (2). 75-79.
- Kopeika, E., Kopeika, J. y Zhang, T. 2007. Cryopreservation of fish sperm. In: *Methods in molecular biology*, vol. 368: Cryopreservation and freeze-drying protocols, second edition. Edited by: J. G. y G. N. Stacey. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Kukas, S.T. y Hassler, T.J. 1986. Species Profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Southwest). California halibut. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 82(11.44) U.S. Army Corps of Engineers, TR EL-82-4. 8pp.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. y Patzner, R.A. 1996. Cryopresrvacion of semen of grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture*. 144. 265-274.
- Lanes, C.F.C., Okamoto, M., Cavalcanti, P. V., Collares, T., Campos, V.F., Deschamps, J.C., Robaldo R.B., Marins, L.F. y Sampaio, L.A. 2008. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*. 275. 361-365.
- Lirhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D. y Kocour, M. 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology*. 51. 250-261.

- Linhart, O., Walford, J., Sivaloganathan, B. y Lam., T.J. 1999. Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater- acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 55, 1344-1358.
- Magyary, I., Urbányi, B. y Horváth, L. 1996. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *Journal of Applied Ichthyology.* 12 (2): 117-119.
- Mazur, P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science.* 168, 939-949.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 247: 125-142
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D. y Rodríguez, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: 327-344.
- Morisawa, M. y Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleost. *Science.* 210, 1145-1146.
- Muchlisin, Z., Hashim, R. y Chong, A. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology.* 62 (1):25-34.
- Munroe, T.A. 2005. Systematic diversity of the Pleuronectiformes. In: Flatfishes, biology and exploitation. Gibson R.N ed. *Fish and Aquatic resources Series 9.* Blackwell. 10-41 pp.
- Ott, A.G. y Horton, H. F. 1971. Fertilization of Chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada.* 28. 745-748.
- Peñaranda, D.S., Pérez, L., Gallego, V., Jover, M. y Asturiano, F.J. 2009. Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. *Cryobiology.* 59.
- Plumner, K.M., DeMartini, E.E. y Roberts, D.A. 1983. The feeding habits and distribution of juvenile-small adult California halibut (*Paralichthys californicus*) coastal waters off northern San Diego County, Calif. *Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* 24:194-201.
- Pullin, R.S.V. 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures. *Aquaculture.* 279-283.
- Richardson, G.F., Wilson, C.E., Crim, L.W. y Yao, Z. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture.* 174. 89-94

- Rideout, R.M., Litvak, M.K. y Trippel. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research*. 34. 653-659.
- Riley, K. L., Holiaday, C. G., Chesney, E. J. Tiersch, T. R. 2004. Cryopresrevation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*. 238. 183-194.
- Ritar, A.J. y Campet, 2000. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineta*). *Theriogenology*. 54. 467-480.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. y Nash, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234. 1-28.
- Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M., Huyskens, G., Kime, D.E., Ollevier, F., 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*. 55, 751-769.
- Saad, A., Billard, R., Theron, M.C. y Hollebecq, M. G. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*. 71. 133-150.
- Salinas-Flores. L., Paniagua-Chavez, C.G., Jenkins, J.A. y Tiersch, T.R. 2005. Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*). *J Shellfish Res* 24:415–420
- Secretaría de Desarrollo Económico. S.F. Catálogo de especies marinas de Baja California. Gobierno del Estado de Baja California. Mexicali, B. C. 130 p.
- Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chávez, C. y Tiersch, T.R. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*. 53:1489-1499.

- SOFIA (El estado mundial de la pesca y la acuicultura). 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma 2009. consultado el 20 de Mayo de 2008. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>
- SOFIA (The State of World Fisheries and Aquaculture). 2006. La situación mundial de la pesca extractiva y la acuicultura. FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 2007. consultada el 20 de Mayo de 2008. <http://www.fao.org/docrep/009/A0699s/A0699s00.htm>
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Stein H. y Bayrle, H. 1978. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann Biol Anim Biophys.* 18: 1073-1076.
- Stoss, J. y Holtz, W. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmon gairdneri*) sperm IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture.* 32. 321-330.
- Stoss, J. y Refstie, T. 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture.* 30. 229-236.
- Suquet, M., Dorange, G., Normant, Y., Le Roux, A. y Fauvel, C. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*) *J. Fish Biol.* 42, 509-516.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, I. y Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31. 231-243.
- Swanson, E.W. y Bearden, H.J. 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J Anima Sci* 10: 981-987.
- Tabares, C.J. y Tarazona, A.M. 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias.* 18 (2):149-161.

- Tian, Y.S., Chen, S.L., Ji, X.S., Zhai, J.M., Sun, L.J., Chen, C. y Su., P.Z. 2008. Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper veriegatus*) sperm. *Aquaculture*. 284. 268-271.
- Tiersch, T.R. 2000. Introduction. In: Tiersch, T. R., Mazik, P. M. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 19-26.
- Tiersch, T.R. y Mazik, P. M. (eds.) (2003) *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Tiersch, T.R., Goudie, C.A. y Carmichael, G.J. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *America Fisheries Society*. 123: 580-596.
- Tvedt, H.B., Benfey T.J., Martin-Robichaud D.J. y Power J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*.194. (1-2):191-200.
- Wayman, W.R, Thomas, R.G. y Tiersch, T.R. 1998. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum *Scianops ocellatus* L. *Aquaculture Research*. 29, 267-273.
- Wayman, W.R. y Tiersch, T.R., 2000. Research methods for cryopreservation of sperm. In: Tiersch, T.R., Mazik. P.M. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 264-275.
- Yao, Z., Crim, L.W., Richardson, G.F. y Emerson, J.C. 2000. Motility, fertility and ultrastructural change of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*. 181: 361-75.
- Young, P.H. 1960. California ocean fisheries resources to the year 1960. Calif. Fish Game Comm. 148 pp.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. Printice hall. New Jersey, EUA
- Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.Y. Wang, C.L., Sawant, M.S., Li, J. y Chen, S.L. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*. 60. 989-996.

11. APÉNDICES

APÉNDICE A

A lo largo del escrito se encuentran términos que a continuación definiré:

Espermatozoides: Es una célula haploide que constituye el gameto masculino antes de la fertilización en la reproducción sexual.

Esperma: Son espermatozoides suspendidos en el líquido seminal.

Motilidad: Porcentaje de espermatozoides que se desplazan activamente en dirección de avance.

Viabilidad o Integridad de la membrana espermática: Evaluación de calidad espermática que involucra la condición de la membrana citoplasmática. Los espermatozoides viables son aquellos cuya membrana citoplasmática se encuentra intacta, por otro lado, los espermatozoides no viables tienen las membranas dañadas.

APÉNDICE B. Procedimiento Estándar Operacional (PEO)

PEO-1. Obtención de la muestra espermática del lenguado de California

Descripción

La obtención de la muestra para organismos se realiza de la siguiente manera: para evitar la contaminación con orina y heces se seca con papel absorbente y algodón la región abdominal y el poro genital de los organismos. Posteriormente se realiza la extracción del esperma mediante presión abdominal en seco, e inmediatamente el esperma es aspirado con una jeringa de 3 ml y se almacena a 4°C, para ser utilizado inmediatamente.

PEO-2. Selección de la mejor solución desactivadora de la motilidad del esperma del lenguado de California

Descripción

Las soluciones fisiológicas son específica de especie y deben de presentar composición iónica y presión osmótica similar a la del plasma seminal y sanguíneo de la especie elegida (Morisawa y Suzuki, 1980). El esperma de los peces una vez que es removido de los testículos puede ser diluido en soluciones fisiológicas, que puede prolongar la viabilidad de las células espermáticas y suprimir la motilidad del esperma manteniendo un el metabolismo bajo y previene la muerte de la célula espermática por desecación e hipoxia (Riley *et al.*, 2004).

Soluciones

Solución de Richardson (Richardson *et al.*, 1999); pH 7.7.

Reactivo	Peso molecular	Gramos Añadidos	molaridad mMol	factor de	
				Van't Haff l	Osmolalidad (mOsmol/kg)
NaCl	58.44	28.02	479.5	2	959
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O*	141.96	1.93	1413.5	2	28
KCl	74.55	2.87	38.5	2	77
					1064
					Calculada

Solución de Zhang (Zhang *et al.*, 2003); pH 8.2.

Reactivo	Peso	Gramos	Molaridad	factor de	Osmolalidad
	molecular	Añadidos	mMol	Van't Haff i	(mOsmol/kg)
NaCl	58.44	24.72	423.00	2	846.00
KCl	74.55	0.67	8.99	2	17.97
CaCl ₂ .2H ₂ O	203.3	1.36	9.25	3	18.50
MgCl ₂ .6H ₂ O	84.01	4.66	55.47	2	110.94
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.5	6.29	25.52	2	51.03
NaHCO ₃	84.01	0.18	2.14	2	4.29
					1048.73
					Calculada

Protocolo

1. Preparar las soluciones a diez osmolaridades (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mOsmol/kg).
2. Colocar el esperma de lenguado en las soluciones fisiológicas Richardson o Zhang a una concentración 1:2 (esperma:solución de fisiológica).
3. E inmediatamente registrar la motilidad de la siguiente manera 2 µl de esperma fresco y mezclar con 4 µl de una de las soluciones desactivadoras.
4. Inmediatamente se observa en el microscopio si hay o no movilidad del mismo y se registra el porcentaje de motilidad del esperma.
5. Posteriormente agregar 8 µl de agua de mar filtrada para reactivar el esperma y observar el porcentaje de motilidad del esperma.

PEO-3. Almacenamiento del esperma del lenguado de California a corto plazo

Descripción

El semen de peces se puede almacenar por períodos cortos de tiempo en soluciones fisiológicas (preservación a corto plazo). El almacenamiento a corto plazo permite que el semen de un organismo pueda ser utilizado para fecundar diferentes hembras en diferentes días, disminuyendo los problemas de asincronía del desove.

Soluciones

Solución de Richardson preparada a 300 mOsm/kg

Protocolo

1. Suspender el esperma en la solución desactivadora de la motilidad (1:2).
2. Inmediatamente después se almacena a 4°C dentro de tubos de 1.5 ml.
3. Evaluar la motilidad diariamente con 0.5 µl de esperma y 10 µl de agua de mar.
4. Evaluar la viabilidad del esperma (integridad de la membrana del esperma).

PEO-4. Evaluación de la citotoxicidad de los crioprotectores en el esperma de lenguado de California

Descripción

Los crioprotectores más comunes son aquellos que presentan la capacidad de penetrar la membrana celular. Las células expuestas a dichas soluciones reducen su tamaño ya que pierden agua hasta llegar a un equilibrio con el medio. Dicha deshidratación se debe a la hiperosmolaridad del medio extracelular. La pérdida de agua se ve compensada por la entrada de crioprotector y se detiene al alcanzarse un balance osmótico entre el interior y el exterior de la célula.

Soluciones

Crioprotectores: Glicerol y DMSO en diferentes concentraciones (0, 5, 10 y 15%)

Concentración del Crioprotector (%)	Solución desactivadora	Crioprotector (μ l)	Esperma	Volumen final (μ l)
0	500	0	500	1000
5	450	50	500	1000
10	400	100	500	1000
15	350	150	500	1000

Protocolo

1. Suspender el esperma del lenguado en la solución desactivadora 300 mOsmkg Richardson, de acuerdo a la tabla anterior.
2. Refrigerar a 4°C.

3. Suspender en el crioprotector (previamente a 4 °C) a la concentración deseada y se homogeniza la muestra.
4. Colocar una alícuota de 10 µl en un porta objetos y se observa en el microscopio la motilidad del esperma.
5. Observar y registrar el tiempo en que la motilidad espermática desciende en un 50%.
6. Repite el procedimiento para cada concentración y crioprotector.

Nota: El esperma suspendido en la solución desactivadora se activa al agregarle el crioprotector (DMSO y G) por lo que es altamente recomendable observar la motilidad del esperma inmediatamente después de la adición del crioprotector.

PEO-5. Criopreservación del esperma de lenguado de California

Protocolo

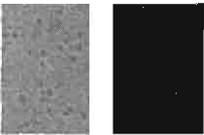
1. Previamente se etiqueta y preparan los popotes franceses de 0.25 ml.
2. En las jeringas de 3 ml desprovistas de aguja se introduce el popote francés.
3. A continuación, el esperma se suspende en la solución fisiológica de Richardson, preparada a 300 mOsm/kg.
4. Se agrega el crioprotector a 4 °C, (10% G y DMSO).
5. Se mezcla la muestra rápida y brevemente por ~ 3s.
6. En un período no mayor a 10 segundos se procede a llenar los popotes franceses, aspirando el líquido con la jeringa preparada en el paso 2 y los popotes son sellados con arcilla.
7. Inmediatamente después se colocan los popotes en la cámara de congelación manual (cámara de poliestireno o unicel) de 29.5 x 20 x 19 cm.
8. Sin tiempo de equilibrio, las muestras se colocaron sobre la malla de plástico y fueron enfriadas con el vapor de N₂L a 6 cm de la superficie de N₂L por 10 minutos (aproximadamente -180°C).
9. Posteriormente la malla se coloca a 1 cm sobre la superficie de N₂L por 5 minutos.
10. Finalmente se sumergen en N₂L.
11. Después de 5 minutos, los popotes fueron colocados en contenedores plásticos e insertados en cañas,
12. Finalmente se depositan en el tanque de almacenamiento (-196°C) (Taylor-Wharton, HC-35) por ~1 semana.
13. Los popotes se descongelaron sumergiéndolos en un baño de agua a 37°C por 3 segundos a continuación se limpia el popote 2 veces con papel secante.

Nota: Se evalúa la motilidad y la integridad de la membrana antes y después de la descongelación.



Colecta del esperma del lenguado de California

Evaluación de la calidad del esperma



Porcentaje de motilidad e Integridad de la membrana espermática



El esperma se suspende en la solución fisiológica 300 mOsm/kg y se agrega el crioprotector (10% G ó 10% DMSO)



Método manual

La congelación se realiza por 10 min a 6 cm sobre N_2L y desciende 5 min a 1 cm de la superficie del N_2L y posteriormente se coloca en el tanque de almacenamiento.



El almacenamiento del esperma se realiza en el tanque de almacenamiento con NL_2 por ~1 semana a $-196^\circ C$



Descongelación en baño de agua a $37^\circ C$ por 3

Figura 13. Proceso de congelación del esperma del lenguado de California *Paralichthys californicus*. Nitrógeno líquido (N_2L).

PEO-6. Descongelación del esperma de lenguado de California

Después que se realizó la congelación de tres pasos propuesto por Chen *et al.*, 2004. La motilidad del esperma vario después de la descongelación en un baño de agua a 37°C.

Esperma diluidos sin tiempo de equilibrio	El tiempo de descongelación	Porcentaje de motilidad Inicial	Tiempo (segundos) en que la motilidad decreció en un 50%
10% DMSO	30 segundos	0%	0
10% DMSO	9 segundos	5%	10
10% DMSO	6 segundos	10%	10
10% DMSO	3 segundos	20-40%	20-30
10% Glicerol	3 segundos	70-75%	30

PEO-7. Evaluación de la viabilidad espermática del lenguado de California con colorantes fluorescentes

Descripción

Se han usado las tinciones fluorescentes para medir la viabilidad del espermatozoide desde hace >58 años en estudio de reproducción de humanos y animales domésticos, fertilización e inseminación artificial (Swanson y Bearden, 1951). La viabilidad es un método que se elige para evaluar la calidad del espermatozoide, la tinción LIVE/DEAD® (Molecular Probes, Eugene, OR) tiñe el ADN, se marcan con colorante SYBR 14® debido a que este colorante, al estar disuelto en DMSO, puede penetrar la membrana intacta y unirse a los ácidos nucleicos y hacer que la célula adquiera fluorescencia verde. Los espermatozoides muertos los tiñe el colorante yoduro de propidio (YP) ya que al estar disuelto en agua, puede penetrar a las membranas dañadas, unirse a los ácidos nucleicos y hacer que la célula adquiera una fluorescencia roja (Flajšhans *et al.*, 2004).

Soluciones

1. SYBR 14®: preparar una solución 1:50 de SYBR 14® con AMF (para preparar 500 µl, mezclar 10 µL de colorante con 490 µL de AMF).
2. Yoduro de propidio (YP): este colorante se agrega directamente como viene preparado en el kit.

Protocolo

1. Agregar 2.5 µL de colorante SYBR 14® a 10 µl del espermatozoide y 490 µl de la concentración desactivadora a 300 mOsm/kg (concentración final de 10 nM).
2. Incubar durante 10 minutos en oscuridad
3. Agregar 2.5 µL de la tinción de YP (concentración final de 12 µM).
4. Incubar durante 10 minutos en oscuridad.

5. Colocar una alícuota de 10 μl en un portaobjeto y cubierta con un cubreobjetos.
6. Realizar las observaciones a 1000X, con ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 80-i) equipado con una lámpara de mercurio de alta presión (modelo LH-M100C-1) y un filtro de excitación de 450-490 nm.
7. Contar 100 células por organismo, a continuación se tomó el porcentaje de células teñidas en rojo y en verde.

APÉNDICE C

Matrices de Análisis Estadístico

Cuadro 2. Para el almacenamiento a corto plazo, se realizó un análisis de varianza de tres vías; en donde las variables independientes fueron el lugar de procedencia, el esperma concentrado o diluido (diluciones) y el tiempo de almacenamiento, mientras que la variable dependiente fue la motilidad. (SC, suma de cuadrados, GI Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, distribución F; P, probabilidad. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

Efecto	SC	GI	CM	F	P
Intersección	155267.5	1	155267.5	3413.579	0.000000
Lugar de procedencia	4792.9	1	4792.9	105.372	0.000000
Esperma concentrado o diluido	10.9	1	10.9	0.240	0.625870
Tiempo de almacenamiento	4599.7	2	2299.9	50.563	0.000000
Lugar de procedencia *Esperma concentrado o diluido	20.1	1	20.1	0.443	0.508438
Lugar de procedencia *Tiempo de Almacenamiento	284.4	2	142.2	3.126	0.051123
Esperma concentrado o diluido *Tiempo de almacenamiento	112.3	2	56.2	1.235	0.298116
Lugar de procedencia *Esperma concentrado o diluido * Tiempo de almacenamiento	73.2	2	36.6	0.805	0.451982
Error	2729.1	60	45.5		

Cuadro 3. Prueba *a posteriori* de Tukey HSD para identificar diferencias significativas específicas entre el lugar de procedencia, la concentración del esperma, el tiempo de almacenamiento sobre la motilidad del esperma del lenguado de California. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996). AL, Aclimatados en el Laboratorio; MN, Medio Natural; C, Concentrados; D, Diluidos.

	Lugar de procedencia	Esperma concentrado o diluido	Tiempo Almacenamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	AL	C	Día 0		0.023	0.000	0.999	0.174	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	AL	C	Día 2	0.023		0.018	0.205	0.999	0.511	0.686	0.007	0.000	0.352	0.071	0.000
3	AL	C	Día 4	0.000	0.018		0.000	0.001	0.937	0.837	1.000	0.680	0.982	0.999	0.350
4	AL	D	Día 0	0.999	0.205	0.000		0.689	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	AL	D	Día 2	0.174	0.999	0.001	0.689		0.115	0.203	0.000	0.000	0.063	0.007	0.000
6	AL	D	Día 4	0.000	0.511	0.937	0.000	0.115		1.000	0.818	0.037	1.000	0.997	0.008
7	MN	C	Día 0	0.000	0.686	0.837	0.000	0.203	1.000		0.661	0.017	0.999	0.981	0.003
8	MN	C	Día 2	0.000	0.007	1.000	0.000	0.000	0.818	0.661		0.851	0.922	0.999	0.542
9	MN	C	Día 4	0.000	0.000	0.680	0.000	0.000	0.037	0.017	0.851		0.071	0.353	0.999
10	MN	D	Día 0	0.000	0.352	0.982	0.000	0.063	1.000	0.999	0.922	0.071		0.999	0.018
11	MN	D	Día 2	0.000	0.071	0.999	0.000	0.007	0.997	0.981	0.999	0.353	0.999		0.131
12	MN	D	Día 4	0.000	0.000	0.350	0.000	0.000	0.008	0.003	0.542	0.999	0.010	0.131	

Cuadro 4. Para el almacenamiento a corto plazo, se realizó un análisis de varianza de tres vías; en donde las variables independientes fueron el lugar de procedencia, el esperma concentrado o diluido (diluciones) y el tiempo de almacenamiento, mientras que la variable dependiente fue la integridad de la membrana. (SC, suma de cuadrados, GI Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, distribución F; P, probabilidad. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

Efecto	SC	GI	CM	F	P
Intersección	235899.2	1	235899.2	7512.767	0.000000
Lugar de procedencia	385.4	1	385.4	12.274	0.000874
Esperma concentrado o diluido	621.4	1	621.4	19.791	0.000038
Tiempo de almacenamiento	989.7	2	494.9	15.760	0.000073
Lugar de procedencia *Esperma concentrado o diluido	6.4	1	6.4	0.204	0.653227
Lugar de procedencia *tiempo de Almacenamiento	777.4	2	388.7	12.380	0.000132
Esperma concentrado o diluido*Tiempo de almacenamiento	68.1	2	34.1	1.085	0.34475
Lugar de procedencia *Esperma concentrado o diluido * Tiempo de almacenamiento	1.8	2	0.9	0.028	0.972196
Error	1884	60	31.4		

Cuadro 5. Prueba *a posteriori* de Tukey HSD para identificar diferencias significativas específicas entre el lugar de procedencia, la concentración del esperma, el tiempo de almacenamiento sobre la integridad de la membrana del esperma del lenguado de California. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arco seno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996). AL, Aclimatados en el Laboratorio; MN, Medio Natural; C, Concentrados; D, Diluidos.

	Lugar de procedencia	Esperma concentrado o diluido	Tiempo Almacenamiento de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	AL	C	Día 0		0.554	0.000	0.819	0.000	0.000	0.008	0.006	0.003	0.000	0.000	0.000
2	AL	C	Día 2	0.554		0.082	0.999	0.223	0.001	0.797	0.751	0.614	0.143	0.002	0.064
3	AL	C	Día 4	0.000	0.082		0.027	0.999	0.946	0.963	0.975	0.994	1.000	0.980	1.000
4	AL	D	Día 0	0.819	0.999	0.027		0.087	0.000	0.525	0.472	0.339	0.051	0.000	0.020
5	AL	D	Día 2	0.000	0.223	0.999	0.877		0.754	0.998	0.999	0.999	1.000	0.857	0.999
6	AL	D	Día 4	0.000	0.001	0.946	0.000	0.754		0.192	0.225	0.333	0.865	1.000	0.966
7	MN	C	Día 0	0.000	0.797	0.963	0.525	0.998	0.192		1.000	1.000	0.991	0.280	0.941
8	MN	C	Día 2	0.006	0.751	0.975	0.472	0.999	0.225	1.000		1.000	0.995	0.322	0.959
9	MN	C	Día 4	0.003	0.614	0.994	0.339	0.999	0.333	1.000	1.000		0.999	0.452	0.988
10	MN	D	Día 0	0.000	0.143	1.000	0.051	1.000	0.865	0.991	0.995	0.999		0.935	1.000
11	MN	D	Día 2	0.000	0.002	0.980	0.000	0.857	1.000	0.280	0.322	0.452	0.935		0.989
12	MN	D	Día 4	0.000	0.064	1.000	0.020	0.999	0.966	0.941	0.959	0.988	1.000	0.989	

Cuadro 6. Para el evaluar la citotoxicidad de los crioprotectores, se realizó un análisis de varianza de dos vías; en donde las variables independientes fueron los crioprotectores y las concentraciones, mientras que la variable dependiente fue la motilidad. (SC, suma de cuadrados, GI Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, distribución F; P, probabilidad. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

Efecto	SC	GI	CM	F	P
Intercepción	79336.11	1	79336.11	563.3333	0.000000
Crioprotectores	100.00	1	100.00	0.7101	0.406092
Concentración	0.72	2	4.86	0.0345	0.966110
Crioprotectores * concentración	329.17	2	164.58	1.1686	0.324519
Error	4225.00	30	140.83		

Cuadro 7. Se realizó la prueba *a posteriori* de Tukey HSD para identificar diferencias significativas específicas entre los crioprotectores y las concentraciones sobre la motilidad del esperma del lenguado de California. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

	Crioprotector	Concentración	1	2	3	4	5	6
1	DMSO	5		0.999102	0.989660	0.955021	0.922969	0.999996
2	DMSO	10	0.999102		0.922969	0.825585	0.762063	0.999879
3	DMSO	15	0.989660	0.922969		0.999879	0.999102	0.976671
4	G	5	0.955021	0.825585	0.999879		0.999996	0.922969
5	G	10	0.922969	0.762063	0.999102	0.999996		0.879709
6	G	15	0.999996	0.999879	0.976671	0.922969	0.879709	

Cuadro 8. Para el evaluarla citotoxicidad de los crioprotectores, se realizó un análisis de varianza de dos vías; en donde las variables independientes fueron los crioprotectores y las concentraciones, mientras que la variable dependiente fue el tiempo en que decreció la motilidad del lenguado de California en un 50%. (SC, suma de cuadrados, GI Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, distribución F; P, probabilidad. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

Efecto	SC	GI	CM	F	P
Intercepción	25921.00	1	25921.00	446.1446	0.000000
Crioprotectores	53.78	1	53.78	0.9256	0.343698
Concentración	1921.50	2	960.75	16.5361	0.000014
Crioprotectores * concentración	196.72	2	98.36	1.6930	0.201079
Error	1743.00	30	58.10		

Cuadro 9. Se realizó la prueba *a posteriori* de Tukey HSD para identificar diferencias significativas específicas entre los crioprotectores y el tiempo en que decreció la motilidad del esperma del lenguado de California en un 50%. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

	Crioprotector	Concentración	1	2	3	4	5	6
1	DMSO	5		0.994539	0.000540	0.768886	0.470146	0.005583
2	DMSO	10	0.994539		0.001911	0.966199	0.789301	0.021141
3	DMSO	15	0.000540	0.001911		0.014587	0.047213	0.930805
4	G	5	0.768886	0.966199	0.014587		0.996137	0.125203
5	G	10	0.470146	0.789301	0.047213	0.996137		0.304221
6	G	15	0.005583	0.021141	0.930805	0.125203	0.304221	

Cuadro 10. Se realizó un análisis de varianza de dos vías; en donde las variables independientes fueron el lugar de procedencia y los crioprotectores. Mientras que la variable dependiente es la motilidad. SC, suma de cuadrados, GI Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, distribución F; P, probabilidad. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

Efecto	SC	GI	CM	F	P
Intercepción	67226.69	1	67226.69	485.9210	0.000000
Lugar de procedencia	161.15	1	161.15	1.1648	0.286630
Crioprotectores	3413.90	2	1707.95	12.3452	0.000061
Lugar de procedencia * crioprotectores	386.26	2	193.13	1.3960	0.258844
Error	5810.66	42	138.35		

Cuadro 11. Se realizó la prueba *a posteriori* de Tukey HSD para identificar diferencias significativas específicas entre el lugar de procedencia y los crioprotectores sobre la motilidad del esperma del lenguado de California. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996). AL, Aclimatados en el Laboratorio; MN, Medio Natural.

	Lugar de procedencia	Crioprotectores	1	2	3	4	5	6
1	AL	Control		0.00182	0.982896	0.9966681	0.2225815	0.851329
2	AL	DMSO	0.00182		0.014762	0.000608	0.434382	0.050196
3	AL	G	0.982896	0.014762		0.851530	0.606563	0.996666
4	MN	Control	0.996681	0.000608	0.8515130		0.85007	0.575578
5	MN	DMSO	0.225815	0.434382	0.606563	0.085007		0.872667
6	MN	G	0.851329	0.50196	0.996666	0.575578	0.872667	

Cuadro 12. Se realizó un análisis de varianza de dos vías; en donde las variables independientes fueron el lugar de procedencia y los crioprotectores. Mientras que la variable dependiente es integridad de la membrana del lenguado de California. SC, suma de cuadrados, GI Grados de libertad; CM, Cuadrado medio; F, distribución F; P, probabilidad. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996).

Efecto	SC	GI	CM	F	P
Intercepción	115302.5	1	115302.5	1389.404	0.000000
Lugar de procedencia	252.2	1	252.2	3.039	0.088614
Crioprotectores	2629.0	2	1314.5	15.840	0.000007
Lugar de procedencia * crioprotectores	174.7	2	87.4	1.053	0.35853
Error	3485.5	42	83.0		

Cuadro 13. Se realizó la prueba *a posteriori* de Tukey HSD para identificar diferencias significativas específicas entre el lugar de procedencia y los crioprotectores sobre la integridad de la membrana del lenguado de California. Los datos porcentuales obtenidos para todos los experimento fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción, para ajustarlos a la distribución normal (Zar, 1996). AL, Aclimatados en el Laboratorio; MN, Medio Natural.

	Lugar de procedencia	Crioprotectores	1	2	3	4	5	6
1	AL	Control		0.000443	0.226509	0.993423	0.12499	0.363768
2	AL	DMSO	0.000443		0.152140	0.000185	0.268194	0.083048
3	AL	G	0.226509	0.152140		0.072020	0.999659	0.999753
4	MN	Control	0.993423	0.000185	0.072020		0.034716	0.133861
5	MN	DMSO	0.124999	0.268194	0.999659	0.034716		0.991391
6	MN	G	0.363768	0.083048	0.999753	0.133861	0.991391	