

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF LOW-COST AND ENVIRONMENT-FRIENDLY TECHNIQUES FOR FISH SPERM CRYOPRESERVATION

Alumno de doctorado: Thales de Souza França

Supervisores: Juan F. Asturiano Nemesio y Danilo Pedro Streit Jr.

Resumen

La criopreservación de semen de peces es una técnica que puede aumentar la eficiencia de la reproducción en cautiverio de especies de peces de agua dulce y marinas. La técnica se aplica en programas de conservación ambiental y en la acuicultura. A lo largo de las últimas décadas, se han establecido protocolos para criopreservación de semen de diversas especies de peces. Sin embargo, el foco principal de los investigadores ha sido en tener éxito en el congelamiento y descongelamiento de los espermatozoides, no llevando en cuenta el período en que los gametos se quedan expuestos a la solución crioprotectora en un momento previo a la fertilización. Esta exposición de los espermatozoides a las soluciones crioprotectoras después del descongelamiento puede ser perjudicial a la calidad de los gametos, ya que pueden ser tóxicos.

La gran mayoría de los protocolos establecidos utilizan recipientes de plástico ultrarresistentes para almacenar el semen durante el proceso de criopreservación. Estos recipientes normalmente no se reutilizan, generando residuos altamente contaminantes al medio ambiente. Además, en algunos países, los recipientes normalmente utilizados son comercializados por pocas industrias, o que dificultan la adquisición y elevan el precio del producto. Así, el objetivo principal de la tesis fue crear y probar métodos de bajo costo que potencialicen el uso de los espermatozoides descongelados de peces y torne el proceso de criopreservación de semen menos contaminante al medio ambiente.

Los experimentos de los capítulos 1 y 2 se llevaron a cabo en Brasil. Utilizamos el jundiá gris *Rhamdia quelen*, especie considerada modelo experimental para peces nativos de América del Sur. Los protocolos para la reproducción artificial y criopreservación de semen de esta especie ya se han establecidos; por lo tanto, nos basamos en estos protocolos para aplicar innovaciones.

En el capítulo 1, probamos el uso de la dilución de semen descongelado para disminuir la toxicidad de la solución crioprotectora. La técnica se utiliza comúnmente en protocolos de criopreservación de semen de mamíferos, pero nunca antes se había aplicado al semen descongelado de peces suramericanos. Muestras de semen descongelado de *R. quelen* se diluyeron en un diluyente salino (NaCl al 1,1% - 325 mOsm kg⁻¹; pH 7,6). Después, observamos que los espermatozoides de muestras diluidas mostraron mayores velocidades, rectitud, progresión y frecuencia de batido flagelar que las muestras no diluidas. La dilución del semen descongelado también proporcionó

mayores tasas de fertilización y eclosión que el grupo no diluido. De esta manera, la dilución de semen descongelado de *R. quelen* resultó ser una metodología sencilla, económica y eficiente que debe incluirse en el protocolo de criopreservación del semen de la especie.

En los capítulos 2 y 3 desarrollamos y probamos la metodología para el uso de cápsulas de gelatina biodegradables (colágeno) y cápsulas de hipromelosa biodegradables (HPMC) como recipiente alternativo al uso de pajuelas de plástico en la criopreservación de semen de peces. En el segundo capítulo observamos que las cápsulas biodegradables mantuvieron los parámetros cinéticos y la capacidad reproductiva del espermatozoide de *R. quelen* así como las pajuelas de plástico. Indicando así que las cápsulas pueden ser utilizadas como un recipiente alternativo al uso de las pajuelas de plástico en la criopreservación de semen de esta especie.

Los procedimientos experimentales del capítulo 3 se llevaron a cabo en España. En este capítulo aplicamos la metodología desarrollada en el capítulo 2 para la criopreservación del semen de anguila europea *Anguilla anguilla*, dorada *Sparus aurata* y lubina *Dicentrarchus labrax*. En estas tres especies, las cápsulas biodegradables conservaron los parámetros cinéticos y la integridad de la membrana de los espermatozoides, así como las pajuelas de plástico. Además, observamos que el daño al ADN en muestras de semen de anguila europea y lubina europea criopreservadas en cápsulas y pajuelas no difirió. Sin embargo, las muestras de semen de dorada mostraron mayor daño en el ADN que las criopreservadas en pajuelas. Aunque, el nivel de daño que observamos en las muestras almacenadas en las cápsulas se considera bajo, por lo que pueden no comprometer el desarrollo embrionario. Evaluamos los resultados y concluimos que las cápsulas de gelatina biodegradables y las cápsulas de HPMC biodegradables pueden utilizarse como recipientes alternativos al uso de pajuelas de plástico para la criopreservación de semen de las tres especies mediterráneas.