

Evaluación de la viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) conservados a -14°C en diferentes estadios de desarrollo embrionario[#]

Viability assessment of cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) embryos preserved at -14°C and obtained at different stages of the embryonic development

E Castillo-Losada, PE Cruz-Casallas, VM Medina-Robles*

Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (GRITOX), Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta, Colombia.

SUMMARY

The aim of this study was to assess the viability of embryo preservation from different hour post-fertilization (1, 6 and 7 HPF) for 1 hour at -14°C . Different cryoprotectants (Ethylene glycol, ETG and methanol, MET) and concentrations (10% and 15%) were used. Sexually matured animals (male and female) were hormonally induced, and once the latency time was over, spawning was performed to obtain the gametes and conduct the egg fertilization. The eggs were finally placed in a 200 L upflow cylindro-conoidal incubator. The stage of the embryonic development, when the embryos were subjected to -14°C for each post-fertilization hour (HPF), was ~8 to 16 cells for the 1HPF, (50% of epiboly) gastrulation for the 6HPF, and segmentation (formation of 13 somites and the appearing of the optic vesicle) for 10 HPF embryos. Once each HPF was over, both the feasible embryos and the diluent were packed in 13 mL Falcon tubes (1:1), and placed for 10 minutes in a box at 6.2°C , to be preserved at -14°C for 60 minutes. Non-preserved embryos were treated as control. The embryos were defrosted and placed in an incubator to start the artificial incubation process again. The highest hatching rate was seen in 10 HPF embryos preserved with 10% and 15% MET ($87.0\pm 1.8\%$ and $83.3\pm 3.1\%$, respectively). No major statistical differences were shown regarding the control ($90.6\pm 1.1\%$) ($P < 0.05$). Ten HPF *Piaractus brachyomus* embryos stored at -14°C for 1 hour using MET at 10% and 15% as cryoprotectants preserved their feasibility, obtaining satisfactory hatching percentages.

Key words: preservation, cryoprotectant, larvae, *Piaractus brachyomus*.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la viabilidad de la conservación de embriones de diferentes horas posfertilización (1, 6 y 10 HPF) durante una hora a -14°C sometidos a diferentes crioprotectores (metanol, MET y etilenglicol, ETG) y concentraciones (10 y 15%). Animales (hembras y machos) sexualmente maduros se seleccionaron e indujeron hormonalmente. Luego de la latencia se efectuó el desove, obteniendo gametos y fertilizando los huevos que fueron dispuestos en una incubadora. El estadio de desarrollo embrionario al someter los embriones a -14°C para cada hora posfertilización (HPF) correspondió a estadio de ~8 a 16 células para los de 1 HPF, gastrulación (epibolia del 50%) a los de 6 HPF, y segmentación (formación de trece somitas y aparición de vesícula óptica) para embriones de 10 HPF. Cumplida cada HPF, embriones viables y el diluyente fueron empacados en tubos Falcon de 13 mL (1:1) y dispuestos durante 10 minutos en una cava a $6,2^{\circ}\text{C}$, y conservados a -14°C durante 60 minutos. Embriones no sometidos a conservación se consideraron control. Los embriones fueron descongelados y sembrados en incubadoras experimentales. La tasa más alta de eclosión se presentó en embriones de 10 HPF y conservados con MET al 10 y 15% ($87,0\pm 1,8\%$ y $83,3\pm 3,1\%$) sin diferencias estadísticas respecto del control ($90,6\pm 1,1\%$) ($P > 0,05$); los menores porcentajes de eclosión se presentaron cuando se conservaron con ETG 10 y 15% ($42 \pm 8,0\%$ y $21,4 \pm 4,8\%$), difiriendo estadísticamente respecto del control ($90,6\pm 1,1\%$) ($P < 0,05$). Los embriones de cachama blanca de 10 HPF almacenados a -14°C durante una hora utilizando como crioprotectores MET al 10 y 15%, conservan su viabilidad permitiendo la obtención de porcentajes satisfactorios de eclosión.

Palabras clave: conservación, crioprotector, larva, *Piaractus brachyomus*.

INTRODUCCIÓN

Desarrollar metodologías que preserven la integridad biológica y estructural de las células y tejidos al momento de ser almacenadas a temperaturas bajo cero o criogénicas (-196°C) proporcionan un gran número de ventajas al momento de aplicarlas en gametos o embriones de especies

ícticas. Entre ellas se encuentra el establecimiento de bancos de germoplasma en espacios pequeños, salvaguardando especies que se encuentren amenazadas o en peligro de extinción; de igual forma, conservar embriones de peces proporciona seguridad en la sanidad de las especies en los establecimientos donde se realiza reproducción, debido a que el transporte de animales reproductores entre fincas sería reemplazado por la movilidad de embriones, disminuyendo el riesgo de contagio de enfermedades que podrían presentarse en animales adultos; además, con especies donde solo se reproducen en ciertas épocas o periodos reproductivos provee a los piscicultores la oportunidad de obtener semilla durante todo el año (Ballou 1992, Wildt

Aceptado: 20.08.2015.

[#] Proyecto de investigación apoyado por el Instituto de Investigaciones de la Orinoquía Colombiana - IIOC. Código MAE-06-2010.

* Km 12 vía Puerto López, A.A. 110, Villavicencio, Meta, Colombia; mauriciomedina77@gmail.com

y col 1993, Zhang y Rawson 1995, Hagedorn y col 1996, Wildt y col 1997, Janik y col 2000, Bart 2000).

Debido a lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta que la crioconservación de embriones de peces se encuentra en desventaja respecto de la crioconservación del material biológico de mamíferos, diferentes investigaciones se han llevado a cabo con el fin de establecer protocolos especie/específicos que permitan obtener resultados satisfactorios en cuanto a viabilidad embrionaria y eclosión larvaria. No obstante, a lo largo de los estudios realizados se han determinado problemáticas que evitan que la aplicación de esta biotecnología obtenga resultados positivos. Dichas problemáticas son ocasionadas por: a) las membranas que rodean el embrión, debido a que presentan diferentes permeabilidades, evitan que el crioprotector ingrese a las células de manera uniforme; b) sensibilidad a la refrigeración que presentan los embriones; c) la toxicidad de los crioprotectores (Zhang y Rawson 1996^b, Hagedorn y col 1997, Hagedorn y col 1998, Janik y col 2000)

En Latinoamérica se han desarrollado pocos estudios acerca de conservación de embriones de especies ícticas encontrándose un trabajo en Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en el que refrigeraron embriones de cuatro estadios de desarrollo durante 6 y 10 horas a -8°C , encontrando resultados favorables para esta especie (Lopes y col 2011). En Colombia, las investigaciones relativas a crioconservación de material biológico han estado conducidas a la crioconservación de gametos masculinos de especies nativas como yamú (*Brycon amazonicus*), cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) y bagre rayado (*Pseudoplatystoma metaense*) (Cruz y col 2006, Ramírez y col 2011, Ramírez y col 2011), creándose la necesidad de implementar esta biotecnología en embriones de peces de la especie nativa más cultivada en Colombia, la cachama blanca (Arias 1988, González 2000), teniendo en cuenta la importancia y ventajas que conduce el aplicar este procedimiento en este tipo de material biológico. De igual forma, el lograr desarrollar de manera eficaz la conservación de embriones de cachama blanca permitirá proporcionar a los piscicultores una nueva opción de producción de la especie en épocas cuando no es posible su reproducción en cautividad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la conservación de embriones de cachama blanca obtenidos en tres estadios embrionarios diferentes y almacenados durante una hora a -14°C bajo la aplicación de dos sustancias crioprotectoras en dos concentraciones cada una.

MATERIAL Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DEL ESTUDIO

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Crioconservación del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, ubicado en la ciudad de Villavicencio, departamento del Meta

(Colombia). Sus instalaciones están situadas a una altura promedio sobre el nivel del mar de 420 metros, con temperatura media ambiental de 26°C , humedad relativa del 75% y precipitación anual de 4.050 mm.

MATERIAL BIOLÓGICO

Para la obtención de los embriones se utilizaron animales adultos de cachama blanca de aproximadamente cuatro años de edad, con peso corporal promedio para las hembras de $4,5 \pm 0,2$ kg y de $3,7 \pm 0,2$ kg para los machos, provenientes del plantel de reproductores de la estación piscícola de la Universidad de los Llanos. La selección de los reproductores se llevó a cabo en dos etapas. La primera se realizó en campo, donde se preseleccionaron animales teniendo en cuenta el desarrollo corporal de los mismos, que para el caso de las hembras fueron aquellas que presentaron abdomen abultado, y para los machos, aquellos individuos que mostraron presencia de semen luego de realizar masaje de la zona abdominal. La forma de captura se desarrolló mediante malla de arrastre, donde una vez seleccionados fueron trasladados en bolsas de plástico a piletas circulares de manejo ubicadas en la sala de reproducción de la estación piscícola, donde permanecieron durante 48 horas con el propósito de reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación y administrar los tratamientos de inducción hormonal para propiciar el respectivo desove y espermiación. En la segunda etapa de selección se tuvo en cuenta además del desarrollo corporal la condición de madurez sexual. En las hembras esta última se determinó con biopsia ovárica realizada mediante introducción de catéter plástico en la papila urogenital, obteniendo una muestra representativa de ovocitos (~ 40), a los que se les determinó el estado de maduración mediante evaluación de la vesícula germinal (núcleo). En los machos, la madurez sexual se determinó por la presencia de semen en la papila urogenital luego de realizar presión en sentido craneocaudal de la región celómica del animal. Por último, los animales seleccionados fueron identificados individualmente mediante chaquiras de colores instaladas en la aleta dorsal para las hembras y en la aleta caudal para los machos.

INDUCCIÓN HORMONAL A LA MADURACIÓN FINAL DE LAS GÓNADAS

La maduración final de las gónadas y posterior ovulación de las hembras se realizó mediante aplicación intramuscular de extracto de hipófisis de carpa-EHC (Stoller Fisheries, USA) con una dosis total de 5,75 mg/kg de peso corporal, distribuida en tres aplicaciones (0,25 (0h) 0,5 (24h) 5 (36h) mg/kg). Entre tanto, la inducción hormonal de los machos se efectuó mediante única inyección intramuscular de EHC, equivalente a 4,0 mg/kg de peso corporal, aplicada simultáneamente con la segunda dosis de inducción hormonal de la hembra.

OBTENCIÓN DE EMBRIONES

El procedimiento se inició con la inmersión de los reproductores en una solución tranquilizante, de 2-Fenoxietanol (300 ppm, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), durante 3 a 5 minutos. Una vez perdido el eje de nado, los animales fueron extraídos de la anterior solución donde posteriormente se les realizó un masaje abdominal en sentido craneocaudal del animal con el fin de extraer los ovocitos y semen, estos fueron colectados en un recipiente plástico y tubos de vidrio aforados. Por último, se realizó la fertilización e hidratación de los ovocitos los cuales fueron dispuestos en una incubadora cilíndrico-cónica con flujo ascendente de 200 l de capacidad.

TRATAMIENTOS

Se ejecutaron 12 tratamientos compuestos por dos soluciones crioprotectoras, etilenglicol (ETG, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) y metanol (MET, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), dos concentraciones para cada solución crioprotectora (10% y 15%) y tres estadios de desarrollo embrionario (estadio de ~8 a 16 células para los embriones de 1 hora posfertilización-HPF, gastrulación (epibolia del 50%) a los de 6 HPF, y segmentación (formación de trece somitas y aparición de vesícula óptica) para los embriones de 10 HPF). Se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento (cuadro 1).

PREPARACIÓN DE DILUYENTES

Se utilizó un diluyente con una concentración final de glucosa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) al 20%, en combinación con dos crioprotectores internos o permeables, metanol (MET, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y etilenglicol (ETG, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), a dos concentraciones finales diferentes, 10% y 15% para cada uno. Como solvente para el diluyente se utilizó solución salina fisiológica (NaCl 0,9%).

SISTEMA DE EMPAQUE DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenidos los embriones mediante reproducción artificial, fueron distribuidos en una incubadora cilíndrico-cónica con flujo ascendente de 200 l de capacidad. El estadio de desarrollo embrionario para cada hora posfertilización (HPF) a evaluar correspondió a estadio de ~8 a 16 células para los embriones de 1 HPF, gastrulación (epibolia del 50%) a los de 6 HPF, y segmentación (formación de trece somitas y aparición de vesícula óptica) para los embriones de 10 HPF. Al momento de cumplir cada hora posfertilización a evaluar (1, 6 y 10 HPF) se tomaron muestras de embriones mediante tubo de vidrio, estos se colocaron en cajas de Petri de donde fueron colectados los embriones viables por medio de pipeta de Pasteur y envasados en tubos Falcon de plástico estériles

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados para la conservación de embriones de cachama blanca a -14 °C durante 1 hora.

Description of treatments implemented to preserve Cachama blanca embryos at -14°C for 1 hour.

Tratamiento	Crioprotector	Diluyente	Hora posfertilización (HPF)
1	ETG 10% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	1
2	ETG 10% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	6
3	ETG 10% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	10
4	ETG 15% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	1
5	ETG 15% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	6
6	ETG 15% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	10
7	MET 10% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	1
8	MET 10% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	6
9	MET 10% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	10
10	MET 15% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	1
11	MET 15% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	6
12	MET 15% Glucosa 20%	NaCl 0,9%	10

y rotulados con capacidad de 13 mL, hasta completar 6 mL de embriones. Seguidamente, a cada tubo Falcon se adicionaron 6 mL del diluyente correspondiente (ETG 10%, ETG 15%, MET 10%, MET 15%) hasta completar una muestra final de 12 mL (6 mL de embriones + 6 mL de diluyente, proporción 1:1). Finalmente, las muestras fueron agitadas de forma suave asegurando una mezcla homogénea de los embriones con el crioprotector. Una submuestra de 6 mL de embriones en cada hora posfertilización (HPF) fue tomada con el objetivo de cuantificar el número de los mismos para cada tiempo (1, 6 y 10 HPF).

CONSERVACIÓN Y POSCONSERVACIÓN DE EMBRIONES

Protocolo para la conservación y posconservación de embriones de cachama blanca. Empacados los embriones más el diluyente en los tubos Falcon en cada HPF, se dispusieron en una gradilla de 24 puestos la cual fue introducida en una cava que presentaba una temperatura de 6,2 °C, y medida mediante una termocupla (Fluke 51K/J Thermometer, USA). Allí se mantuvieron durante 10 minutos, tiempo en donde los embriones iniciaron el proceso de intercambio del líquido extra e intracelular por

el diluyente y se acondicionaron a la nueva temperatura (periodo de equilibrio). Pasado este lapso, las muestras se llevaron a un congelador comercial (Samsung RS20-555L, USA), donde fueron dispuestos en una gradilla metálica de 24 puestos y conservados a -14°C durante una hora. El protocolo anteriormente mencionado fue implementado para las tres horas posfertilización estudiadas (1, 6 y 10 HPF).

Transcurrido el tiempo de conservación para cada hora posfertilización (HPF) se retiraron los tubos del congelador y se dispusieron en baño de agua a 27°C durante nueve minutos, tiempo donde el diluyente de los tubos Falcon se igualó con la temperatura del agua en la que continuaron su proceso de incubación artificial. La temperatura mencionada fue validada mediante ensayo previo introduciendo dos termocuplas (Fluke 51K/J Thermometer, USA), cada una en un tubo Falcon con el diluyente sometido a -14°C , monitoreando la temperatura interna del tubo y el tiempo de equilibrio de esta temperatura una vez que fueron sumergidos los tratamientos en el agua; la temperatura del agua fue medida con un termómetro convencional de mercurio. Posterior a los nueve minutos los embriones de cada tratamiento fueron lavados con agua de incubadora con el objetivo de eliminar el diluyente y sembrados en incubadoras de tipo experimental de flujo ascendente con capacidad para 2 l de agua.

CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD Y ECLOSIÓN DE LOS EMBRIONES POSCONSERVACIÓN SOMETIDOS A INCUBACIÓN ARTIFICIAL

Cuantificación de la viabilidad. La viabilidad de los embriones se calculó cada hora a partir de iniciada la incubación artificial posconservación y se realizó tomando tres muestras representativas de embriones de cada incubadora experimental o réplica, mediante un tubo de vidrio. La evaluación consistió en referir el número de embriones traslúcidos y blancos de treinta (30) embriones contados en cada medición, donde traslúcido indicó viabilidad embrionaria y blanco exteriorizó mortalidad o no viabilidad de los embriones (Velasco y col 2006, Ramírez y col 2011, Torres y col 2012). El resultado de la viabilidad embrionaria de cada tratamiento se expresó en porcentaje (%).

Cuantificación de la eclosión. La eclosión embrionaria de los tratamientos se cuantificó mediante observación en tubo de vidrio, tomando tres muestras representativas de cada réplica y refiriendo las larvas eclosionadas sobre el total de embriones contados (treinta embriones) en cada medición o muestreo. El resultado de la eclosión se expresó en porcentaje (%).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó un arreglo factorial asimétrico balanceado $2^2 \times 3$ en el tiempo efecto fijo, mediante un diseño de estructura completamente aleatorizado, donde los factores

fueron crioprotector (metanol y etilenglicol), concentración del crioprotector (10 y 15%), tiempo posfertilización (1, 6 y 10 HPF), donde las variables de respuestas fueron el porcentaje de viabilidad embrionaria y eclosión, medidos cada hora a partir de iniciada la incubación posconservación. Se convalidaron los supuestos asociados con el modelo experimental (normalidad, aleatoriedad, independencia de los errores experimentales, homogeneidad de varianzas y no relación de medidas y varianzas). Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media (EE). Posteriormente los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), previo al análisis de homogeneidad (Levene's) y normalidad (Kolmogorov-Smirnov) de los datos, siendo las variables de características paramétricas. Para observar diferencias estadísticas significativas se utilizó prueba de Tukey, donde para todos los casos $P < 0,05$ fue utilizado como criterio estadístico para revelar significancia entre los valores. Los datos fueron analizados mediante el *software* GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

VIABILIDAD Y ECLOSIÓN DE EMBRIONES DE CACHAMA BLANCA POSCONSERVACIÓN A -14°C

Viabilidad embrionaria posconservación. La figura 1 muestra el comportamiento de los embriones de 1 HPF sometidos a conservación con metanol (MET) 10% durante una hora a -14°C , los que mostraron viabilidad hasta la hora 5 ($2,3 \pm 0,1\%$) luego de iniciada la incubación artificial; entre tanto, los embriones sometidos con el mismo crioprotector pero bajo una concentración del 15%, solamente alcanzaron viabilidad durante la primera hora de incubación ($5,8 \pm 3,1\%$). Diferente ocurrió con los embriones conservados con etilenglicol (ETG) en las dos concentraciones (10% y 15%), quienes mostraron viabilidad embrionaria hasta la hora sexta de incubación ($2,2 \pm 1,1\%$ y $1,7 \pm 0,6\%$) (figura 1). Al hacer comparación estadística entre concentraciones al interior de cada crioprotector y de cada hora de incubación, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$); no obstante, los valores sí difirieron estadísticamente cuando se confrontaron los dos crioprotectores al interior de cada hora de incubación ($P < 0,05$). Respecto del tratamiento control, solamente en la hora 1 no se presentaron diferencias significativas con los tratamientos con ETG 10% y 15% ($P > 0,05$). Desde la segunda hora de incubación y hasta la hora séptima el tratamiento control siempre tuvo diferencias estadísticas respecto de los tratamientos con crioprotectores ($P < 0,05$) (figura 1).

Embriones de 6 HPF (figura 2) presentaron viabilidad hasta la novena hora de incubación, siendo MET 10% el tratamiento que mayor porcentaje obtuvo ($69,3 \pm 6,1\%$) y ETG 15% el de menor viabilidad ($16,7 \pm 6,6\%$). Al comparar estadísticamente los tratamientos con el control

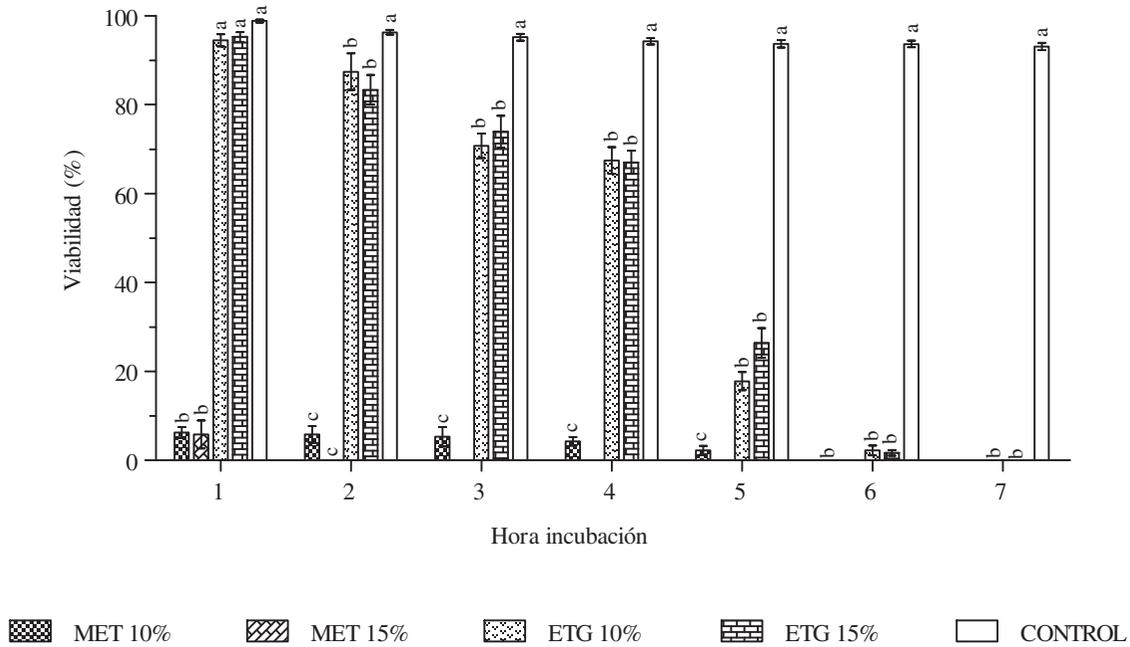


Figura 1. Viabilidad post-conservación de embriones de cachama blanca de 1 hora post-fertilización (HPF) sometidos a conservación durante una hora a -14°C , utilizando agentes crioprotectores como metanol (MET) y etilenglicol (ETG). a, b, c Barras con letras diferentes al interior de cada hora de incubación difieren estadísticamente ($P < 0.05$). Los valores son mostrados como media \pm EE ($n = 4$). Una vez determinada la viabilidad embrionaria nula, el tratamiento fue excluido en la comparación estadística de la hora de incubación siguiente.

Post-preservation feasibility of 1 hour post-fertilization (HPF) of cachama blanca embryos subjected to an hour preservation at -14°C . Cryoprotectant agents such as methanol and ethylene glycol were implemented. a, b, c Bars with different letters within each incubation hour differ statistically ($P < 0.05$). The values are shown as mean \pm SEM ($n = 4$). Once the embryonic feasibility was stated as null, the treatment was withdrawn from the statistical comparison of the following incubation hour.

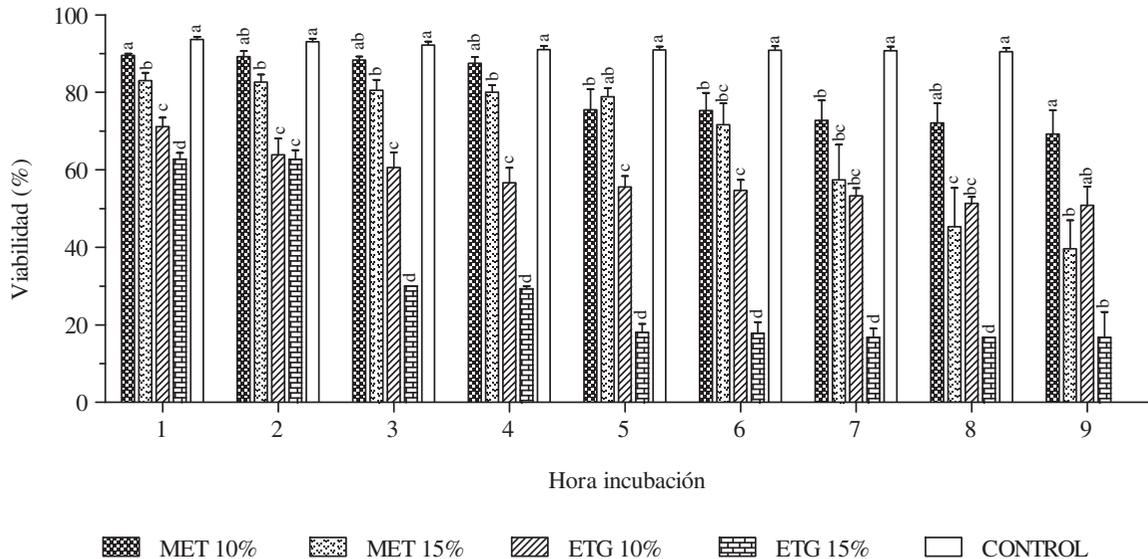


Figura 2. Viabilidad post-conservación de embriones de cachama blanca de 6 horas post-fertilización (HPF) sometidos a conservación durante una hora a -14°C , utilizando agentes crioprotectores como metanol (MET) y etilenglicol (ETG). a, b, c, d Barras con letras diferentes al interior de cada hora de incubación difieren estadísticamente ($P < 0.05$). En la hora nueve de incubación, no se presentó comparación estadística de los tratamientos frente al tratamiento control debido a que los embriones del tratamiento control eclosionaron en la hora ocho de incubación. Los valores son mostrados como media \pm EE ($n = 4$).

Post-preservation feasibility of 6 hour post-fertilization (HPF) cachama blanca embryos subjected to an hour preservation at -14°C . Cryoprotectant agents such as methanol and ethylene glycol were implemented. a, b, c, d Bars with different letters within each incubation hour differ statistically ($P < 0.05$). A statistical comparison between the treatments and the control treatment was not performed in the ninth hour of incubation. This was not performed due to the control treatment embryos hatched in the eighth hour of incubation. The values are shown as mean \pm SEM ($n = 4$).

al interior de cada hora de incubación, se observa que el tratamiento con MET 10% no difirió estadísticamente con el control hasta la hora cuatro de incubación ($P > 0,05$), como sí ocurrió con MET 15% y ETG al 10% y 15% ($p < 0,05$). Entre tanto, hacia la hora cinco de incubación MET 15% fue el tratamiento que no presentó diferencias estadísticas respecto del control ($P > 0,05$). Para la hora sexta y séptima de incubación artificial todos los tratamientos presentaron diferencias significativas respecto del control ($P < 0,05$), mientras que en la hora ocho el diluyente con MET 10% fue el único que no tuvo diferencias estadísticas al ser comparado con el control ($P > 0,05$). Finalmente, en la hora nueve no se hace comparación entre los tratamientos y el control debido a que los embriones control presentaron eclosión en esta hora de incubación (figura 2).

Para los embriones de 10 HPF (figura 3) la viabilidad fue medida hasta la hora 5 luego de reanudar la incubación artificial posconservación. Los tratamientos con MET 10% y 15% fueron los que presentaron mayor porcentaje de viabilidad ($94,8 \pm 1,3\%$ y $96,1 \pm 1,0\%$); entre tanto, los tratamientos con ETG 10% y 15% arrojaron los valores más bajos en cuanto a viabilidad embrionaria se refiere ($74,5 \pm 2,2\%$ y $77,4 \pm 1,3\%$). Estadísticamente, al confrontar el tratamiento control con los crioprotectores en sus dos concentraciones al interior de cada hora de incubación se observó que este primero no presentó diferencias con ETG al 15% durante las cuatro horas de incubación evaluadas

($P > 0,05$); no obstante, los embriones sometidos con ETG 10% presentaron el mismo comportamiento estadístico en la hora uno y dos de incubación ($P > 0,05$), pero en las horas tres y cuatro las diferencias estadísticas respecto del control se hicieron evidentes ($P < 0,05$). Los tratamientos con MET al 10 y 15%, fueron diferentes al control para la hora uno y dos de incubación ($p < 0,05$). Entre tanto, en la hora tres y cuatro el tratamiento con MET 15% no presentó diferencias estadísticas frente al control ($P > 0,05$), mientras que MET 10% fue igual estadísticamente en la hora tres ($P > 0,05$) pero difirió en la hora cuatro ($P < 0,05$). No se realizó comparación entre tratamientos y el control en la hora cinco debido a que los embriones control presentaron eclosión en esta hora de incubación (figura 3).

Eclosión posconservación. Los embriones de 1 HPF no presentaron eclosión en ninguno de los tratamientos establecidos (figura 4). Por su parte, los embriones de 6 y 10 HPF fueron los que eclosionaron luego de ser sometidos a conservación durante una hora a -14°C , obteniendo mejores resultados aquellos conservados bajo la adición de MET al 10% y 15% ($87,0 \pm 1,8\%$ y $83,3 \pm 3,1\%$) y obtenidos a las 10 HPF. La mayor eclosión presentada en los embriones de 6 HPF fue de $63,9 \pm 6,5\%$ preservados con MET 10% y el menor porcentaje correspondió a MET 15% con $36,7 \pm 10,9\%$ de eclosión. Todos los tratamientos de los embriones de 6 HPF presentaron diferencias estadísticas respecto del control ($P < 0,05$). Entre tanto, a

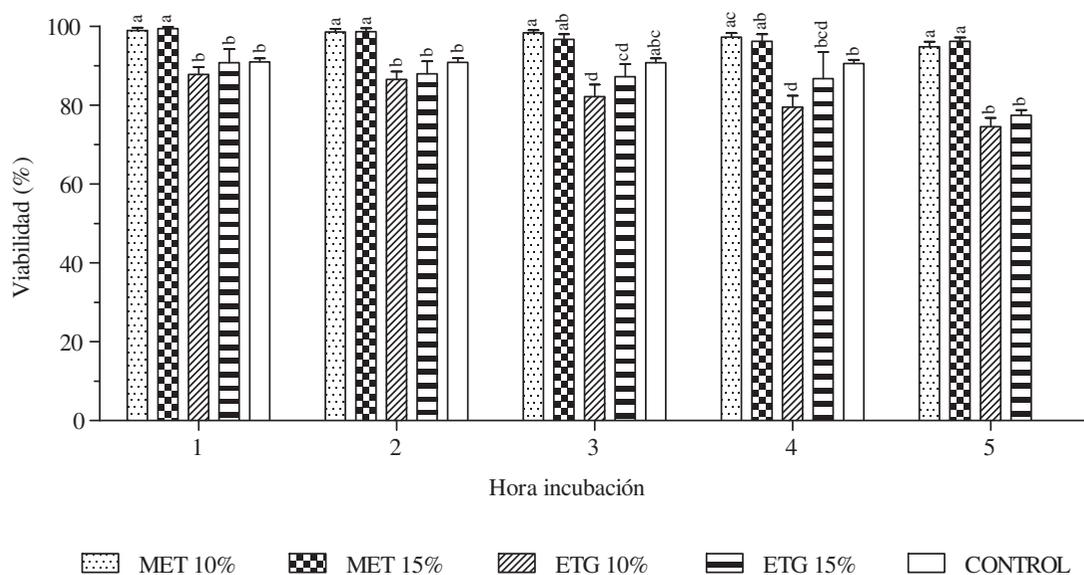


Figura 3. Viabilidad posconservación de embriones de cachama blanca de 10 horas posfertilización (HPF) sometidos a conservación durante una hora a -14°C , utilizando agentes crioprotectores como metanol (MET) y etilenglicol (ETG). ^{a, b, c, d} Barras con letras diferentes al interior de cada hora de incubación difieren estadísticamente ($P < 0,05$). En la hora cinco de incubación no se presentó comparación de los tratamientos frente al tratamiento control debido a que los embriones del tratamiento control eclosionaron en la hora cuatro de incubación. Los valores son mostrados como media \pm EE ($n = 4$).

Post-preservation feasibility of 10 hour post-fertilization (HPF) cachama blanca embryos subjected to an hour preservation at -14°C . Cryoprotectant agents such as methanol and ethylene glycol were implemented. ^{a, b, c, d} Bars with different letters within each incubation hour differ statistically ($P < 0,05$). A statistical comparison between the treatments and the control treatment was not performed in the fifth hour of incubation. This was not performed due to the control treatment embryos hatched in the fourth hour of incubation. The values are shown as mean \pm SEM ($n = 4$).

las 10 HPF los tratamientos con MET al 10% y 15% no difirieron estadísticamente al compararlos con el control al interior de la misma hora ($P > 0,05$), mientras que los tratamientos con ETG 10% y 15% de la misma hora posfertilización sí fueron diferentes ($P < 0,05$) (figura 4).

DISCUSIÓN

En los últimos años, estudios relativos a conservación en frío de embriones de peces teleósteos se han llevado a cabo sin obtener éxito en cuanto a porcentajes de eclosión se refiere (Harvey 1983, Liu y col 1999, Lance y col 2004). No obstante, investigaciones relacionadas acerca del efecto que ejercen los diluyentes y su toxicidad en la tasa de eclosión embrionaria (Zhang y col 2005), concentraciones de crioprotectores y temperaturas de congelación (Ahammad y col 2003^b) y evaluación de diferentes estadios embrionarios (Lopes y col 2011) se han llevado a cabo con el ánimo de obtener soluciones que mitiguen las problemáticas presentadas durante la crioconservación de embriones de peces.

En cuanto a la determinación del estadio embrionario óptimo para llevar a cabo procesos de conservación a temperaturas bajo cero, Lahnsteiner (2008) realizó un estudio en zebrafish (*Danio rerio*) donde evaluó diferentes crioprotectores internos respecto de la viabilidad de diferentes estadios embrionarios, encontrando que embriones de *Danio rerio* en estadios tempranos de desarrollo son más sensibles a la toxicidad de los crioprotectores que los embriones que presentaban mayor desarrollo; así mismo, determinó que dimetilsulfóxido (DMSO) y 1-2

Propanediol fueron menos tóxicos para los embriones de todos los estadios de desarrollo evaluados (1, 12, 24 y 36 HPF), respecto del glicerol, etilenglicol, metanol y dimetilacetamida. Igualmente, Bart (2000) evaluó la viabilidad de embriones de zebrafish (*Brachydanio rerio*) de dos estadios de desarrollo (60% de epibolia y 8 somitas) bajo diferentes crioprotectores (metanol, dimetilsulfóxido, etilenglicol), obteniendo que embriones en estadio de epibolia fueron más vulnerables a la toxicidad de los crioprotectores que los embriones en estadio de segmentación (aparición de somitas), demostrando también mejores tasas de viabilidad cuando fueron sometidos con metanol. Lo mismo ocurrió en el presente estudio, al evaluar tres estadios embrionarios (estadio de ~8 a 16 células para los embriones de 1 hora posfertilización - HPF, gastrulación (epibolia del 50%) a los de 6 HPF, y segmentación (formación de trece somitas y aparición de vesícula óptica) para los embriones de 10 HPF) bajo dos crioprotectores (metanol y etilenglicol) y dos concentraciones (10% y 15%) sobre la tasa de eclosión, obteniendo los mejores resultados en embriones de 10 HPF cuando se conservaron con metanol al 10% y 15%. La alta sensibilidad que presentan los embriones de peces teleósteos cuando son conservados a temperaturas bajo cero en estadios tempranos de desarrollo puede estar asociada a: i) la afectación causada por la acción de los crioprotectores a los procesos de diferenciación temprana propios del embrión; ii) la falta de desarrollo del proceso de defensa de los embriones ante condiciones ambientales externas (endurecimiento del corion, captación de agua y osmorregulación); iii) La fácil entrada de los crioprotectores

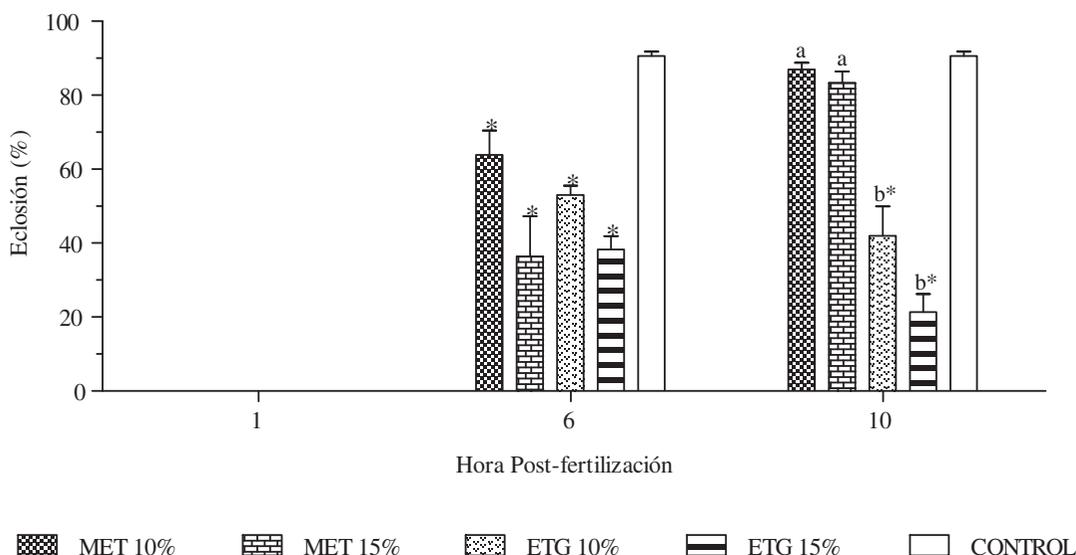


Figura 4. Tasa de eclosión de embriones de cachama blanca sometidos a conservación durante una hora a -14°C , utilizando agentes crioprotectores como metanol (MET) y etilenglicol (ETG). ^{a, b} Al interior de los tratamientos, barras con letras diferentes dentro de la misma hora posfertilización (HPF) difieren estadísticamente. * Barras con asteriscos dentro de la misma HPF presentan diferencias significativas respecto del control ($P < 0,05$). Los valores son mostrados como media \pm EE ($n = 4$).

Cachama blanca embryos hatching rate subjected to preservation for an hour at -14°C . Cryoprotectant agents such as methanol and ethylene glycol were implemented. ^{a, b} Bars with different letters within the same post-fertilization hour (HPF) differ statistically. * Bars with the star within the same HPF present important differences with regard to the control ($P < 0.05$). The values are shown as mean \pm SEM ($n = 4$).

en estadios tempranos, debido a la no formación completa de las estructuras embrionarias; iv) el bajo potencial de detoxificación de los embriones que evita compensar el efecto tóxico de los crioprotectores mediante vías de regulación metabólicas (Lahnsteiner 2008). En adición a lo expuesto, la mayoría de los embriones en estadios tempranos del desarrollo (a excepción del *Sciaenops ocellatus*) son más sensibles a los daños ocasionados por la refrigeración, atribuyéndose esto a la cantidad de componentes lipídicos que se encuentran en mayor cantidad al interior del saco vitelino y en las membranas embrionarias (Valdez Jr y col 2005), y confirmándose en un estudio realizado por Liu y col (1999) donde redujeron la sensibilidad a la refrigeración en embriones de zebrafish (*Danio rerio*) cuando les fue removido entre el 50 y 75% del vitelo. Lo anterior pudo haber sido una de las causas por las cuales los embriones de una HPF de cachama blanca no presentaron viabilidad superior a la quinta hora de incubación artificial, debido posiblemente al gran saco vitelino que presenta esta especie en los primeros estadios de desarrollo embrionario. Entre tanto, debido a que el inicio de la circulación sanguínea en los embriones ocurre en estadios ulteriores, etapa de segmentación para el caso de cachama blanca (Díaz y col 2010) y *Cyprinus carpio* (Ahammad y col 2003^a), estos pueden disminuir o mitigar los daños ocasionados por el frío aumentando la eficacia de los mecanismos de reparación, lo que los vuelve más resistentes a estos procesos de conservación (Dinnyes y col 1998).

Crioprotectores internos como el metanol (MET), etilenglicol (ETG), dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLY) y etanediol (ETA) son los crioprotectores más utilizados en la conservación de embriones de peces, estos presentan un nivel de toxicidad moderado, según lo reportado por Asahina y Takahashi (1978) y Harvey (1983), limitando en gran parte la concentración en que estos pueden ser utilizados, y en consecuencia, el no aprovechamiento de la eficiencia crioprotectora de los mismos (Arakawa y col 1990). La eficacia de la permeación de los crioprotectores se hace importante al momento de establecer protocolos de crioconservación de embriones de peces, teniendo en cuenta que estos son los encargados de proteger la integridad biológica de las células o tejidos cuando son sometidos a esta biotecnología, donde lo que se busca es mantener este tipo de material biológicamente inerte y genéticamente estable durante su almacenamiento. Esto último se logra mediante el mecanismo de permeación de los agentes crioprotectores por medio de los variados compartimientos que poseen los embriones, estos a su vez presentan diferentes permeabilidades (Hagedorn y col 1998). Suzuki y col (1995) reportaron la captación de DMSO en el espacio perivitelínico y en algunos tejidos embrionarios, pero esta permeación no fue suficiente para el proceso de crioconservación. Así mismo, Zhang y Rawson (1996^a, 1996^b) mediante mediciones ópticas, evaluaron la permeación de diferentes crioprotectores en *Brachydanio rerio*, concluyendo que metanol fue el único crioprotector que mostró evidencia de penetración en los embriones.

Zhang y col (2005) realizaron un estudio en embriones de 45 horas posfertilización (etapa en la que la larva inicia sus movimientos previo a la eclosión) de *Paralichthys olivaceus* donde evaluaron la eficiencia de diferentes crioprotectores (dimetilsulfóxido, metanol, etilenglicol, glicerol, 1-2 propilenglicol) y concentraciones (10%, 15%, 20%, 25% y 30%) sobre la tasa de eclosión de los mismos luego de ser sometidos a -15°C durante 60 minutos. Al comparar el anterior trabajo con el presente estudio, y teniendo en cuenta las similitudes entre los dos experimentos (igual tiempo de almacenamiento, crioprotectores, similar estadio de desarrollo embrionario y temperatura de conservación), los resultados se comportaron diferentes en cuanto al crioprotector y su concentración, encontrando los mejores valores de eclosión en el trabajo realizado por Zhang y col (2005) cuando sometieron los embriones bajo el diluyente 1-2 propilenglicol en concentraciones del 20%. Entre tanto, MET al 10% y 15% fueron los crioprotectores que mayores tasas de eclosión arrojaron en este estudio. Lo anterior demuestra que la eficiencia de los agentes crioprotectores y su concentración puede estar ligada a la especie, encontrándose embriones de especies ícticas que para obtener mayor protección de sus estructuras durante estos procesos de conservación requieren concentraciones altas del crioprotector; no obstante, estas concentraciones elevadas están directamente relacionadas con los daños embrionarios ocasionados a causa de la toxicidad de los crioprotectores (Zhang y col 2005, Lahnsteiner 2008), limitando la utilización de estos y su capacidad protectora en especies que requieran dichos niveles. En adición a esto, estudios realizados por Harvey y Ashwood-Smith (1982) y Zhang y col (1993) demuestran que la alta permeabilidad que presenta el metanol cuando es utilizado en embriones de algunas especies de peces se cree que es debido a factores como el bajo nivel de toxicidad que este presenta frente a los demás crioprotectores y como también a su posible rápida penetración. Finalmente, se hace necesario desarrollar protocolos que disminuyan los efectos adversos sobre la morfología embrionaria relacionada a la baja penetración del crioprotector ocasionada por la presencia de diferentes permeabilidades de las membranas, que repercutan positivamente sobre la tasa de sobrevivencia embrionaria posconservación. En conclusión, conservar embriones de 10 horas posfertilización de cachama blanca durante 60 minutos a -14°C bajo los protocolos con metanol al 10% y 15%, con concentraciones de glucosa del 20%, permiten obtener porcentajes satisfactorios de eclosión.

REFERENCIAS

- Ahammad MM, D Bhattacharyya, BB Jana. 2003^a. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2°C in different concentrations of methanol and sucrose. *Theriogenology* 60, 1409–1422.
- Ahammad MM, D Bhattacharyya, BB Jana. 2003^b. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* 46, 2–16.

- Arakawa T, JF Carpenter, YA Kita, JH Crowe. 1990. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology* 27, 401-415.
- Arias JA. 1988. Apuntes sobre el cultivo de la Cachama en el Meta. *Agrometa*, 9-10.
- Asahina E, T Takahashi. 1918. Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin. *Cryobiology* 15, 122-127.
- Ballou JD. 1992. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* 29, 19-25.
- Bart AN. 2000. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: Tiersch TR, Mazik PM (eds). *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Pp 179-187.
- Cruz PE, VM Medina, YM Velasco. 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev Col Cienc Pec* 19, 2.
- Díaz J, LJ Marciales, F Cristancho, PE Cruz. 2010. Comparación del desarrollo embrionario de *Piaractus brachypomus* (Serrasalimidae) y *Pseudoplatystoma* sp. (Pimelodidae). *Int J Morphol* 28, 1193-1204.
- Dinnyes A, B Urbanyi, B Baranyai, I Magyary. 1998. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* 50, 1-13.
- González R. 2000. La cachama blanca. *Revista Acuorient* 8, 8-10.
- Hagedorn M, EW Hsu, U Pilatus, DE Wildt, WF Rall, SJ Blackband. 1996. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartmental biological system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 7454-7459.
- Hagedorn M, FW Kleinhans, DE Wildt, WF Rall. 1997. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology* 34, 251-263.
- Hagedorn M, FW Kleinhans, D Artemov, U Pilatus. 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biol Reprod* 59, 1240-1250.
- Harvey B, MJ Ashwood-Smith. 1982. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology* 19, 29-40.
- Harvey B. 1983. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the Zebra Fish, *Brachydanio rerio* to -196°C . *Cryobiology* 20, 440-447.
- Janik M, FW Kleinhans, M Hagedorn. 2000. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology* 41, 25-34.
- Lahnsteiner F. 2008. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 69, 384-396.
- Lance SL, AS Peterson, M Hagedorn. 2004. Developmental expression of aquaporin-3 in Zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C* 138, 251-258.
- Liu X-H, T Zhang, DM Rawson. 1999. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Cryobiology* 39, 236-242.
- Lopes T da S, E Romagosa, DP Streit Jr, RP Ribeiro, M Digmayer. 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* 75, 570-576.
- Ramírez JA, VM Medina, PE Cruz. 2011. Criopreservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Arch Med Vet* 43, 135-144.
- Ramírez JA, YM Velasco, VM Medina, PE Cruz. 2011. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). *Aquac Res* 42, 738-745.
- Ramírez JA, VM Medina, PE Cruz. 2011. Criopreservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Arch Med Vet* 43, 135-144.
- Suzuki T, H Komada, R Takai, K Aarii, TT Kozima. 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. *Fish Sci.* 61, 193-197.
- Torres A, N Novoa, LY Sandoval, YM Velasco, PE Cruz, VM Medina. 2012. Estudios preliminares sobre congelación de embriones de yamú (*Brycon amazonicus*) en diferentes estadios de desarrollo. *Orinoquia suplemento* Vol. 16, 2.
- Valdez Jr. DM, A Miyamoto, T Hara, K Edashige, M Kasai. 2005. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology* 64, 112-122.
- Velasco YM, VM Medina, PE Cruz. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture* 256, 264-271.
- Wildt DE, US Seal, WF Rall. 1993. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. In: Cloud JG, Thorgaard GH (eds). *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. Plenum, New York, USA, Pp 159-173.
- Wildt DE, WF Rall, JK Critser, SL Monfort, US Seal. 1997. Genome resource banks: Living collections for biodiversity conservation. *BioScience* 47, 689-698.
- Zhang T, DM Rawson, GJ Morris. 1993. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquat Living Resour* 6, 145-153.
- Zhang T, DM Rawson. 1996^a. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 33, 1-13.
- Zhang T, DM Rawson. 1996^b. Permeability of the vitelline membrane of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to methanol and propane-1,2-diol. *Cryo Lett* 17, 273-280.
- Zhang T, DM Rawson. 1995. Studies on chilling sensitivity of on zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 32, 239-246.
- Zhang YZ, SC Zhang, XZ Liu, YJ Xua, JH Hu, YY Xu, J Li, SL Chen. 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology* 63, 763-773.

