

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Maestría en Ciencias en Acuicultura

**Criopreservación del esperma del abulón azul *Haliotis fulgens*:
Efecto de los crioprotectores y la tasa de enfriamiento en la
viabilidad espermática**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Erika Castro Acevedo

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Erika Castro Acevedo

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de Tesis

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Codirectora de Tesis

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Erika Castro Acevedo © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Erika Castro Acevedo** requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Criopreservación del esperma del abulón azul *Haliotis fulgens*: Efecto de los crioprotectores y la tasa de enfriamiento en la viabilidad espermática

Resumen aprobado por:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de Tesis

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Codirectora de Tesis

El abulón azul (*Haliotis fulgens*) es una especie endémica de las costas del Pacífico de la península de Baja California y de California que constituye una pesquería económicamente importante a nivel nacional e internacional, que actualmente es considerada una especie amenazada. La criopreservación de esperma es una herramienta útil en la industria de la acuicultura que puede ayudar en la producción y conservación de recursos genéticos tanto en especies cultivadas como en peligro de extinción. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la conservación a corto plazo en refrigeración (4 °C) y desarrollar un protocolo de criopreservación para el esperma del abulón azul. En el almacenamiento a corto plazo se evaluó la motilidad espermática y se determinó que el esperma puede mantener una motilidad >40% al tercer día de almacenamiento. Para el experimento de criopreservación se evaluaron cuatro crioprotectores: dimetilsulfóxido (DMSO), propilenglicol (PG), glicerol (GLY) y metanol (MeOH) a cuatro concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) y cuatro tiempos de incubación (5, 10, 15 y 20 min). El congelamiento se llevó a cabo utilizando una cámara de congelamiento manual a una tasa de -30 °C por 10 min. Para determinar la calidad del esperma descongelado se evaluó la motilidad y viabilidad de las células. La motilidad fue evaluada estimando el porcentaje de esperma móvil en los diferentes tratamientos. Para determinar la viabilidad espermática se utilizó el kit *LIVE/DEAD Sperm Viability*. En el experimento de criopreservación se encontraron diferencias significativas en la selección del crioprotector. La máxima motilidad ($48 \pm 4.7\%$) y viabilidad ($62 \pm 8.8\%$) se obtuvieron al suspender el esperma en 15% de DMSO durante 5 min. Mientras que el uso de PG, GLY y MeOH mostró una motilidad < 5% en todos los tratamientos. Posteriormente se realizó un protocolo de optimización utilizando 12%, 15% y 18% de DMSO durante 8 y 18 min de incubación. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la motilidad y viabilidad espermática. Por lo tanto, el mejor tratamiento para congelar esperma del abulón azul fue DMSO al 15%.

Palabras clave: *Haliotis fulgens*, abulón azul, criopreservación, calidad espermática

Abstract of the thesis presented by **Erika Castro Acevedo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Sperm cryopreservation of green abalone *Haliotis fulgens*: The effect of the cryoprotectant and the freezing rate on sperm viability

Abstract approved by:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Thesis Director

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Thesis Director

Green abalone, *Haliotis fulgens*, is an endemic species of the Pacific coasts of California and the peninsula of Baja California considered a high-commercial value product at national and international levels. Cryopreservation of sperm of aquatic species can be helpful in the aquaculture industry and the conservation of genetic resources for culture and endangered species. This study aimed to evaluate the effect of short-term storage in refrigeration (4 ° C) and to develop a cryopreservation protocol for sperm of green abalone. For short-term storage, sperm motility was evaluated, and it was determined that sperm could maintain > 40% motility on the third day of storage. For the cryopreservation experiment, four commonly used cryoprotectants were evaluated: dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol (PG), glycerol (GLY), and methanol (MeOH) at four concentrations (5%, 10%, 15%, and 20%) and four equilibration times (5, 10, 15 and 20 min). Then the sperm was frozen using a manually controlled styrofoam chamber at -30 ° C for 10 min. Sperm quality was estimated as the percentage of motile sperm; to determine the plasma membrane integrity the LIVE / DEAD Sperm Viability kit was used. In the cryopreservation experiment, significant differences were found in the selection of the cryoprotectant. The highest motility ($48 \pm 4.7\%$) and viability ($62 \pm 8.8\%$) were found using sperm suspended in 15% DMSO for 5 min. Sperm cryopreserved with PG, GLY and MeOH showed the lowest motility <5% in all treatments. An optimization protocol was carried out using 12%, 15%, and 18% DMSO during 8 and 18 min of equilibration. However, no significant differences were found in sperm motility and viability. Therefore, the best treatment for sperm cryopreservation of green abalone is 15% DMSO. The use of cryopreserved sperm from green abalone provides an alternative breeding option for culture for this species.

Keywords: *Haliotis fulgens*, green abalone, cryopreservation, sperm quality

Dedicatoria

A mi papá

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme el apoyo económico para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por abrirme las puertas a sus instalaciones y brindarme los conocimientos necesarios para realizar la maestría. A todos los académicos, técnicos y administrativos del Departamento de Acuicultura, por ser parte de mi desarrollo profesional.

A la Dra. Carmen Paniagua, por los conocimientos impartidos, el apoyo y la motivación en cada una de las etapas de este proyecto. Por su buena disposición ante los cambios y retos que enfrentamos y sobre todo por ser una inspiración como mujer en la ciencia. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Fabiola Lafarga, por haber aceptado ser parte de este proyecto con tan poco tiempo de anticipación. Por impartirme sus conocimientos, recomendaciones y consejos en todo lo que respecta a los abulones.

Al Dr. Miguel Ángel del Río y al Dr. Luis Calderón, por haber aceptado formar parte de este proyecto como miembros del comité. Agradezco su apoyo, sus valiosas observaciones y correcciones a lo largo de este trabajo a pesar de la distancia.

A mis compañeros Salvador y Vincent, por sus valiosos consejos, por su paciencia y apoyo en el laboratorio. Gracias por bríndame su amistad y compañía.

A mis amigos, que a pesar de la distancia y las situaciones de la vida sé que están ahí para apoyarme y escucharme. A mis compañeras y amigas de maestría Lorena y Melanie, fue un gusto conocerlas y compartir clases juntas.

A mi amiga Brianda, por todo el cariño y apoyo durante todos estos años; pero principalmente por haber formado parte de mi vida durante esta etapa de maestría y pandemia, por hacer mis días más divertidos y bonitos...gracias.

A Oscar, por el apoyo incondicional, los consejos y la motivación. Gracias por compartir tu tiempo conmigo y por todo tu cariño.

A mi familia por todo el apoyo y amor incondicional en cada etapa de mi vida. A mi papá Julián por ser una fuente de inspiración y motivarme a crecer académicamente. A mi mamá Letty por regalarme siempre su mejor versión sin importar las circunstancias y demostrarme que efectivamente el que persevera alcanza. A mi hermano Sergio, a Marlene y Leo por su tiempo y su apoyo. Y a Luna y Emma por llenar de alegría mis días.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.1.1. Importancia del abulón azul <i>Haliotis fulgens</i>	2
1.1.2. Características del abulón azul.....	4
1.1.3. Aspectos reproductivos.....	5
1.1.4. Los gametos y el proceso de fertilización	6
1.1.5. La calidad del esperma.....	9
1.1.6. Conservación a corto plazo	10
1.1.7. La criopreservación de esperma como herramienta en la acuicultura	11
1.1.8. Crioprotectores y su química	12
1.1.9. Tasa de congelación	13
1.2. Justificación.....	14
1.3. Hipótesis	16
1.4. Objetivos.....	16
1.4.1. Objetivo general.....	16
1.4.2. Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Metodología.....	17
2.1. Obtención de organismos y liberación de esperma	17
2.2. Determinación de la motilidad espermática	17
2.3. Determinación de la viabilidad espermática	17
2.4. Determinación de densidad espermática.....	18
2.5. Almacenamiento a corto plazo de esperma.....	18
2.6. Criopreservación de esperma.....	18

2.6.1. Método no controlado	19
2.6.1.1. Optimización de los resultados obtenidos del Ensayo 1.....	19
2.6.2. Método controlado	20
2.7. Descongelamiento	21
2.8. Análisis estadístico.....	22
Capítulo 3. Resultados.....	24
3.1. Densidad espermática	24
3.2. Almacenamiento a corto plazo de esperma.....	24
3.2.1. Motilidad espermática de la PI	24
3.2.2. Motilidad espermática de la SI.....	24
3.3. Calidad del esperma criopreservado	26
3.3.1. Ensayo 1 y 2.....	26
3.3.1.1. Motilidad	26
3.3.1.2. Viabilidad.....	26
3.3.2. Ensayo 3	30
3.3.2.1. Motilidad	30
3.3.2.2. Viabilidad.....	30
3.3.3. Ensayo 4	34
3.3.3.1. Motilidad y Viabilidad con DMSO	34
3.3.3.2. Motilidad y Viabilidad con EG	34
3.4. Daños en el esperma criopreservado	37
Capítulo 4. Discusión.....	40
Capítulo 5. Conclusiones.....	47
Capítulo 6. Recomendaciones.....	48
Literatura citada.....	49
Anexos.....	58

Figuras

Figura		Página
1	Límites de distribución reportados para las especies de abulón de la costa noroeste del pacífico (Tomado de Vega-García, 2016).....	3
2	Abulón azul <i>Haliotis fulgens</i> mantenido en el laboratorio de cultivo de abulón del Departamento de Acuicultura del CICESE. Fotografía tomada por la autora.....	4
3	Microfotografía de espermatozoide de <i>Haliotis fulgens</i> : A) técnica microscopía electrónica de transmisión. B) Técnica microscopía electrónica de barrido. Flagelo (fl), mitocondria (m), núcleo (nc), acrosoma (ac), laguna nuclear (cabeza de flecha) (Tomado de Vélez-Arellano, 2016).	7
4	Representación esquemática de las estructuras del esperma del abulón (<i>Haliotis rufescens</i>). Estructuras primarias: acrosoma granular (AG), núcleo (N), pieza intermedia (M), flagelo (F); otras estructuras: fosa acrosómica (AF), lagunas (L), fosa nuclear (NF), anclajes (A), vesículas (V) (Tomado de Lewis <i>et al.</i> , 1980).....	8
5	Descripción general de la fecundación de ovocitos del abulón: flagelo (F), mitocondria (M), núcleo (N), proceso acrosómico (AP), vesícula acrosomal (AV), capa de gelatina (JC) y envoltura vitelina (VE) (Tomado de Kresge <i>et al.</i> , 2001).....	8
6	Cámara de congelamiento utilizada para el método no controlado durante la criopreservación de esperma del abulón azul. A) Vista área y B) Vista Rayos X.....	20
7	Tasa de congelación utilizada en el congelador programable Planer Kryo 560-16.....	21
8	Esquema de la metodología de criopreservación del esperma de abulón azul. Tras la inducción a la liberación de gametos, se obtiene el esperma y se agrega el crioprotector y se deja actuar durante el tiempo de incubación a 4 °C. El esperma se captura en pajillas francesas y la congelación se lleva a cabo mediante el método controlado o no controlado. Las pajillas se almacenan en tanques con nitrógeno líquido. Para la descongelación las pajillas se sumergen en un baño de agua a 45 °C durante 6 s y el esperma se suspende en 250 µL de AMF. La calidad espermática es evaluada. Imagen creada con Biorender (BioRender.com).....	23
9	Motilidad espermática (%) durante la evaluación del almacenamiento a corto plazo del esperma de la primera inducción. (Esperma con 20 µL antibiótico/antimicótico, círculo azul; esperma control, cuadro rojo).....	25
10	Motilidad espermática (%) durante la evaluación del almacenamiento a corto plazo del esperma de la segunda inducción. (Esperma con 10 µL antibiótico/antimicótico, círculo azul; esperma control, cuadro rojo).....	25
11	Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando DMSO (A), PG (B), GLY (C) y MeOH (D).....	28

12	Viabilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando DMSO (A), GLY (B) y MeOH (C).....	29
13	Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción SI).....	31
14	Viabilidad espermática (% de células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción SI).....	31
15	Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción, SI). Esperma incubado durante ocho min, color verde; esperma incubado durante 18 min, color azul; A) Organismo 1, B) Organismo 2, C) Organismo 3, D) Organismo 4.....	32
16	Viabilidad espermática (% de células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción, SI). Esperma incubado durante ocho min, color verde; esperma incubado durante 18 min, color azul; A) Organismo 1, B) Organismo 2, C) Organismo 3, D) Organismo 4.....	33
17	Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).....	35
18	Viabilidad espermática (% células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).....	35
19	Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando etilenglicol (EG) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).....	36
20	Viabilidad espermática (% células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando etilenglicol (EG) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).....	36
21	Imágenes de microscopia de fluorescencia de esperma criopreservado después de la tinción LIVE/DEAD. A) Esperma criopreservado con DMSO con membranas intactas (verdes) y dañadas (rojos); B) Esperma criopreservado con DMSO ligeramente aglutinado; C) Esperma criopreservado con GLY ligeramente dañado; D) Esperma aglutinado con membranas dañadas e intactas, criopreservado con GLY; E) Esperma criopreservado con MeOH; y F) Esperma dañado y aglutinado, criopreservado con MeOH. DMSO, dimetilsulfóxido; GLY, glicerol y MeOH, metanol..	38
22	Daños morfológicos en el esperma criopreservado (flechas de color rojo). A) Flagelo doblado y defecto en el acrosoma; B) Cuello plegable y defecto en el acrosoma; y C) Flagelo corto y defecto en el acrosoma.....	39

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Características de la gónada para determinación de Índice Visual Gonadal (IVG) (Leighton, 2000).....	5
2	Protocolos de criopreservación en especies de abulones. GLY, glicerol; DMSO, dimetilsulfóxido; C, congelación controlada; NC, congelación no controlada y NL, nitrógeno líquido.....	15
3	Ensayos de criopreservación de esperma de abulón azul. ILG, Inducción a la liberación de gametos; PI, Primera Inducción; SI, Segunda Inducción; TI, Tercera Inducción; DMSO, dimetilsulfóxido; PG, propilenglicol; GLY, glicerol; MeOH, metanol y EG, etilenglicol.....	22
4	Concentración de antibiótico antimicótico para el experimento A y B de la conservación a corto plazo.....	61
5	Preparación de soluciones crioprotectoras para la criopreservación del esperma del abulón azul <i>Haliotis fulgens</i>	62
6	Análisis de Covarianza para la comparación de la adición de antibiótico antimicótico (20 μ L) sobre la motilidad del esperma de abulón azul a lo largo del tiempo (7 días). Donde se muestra el Estimando, Error estándar, y valor P; ($P < 0.05$).....	63
7	Análisis de Covarianza para la comparación de la adición de antibiótico antimicótico (10 μ L) sobre la motilidad del esperma de abulón azul a lo largo del tiempo (7 días). Donde se muestra el Estimando, Error estándar, y valor P; ($P < 0.05$).....	63
8	Resumen del análisis (ANOVA) de la motilidad espermática para la comparación del efecto de los crioprotectores (DMSO, PG, Gly y MeOH) y concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); GI, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad. Significancia estadística ($P < 0.05$).....	63
9	Resumen del análisis (ANOVA) de la viabilidad espermática para la comparación del efecto de los crioprotectores (DMSO, Gly y MeOH) y concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); GI, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad. Significancia estadística ($P < 0.05$).....	64
10	Resumen del análisis (ANOVA) de la motilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); GI, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).....	64

11	Resumen del análisis (ANOVA) de la viabilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); GI, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).....	64
12	Resumen del análisis (ANOVA) de la motilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (12%, 15% y 18%) a lo largo del tiempo (8 y 18 min); GI, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).....	64
13	Resumen del análisis (ANOVA) de la viabilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (12%, 15% y 18%) a lo largo del tiempo (8 y 18 min); GI, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).....	65

Capítulo 1. Introducción

Los abulones son moluscos marinos que habitan en las costas rocosas de todos los continentes del mundo, así como en algunas islas del Océano Pacífico, Atlántico e Índico (Cox, 1962; Leighton, 2000). En Norteamérica existen ocho especies nativas que se distribuyen al largo de la costa occidental: abulón rojo (*Haliotis rufescens*), abulón amarillo (*Haliotis corrugata*), abulón azul (*Haliotis fulgens*), abulón negro (*Haliotis cracherodii*), abulón chino (*Haliotis sorenseni*), abulón plano o verde (*Haliotis walallensis*), abulón pinto (*Haliotis kamtschatkana*), y abulón rayado, *Haliotis k. assimilis* (Figura 1) (Leighton, 2000; CNP, 2018). En México, la especie más cultivada es el abulón rojo, pero el abulón azul constituye una pesquería importante en la región. Su pesquería comercial se constituyó a partir de 1940 (McShane, 1995) y actualmente alrededor del 68% de la pesquería comercial en la península depende de esta especie (CONAPESCA, 2014). Sin embargo, la pérdida de hábitat, contaminación, competencia con otras especies de invertebrados, la sobrepesca, pesca ilegal y mortalidades masivas, así como una gestión inapropiada de los cierres estacionales han propiciado el declive de las poblaciones de abulón en México y en California, EE. UU. (Leighton, 2000; CNP, 2018).

A pesar de que en términos de producción los abulones contribuyen solo una pequeña proporción del sector acuícola, estos moluscos figuran entre los productos acuícolas más apreciados en el mundo. El precio de los abulones de cultivo puede variar dependiendo de diversos factores como la especie de cultivo, el país de origen, el tamaño y la calidad de la carne (Cook, 2014; Cook, 2019). La demanda por abulón es alta en varias partes del mundo, particularmente en el mercado asiático (China, Hong Kong, Singapur, Japón, Taiwán y Malasia), pero también en Norteamérica, Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Leighton, 2000; Cook, 2014; CEP, 2015). En China, se consume el 90% de toda la producción de abulón, con un precio nacional alrededor de los 26 USD/kg. Por otro lado, los precios de abulones de exportación para especies de tamaños más grandes, así como para las especies Premium son mayores a 40 USD/kg. El abulón azul es considerado una especie Premium a nivel internacional (FAO, 2017).

Debido al declive de las poblaciones y la alta demanda por abulón en el mundo, se han intentado recuperar dichas especies. En California, las prácticas de acuicultura para repoblamiento de abulón comenzaron a mitad de 1960, poco tiempo antes de que se volviera evidente que las poblaciones naturales estaban reduciéndose (Leighton, 2000). Sin embargo, a pesar de que la especie de abulón azul tiene gran potencial para ser cultivada en la península de Baja California, la acuicultura comercial se ha desarrollado lentamente. Esto puede deberse a las dificultades y riesgos de este tipo de actividad en el país, además de la falta de infraestructura en las regiones costeras y a los altos costos de operación (Searcy-Bernal *et al.*,

2010). En Baja California, para el año 2010, existían 15 cooperativas de producción pesquera dedicadas a la extracción de abulón azul. Seis de ellas con laboratorios para la producción de larva, postlarva y semilla. Al menos dos de ellas han realizado pruebas de repoblamiento de abulón amarillo y abulón azul. Esto con el objetivo de colaborar en la recuperación de las poblaciones naturales (Searcy-Bernal *et al.*, 2010).

La criopreservación de células reproductivas es una técnica que permite el almacenamiento de material biológico por un tiempo indefinido (Mazur, 1985). El almacenamiento de gametos y embriones utilizando técnicas de criopreservación es una estrategia que puede ayudar en la producción y conservación de recursos genéticos acuáticos tanto en especies cultivadas como en peligro de extinción. Entre sus beneficios ofrece: la sincronización en la disponibilidad de gametos de ambos sexos, reducción en los costos de mantenimiento y maduración de reproductores, reducción en la transmisión de infecciones, disponibilidad de esperma con características deseables para la cruce selectiva, así como, el mantenimiento de líneas genéticas (Blaxter, 1953; Renard y Cochard, 1989; Suquet *et al.*, 2000; Salinas-Flores *et al.*, 2005). El objetivo principal de la criopreservación es establecer protocolos específicos que permitan el almacenamiento de células funcionales a largo plazo (Koebe *et al.*, 1993). Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo establecer un protocolo de criopreservación del esperma del abulón azul.

1.1. Antecedentes

1.1.1. Importancia del abulón azul *Haliotis fulgens*

El abulón azul (*Haliotis fulgens*) es una especie endémica de la costa occidental del Pacífico norte que se extiende desde el sur de Punta Concepción, California, EE. UU. hasta Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. (Leighton, 2000). Es considerado como uno de los mariscos más apreciados y atractivos en la industria de la gastronomía asiática que mantiene una alta demanda y popularidad a pesar de sus precios elevados. Su carne es conocida por su excelente sabor y el material de su concha ha sido utilizado para arte e incrustaciones de joyería; además, su aprovechamiento otorgó empleos y permitió fundar varios poblados a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California. Estos motivos posicionan a la pesquería de abulón como una de las de mayor importancia regional (Leighton, 2000; Ponce-Díaz *et al.*, 2000). En México, la pesquería inicio a mediados de 1800s, pero no fue hasta inicios de

1940 que se estableció la pesquería comercial. Desde entonces, el derecho de captura de este recurso está reservado para las organizaciones de cooperativas a lo largo de la península de Baja California. Sin embargo, una combinación de alta demanda y constante sobreexplotación llevó a un declive de las poblaciones y para 1950 la pesquería alcanzó una producción record de 6000 t (Guzmán del Proó, 1992; Vega *et al.*, 1994; Ponce-Díaz *et al.*, 2000).

Desde 1956 se han aplicado tres medidas regulatorias para la mejora en el manejo de abulón: 1) el establecimiento de dos tipos de vedas: la veda reproductiva, que impide la captura durante la época de máxima actividad reproductiva y la veda prohibitiva, que no permite la captura en ningún momento; 2) la determinación de la talla mínima de captura, que se fija con base en la talla de primera reproducción y 3) el establecimiento de zonas de reserva, que se aplica a recursos con hábitos de agregación reproductora (Baquero, 1992). Actualmente el aprovechamiento de las distintas especies de abulón se rige bajo las Normas Oficiales Mexicanas NOM- 005-PESC-1993 (SEPESCA, 1993) y NOM-009-SAG/PESC-2015 (SAGARPA, 2016), en las que se establece el procedimiento para determinar las épocas y zonas de veda para la captura de las diferentes especies de la flora y fauna acuáticas (Vélez-Arellano, 2016)

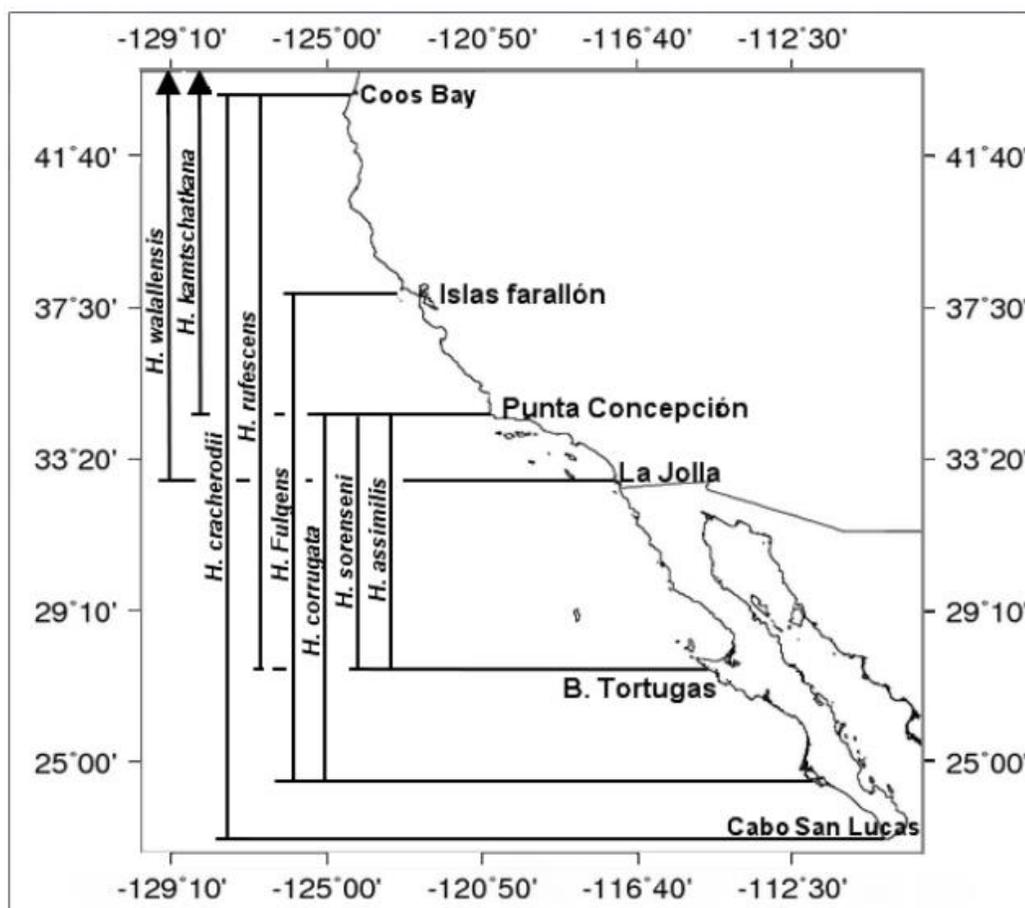


Figura 1. Límites de distribución reportados para las especies de abulón de la costa noroeste del pacífico (Tomado de Vega-García, 2016).

1.1.2. Características del abulón azul

El abulón azul es una especie de aguas superficiales (8-15 m) que habita en arrecifes rocosos y superficies cubiertas por pastos marinos como *Phyllospadix scouleri* y *P. torreyi* (Figura 2). Son organismos longevos que pueden llegar a vivir cerca de 20 años de edad. Sus características morfológicas más evidentes son su concha ovalada que puede alcanzar tallas de 27 cm de largo, que presentan colores marrones con poros abiertos en la superficie y un interior cubierto de nácar en colores verde y azul (Guzmán del Proó y Marín, 1976; Guzmán del Proó, 1992; Leighton, 2000). La mayor parte del cuerpo consiste en una masa muscular que incluye al pie, los epipodios y el gran músculo columelar. Los tentáculos cefálicos lucen una coloración gris oscuro y los tentáculos epipodios presentan un margen dividido en dos lóbulos de color gris claro o amarillo (Cox, 1962; Leighton, 2000).

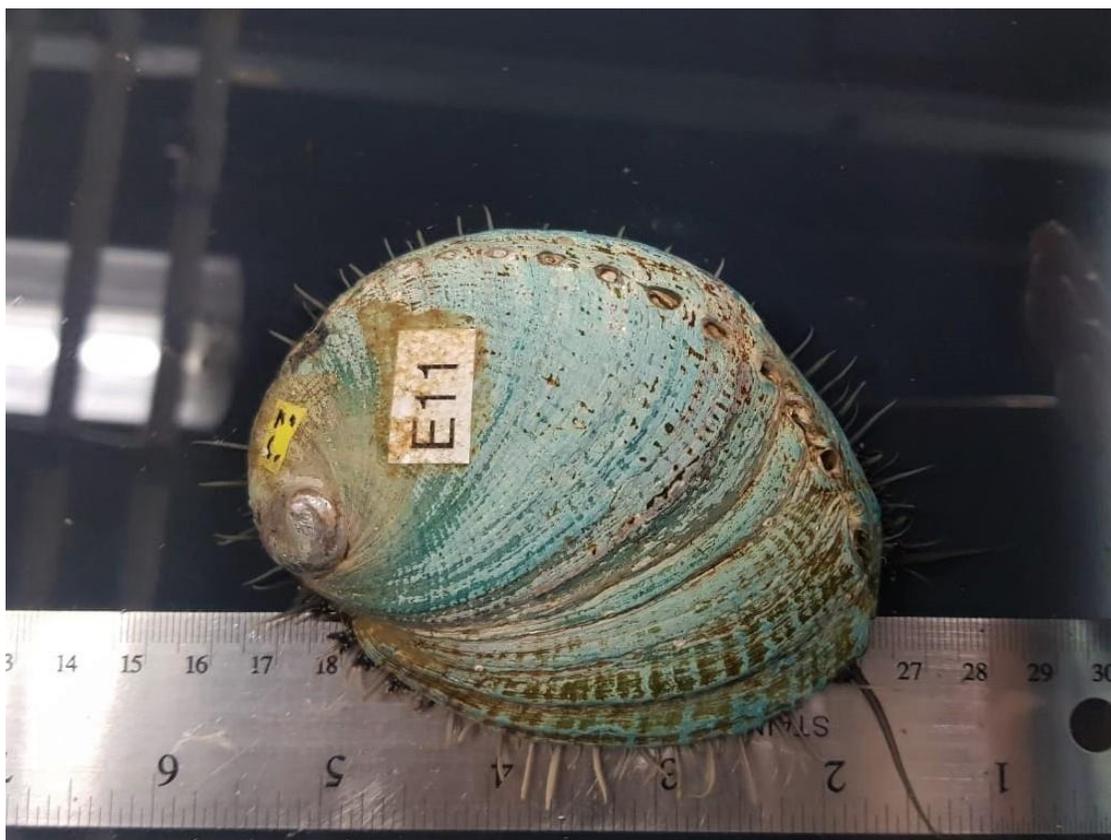


Figura 2. Abulón azul *Haliotis fulgens* mantenido en el laboratorio de cultivo de abulón del Departamento de Acuicultura del CICESE. Fotografía tomada por la autora.

1.1.3. Aspectos reproductivos

Los abulones son organismos dioicos que liberan sus gametos directamente en la columna de agua donde se lleva a cabo la fertilización. La temperatura y el fotoperiodo figuran como los factores más importantes para la maduración gonadal, para asegurar el éxito reproductivo tiene que sincronizarse la maduración y el periodo de desove. Asimismo, la nutrición es un factor de gran importancia y necesita ser óptima para la producción de gametos completamente viables y en cantidades abundantes (Leighton, 2000). En los haliótididos las gónadas maduran anualmente durante una o más temporadas. En el abulón azul se observan dos picos de desove que ocurren de marzo a julio y de septiembre a diciembre. La talla de primera madurez es de 135 mm pero pueden encontrarse organismos maduros a partir de 66 mm, el tiempo en alcanzar esta talla suele ser de 4 a 5 años de edad (Leighton, 2000, Vélez-Arellano, 2016).

La gónada es parte de un apéndice cónico que se conoce como complejo hepatogonadal. La gónada se encuentra envolviendo a la glándula digestiva o hepatopáncreas y puede observarse fácilmente elevando el pie y el epipodio. Su coloración varía dependiendo del sexo y el estado de madurez del organismo. En el caso de los machos presentan una coloración beige o amarillo cremoso y las hembras una coloración verde pardo. Cuando los organismos están maduros, la gónada cubre gran parte del hígado, estómago, órganos renales y el corazón (Booolootian *et al.*, 1962; Cox, 1962; Leighton, 2000). Estas características permiten identificar el sexo y grado de madurez del espécimen sin disecarlo para cortes histológicos utilizando la técnica del índice visual gonadal (IVG). Esta técnica consiste en asignar un valor al abultamiento de la gónada en una escala de 1 al 3 (Tabla 1) (Ault, 1985; Leighton, 2000; Vélez-Arellano *et al.*, 2015).

Tabla 1. Características de la gónada para determinación de Índice Visual Gonadal (IVG) (Leighton, 2000).

IVG	Descripción
1	Sin abultamiento completamente inmaduro, se observa un epitelio que cubre porciones del hepatopáncreas.
2	Abultamiento moderado, inicia la maduración gonadal. El epitelio cubre gran parte del hepatopáncreas y la coloración empieza a ser evidente: beige o amarillo cremoso para machos y verde grisáceo con tonalidades en café claro para hembras.
3	Abultamiento pronunciado que indica que la gónada está totalmente madura. La coloración se intensifica.

1.1.4. Los gametos y el proceso de fertilización

Los haliótidos son prosobranquios primitivos que liberan abundantes cantidades de gametos en la columna de agua. Es ahí donde sucede la fecundación del ovocito y el desarrollo de los embriones en larvas pelágicas (Lewis *et al.*, 1980). Los ovocitos de los abulones son células redondas que llegan a medir hasta 200 μm de diámetro. Están rodeados de una matriz extracelular compuesta de múltiples capas que protegen del contacto directo entre el esperma y el citoplasma del ovocito. (Mozingo *et al.*, 1995; Velez-Arellano, 2016). Los abulones poseen un esperma primitivo con una forma alargada similar a la de una bala. El esperma del abulón azul tiene una longitud de $10.8 \pm 1 \mu\text{m}$, con un acrosoma granular de forma ovalada que mide $3.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$ de longitud. En el cuello del espermatozoide se encuentran cinco mitocondrias que rodean un centriolo. Las mitocondrias tienen un diámetro promedio de $1.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (Figura 3 y Figura 4) (Lewis *et al.*, 1980; Kang *et al.*, 2004; Vélez-Arellano, 2016).

El espermatozoide de los abulones es una célula especializada para dos propósitos: la penetración del revestimiento del ovocito y la fusión con la membrana plasmática del ovocito. La reacción acrosomal consiste en la apertura de la punta del esperma que libera al acrosoma granular y es el evento clave durante la fertilización animal, ya que si el esperma no es capaz de liberar proteínas acrosomales, el ovocito no puede ser fertilizado (Lewis *et al.*, 1980; Lewis *et al.*, 1982).

Al encontrar un ovocito, el esperma nada a través del primer recubrimiento, la capa gelatinosa que mide aproximadamente 5 μm de grueso y está compuesta de fibras de diferentes tamaños. Posteriormente el esperma hace contacto con la envoltura vitelina, una capa más delgada (0.6 μm) compuesta de glicoproteínas que forman una red de fibras entrelazadas. Después, el esperma hace contacto con la envoltura vitelina con su acrosoma aun intacto y subsecuentemente induce la reacción acrosomal, provocando una liberación de proteínas no enzimática en la superficie de la envoltura vitelina que permite que las fibras se desenreden y separen formando un orificio que atravesara el esperma. El acrosoma se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, los núcleos haploides se fusionan formando un genoma diploide y el huevo es activado para empezar la división celular y formar un embrión de abulón (Figura 5) (Kresge *et al.*, 2001).

El esperma de los abulones tiene un acrosoma granular considerablemente largo, implicando que se necesitan grandes cantidades de proteínas para disolver la envoltura vitelina. La lisina (16 kDa) es la proteína que es liberada durante la reacción acrosomal que tiene la habilidad de destruir la envoltura

vitelina, creando un agujero por el cual el espermatozoide nada para unirse a la superficie del ovocito (Lewis *et al.*, 1982; Mozingo *et al.*, 1995; Kresge *et al.*, 2001).

En especies de abulón, cuando se realizan fertilizaciones *in vitro* de especies diferentes se necesitan alrededor de diez veces más espermatozoide de lo normal para alcanzar el porcentaje máximo de fertilización. Debido a que la fertilización en estos organismos sucede en la columna de agua, la única explicación de esta incompatibilidad de fertilización entre especies es que el espermatozoide y el ovocito no se reconocen entre ellos. Es decir, cuando sucede la reacción acrosomal, la lisis de la envoltura vitelina se encarga del reconocimiento entre gametos y es esencial para la unión del espermatozoide por lo que esta interacción se conoce como especie-específica (Lewis *et al.*, 1980; Kresge *et al.*, 2001).

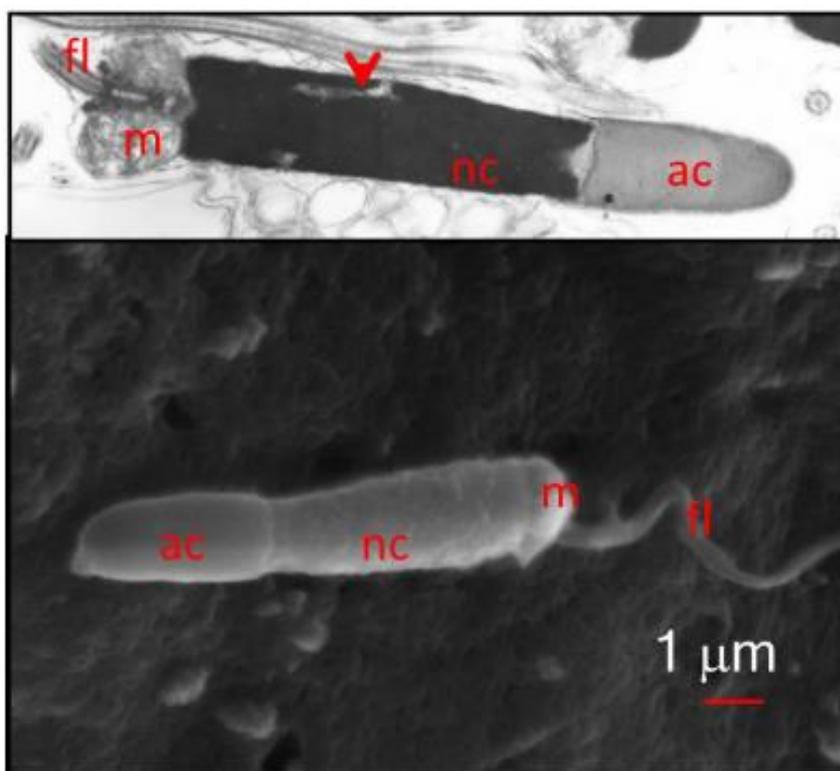


Figura 3. Microfotografía de espermatozoide de *Haliotis fulgens*: A) técnica microscopía electrónica de transmisión. B) Técnica microscopía electrónica de barrido. Flagelo (fl), mitocondria (m), núcleo (nc), acrosoma (ac), laguna nuclear (cabeza de flecha) (Tomado de Vélez-Arellano, 2016).

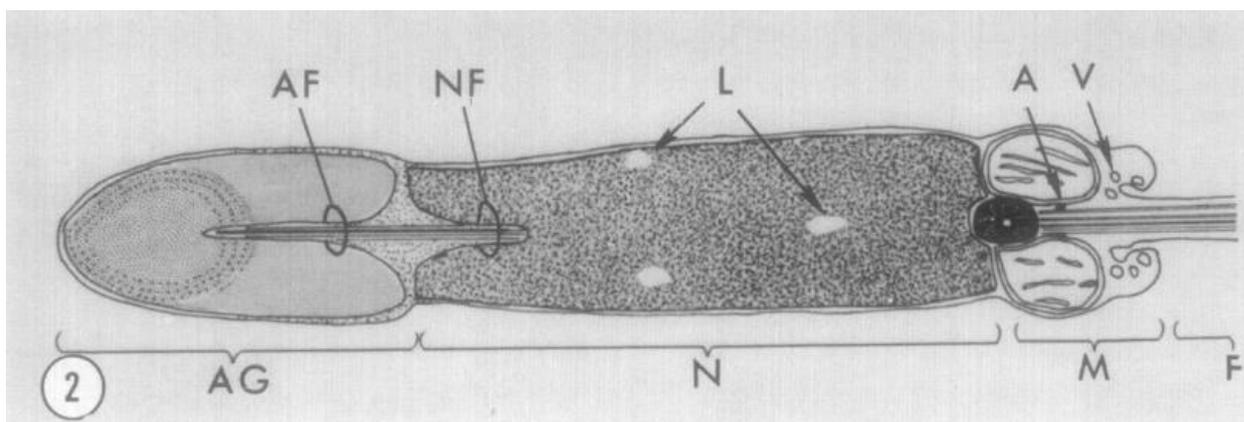


Figura 4. Representación esquemática de las estructuras del espermatozoide del abulón (*Haliotis rufescens*). Estructuras primarias: acrosoma granular (AG), núcleo (N), pieza intermedia (M), flagelo (F); otras estructuras: fosa acrosómica (AF), lagunas (L), fosa nuclear (NF), anclajes (A), vesículas (V) (Tomado de Lewis *et al.*, 1980).

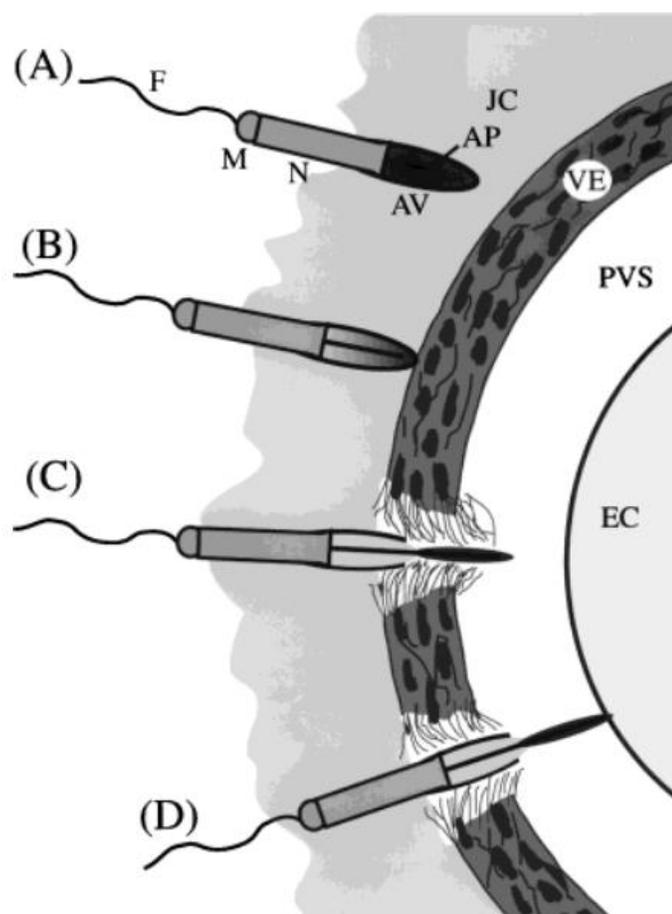


Figura 5. Descripción general de la fecundación de ovocitos del abulón: flagelo (F), mitocondria (M), núcleo (N), proceso acrosómico (AP), vesícula acrosomal (AV), capa de gelatina (JC) y envoltura vitelina (VE) (Tomado de Kresge *et al.*, 2001).

1.1.5. La calidad del esperma

En la producción de semilla es indispensable disponer de cantidades suficientes de esperma de buena calidad. Poder criopreservar este esperma puede tener beneficios durante la inseminación artificial porque permite fertilizar ovocitos sin tener que sincronizar eventos de desove; facilita la dispersión de material genético con rasgos valiosos y deseados entre diferentes localidades evitando problemas de enfermedades (Adams *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2005a; b; 2006; 2007; Salinas-Flores *et al.*, 2005; Matteo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Además se puede reducir el estrés en los reproductores causado por un manejo constante, así como por múltiples inducciones al desove que va reduciendo la calidad espermática (Yao *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2004). Sin embargo, durante la criopreservación de esperma se forman cristales de hielo causados por el choque térmico, esto tiene como resultado daños considerables en la estructura de la célula que afectan la motilidad espermática, tasa de sobrevivencia y fertilización (Lahnsteiner *et al.*, 1996; Watson, 1995). La calidad del esperma se refiere a la función correcta del conjunto de las estructuras celulares que pueden verse afectadas por distintos factores y a los daños que pueden ocurrir en múltiples estructuras (Kang *et al.*, 2004). Los espermatozoides son células complejas con múltiples organelos que requieren condiciones óptimas; por ello, responden distinto ante el proceso de criopreservación. Por ejemplo, problemas en la motilidad pueden estar relacionados con daños en el flagelo mientras que el desarrollo embrionario puede verse afectado por daños en el núcleo (Tiersch *et al.*, 2007).

Para detectar problemas en la calidad del esperma es importante integrar varias técnicas y criterios que evalúen el daño celular (alteración en la morfología y organelos intracelulares), así como la capacidad de motilidad y fertilización. En especies de haliótidos como *H. rufescens*, *H. laevigata* y *H. discus hannai* se han utilizado técnicas de microscopía de epifluorescencia que permiten detectar daños específicos en la célula como la integridad de la membrana plasmática; integridad del acrosoma y potencial de la membrana de las mitocondrias (Salinas-Flores *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014b; Kim *et al.*, 2020). La citometría de flujo es otra técnica ampliamente utilizada para evaluar la calidad espermática, la cual ayuda a tener resultados más rápidos. La citometría de flujo ha sido utilizada en especies de moluscos como el *H. rufescens*, *Crassostrea virginica* y *H. laevigata* (Salinas-Flores *et al.*, 2005; Paniagua-Chávez *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014b). La membrana plasmática del esperma es una de las estructuras principales que puede ser dañada durante la criopreservación. Por ello es necesario una evaluación de la integridad, así como la proporción de células de buena calidad (Segovia *et al.*, 2000). La integridad de la membrana plasmática puede ser evaluada utilizando sondas fluorescentes como SYBR-14 y Yoduro de propidio (YP). Cuando estas

tinciones se utilizan en conjunto es posible diferenciar a las células vivas de las muertas. El SYBR 14 se une al ADN de las células vivas con membranas intactas emitiendo fluorescencia verde a 516 nm de longitud de onda, mientras que el YP solo puede entrar a las células con membranas dañadas, emitiendo fluorescencia roja a 617 nm (Garner *et al.*, 1994; Donoghue *et al.*, 1995).

Por otro lado, para que un espermatozoide sea capaz de fertilizar tiene que tener estructuras viables. El flagelo obtiene su energía de las mitocondrias, por ende, daño en las mitocondrias podría resultar en una disminución de motilidad (Morisson *et al.*, 1997; Jenkins, 2011). Sin embargo, la determinación de la motilidad mediante microscopia puede ser variable, ya que depende de la subjetividad del evaluador, si bien ya se han utilizado programas en varias especies de peces para el Análisis Espermático Asistido por Computadora necesita estandarizarse para especies de moluscos (Morisson *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2015). En haliótidos solo se ha estandarizado para la especie *Haliotis kamtschatkana* (O'Brien, 2019).

Usualmente la última medida de calidad espermática es la habilidad del espermatozoide de fertilizar ovocitos. Esta medida suele ser costosa, además requiere de tiempo y práctica. Mientras que los métodos de laboratorio dan resultados indirectos prácticamente inmediatos, la estimación de huevos fertilizados, con espermatozoide descongelado, se obtiene en un periodo de tiempo más largo (Aas *et al.*, 1991; Jenkins, 2011). Además, la motilidad del espermatozoide no es suficiente como último parámetro para evaluar el estatus fisiológico del espermatozoide criopreservado durante la fertilización de ovocitos. El espermatozoide debe de mantener la capacidad de llegar y penetrar a los ovocitos y, para ello, necesita no solo tener un flagelo funcional para la propulsión si no también una membrana intacta que le permita unirse a las microvellosidades de la envoltura vitelina (Holt, 2000).

1.1.6. Conservación a corto plazo

El almacenamiento de gametos en la reproducción artificial de organismos acuáticos es una herramienta de gran utilidad, ya que permite sincronizar la fertilización que depende de la disponibilidad de los gametos, transporte entre localidades y facilita el uso de volúmenes grandes (Cabrita *et al.*, 2010; Bobe y Labbé, 2009). Dependiendo de la especie y de la calidad inicial de los gametos, estos pueden ser almacenados durante horas o días. En el caso del espermatozoide de *Haliotis fulgens*, puede ser almacenado a bajas temperaturas (-5 °C) hasta por 6 u 8 días. Sin embargo, después la recolección de gametos, los

espermatozoides empiezan un proceso degenerativo, disminuyendo la capacidad de fertilizar ovocitos. La calidad disminuye con el paso del tiempo resultando en una apoptosis influenciada por las condiciones de almacenamiento, es por ello que las condiciones necesitan ser optimizadas para retardar este proceso de degradación (Leighton, 2000; Beirão *et al.*, 2010).

1.1.7. La criopreservación de esperma como herramienta en la acuicultura

La criopreservación es una técnica para preservar células y tejidos por un tiempo indefinido a muy bajas temperaturas (-196 °C) utilizando nitrógeno líquido como refrigerante (Pegg, 2015). Las técnicas de criopreservación de esperma usualmente incluyen los siguientes pasos: colección del esperma, estimación de la calidad inicial del esperma, selección de los crioprotectores y del contenedor para congelar, congelamiento, descongelamiento y evaluación de la calidad del esperma descongelado (Tiersch, 2000; Adams *et al.*, 2011; Leibo y Pool, 2011). La criopreservación de esperma en vertebrados acuáticos ha sido ampliamente investigada a diferencia de las especies de moluscos marinos (Cabrita *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015a). Sin embargo, se ha visto un aumento en los estudios de criopreservación del esperma de moluscos en la última década, especialmente para especies de importancia económica (Paniagua-Chávez y Tiersch, 2001; Salinas-Flores *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2005a, b, 2006, 2007; Adams *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). En haliótidos el interés en la criopreservación de gametos ha incrementado en los últimos 20 años, por lo que se han establecido protocolos de criopreservación de esperma para algunas especies de abulón: *H. diversicolor*, *H. rufescens*, *H. laevigata*, *H. rubra*, *H. kamtschatkana* y *H. discus hannai* (Gwo *et al.*, 2002; Salinas-Flores *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014a; Liu *et al.*, 2015b; O'Brien, 2019; Kim *et al.*, 2020).

La criopreservación de esperma de moluscos ofrece oportunidades para abordar problemáticas tales como el poder contar con esperma para ser utilizado durante todo el año, proveer material biológico de líneas genéticas con rasgos valiosos y deseados, así como facilitar la dispersión de material genético entre ubicaciones que pudieran tener problemas de enfermedades (Adams *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2005a; b; 2006; 2007; Salinas-Flores *et al.*, 2005; Matteo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Además, el almacenamiento de gametos y embriones también puede ser útil en programas de protección de especies en peligro, ya que pueden ayudar en la protección de la biodiversidad en caso de desastres naturales o accidentes que puedan afectar las poblaciones (Chao y Liao, 2001). Desafortunadamente los protocolos de

criopreservación en las especies acuáticas tales como los moluscos gasterópodos son especie-específicos (Tabla 2) y dependen del tipo de célula, concentración y selección del crioprotector, tiempo de equilibrio o incubación de las células a criopreservar y las tasas de congelación y descongelación. Es así que la selección del crioprotector parece ser una cuestión de prueba y error en casi todas las investigaciones (Holt, 2000).

1.1.8. Crioprotectores y su química

Los crioprotectores son soluciones químicas que se utilizan durante la criopreservación para proteger a la célula del daño que es causado por este proceso. Su función es evitar la formación de hielo dentro de la célula e impedir la muerte celular durante el proceso de congelación o descongelación, en función de la concentración del crioprotector y el tiempo de equilibrio (Tiersch *et al.*, 2007). Durante el proceso de criopreservación, la célula se expone a cambios en la concentración y composición de las soluciones acuosas, provocando movimientos de agua y solutos dentro de la célula. Es así, que los procesos de difusión y ósmosis son muy importantes durante la criopreservación. Las membranas dentro de los sistemas biológicos permiten la difusión de solutos, cambiando las concentraciones y buscando un equilibrio; sin embargo, si el cambio en los volúmenes es excesivo esto puede resultar dañino para la célula (Pegg, 2015).

Los crioprotectores se pueden clasificar como crioprotectores permeables (CP) y crioprotectores no permeables (CNP) (Dong *et al.*, 2005b). Los mecanismos de acción no han sido completamente explicados, pero se considera que los CP bajan el punto de congelación de la solución minimizando el choque osmótico, además reemplazan el agua intracelular reduciendo la formación de cristales que puedan dañar a la célula desde adentro (Gao y Crister, 2000; Tierch *et al.*, 2007; Jang, *et al.*, 2017). El dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol, el etilenglicol, el propilenglicol y el metanol son ejemplos de CP. En especies de moluscos marinos como ostiones, ostras perleras, mejillones, abulones, escalopos y almejas destaca el uso del DMSO en concentraciones entre 5 y 20% para la criopreservación de esperma (Tiersch *et al.*, 2007). Por otro lado, los CNP son azúcares y polímeros que se considera que ayudan a estabilizar la membrana durante la criopreservación donde destacan la trehalosa, polietilenglicol y sacarosa que pueden ser utilizados en combinación con los CP (Meryman, 1971; Tiersch *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014b). En ambos tipos de crioprotectores, la disolución de estos compuestos genera una alta

presión osmótica que provoca el encogimiento y el estallamiento de las células suspendidas (McFradzen, 1995; Özkavukcu y Erdemli, 2003). De esta manera, un bajo peso molecular, una baja toxicidad y alta solubilidad en el agua son requerimientos obligados para la selección de un crioprotector (Chao y Liao, 2001; Pegg, 2007; Leibo, 2008).

Por otro lado, para una acción óptima de un CP es necesario que transcurra un tiempo de equilibrio (Salinas-Flores *et al.*, 2005). El tiempo de equilibrio es el periodo que transcurre desde que se agrega la solución crioprotectora al medio hasta que la célula alcanza un balance osmótico con el mismo, ya que es necesario que exista un equilibrio entre la salida del agua del interior de la célula al medio y la entrada del crioprotector a la célula (Fahning y García, 1992). Por otra parte, los crioprotectores pueden ser tóxicos para la célula (Lovelock, 1953; Meryman *et al.*, 1977; Fahy, 1986). El efecto de la toxicidad generalmente determina qué reactivos, permeables a la membrana, son agentes crioprotectores útiles y cuáles no. Es así que una equilibración óptima: selección del crioprotector y su concentración (un balance entre protección y toxicidad) es indispensable antes de congelar para permitir a los crioprotectores el tiempo necesario de penetrar a la célula (Tiersch *et al.*, 2007). Si los crioprotectores no presentaran toxicidad y fueran capaces de alcanzar y penetrar todas las células que se necesitan criopreservar podrían usarse a concentraciones arbitrariamente altas y evitarse todas las lesiones por congelamiento que no estén relacionadas con el enfriamiento *per se* (lesión por enfriamiento). Por lo tanto, la toxicidad crioprotectora puede verse como el factor más limitante para el éxito de la criopreservación (Fahy *et al.*, 1987).

1.1.9. Tasa de congelación

Durante el proceso de criopreservación las reacciones químicas y biológicas en las células se ven reducidas drásticamente, permitiendo la conservación de células y tejidos durante periodos de tiempo indefinidos (Jang *et al.*, 2017). Sin embargo, durante el proceso de congelación las células son más propensas a sufrir lesiones causadas por congelación cuando se encuentran entre los 0 y -40 °C (Chao y Liao, 2001). En este rango de temperatura aumenta la formación de cristales de hielo intra y extracelulares (Karlsson y Toner, 1996). Por lo tanto, un factor crítico durante el proceso de criopreservación es identificar la tasa de congelación adecuada, ya que la congelación lenta evita la formación de hielo intracelular, mientras que la congelación rápida minimiza el efecto tóxico a una concentración de crioprotector más alta. El hielo intracelular y la toxicidad del crioprotector contribuyen al daño celular, por lo que la velocidad

de congelación debe ser lo suficientemente lenta como para minimizar la formación de hielo y lo suficientemente rápida como para minimizar el efecto del crioprotector (Chao y Liao, 2001). Por otro lado, la temperatura de descongelación es otro factor que afecta el éxito de la criopreservación del esperma, las altas temperaturas de descongelación pueden inhibir la recristalización de hielo intracelular, en cambio las bajas temperaturas pueden prevenir al esperma del estrés osmótico (Gao y Critser, 2000). Otro factor importante es el volumen de la muestra, ya que puede afectar la velocidad de transferencia de calor durante la congelación y descongelación (Xu *et al.*, 2010). Por lo tanto, el volumen de muestra debe optimizarse para garantizar la reproducibilidad de un protocolo de criopreservación (Tabla 2) (Hassan *et al.*, 2017).

1.2. Justificación

Las pesquerías no reguladas y las actividades antropogénicas han perjudicado a los ecosistemas acuáticos. Esto ha llevado a la búsqueda de la conservación de las especies y su ambiente. En este sentido, la criopreservación es una alternativa para conservar el germoplasma de las especies y posteriormente para ser usada en programas de repoblamiento, específicamente para especies acuáticas amenazadas y de importancia comercial y biológica como lo es el abulón azul en las costas de Baja California, cuya pesquería comercial comenzó aproximadamente hace 80 años. A pesar de que en el pasado fue una pesquería prospera, se considera que esa situación ha cambiado y actualmente el aprovechamiento de las distintas especies de abulón se ajusta a las Normas Oficiales Mexicanas NOM- 005-PESC-1993 (SEPESCA, 1993) y NOM-009-SAG/PESC-2015 (SAGARPA, 2016), en las que se define el procedimiento para la determinar las épocas y zonas de veda para la captura de las diferentes especies de la flora y fauna acuáticas. Aunado a esto, la falta de cumplimientos en la regulación de las actividades pesqueras de abulón azul desde el inicio de su pesquería comercial ha provocado una disminución en las poblaciones naturales de este gasterópodo. La criopreservación de esperma de abulón azul permitiría establecer un banco de germoplasma de las poblaciones locales que darán pauta para futuras investigaciones en el desarrollo de protocolos para la conservación de la especie. Además, permitiría establecer las bases para el desarrollo del sector acuícola de la especie contribuyendo en la conservación de las poblaciones y su ambiente influyendo positivamente al bienestar de pescadores y acuicultores por medio del desarrollo de programas de mejoramiento genético o repoblamiento utilizando semilla producida con germoplasma congelado.

Tabla 2. Protocolos de criopreservación en especies de abulones. GLY, glicerol; DMSO, dimetilsulfóxido; C, congelación controlada; NC, congelación no controlada y NL, nitrógeno líquido.

Especie	Nombre común	Crioprotector	Almacenamiento	Método de congelamiento	Tasa de congelamiento	Tasa de descongelación	Referencia
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	Abulón de varios colores	10% DMSO	Tubo cónico de 1.5 mL	NC	-12 o -15 °C/min de 20 °C a -90 °C	70 °C	Gwo <i>et al.</i> , (2002)
<i>Haliotis rufescens</i>	Abulón rojo	10% GLY	Pajillas de 0.5 mL	C NC	-16 °C/ min de 5 °C a -140 °C -1 °C/ min de -20 °C a -30 °C	45 °C por 8 s	Salinas-Flores <i>et al.</i> , (2005)
<i>Haliotis laevigata</i>	Abulón australiano	6% DMSO	Crioviales 2 mL (1.5 mL por criovial)	NC	-60 °C por 20 min	50 °C 18 °C para recuperación	Zhu <i>et al.</i> , (2014)
<i>Haliotis laevigata</i> (cultivo)	Abulón australiano	6% DMSO + 1% glucosa	Pajillas de 0.25 mL	NC	5.2 cm encima de NL por 10 min	60 °C 18 °C para recuperación	Liu <i>et al.</i> , (2014b)
<i>Haliotis rubra</i> (cultivo)	Abulón de labios negros	6% DMSO + 2% glucosa	Pajillas de 0.25 mL	NC	5.2 cm encima de NL por 10 min	60 °C por 5 s 16 °C para recuperación	Liu <i>et al.</i> , (2015b)
<i>Haliotis kamtschatkana</i>	Abulón pinto	5% DMSO	Pajillas de 0.5 mL	C	-3 °C/ min de -1 °C a -60 °C	40 °C por 8 s	O'Brien (2019)
<i>Haliotis discus hannai</i>	Abulón japonés	8% DMSO	Pajillas de 0.25 mL y 0.5 mL	NC	5 cm encima de la superficie de NL por 10 min	60 °C por 4 s	Kim <i>et al.</i> , (2020)

1.3. Hipótesis

- La motilidad del espermatozoides del abulón azul *Haliotis fulgens* será mayor o igual al 50% al ser refrigerada por 7 días a 4 °C.
- La motilidad y viabilidad del espermatozoides del abulón azul *Haliotis fulgens* será mayor o igual al 50% en los diferentes tratamientos considerando el tipo de crioprotector y la tasa de congelación.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la conservación a corto plazo en refrigeración (4 °C) y la criopreservación en la motilidad y viabilidad del espermatozoides del abulón azul *Haliotis fulgens*.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la conservación a corto plazo en refrigeración (4 °C) respecto a la motilidad del espermatozoides de *Haliotis fulgens*.
2. Evaluar el efecto citotóxico de cuatro crioprotectores (dimetilsulfóxido, propilenglicol, glicerol y metanol) a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20%) en la motilidad y viabilidad del espermatozoides de *Haliotis fulgens*.
3. Evaluar el efecto de la congelación controlada y no controlada en la motilidad y viabilidad del espermatozoides de *Haliotis fulgens*.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Obtención de organismos y liberación de esperma

El esperma utilizado en estos experimentos fue donado por el laboratorio de cultivo de abulón del Departamento de Acuicultura del CICESE. La inducción a la liberación de gametos fue realizada de acuerdo al Anexo A. Los abulones utilizados fueron organismos F1 de cultivo, entre 4 y 6 años de edad provenientes de La Bocana, Baja California Sur. La inducción a la liberación de gametos se realizó en tres ocasiones en las que se utilizaron organismos con un Índice Visual Gonadal 2 (IVG 2) o IVG 3 (Tabla 1). La disponibilidad de esperma varió entre experimentos debido al número de organismos que expulsaron esperma. En la primera inducción (PI) se utilizó el esperma de cuatro abulones machos con un IVG 2 e IVG 3. En la segunda inducción (SI) se utilizó el esperma de cuatro machos con un IVG 2 y para la tercera inducción (TI) solo se utilizó el esperma de un macho con un IVG 2.

2.2. Determinación de la motilidad espermática

Se consideró como esperma móvil aquel esperma que exhibía un movimiento vigoroso hacia adelante. El porcentaje de motilidad fue estimado para cada organismo visualizando muestras del mismo en un microscopio compuesto (Marca Olympus modelo CX-31) con campo oscuro y un aumento de 200X. El esperma que se encontraba vibrando en su lugar no fue considerado como esperma motil. Solo el esperma que exhibía nado activo ($\geq 80\%$) fue seleccionado para los experimentos.

2.3. Determinación de la viabilidad espermática

Las muestras se tiñeron con los fluorocromos SYBR 14 y Yoduro de Propidio (YP) (Anexo B). El análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando un microscopio de epifluorescencia (Marca Nikon modelo eclipse 80i) con un filtro de excitación de 450-490 nm. Para cada tratamiento se determinó el porcentaje de células viables y células no viables de 100 espermatozoides por muestra. Las células teñidas con SYBR 14 (Fluorescencia verde) fueron consideradas como células viables que mantuvieron la membrana citoplasmática intacta mientras que las células teñidas con YP (Fluorescencia roja) fueron consideradas como células con membrana citoplasmática dañada.

2.4. Determinación de densidad espermática

Para estimar la densidad espermática se colocó una muestra de 10 μL , fijada previamente con lugol, en una cámara Neubauer o hematocitómetro siguiendo el protocolo descrito por Arredondo y Voltolina (2007). Las células se contaron en un microscopio compuesto con un aumento de 1000X. La fórmula utilizada para determinar la densidad espermática es la siguiente:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{\text{Número de células}}{\text{Número de cuadros}} \right) (f)(10\ 000) \quad (1)$$

Donde f es el factor de dilución.

2.5. Almacenamiento a corto plazo de esperma

El esperma obtenido de los cuatro machos de la primera inducción a la liberación de gametos (PI) fue utilizado individualmente para el experimento. Una vez obtenido el esperma se determinó la motilidad y la concentración de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Posteriormente, se tomó 1 mL de esperma de cada uno de los organismos, se colocó en un tubo de 1.5 mL y se le agregó 20 μL de una solución antibiótico/antimicótico (SIGMA-ALDRICH A5955) de acuerdo a la Tabla 4 del Anexo C. Una muestra sin antibiótico/antimicótico fue utilizada como control. Todas las muestras fueron refrigeradas a 4 °C por 7 días. La motilidad se determinó diariamente tomando una alícuota de 10 μL de cada una de las muestras después de homogenizarlas y observándola al microscopio de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. La motilidad espermática se registró por triplicado.

Un segundo experimento se realizó utilizando el esperma de los otros cuatro machos de la segunda inducción (SI). Para este experimento se utilizaron 10 μL de antibiótico/antimicótico y se realizó con la misma metodología descrita en este apartado.

2.6. Criopreservación de esperma

En todos los experimentos de criopreservación descritos a continuación se utilizaron pajillas francesas de 250 μL de capacidad (Classic IMV Technologies straw, Paris, Francia) para almacenar el esperma. Las soluciones crioprotectoras se prepararon de acuerdo a la Tabla 5 del Anexo D. La congelación del esperma se llevó a cabo utilizando un método no controlado y se hizo un ensayo adicional utilizando

un método de congelación controlado que no se describe en los objetivos debido a que solo se utilizó el esperma de un organismo.

2.6.1. Método no controlado

Para este método se utilizó una caja isotérmica de poliestireno con una capacidad de 7 L (30.5 cm x 23.5 cm x 23.5 cm) (Figura 6). La cámara se llenó con nitrógeno líquido a un tercio de su capacidad y en el interior se colocó una malla de plástico que se podía ajustar a la altura deseada y controlar la temperatura de las pajillas. Las pajillas se colocaron sobre la malla plástico para proceder al enfriamiento con vapor de nitrógeno líquido. Las pajillas se congelaron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min y el control de la temperatura se logró elevando o bajando la malla de plástico. La temperatura se registró utilizando un termopar (Marca Cole-Parmer modelo 91100-40). Una vez concluido ese tiempo se sumergieron en otra caja de poliestireno con nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) para posteriormente ser almacenadas en tanques con nitrógeno líquido hasta su análisis posterior.

Ensayo 1. Para este experimento se probaron dos soluciones crioprotectoras: dimetilsulfóxido (DMSO) y propilenglicol (PG) a cuatro concentraciones (5%, 10%, 15% o 20%) con esperma de los cuatro machos de la PI. Al esperma suspendido en agua de mar filtrada (AMF) se agregaron los porcentajes de crioprotectores antes mencionados. Una vez llenas las pajillas se dejaron incubar por 5, 10, 15 o 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de ser enfriadas mediante el método no controlado descrito anteriormente.

Ensayo 2. Para este experimento se probaron dos soluciones crioprotectoras: glicerol (GLY) y metanol (MeOH) a cuatro concentraciones (5%, 10%, 15% o 20%) con esperma de los cuatro machos de la SI. Los tiempos de incubación y enfriamiento fueron iguales a los establecidos en el Ensayo 1.

2.6.1.1. Optimización de los resultados obtenidos del Ensayo 1

Ensayo 3. Posteriormente, se seleccionaron los mejores resultados obtenidos de la congelación del esperma de la PI y se realizó un segundo experimento utilizando esperma de la SI. Esperma de cuatro organismos se suspendieron en DMSO al 12%, 15% o 18% y se incubaron por 8 o 18 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las pajillas francesas se enfriaron empleando el método no controlado descrito anteriormente.

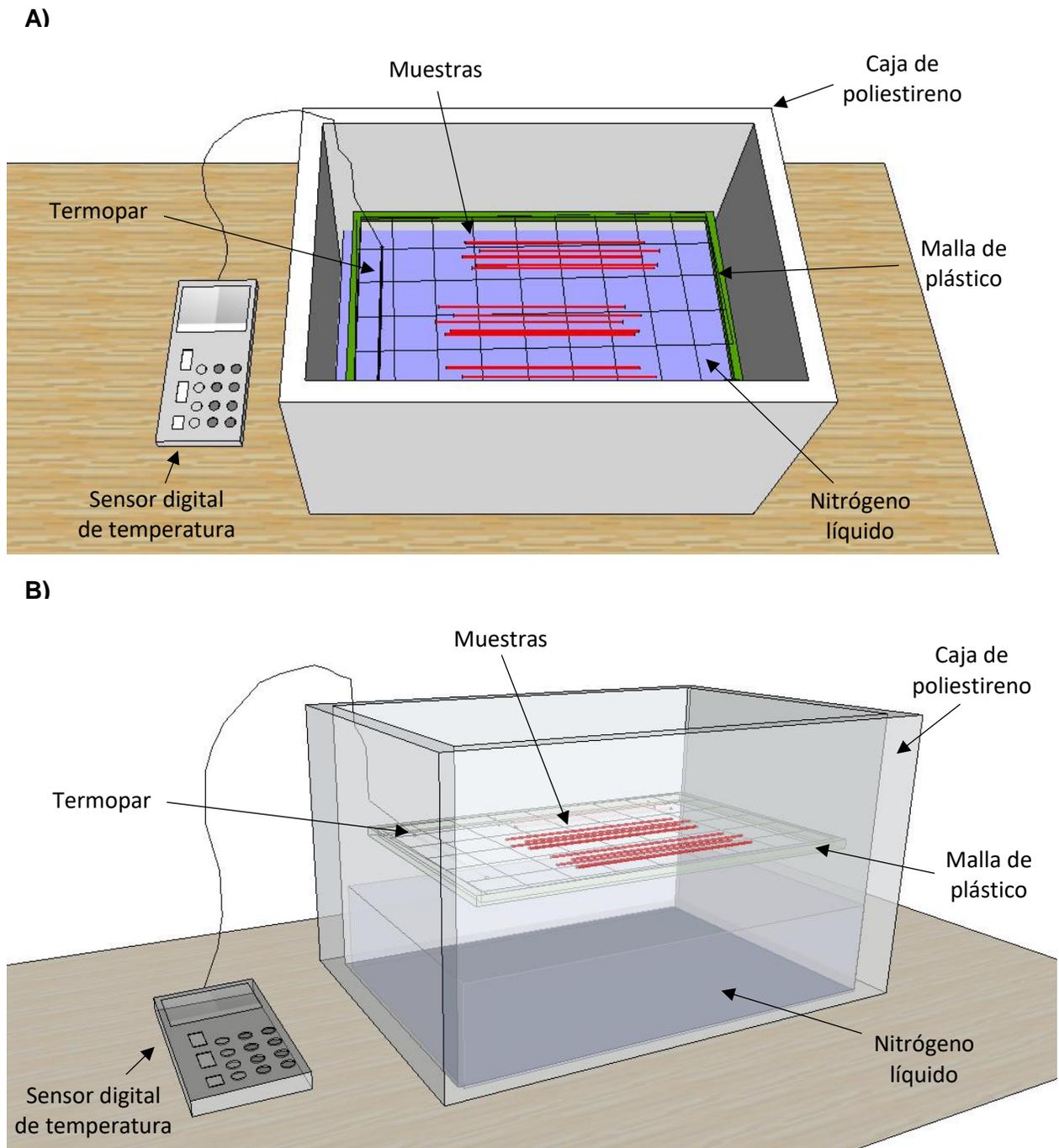


Figura 6. Cámara de congelamiento utilizada para el método no controlado durante la criopreservación del esperma de abulón azul. A) Vista área y B) Vista Rayos X.

2.6.2. Método controlado

Para este método se utilizó un congelador automático programable (Planer Kryo 560-16), siguiendo la metodología propuesta por Salinas-Flores *et al.* (2005). Las pajillas se enfriaron de 15 °C a -30 °C con una

tasa de congelación de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Figura 7), una vez transcurrido el tiempo de congelación, las pajillas fueron sumergidas y almacenadas en tanques con nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su análisis posterior.

Ensayo 4. Durante este experimento se utilizó el esperma de un macho producto de una tercera inducción (TI). El esperma fue suspendido en DMSO o etilenglicol (EG) a cuatro concentraciones (5%, 10%, 15% o 20%). Se llenaron las pajillas y se incubaron en estos crioprotectores por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez finalizada la incubación las pajillas se enfriaron mediante el método controlado descrito anteriormente.

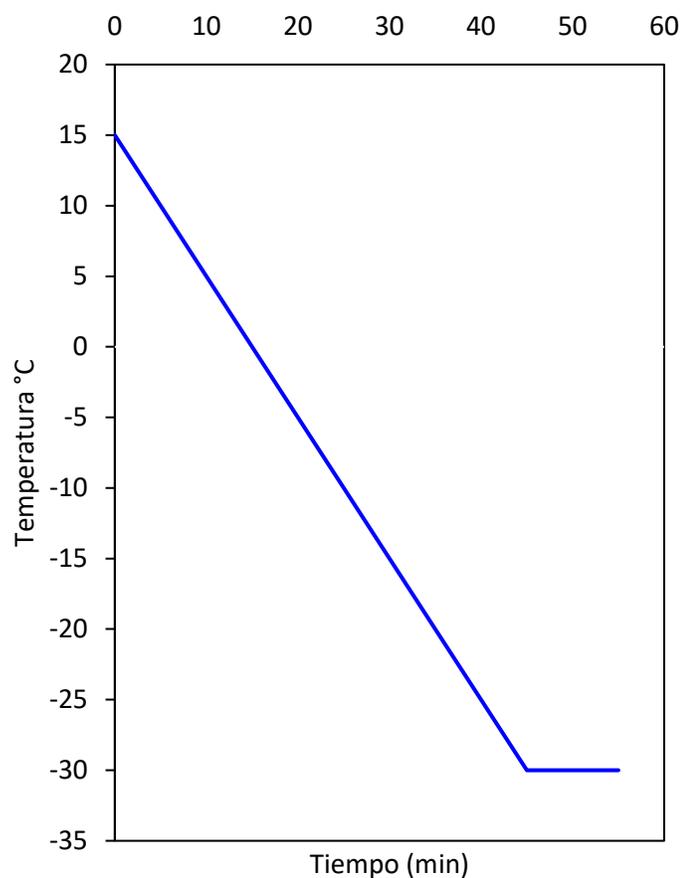


Figura 7. Tasa de congelación utilizada en el congelador programable Planer Kryo 560-16.

2.7. Descongelamiento

Las pajillas se descongelaron en un baño de agua (Memmert WNB 22) a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $\sim 6\text{ s}$. Se cortó el extremo sellado de las pajillas y el esperma se colocó en tubos cónicos de 1.5 mL que contenía $250\text{ }\mu\text{L}$ de AMF a $\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. El esperma se incubó a temperatura ambiente durante $\sim 1\text{ min}$ antes de verificar la calidad del esperma de acuerdo a la metodología descrita en los puntos 2.2. y 2.3.

Tabla 3. Ensayos de criopreservación de esperma de abulón azul. ILG, Inducción a la liberación de gametos; PI, Primera Inducción; SI, Segunda Inducción; TI, Tercera Inducción; DMSO, dimetilsulfóxido; PG, propilenglicol; GLY, glicerol; MeOH, metanol y EG, etilenglicol.

	ILG	Crioprotector	Concentración	Tiempo de incubación	Congelación
Ensayo 1	PI	DMSO PG	5, 10, 15 y 20%	5, 10, 15 y 20 min	No controlada
Ensayo 2	SI	GLY MeOH	5, 10, 15 y 20%	5, 10, 15 y 20 min	No controlada
Ensayo 3	SI	DMSO	12, 15 y 18%	8 y 18 min	No controlada
Ensayo 4	TI	DMSO EG	5, 10, 15 y 20%	15 min	Controlada

2.8. Análisis estadístico

Los datos de porcentaje fueron transformados a raíz cuadrada del arcoseno para normalizar la distribución de los datos y estabilizar las varianzas (Sokal y Rohlf, 1995). En todos los tratamientos se revisaron los supuestos de normalidad con una prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas mediante una prueba de Bartlett. Un análisis de covarianza (ANCOVA) fue utilizado para determinar diferencias significativas en la conservación a corto plazo del esperma. Se utilizó un ANOVA de tres vías para identificar diferencias en la motilidad y viabilidad espermática respecto a la concentración del crioprotector, concentración y tiempo de incubación de los resultados del Ensayo 1 y 2. Por otro lado, se utilizó un ANOVA de dos vías para identificar diferencias en la motilidad y viabilidad de los Ensayos con DMSO respecto a la concentración del crioprotector y tiempo de incubación. Posteriormente, se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey para identificar agrupamientos en todos los ANOVA. Se utilizó un nivel de significancia α 0.05. Los datos fueron analizados en el programa Rstudio (Version 1.2.1335).

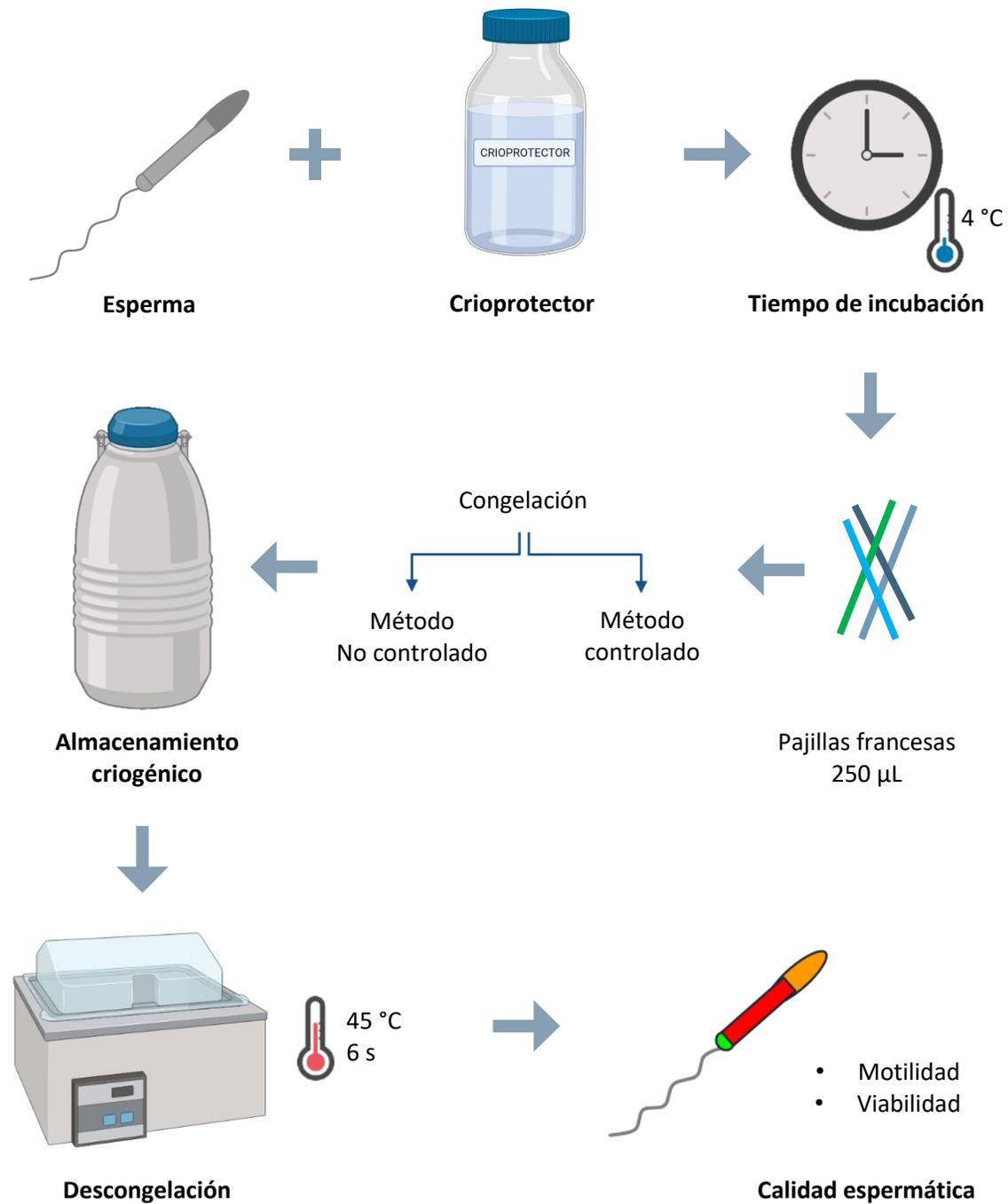


Figura 8. Esquema de la metodología de criopreservación del esperma de abulón azul. Tras la inducción a la liberación de gametos, se obtiene el esperma y se agrega el crioprotector y se deja actuar durante el tiempo de incubación a 4 °C. El esperma se captura en pajillas francesas y la congelación se lleva a cabo mediante el método controlado o no controlado. Las pajillas se almacenan en tanques con nitrógeno líquido. Para la descongelación las pajillas se sumergen en un baño de agua a 45 °C durante 6 s y el esperma se suspende en 250 µL de AMF. La calidad espermática es evaluada. Imagen creada con Biorender (BioRender.com).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Densidad espermática

Del esperma obtenido de los cuatro organismos de la PI (ver Tabla 3 para notación) se obtuvo un promedio de 100,500 espermatozoides por μL por organismo, con un máximo de 136,000 espermatozoides por μL y un mínimo de 66,000 espermatozoides por μL .

Del esperma obtenido de los cuatro organismos de la SI obtuvo un promedio de 202,500 espermatozoides por μL por organismo, con un máximo de 260,000 espermatozoides por μL y un mínimo de 150,000 espermatozoides por μL .

Del esperma obtenido del macho de la TI se obtuvo un promedio de 208,000 espermatozoides por μL .

3.2. Almacenamiento a corto plazo de esperma

3.2.1. Motilidad espermática de la PI

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.651$) entre la motilidad del esperma almacenado con antibiótico/antimicótico (20 μL) y el control. La mejor motilidad se obtuvo en las muestras control. La motilidad disminuyó paulatinamente de $57.5 \pm 2.8\%$ en el día 1 a $6.25 \pm 2.5\%$ para el día 7. El esperma con antibiótico/antimicótico tuvo una motilidad $< 40\%$ al segundo día de almacenamiento (Figura 9).

3.2.2. Motilidad espermática de la SI

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.864$) entre la motilidad del esperma almacenado con antibiótico/antimicótico (10 μL) y el control. La motilidad espermática disminuyó en ambos tratamientos a $< 40\%$ al tercer día de almacenamiento (Figura 10).

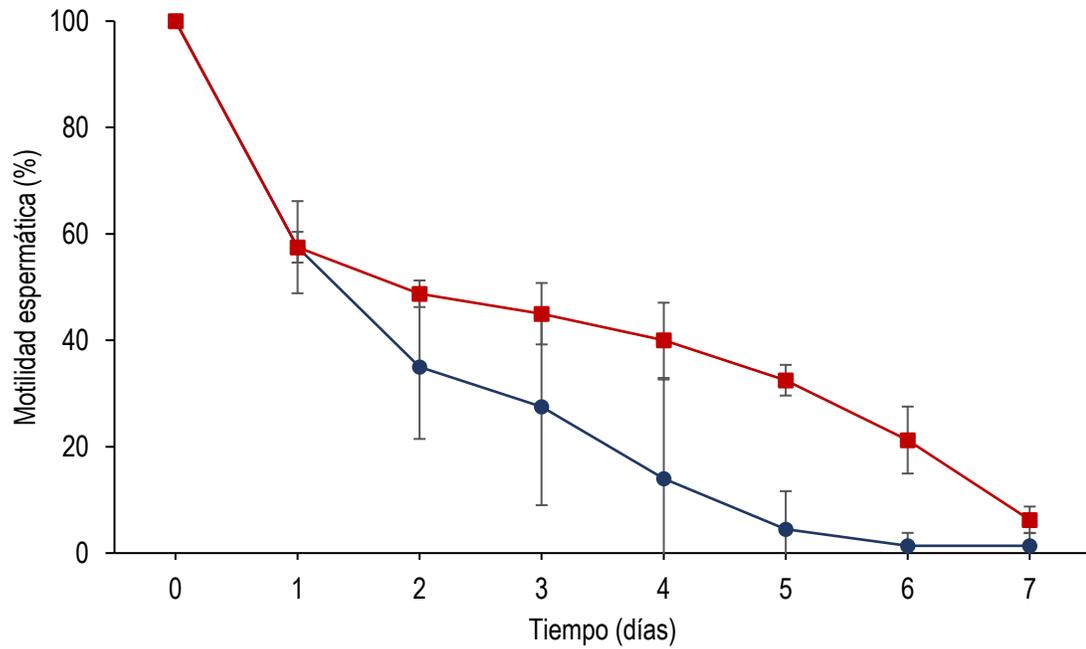


Figura 9. Motilidad espermática (%) durante la evaluación del almacenamiento a corto plazo del espermatozoides de la primera inducción. (Esperma con 20 µL antibiótico/antimicótico, círculo azul; espermatozoides control, cuadro rojo).

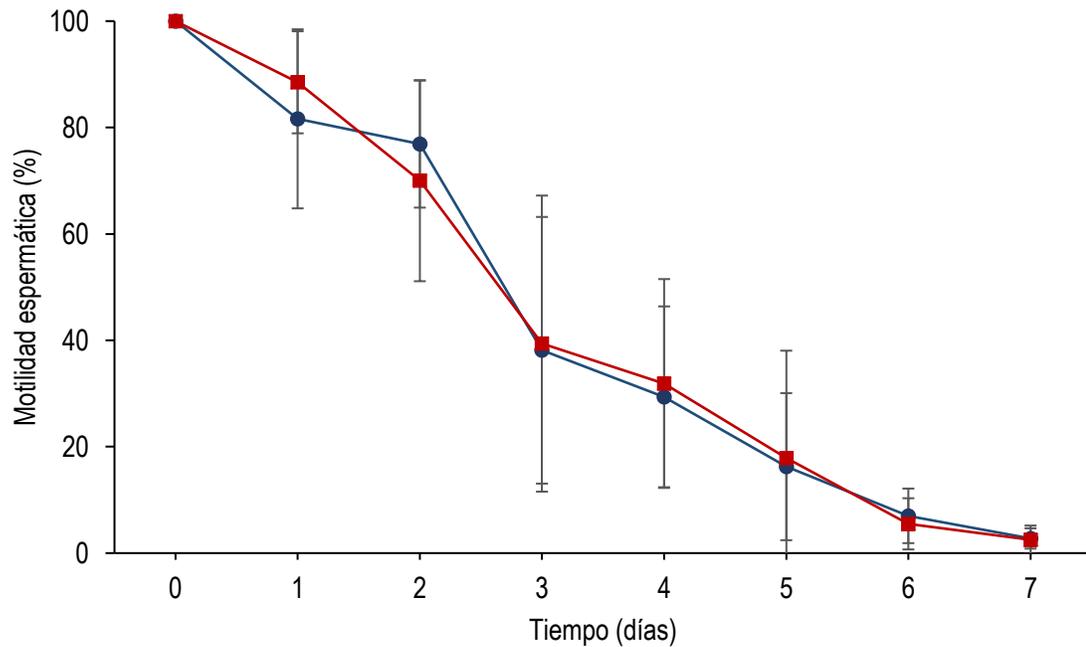


Figura 10. Motilidad espermática (%) durante la evaluación del almacenamiento a corto plazo del espermatozoides de la segunda inducción. (Esperma con 10 µL antibiótico/antimicótico, círculo azul; espermatozoides control, cuadro rojo).

3.3. Calidad del esperma criopreservado

3.3.1. Ensayo 1 y 2

3.3.1.1. Motilidad

Se encontraron diferencias significativas en la motilidad del esperma entre los tipos de crioprotector ($P < 0.001$) y concentraciones ($P < 0.001$), pero no en el tiempo de incubación ($P = 0.109$). Los mejores tratamientos fueron encontrados cuando se utilizó DMSO. La mayor motilidad registrada ($48.7 \pm 4.7\%$) se obtuvo después de incubarse el esperma por 5 min en DMSO al 15%. Mientras que la mínima motilidad ($15 \pm 12.2\%$) se obtuvo después de incubarse el esperma por 10 min en DMSO al 20%. Aunque se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) en las concentraciones del DMSO, no se encontraron diferencias ($P = 0.095$) en el tiempo de incubación. El esperma incubado en PG, GLY o MeOH tuvieron motilidades $< 3\%$ en cualquiera de las concentraciones y tiempos de incubación (Figura 11).

3.3.1.2. Viabilidad

Se encontraron diferencias significativas en la viabilidad del esperma entre los tipos de crioprotectores ($P < 0.001$), las concentraciones ($P = 0.026$) y el tiempo de incubación ($P = 0.002$). Los mejores tratamientos fueron encontrados cuando se utilizó DMSO. La mayor viabilidad registrada ($62 \pm 8.8\%$), se obtuvo en esperma incubado por 5 min en DMSO al 15%. La mínima viabilidad ($27.5 \pm 6.2\%$), se observó en esperma incubado por 15 min en 15% DMSO. Para GLY la mayor viabilidad ($21.8 \pm 6.9\%$) se observó en el esperma suspendido en GLY al 10% incubado durante 20 min y la menor viabilidad ($1 \pm 1.1\%$) cuando incubado por 10 min en GLY al 15%. La mayor viabilidad ($8.9 \pm 9.6\%$), registrada para MeOH se obtuvo cuando el esperma se incubó por 20 min en MeOH al 15%, mientras que la menor viabilidad fue de 0% utilizando una concentración de 5% durante 5 min de incubación (Figura 12). La viabilidad espermática no fue estimada en las muestras de PG debido a que estas pajillas fueron eliminadas por error.

En el análisis estadístico exclusivo de DMSO (Figura 12, sección A) se encontraron diferencias significativas en el tiempo de incubación ($P = 0.048$); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración del crioprotector ($P = 0.362$) o en la interacción entre los efectos ($P = 0.755$). Las pruebas *a posteriori* indicaron diferencias entre 5 min y 15 min de incubación que probablemente se relaciona con variabilidad biológica de los reproductores.

La evaluación de la viabilidad espermática de las muestras criopreservadas con DMSO fue posterior a realizar el protocolo de optimización, por lo que estos resultados no fueron tomados en cuenta para diseñar ese protocolo (apartado 2.6.1.1.).

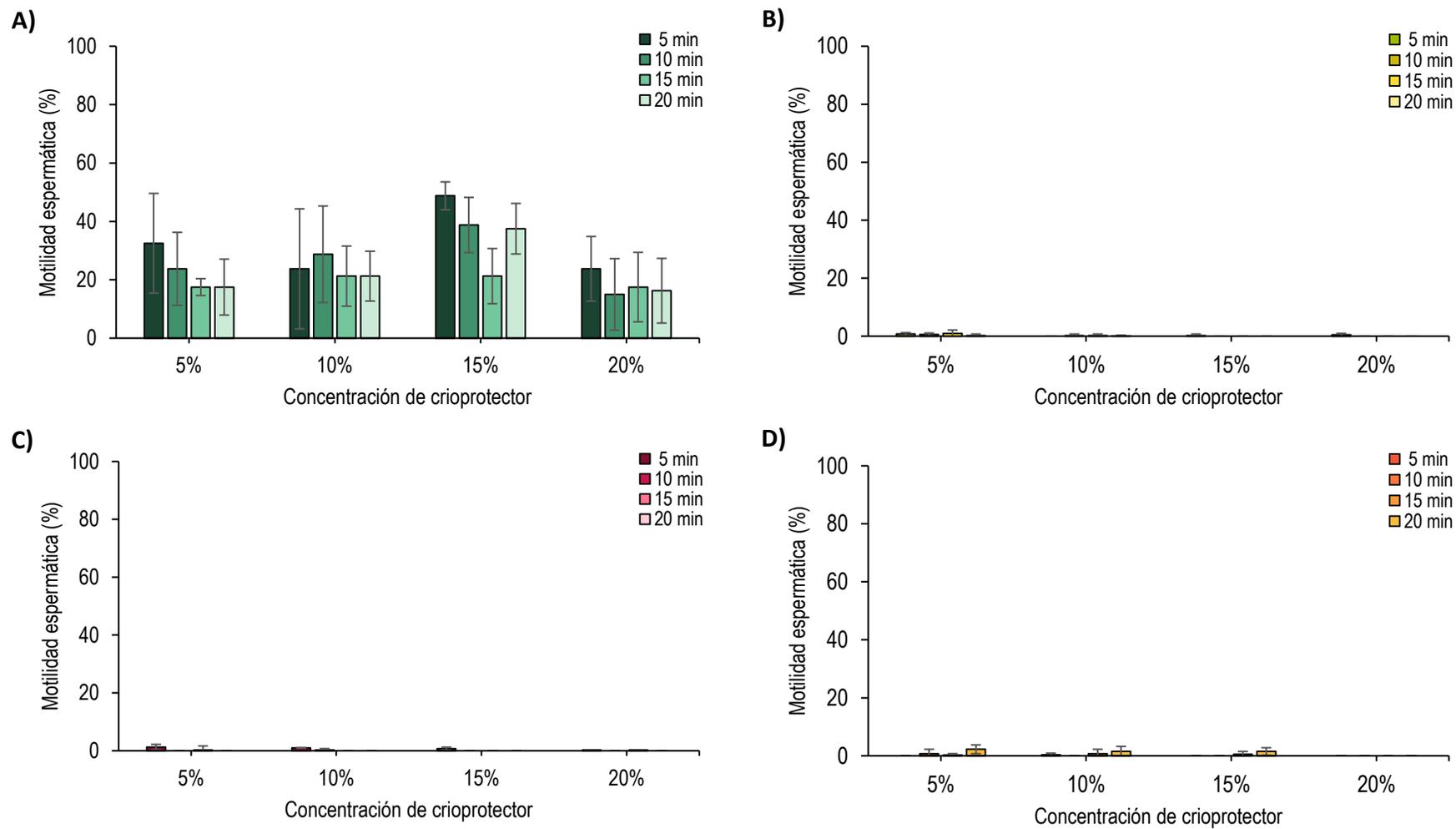


Figura 11. Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando DMSO (A), PG (B), GLY (C) y MeOH (D).

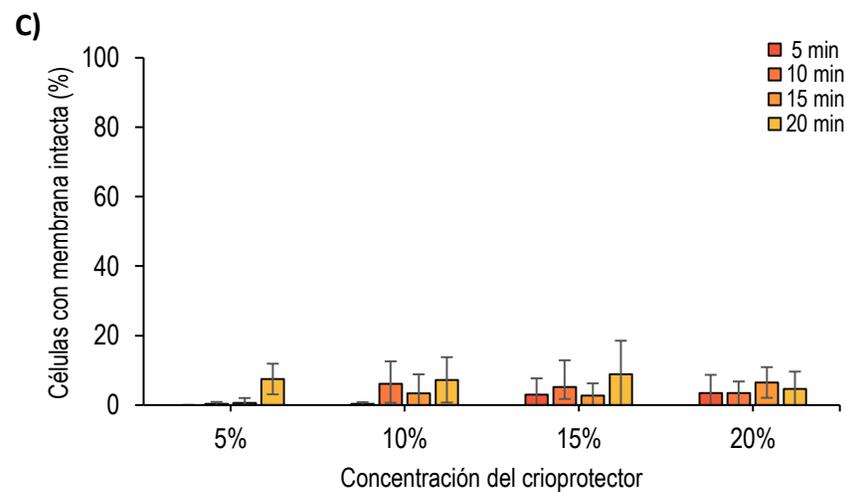
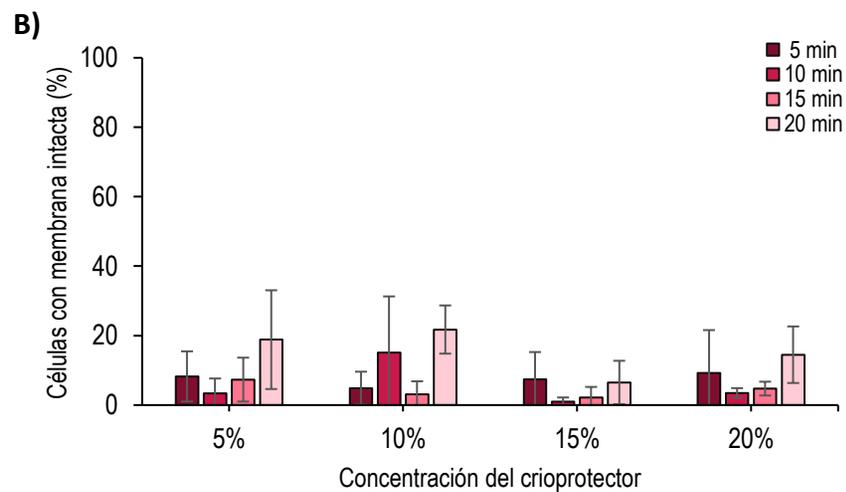
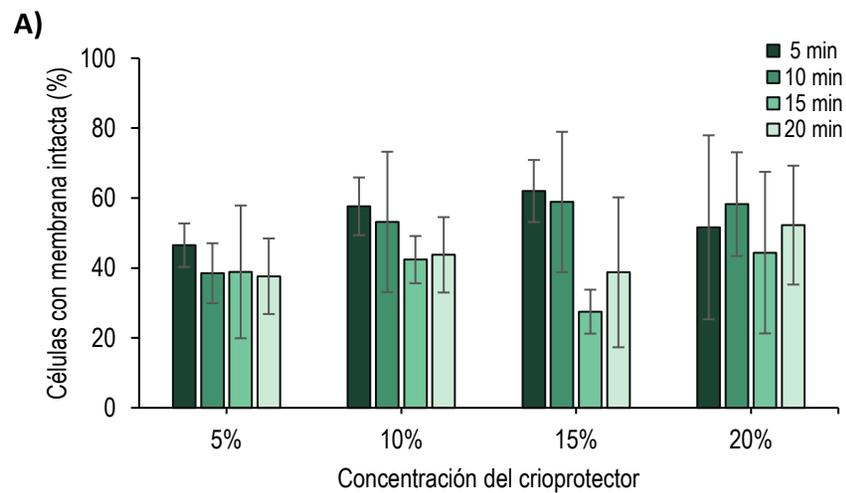


Figura 12. Viabilidad espermática (% de células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando DMSO (A), GLY (B) y MeOH (C).

3.3.2. Ensayo 3 (optimización DMSO)

3.3.2.1. Motilidad

No se encontraron diferencias significativas en la motilidad espermática entre la concentración ($P = 0.618$) o tiempo de incubación ($P = 0.619$). La mayor motilidad registrada ($18.7 \pm 19\%$) se obtuvo después de incubarse el esperma por 18 min en DMSO al 12%. Mientras que la mínima motilidad ($10 \pm 16.8\%$) se obtuvo después de incubarse el esperma por 18 min en DMSO al 15% (Figura 13).

3.3.2.2. Viabilidad

No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad del esperma entre la concentración ($P = 0.935$) o tiempo de incubación ($P = 0.376$). La mayor viabilidad registrada ($15.1 \pm 12.3\%$) se obtuvo en esperma incubado durante 8 min en DMSO al 15%. La mínima viabilidad ($5.1 \pm 7\%$) se observó en esperma incubado por 18 min en DMSO al 18% (Figura 14). Sin embargo, en el organismo D se observó una mayor motilidad y viabilidad espermática comparado con el resto de los organismos (Figuras 15 y 16, sección D).

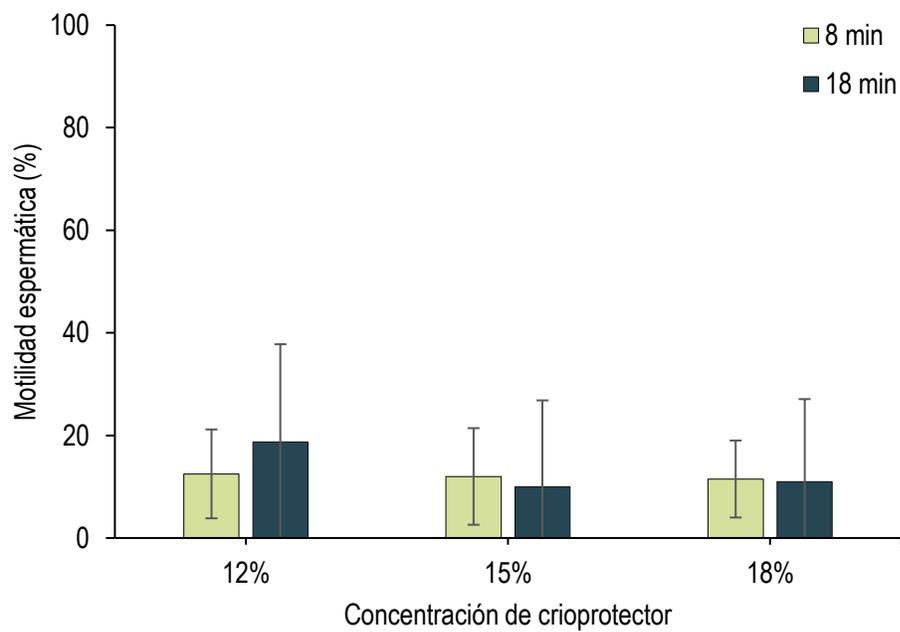


Figura 13. Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción SI).

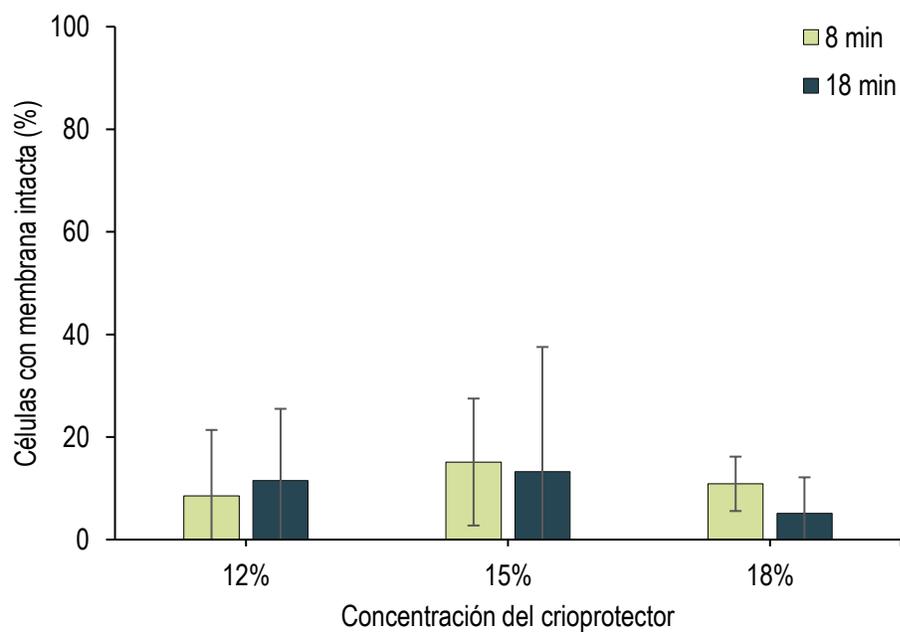


Figura 14. Viabilidad espermática (% de células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción SI).

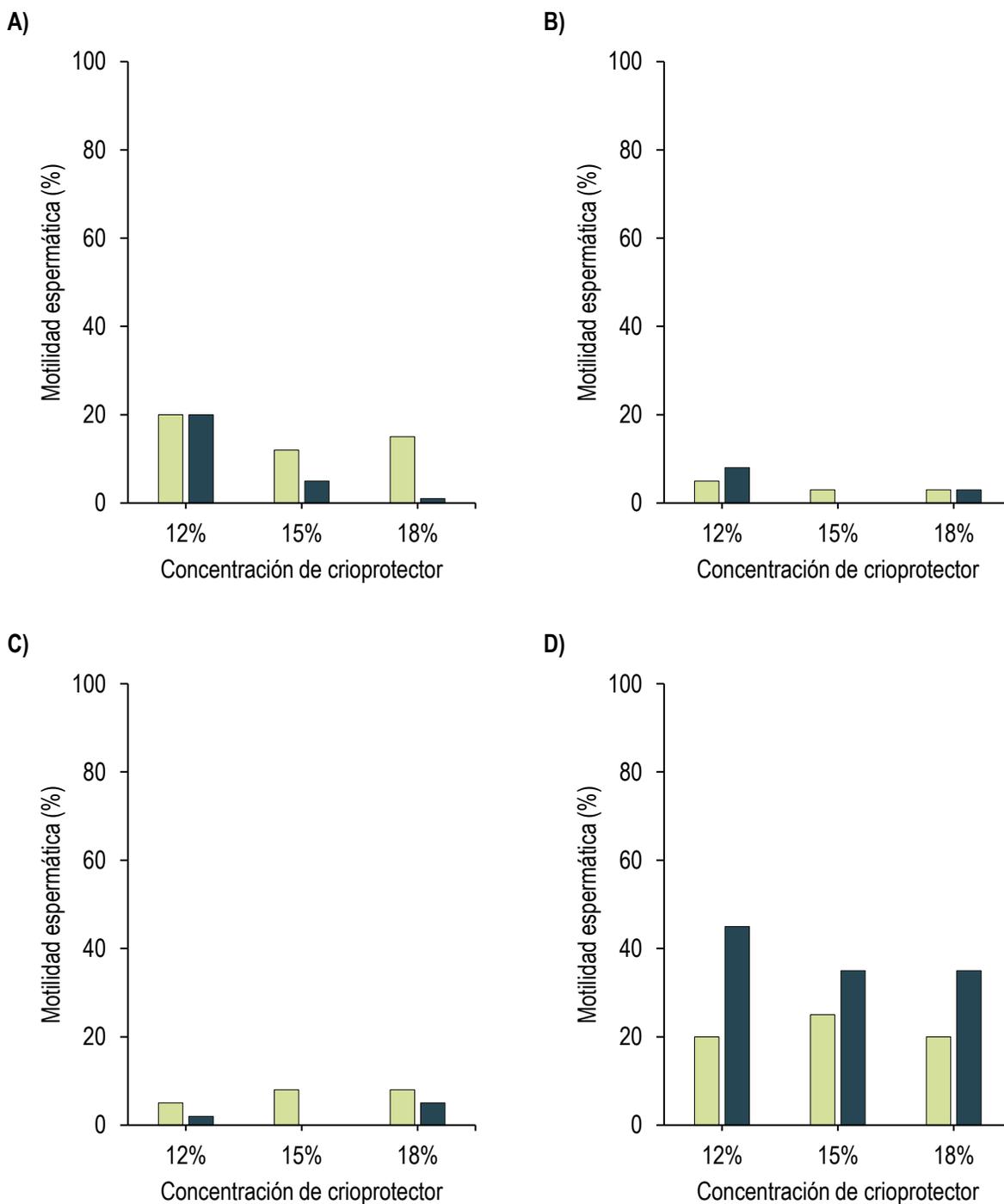


Figura 15. Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción, SI). Esperma incubado durante ocho min, color verde; esperma incubado durante 18 min, color azul; A) Organismo 1, B) Organismo 2, C) Organismo 3, D) Organismo 4.

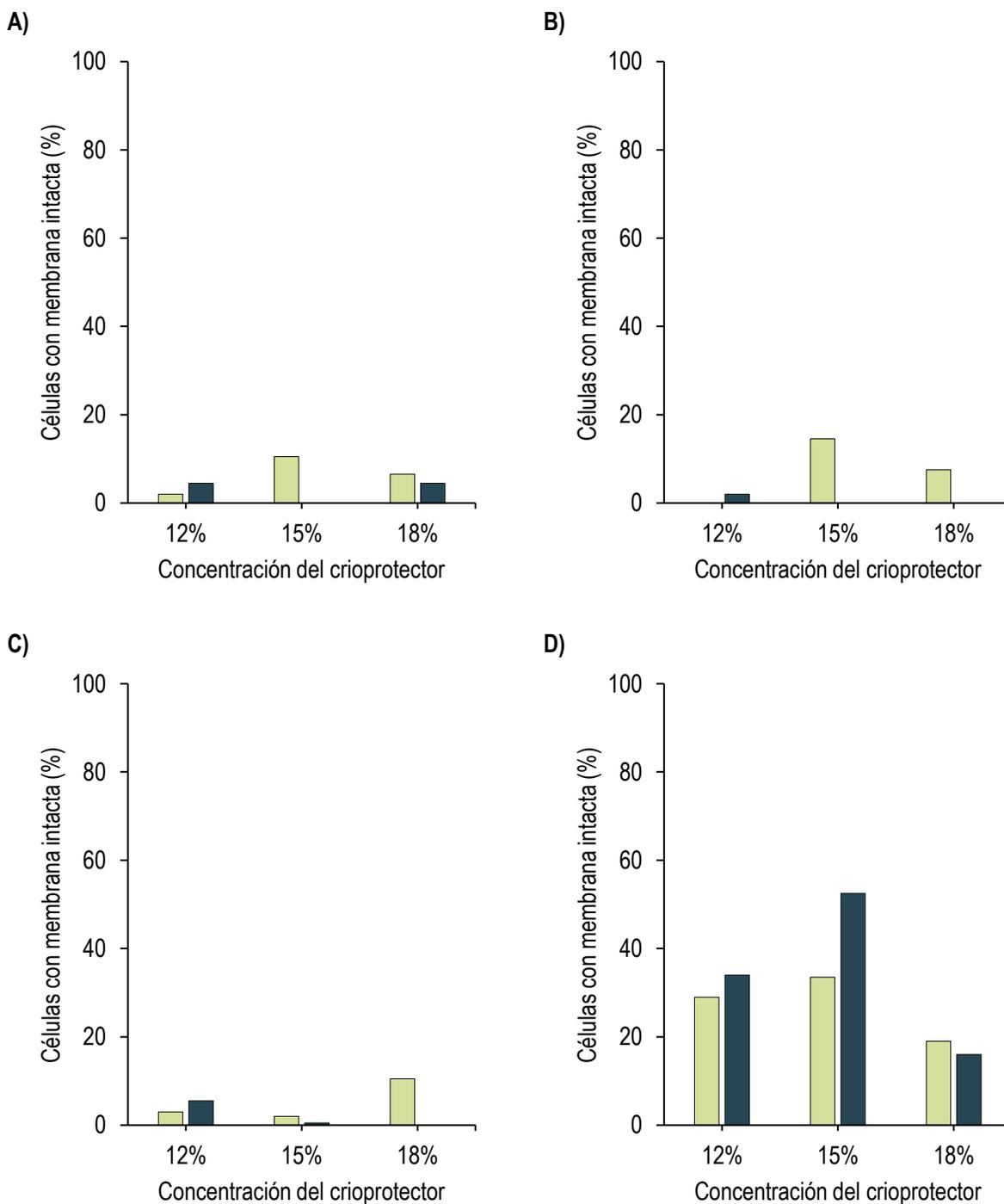


Figura 16. Viabilidad espermática (% de células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método no controlado (esperma de la segunda inducción, SI). Esperma incubado durante ocho min, color verde; esperma incubado durante 18 min, color azul; A) Organismo 1, B) Organismo 2, C) Organismo 3, D) Organismo 4.

3.3.3. Ensayo 4

Estos resultados no fueron sometidos a un modelo estadístico debido a que solo se utilizó el esperma de un organismo.

3.3.3.1. Motilidad y viabilidad con dimetilsulfóxido (DMSO)

La mayor motilidad registrada ($8.6 \pm 1.1\%$) se observó después de incubarse el esperma por 15 min en DMSO al 5%. La motilidad espermática disminuyó al ser expuesta a concentraciones cada vez más altas del crioprotector, la mínima motilidad (0%) se obtuvo después de incubar al esperma por 15 min en DMSO al 20% (Figura 17).

La mayor viabilidad ($59 \pm 7\%$), en términos del porcentaje de células con membrana citoplasmática intacta, se observó después de incubarse el esperma por 15 min en DMSO al 10%. Mientras que la menor viabilidad ($29 \pm 5.6\%$) se obtuvo después de incubar por 15 min en DMSO al 5% (Figura 18).

3.3.3.2. Motilidad y viabilidad con etilenglicol (EG)

La mayor motilidad registrada ($12.6 \pm 4.6\%$) se obtuvo después de incubar el esperma por 15 min en EG al 10%. Mientras que la mínima motilidad ($3.3 \pm 2.8\%$) se observó en el esperma incubado por 15 min en EG al 20% (Figura 19).

La mayor viabilidad ($50.5 \pm 2.1\%$) se observó después de suspender el esperma por 15 min en EG al 10%. Mientras que la mínima viabilidad ($11.5 \pm 2.1\%$) se obtuvo al suspender al esperma por 15 min en 20% EG (Figura 20).

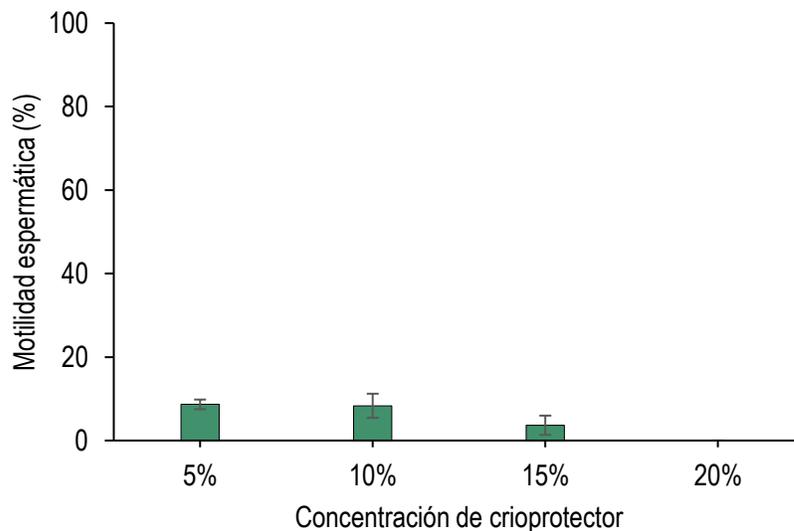


Figura 17. Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).

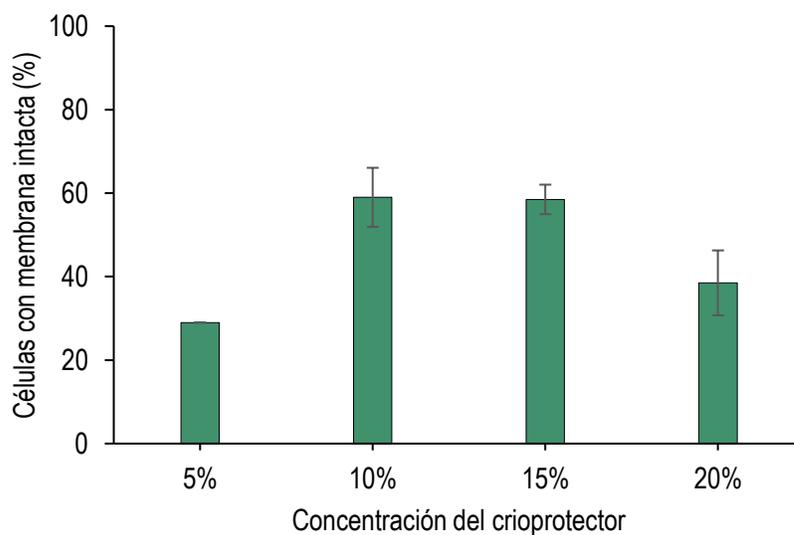


Figura 18. Viabilidad espermática (% células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).

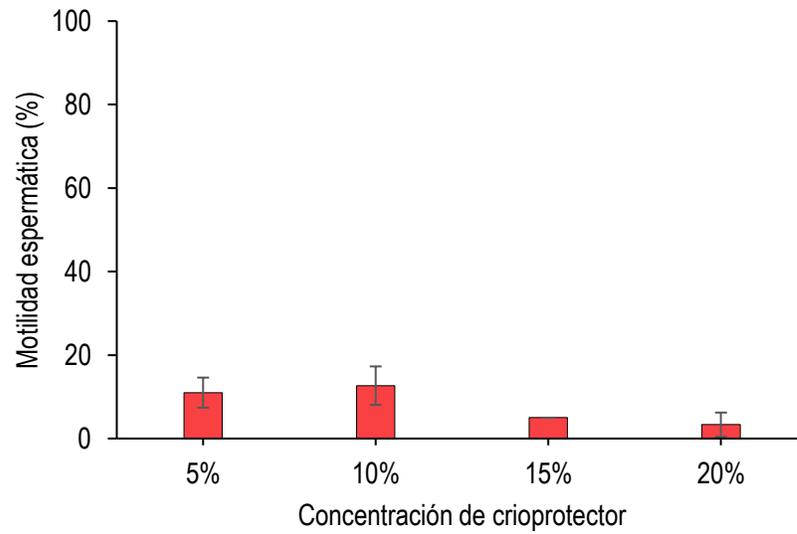


Figura 19. Motilidad espermática (%). Esperma criopreservado utilizando etilenglicol (EG) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).

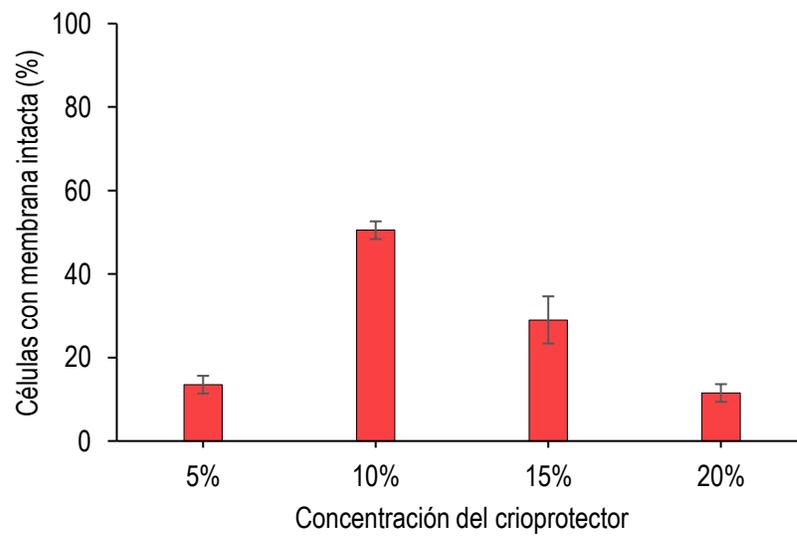


Figura 20. Viabilidad espermática (% células con membrana intacta). Esperma criopreservado utilizando etilenglicol (EG) como crioprotector, método controlado (esperma de la tercera inducción, TI).

3.4. Daños en el esperma criopreservado

En las muestras de los Ensayos 1, 2 y 3 se observó esperma aglutinado (Figura 21). En el Ensayo 1, el 25% de las muestras del esperma criopreservado con DMSO o PG se encontraba aglutinado. En el Ensayo 2, el 60.9% de las muestras de esperma incubadas con GLY y el 45.3% de las muestras incubadas con MeOH se encontraban aglutinadas. Para el Ensayo 3, el 29.1% de las muestras del esperma criopreservado con DMSO presento aglutinamiento. En ninguna de las muestras del ensayo 4 se observó aglutinamiento.

En todos los tratamientos se observó cierto grado de daño morfológico en el esperma descongelado (Figura 22). Estos daños se observaron en el acrosoma como lo es doblamiento o separación. Flagelo doblado o roto y cuello plegable que se refiere a la curvatura de la parte media del esperma que se dobla hacia flagelo.

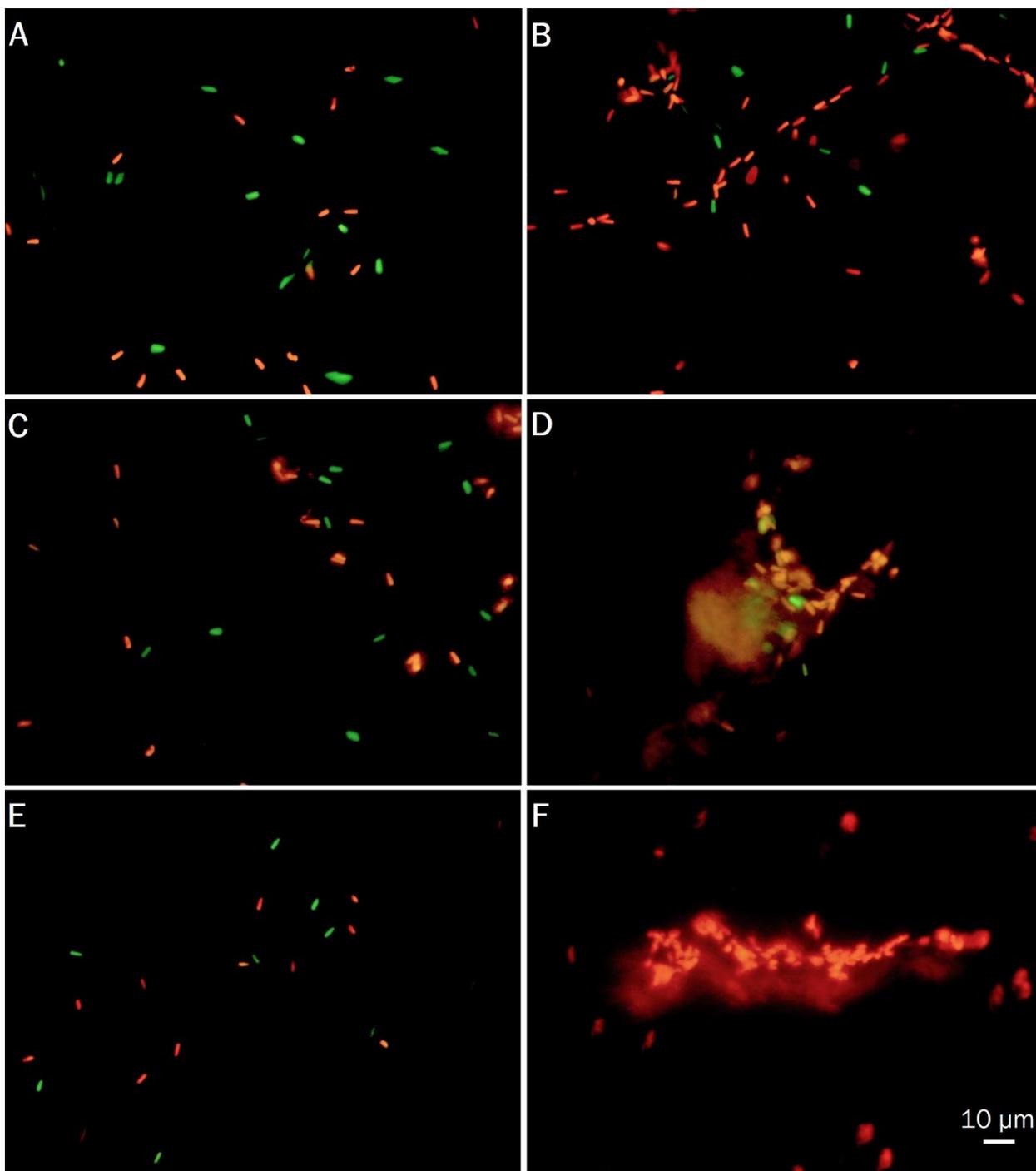


Figura 21. Imágenes de microscopía de fluorescencia de espermatozoides criopreservados después de la tinción LIVE/DEAD. A) Espermatozoides criopreservados con DMSO con membranas intactas (verdes) y dañadas (rojos); B) Espermatozoides criopreservados con DMSO ligeramente aglutinados; C) Espermatozoides criopreservados con GLY ligeramente dañados; D) Espermatozoides aglutinados con membranas dañadas e intactas, criopreservados con GLY; E) Espermatozoides criopreservados con MeOH; y F) Espermatozoides dañados y aglutinados, criopreservados con MeOH. DMSO, dimetilsulfóxido; GLY, glicerol y MeOH, metanol.

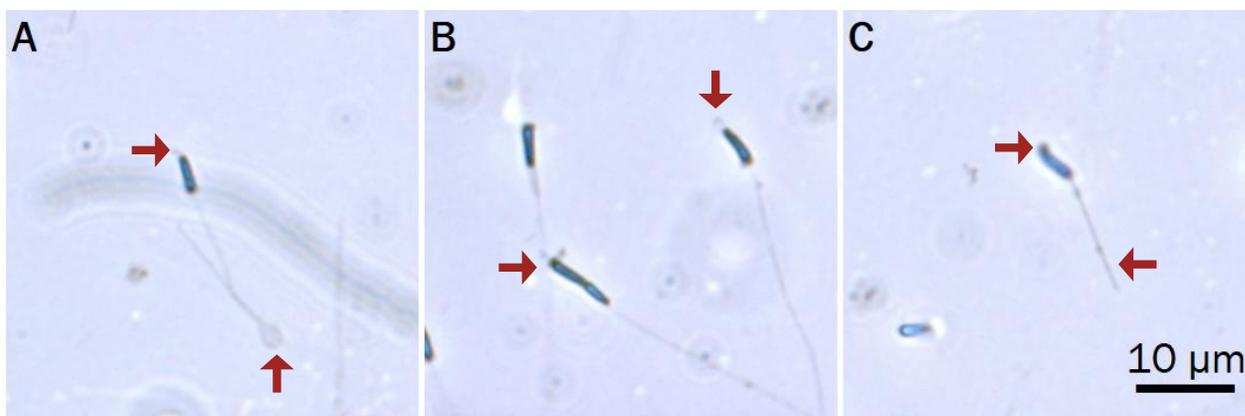


Figura 22. Daños morfológicos en el esperma criopreservado (flechas de color rojo). A) Flagelo doblado y defecto en el acrosoma; B) Cuello plegable y defecto en el acrosoma; y C) Flagelo corto y defecto en el acrosoma.

Capítulo 4. Discusión

En este estudio, se describió la conservación de esperma a corto plazo en refrigeración (4 °C) y además se describió por primera vez un protocolo de criopreservación del esperma para abulón azul, una especie de importancia pesquera y gran potencial acuícola en México. El protocolo de criopreservación comprende desde la obtención del esperma, selección del crioprotector, así como su concentración y tiempo de incubación, congelamiento, descongelamiento y evaluación calidad del esperma que incluye la motilidad e integridad de la membrana citoplasmática. En este proyecto se utilizó una cámara de congelación no controlada y además se describen los resultados preliminares utilizando una cámara de congelamiento programable.

Durante la inducción a la liberación de gametos el macho eyacula en el agua de mar por lo que el esperma usualmente se encuentra contaminado con mucosidad y heces (Gwo *et al.*, 2002). El crecimiento de bacterias y hongos pueden dañar al esperma almacenado, por lo que la adición de antimicrobianos y antimicóticos juegan un papel importante para que estos microorganismos no disminuyan la calidad del esperma (Lake, 1978; Jenkins, 2011). En nuestros resultados no se encontraron diferencias en la motilidad de las muestras control respecto al uso de 20 o 10 µL de antibiótico/antimicótico. Los resultados indican que el esperma fresco del abulón azul almacenado a 4 °C puede conservar una motilidad > 40% al segundo o incluso al tercer día de almacenamiento. Esto presenta una ventaja para los laboratorios de producción de semilla durante la inducción a la liberación de gametos, ya que en caso de que las hembras desovaran en los siguientes dos o tres días el esperma almacenado aun podría fertilizar ovocitos utilizando mayores concentraciones de esperma. Por otro lado, en el esperma de los machos de la PI y SI se obtuvieron resultados variables en la motilidad del esperma fresco, esto puede estar relacionado a la variabilidad biológica de los reproductores (que se discute más adelante) que posiblemente se vio reflejada en la calidad del esperma fresco y criopreservado.

En la criopreservación de esperma de especies acuáticas, el tipo de crioprotector, la concentración, tiempo de incubación, así como la tasa de congelación y descongelación deben de ser seleccionados cuidadosamente (Salinas-Flores *et al.*, 2005; Paredes, 2015). En especies acuáticas de moluscos el DMSO es el crioprotector más frecuentemente utilizado (Liu *et al.*, 2015a). En este trabajo, el esperma del abulón azul criopreservado con DMSO exhibió una mayor motilidad y viabilidad en comparación con PG, GLY y MeOH (Figura 12 y 13). Esto coincide con los resultados obtenidos en la criopreservación de esperma de otras especies abulones como *H. diversicolor supertexta*, *H. laevigata*, *H. rubra*, *H. kamtschatkana* y *H. discus hannai* (Gwo *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014a, 2015b;

O'Brien, 2019; Kim *et al.*, 2020) que han tenido éxito utilizando DMSO como crioprotector. Algunos autores proponen que esto se debe a que la permeabilidad del DMSO es más tolerable a las bajas temperaturas, permitiéndole ingresar al esperma rápidamente e interactuar con los fosfolípidos de la membrana, proporcionando protección durante la congelación (Suquet *et al.*, 2000; Sansone *et al.*, 2005).

En otras especies de moluscos marinos como *Magallana gigas* (anteriormente *Crassostrea gigas*), *Pinctada fucata martensii*, *Mytilus galloprovincialis* y *Perna canaliculus* (Adams *et al.*, 2004; Kawamoto *et al.*, 2007; Matteo *et al.*, 2009; Smiths *et al.*, 2012; Salvi *et al.*, 2021), la concentración óptima del crioprotector varía entre 6% y 12%. En este estudio, el mayor porcentaje de motilidad se observó en el esperma que fue suspendido en una concentración de 15% de DMSO e incubado durante 5 min (Ensayo 1) (Figura 12, sección A). Asimismo, durante el experimento de optimización (Ensayo 3) (Figura 14 y 15) no se encontraron diferencias significativas al utilizar concentraciones de DMSO entre 12 y 18%. Por el contrario, Liu *et al.* (2014a) mencionan que los espermatozoides de *H. laevigata* fueron sensibles a concentraciones de DMSO superiores a 12%, estos resultados coinciden con los protocolos establecidos para otras especies de abulones en donde utilizaron concentraciones entre 5 y 10% de DMSO (Gwo *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015b; O'Brien, 2019; Kim *et al.*, 2020). De modo que, podemos concluir que el esperma del abulón azul tolera concentraciones mayores de DMSO respecto a otras especies de haliótidos.

En los experimentos de los Ensayos 1 y 2 se observó que el uso de PG, GLY y MeOH tienen un efecto tóxico en el esperma del abulón azul incluso a una concentración del 5%. Esto concuerda con los resultados encontrados para *H. diversicolor supertexta* y *H. rufescens*, donde el uso de esos crioprotectores tuvo un efecto nocivo en la viabilidad del esperma (Gwo *et al.*, 2002; Salinas-Flores *et al.*, 2005). Por ejemplo, el uso de MeOH al 5% en *H. diversicolor supertexta* redujo la motilidad del esperma a 0% (Gwo *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que el GLY es un crioprotector adecuado para el esperma de otras especies de abulones como *H. gigantean*, *H. rufescens* y *H. discus hannai* (Matsunaga *et al.*, 1983; Salinas-Flores *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2020). Sin embargo, los espermatozoides del abulón azul fueron extremadamente sensibles al GLY en cualquiera de las concentraciones y tiempos de incubación. Un resultado similar se observó en *H. diversicolor supertexta*, *H. laevigata*, *H. rubra* y *H. kamtschatkana* (Gwo *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014a, 2015b; O'Brien, 2019) en donde el GLY redujo la motilidad de los espermatozoides a < 25% en concentraciones menores a 8%. Estos resultados coinciden con lo observado en otras especies de moluscos, como en *P. fucata martensii* y *Ostrea edulis* (Kawamoto *et al.*, 2007, Vitiello *et al.*, 2011) en donde el esperma suspendido en GLY mostró baja motilidad espermática.

Por lo tanto, como menciona Gwo (2000) las técnicas de criopreservación en invertebrados acuáticos son especie específica, por lo que es necesario desarrollar un protocolo para cada especie.

En este estudio la motilidad espermática no se vio afectada por el tiempo de incubación. Por el contrario, Gwo (2000) menciona que para garantizar la motilidad del espermatozoide en especies acuáticas después de descongelarse, este no debe exponerse al crioprotector por más de 10 min y recomienda un tiempo de incubación corto menor a 3 min. En la motilidad espermática del abulón azul no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de incubación en ninguno de los crioprotectores del Ensayo 1 y 2, ni en el protocolo de optimización del Ensayo 3. Es así que, al utilizar DMSO el espermatozoide puede ser incubado entre 5 y 20 min. Este rango de tiempo difiere de lo recomendado para *H. diversicolor supertexta*, *H. rufescens* y *H. rubra*, (Gwo *et al.*, 2002; Salinas-Flores, 2003; Liu *et al.*, 2015b) donde la motilidad disminuía a mayor tiempo de incubación que se exponía al espermatozoide. Poder incubar el espermatozoide del abulón azul por periodos más largos representa una ventaja debido a la rapidez con la que se tienen que llevar a cabo los experimentos de criopreservación. Particularmente durante la congelación utilizando el método no controlado el utilizar tiempos de incubación mayores a 10 min podría disminuir la posibilidad de errores. Por otro lado, en la viabilidad espermática de las muestras de DMSO del Ensayo 1 se encontraron diferencias significativas en el tiempo de incubación debido a una gran variabilidad de los datos. Los valores de desviación estándar sugieren diferencias entre los organismos al utilizar los mismos tratamientos de criopreservación que podrían estar relacionadas con la variabilidad biológica de los reproductores. En moluscos la temperatura del agua, la disponibilidad de alimento, fotoperiodo y salinidad entre otros factores tiene un efecto en el desarrollo de las gónadas y el ciclo de reproducción (Uki y Kikuchi, 1984). No obstante, en poblaciones silvestres, no hay información sobre los antecedentes del desempeño reproductivo de esos organismos o si estuvieron expuestos a contaminantes durante su ciclo de vida en la naturaleza, los cuales pueden contribuir directamente en el desarrollo gonadal afectando en la calidad espermática (Cabrita *et al.*, 2011). La calidad del espermatozoide fresco es un requisito previo para la criopreservación, ya que si la calidad es variable se podrían obtener resultados inesperados (Acosta-Salmón *et al.*, 2007). Los reproductores utilizados en este estudio eran organismos obtenidos del medio natural, por lo que desconocemos si el desarrollo gonadal se pudo haber visto afectado durante algún punto de su historia de vida y por consiguiente en la calidad espermática.

A pesar de que el uso del EG no estaba contemplado en los objetivos de este trabajo, los resultados preliminares que obtuvimos durante el Ensayo 4 sugieren que el EG pudiera ser un crioprotector aceptable para el espermatozoide del abulón azul. La habilidad del EG como crioprotector se ha demostrado en especies de bivalvos como *M. galloprovincialis* utilizando una concentración de 7% y en *Ostrea edulis* a 15% (Matteo

et al., 2009; Vitiello *et al.*, 2011). En abulones se ha descrito su uso en *H. laevigata* y *H. rubra*; en ambos estudios durante el periodo de incubación la motilidad espermática fue mayor a 70% utilizando la concentración más baja de 4%; sin embargo la motilidad disminuyó a menos de 25% después de descongelar el esperma (Liu *et al.*, 2014a, 2015b). Por otro lado, en *H. discus hannai*, al utilizar EG al 8% la motilidad del esperma descongelado fue de 45%. No obstante se obtuvieron mejores resultados al utilizar DMSO y GLY (Kim *et al.*, 2020). En este sentido, nuestros resultados utilizando EG como crioprotector pueden ser la base para futuros experimentos en la criopreservación de esperma del abulón azul. La selección cuidadosa de un crioprotector es muy importante ya que frecuentemente las pruebas preliminares son limitadas y en ocasiones la calidad del esperma puede variar en los diferentes lotes, entre organismos o incluso en las pruebas experimentales (Dong *et al.* 2007).

Las técnicas para congelar esperma en moluscos marinos se categorizan como congelación controlada o no controlada (Liu *et al.*, 2015a). El método de congelación no controlada utilizando una caja de poliestireno, como el que utilizamos durante los experimentos del Ensayo 1, 2 y 3, se basa en un enfriamiento relativamente lento y controlado durante las primeras etapas de formación del hielo (Zhu *et al.*, 2014). En protocolos de especies de abulones se ha demostrado que este método es conveniente ya que no se necesitan instrumentos costosos, por lo que es económico en comparación con una cámara programable y puede llevarse a cabo en el campo o en criaderos (Tsai y Chao 1994; Salinas-Flores *et al.*, 2005). Sin embargo, la velocidad de congelación de un líquido a una temperatura bajo cero está determinada no solo por el volumen del líquido sino también por la relación entre el área de la superficie y el volumen del líquido, que a su vez está determinada por las formas de la pajilla o el criovial utilizado en la criopreservación (Zhu *et al.*, 2014). Mientras que en *H. discus hannai* no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de la pajilla utilizando volúmenes de 0.25 y 0.5 mL (Kim *et al.*, 2020); en *H. laevigata* sí se encontraron diferencias en la motilidad respecto al tamaño del criovial (Zhu *et al.*, 2014). Nosotros utilizamos pajillas de 0.25 mL que son las más comúnmente usadas en estudios de criopreservación, habría que considerar que en la aplicación de esta técnica en la producción acuícola se necesitaría la congelación de grandes cantidades de esperma y a su vez de la estandarización de un protocolo para pajillas o crioviales más grandes que permitan la congelación de un volumen más grande de esperma.

En especies de abulones la calidad del esperma frecuentemente ha sido evaluada mediante la motilidad, viabilidad y fertilización (Gwo *et al.*, 2002; Salinas-Flores *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014a, 2014b, 2015b; O'Brien, 2019; Kim *et al.*, 2020). La integridad de la membrana citoplasmática es el indicador fisiológico más evaluado en el esperma criopreservado y es crucial al evaluar la calidad

espermática debido a que juega un rol de vital importancia en la fusión del espermatozoide con el ovocito (Maxwell y Salamon, 1993; Figueroa *et al.*, 2016; Alcay *et al.*, 2020). En nuestro estudio, el espermatozoide criopreservado con DMSO (Ensayo 1) mostró un mayor porcentaje de células con membrana citoplasmática intacta en comparación con el espermatozoide criopreservado con los demás crioprotectores. Además, los valores más altos de motilidad y viabilidad espermática resultaron al utilizar una concentración de 15% de DMSO.

Por otro lado, en los Ensayos 1, 2 y 4 observamos un menor porcentaje de motilidad respecto al porcentaje de viabilidad en todas las concentraciones y tiempos de incubación. En el espermatozoide criopreservado de *H. rufescens* se reportaron resultados similares, esto sucede debido a que el espermatozoide puede presentar una membrana intacta y teñirse de verde con SYBR 14. Pero, al mismo tiempo, puede presentar daños en las estructuras que promueven la motilidad como el flagelo o las mitocondrias (Salinas-Flores, 2003). Sin embargo, a pesar de que en nuestros resultados de GLY y MeOH se observó hasta un 21.8% de células con membranas citoplasmática intacta, la motilidad no fue mayor a 3% en ninguno de los tratamientos, asimismo el uso de estos crioprotectores resultó en el mayor porcentaje de espermatozoides aglutinados. La integridad de la membrana citoplasmática es indispensable para asegurar el éxito reproductivo, pero también es necesario que el espermatozoide no se encuentre aglutinado para que pueda nadar libremente hasta un ovocito y fertilizarlo.

Uno de los parámetros más importantes para evaluar la calidad del espermatozoide criopreservado es la habilidad de fertilizar un ovocito y producir un embrión que se desarrolle de la manera en que lo haría si se fertilizara con espermatozoide fresco (Labbé *et al.*, 2013). En nuestro experimento no pudimos realizar una fertilización con espermatozoide del abulón azul criopreservado a causa de falta de reproductores maduros y un corto periodo experimental. No obstante, los resultados obtenidos ofrecen una perspectiva para los siguientes experimentos de criopreservación de espermatozoide del abulón azul. Adicionalmente, al observar el espermatozoide bajo el microscopio se pudieron identificar daños en sus estructuras y espermatozoides aglutinados. El aglutinamiento es un fenómeno en el que los espermatozoides se adhieren entre sí y en casos extremos llegan a formar estructuras alongadas similares a fideos (Dong *et al.*, 2005a). En el espermatozoide de *H. rufescens* se reportó la presencia de aglutinamiento y células de apariencia rota que probablemente se debieron a las reacciones acrosomales espontáneas que pudieron haber ocurrido durante la congelación o descongelación (Salinas-Flores, 2003). La reacción acrosomal consiste en la apertura de la punta del espermatozoide que libera al acrosoma granular provocando una liberación de proteínas que tienen por objetivo destruir la envoltura vitelina y formar un orificio que atravesará el espermatozoide para unirse a la superficie del ovocito (Lewis *et al.*, 1982; Kresge *et al.*, 2001). Nosotros no evaluamos la integridad de la membrana

acrosomal, pero pudimos observar esperma aglutinado en muestras de todos los tratamientos (Figura 22). Por otro lado, Hossen *et al.* (2021) describen que una de las anomalías más frecuentes en el esperma fresco de *H. discus hannai* es el cuello plegable que se refiere a la curvatura de la parte media del esperma que se dobla hacia flagelo. En cambio, en el esperma criopreservado las anomalías se presentan en toda la estructura del esperma, así como en el flagelo que puede llegar a enroscarse o formar una apariencia de nudo. En el esperma descongelado del abulón azul se observaron algunos de los daños morfológicos que se describieron en *H. discus hannai* como doblamiento o separación del acrosoma o daños en el flagelo (Figura 23). El daño en el esperma descongelado puede ocurrir debido a diversos factores como el choque frío, cristalización del hielo o toxicidad del crioprotector (Chao y Liao, 2001).

La calidad del esperma fresco es un requisito indispensable para la criopreservación debido a que este puede variar en los diferentes lotes, entre organismos o en las pruebas experimentales (Acosta-Salmón *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2007). En *C. virginica* se encontró que aunque la motilidad inicial en todos los organismos fue de ~90%, la calidad de los espermatozoides después de la descongelación difirió significativamente entre los organismos (Paniagua-Chávez y Tiersch 2001). Lo anterior coincide con nuestros resultados obtenidos durante el Ensayo 3 en donde se observó variabilidad en la calidad del esperma de los cuatro organismos; particularmente en uno de los organismos que presentó los mayores porcentajes de motilidad y viabilidad (Figura 16). En relación a lo anterior, la nutrición de los reproductores es un factor de gran importancia y necesita ser óptima para la producción de gametos completamente viables y en cantidades abundantes. Una nutrición adecuada del reproductor puede afectar directamente en la capacidad de los espermatozoides para resistir el proceso de congelación. (Leighton, 2000; Cabrita *et al.*, 2010). Además, una de las desventajas al utilizar reproductores silvestres, es la falta de información sobre el desempeño reproductivo de los individuos o la posible exposición a contaminantes durante su ciclo de vida en la naturaleza. La mayoría de los contaminantes afectan el desarrollo gonadal que se verá reflejado en la calidad del esperma, afectando la motilidad, velocidad, viabilidad y fertilidad de los espermatozoides en muchas especies acuáticas (Kime *et al.*, 2001).

Por otra parte, durante la selección de reproductores maduros para la inducción a la liberación de gametos tuvimos dificultades al utilizar el Índice Visual Gonadal (IVG). Esto pudo haber contribuido en la selección de organismos inmaduros (con un IVG menor a 3). A pesar de que el IVG ha sido utilizado con anterioridad en especies de abulones, se trata de una técnica subjetiva al observador que ha generado controversia, por lo que es necesario innovar y aplicar nuevas herramientas para definir el grado de madurez (Vélez-Arellano *et al.*, 2015). En este sentido, el método de ultrasonido ha permitido determinar el sexo y el grado de madurez de diferentes especies de peces como la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*

y el esturión chino *Acipenser sinensis* (Hliwa *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2017). El uso de ultrasonido podría sustituir los muestreos tradicionales en abulones, evitando daños en la gónada o en el musculo, sin embargo no se han encontrado artículos que evalúen la precisión de este método (*com. pers.* Paniagua-Chávez, CICESE, 2021). Establecer las condiciones ambientales requeridas para la maduración y liberación de gametos, así como la correcta evaluación del grado de madurez, son esenciales para la obtención de gametos de buena calidad (Uki y Kikuchi, 1984).

Capítulo 5. Conclusiones

- El espermatozoide de abulón azul *Haliotis fulgens* puede ser almacenado durante tres días a 4 °C y mantener una motilidad > 40%.
- El espermatozoide criopreservado con dimetilsulfóxido (DMSO) exhibió una mayor motilidad y viabilidad en comparación con otros crioprotectores evaluados (PG, GLY y MeOH).
- El uso de los crioprotectores PG, GLY y MeOH a bajas concentraciones (5%) reduce significativamente la motilidad espermática en abulón azul.
- El crioprotector óptimo para la criopreservación del espermatozoide de abulón azul fue dimetilsulfóxido (DMSO) al 15%. El tiempo de equilibrio óptimo para suspender al espermatozoide puede ser entre 5 y 20 min.
- De acuerdo con el protocolo de optimización el espermatozoide de abulón azul puede suspenderse en concentraciones entre 12 y 18% de DMSO sin observar diferencias significativas. Sin embargo, sería recomendable realizar más pruebas para optimizar este protocolo.
- El método de congelamiento no controlado permite obtener hasta un 48% de motilidad y 62% de viabilidad espermática en abulón azul, además de ser rápido, práctico y económico.
- La criopreservación de espermatozoides es una técnica que permite conservar el espermatozoide de especies acuáticas de importancia ecológica y socioeconómica como el abulón azul.
- El espermatozoide inmóvil puede presentar su membrana citoplasmática intacta, pero otras estructuras asociadas a la motilidad dañadas, por lo que es importante utilizar más de un método de evaluación de la calidad del espermatozoide.

Capítulo 6. Recomendaciones

- En la congelación controlada, el esperma suspendido en EG mostró una motilidad y viabilidad similar a los resultados con DMSO. Se recomienda considerar este crioprotector en futuros experimentos para la criopreservación de esperma del abulón azul.
- Se recomienda evaluar la viabilidad del esperma fresco previo a la criopreservación.
- Se recomienda más experimentos para delimitar el tiempo de equilibrio con mayor precisión.
- Se recomienda innovar y aplicar nuevas herramientas para definir el grado de madurez de los reproductores.

Literatura citada

- Aas, G. H., Refstie, T., Gjerde, B. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95(1–2), 125–132.
- Acosta-Salmón, H., Jerry, D. R., Southgate, P. C. 2007. Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa. *Cryobiology*, 54, 13–18.
- Adams, S.L., Smith, J.F., Roberts, R.D., Janke, A.R., Kaspar, H.F., Tervit, T.R., Pugh, P.A., Webb, S.C., King, N.G. 2004. Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of a practical method for commercial spat production. *Aquaculture* 242:271–282.
- Adams, S.L., Smith, J.F., Roberts, R.D., Janke, A.R., King, N.G., Tervit, H.R., Webb, S. C. 2008. Application of sperm cryopreservation in selective breeding of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture Research* 39:1434–1442.
- Adams, S. L., Smith, J. F., Tervit, R.H., McGowan, L. T., Roberts, R. D., Janke, A. R., King, N. G., Gale, S. L., Webb, S. C. 2011. Cryopreservation of Molluscan Sperm: Pacific Oyster, Green-lipped Mussel, and Paua Abalone. En: Tiersch, T. R., y Green, C. C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. pp. 562-573.
- Alcay, S., Ustuner, B., Aktar, A., Mulkpınar, E., Duman, M., Akkasoglu, M., Cetinkaya, M. 2020. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. *Andrologia*, 52(4), 3–7.
- Arredondo B, Voltolina D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México. pp. 19
- Ault, J. S. 1985. Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of the World Mariculture Society*, 16(1-4), 398-425.
- Baqueiro, C. E., Avilés-Quevedo, A., Masso-Rojas, J. A., Muciño-Díaz, M., Rogers-Nieto, P., Vélez-Barajas, A. 1992. Manual de métodos de muestreo y evaluación de poblaciones de moluscos y otros recursos bentónicos. Secretaría de Pesca, México, D.F. pp. 73.
- Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Herráez, M. P. 2010. Detection of early damage of sperm cell membrane in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) with the nuclear stain YO-PRO 1. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 794–796.
- Blaxter, J. 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172, 1189–1190.

- Bobe, J., Labbé, C. 2009. Chilled storage of sperm and eggs. En: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P., (Eds.), Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species. Boca Raton. pp. 219-36.
- Booolootian, R. A., Farmanfarmaian, A., Giese, A. C., 1962. On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. The Biological Bulletin, 122(2), 183-193.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Paramo, S., Robles, V., Beirao, J., Peraz-Cerezales, S., Herrarez, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspective. J Applied Ichthyology 26:623–635.
- Cabrita, E., Robles, V., Sarasquete, C., Herraez, P. 2011. New Insight on Sperm Quality Evaluation for Broodstock Improvement. En: Tiersch, T. R., y Green, C. C. (Eds.), Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. pp. 146-161.
- Chao N., Liao I. 2001. Cryopreservation of Finfish and Shellfish Gametes and Embryos. Aquaculture. 197: 161-189.
- Carta Nacional de Pesca (CNP). 2018. Consultado el 28 octubre de 2020, de <https://www.gob.mx/inapesca/documentos/carta-nacional-pesquera-2017>.
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA). 2014. Consultado el 28 de octubre de 2020, de https://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/informacion_estadistica_por_especie_y_entidad
- Cook, P. A. 2014. The Worldwide Abalone Industry. Modern Economy. 5:1181–1186.
- Cook, P. A. 2019. Worldwide abalone production statistics. Journal of Shellfish Research. 38(2), 401–404.
- Cox, K. W. 1962. Fish Bulletin No. 118. California Abalones, Family Haliotidae.
- Di Matteo, O., Langellotti, A. L., Masullo, P., Sansone, G. 2009. Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. Cryobiology, 58(2), 145–150.
- Dong, Q., Eudeline, B., Huang, C., Allen, S., Tiersch, T. 2005a. Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Cryobiology 50:1–16.
- Dong, Q., Huang, C., Eudeline, B., Tiersch, T. 2005b. Systematic factor optimization for cryopreservation of shipped sperm samples of diploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Cryobiology 51:176–197.
- Dong, Q., Huang, C., Eudeline, B., Allen, S., Tiersch, T. 2006. Systematic factor optimization for sperm cryopreservation of tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Theriogenology 66:387–403.

- Dong, Q., Huang, C., Eudeline, B., Tiersch, T. 2007. Cryoprotectant optimization for sperm of diploid Pacific oysters by use of commercial dairy sperm freezing facilities. *Aquaculture* 271:537–545.
- Donoghue, A. M., Garner, D. L., Donoghue, D. J., Johnson, L. A. 1995. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poultry science*, 74(7), 1191–1200.
- Du, H., Zhang, X., Leng, X., Zhang, S., Luo, J., Liu, Z., Qiao, X., Kynard, B., Wei, Q. 2017. Gender and gonadal maturity stage identification of captive Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, using ultrasound imagery and sex steroids. *General and Comparative Endocrinology*, 245, 36–43.
- Fahning, M., Garcia, M., 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 29:1-18.
- Fahy, G. 1986. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 23:1- 13.
- Fahy, G., Levy, D., Ali, S. 1987. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*. 24:196-213.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2017. Consultado el 20 de octubre de 2020, de <https://www.fao.org/in-action/globefish/marketreports/resource-detail/es/c/902592/>.
- Figuerola, E., Valdebenito, I., Farias, J. G. 2016. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*, 47: 1691–1705.
- Gao, D., Critser, J. K. 2000. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal*, 41(4), 187–196.
- Garner, D. L., Johnson, L. A., Yue, S. T., Roth, B. L., Haughland, R. P. 1994. Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Journal of Andrology*, 15(6), 620–629.
- Gobierno del estado de Baja California. 2000-2015. Carta Estatal Pesquera (CEP). Consultado el 01 de noviembre de 2020, de: <http://www.sepescabc.gob.mx/x/salaDePrensa/difusionAcciones/docs/CartaEstatalPesquera.pdf>
- Guzmán-del Próo, S. A. 1992. A review of the biology of abalone and its fishery in México, 341-360. En: S. A. Shepherd, M. J. Tegner & S. A. Guzmán-del Próo, (Eds.), *Abalone of the World: Their Biology, Fisheries and Culture*. Blackwell, Oxford. pp. 608
- Guzmán del Próo, S. A., Marín, A., 1976. Resultados preliminares sobre crecimiento de abulón amarillo y azul (*Haliotis corrugata* y *H. fulgens*) en Punta Abreojos, B. C. INP/SC: 17. pp. 11

- Gwo, J. C. 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research*, 31(3), 259–271.
- Gwo, J. C., Chen, C. W., Cheng, H. Y. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology*, 58(8), 1563–1578.
- Hassan, M., Li, X., Liu, Y., Qin, J., 2017. Sperm cryopreservation in the spermcasting Australian flat oyster *Ostrea angasi* by a programmable freezing method. *Cryobiology* 76:119-124.
- Hliwa, P., Bah, M., Kuźmiński, H., Dobosz, S., Ciereszko, A. 2014. Ultrasound evaluation of the gonadal structure in sex-reversed rainbow trout females. *Aquaculture International*, 22(1), 89–96.
- Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58.
- Hossen, S., Sukhan, Z. P., Cho, Y., Kho, K. H. 2021. Effects of Cryopreservation on Gene Expression and Post Thaw Sperm Quality of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1–16.
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R., Han, J. 2017. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12–18.
- Jenkins, J. 2011. Infectious Disease and Quality Assurance Considerations for the Transfer of Cryopreserved Fish Gametes. En: Tiersch, T. R., y Green, C. C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. pp. 939-959
- Kang, K., Kim, J. M., Kim, Y. H. 2004. Short term storage and cryopreservation of abalone (*Haliotis discus hannai*) Sperm. *Korean Journal of Malacology*, 20(1), 17–26.
- Karlsson, J., Toner, M. 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, 17(3), 243–256.
- Kawamoto, T., Narita, T., Isowa, K., Aoki, H., Hayashi, M., Komaru, A., Ohta, H. 2007. Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology*, 54(1), 19–26.
- Kim, S. C., Hossen, S., Kho, K. H. 2020. Cryopreservation of sperm from farmed Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Cryobiology*, 94: 49–56.
- Kime, D. E., Van Look, K. J. W., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 130(4), 425–433.

- Koebe, H., Werner, A., Lange, V., Schildberg, F. 1993. Temperature gradients in freezing chambers of rate-controlled cooling machines. *Cryobiology* 30:349–352.
- Kresge, N., Vacquier, V. D., Stout, D. C. 2001. Abalone lysin: the dissolving and evolving sperm protein. *BioEssays*, 23(1), 95–103.
- Labbé, C., Robles, V., Herraiez, M. P. 2013. Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation. En: *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. pp. 76-116.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., Weismann, T. 1996. Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research*, 27(9), 659–671.
- Lake, P. E. 1978. The principles and practice of semen collection and preservation in birds. *Symposium of the Zoological Society of London* 43:31-49.
- Leibo, S. P. 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*. 69:37–47.
- Leibo, S. P., Pool, T. B. 2011. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertility and Sterility*, 96(2), 269–276.
- Leighton, D. L. 2000. *The biology and culture of the California abalones*. Dorrance Publishing Company
- Lewis, C. A., Leighton, D. L., Vacquier, V. D. 1980. Morphology of abalone spermatozoa before and after the acrosome reaction. *Journal of Ultrastructure Research*, 72(1), 39–46.
- Lewis, C. A., Talbot, C. F., Vacquier, V. D. 1982. A protein from abalone sperm dissolves the egg vitelline layer by a nonenzymatic mechanism. *Developmental Biology*, 92(1), 227–239.
- Liu, Y., Xu, T., Robinson, N., Qin, J., Li, X. 2014a. Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone *Haliotis laevis*. *Cryobiology*, 68(2), 185–193.
- Liu, Y., Li, X., Xu, T., Robinson, N., Qin, J. 2014b. Improvement in non-programmable sperm cryopreservation technique in farmed greenlip abalone *Haliotis laevis*. *Aquaculture*, 434, 362–366.
- Liu, Y., Li, X., Robinson, N., Qin, J. 2015a. Sperm cryopreservation in marine mollusk: a review. *Aquaculture International*, 23(6), 1505–1524.

- Liu, Y., Xu, T., Robinson, N., Qin, J., Li, X. 2015b. Cryopreservation of sperm in farmed blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach, 1814). *Aquaculture Research*, 46(11), 2628–2636.
- Lovelock, J. 1953. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* 10:414-426.
- Matsunaga, H., Iwata, N., Kurokura, H., Hirano, R. 1983. A preliminary study about cryopreservation of abalone sperm (in Japanese). *Journal of the Faculty of Applied Biological Science*, 22(1), 135–139.
- Maxwell, W. M. C., Salamon, S. 1993. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 613–638.
- Mazur, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. En: L.A. Johnson, K. Larsson (Eds.), *Proceedings of the First International Conference on Deep Freezing of Boar semen*, Uppsala. pp. 91–111.
- McFradzen, I. 1995. Cryopreservation of the sperm of the Pacific *Crassostrea gigas*. En: Day, J., y McLellan, M. (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Human Press Inc., Totowa. pp. 145-149
- McShane, P. E. 1995. Recruitment Variation in Abalone: Its Importance to Fisheries Management. *Marine and Freshwater Research*, 46(3), 550–570.
- Meryman, H. T. 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8(2), 173-183.
- Meryman, H., Williams, R., Douglas, M. 1977. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 14:287-302.
- Morisson, M., Bordas, A., Petit, J. M., Julien, R., Minvielle, F. 1997. Associated Effects of Divergent Selection for Residual Feed Consumption on Reproduction, Sperm Characteristics, and Mitochondria of Spermatozoa. *Poultry Science*, 76(3), 425–431.
- Mozingo, N. M., Vacquier, V. D., Chandler, D. E. 1995. Structural features of the abalone egg extracellular matrix and its role in gamete interaction during fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 41(4), 493–502.
- O’Brien, C. 2019. Development of cryopreservation methods for sperm of pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*) for conservation aquaculture. Tesis de Maestría en Ciencias. Western Washington University. pp. 32.
- Özkavukcu, S., Erdemli, E., 2003. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*. 24 (4): 187-196.

- Paniagua-Chávez, C.G., Tiersch, T. 2001. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the Eastern oyster. *Cryobiology* 43:211–223
- Paniagua-Chávez, C. G., Jenkins, J., Segovia, M., Tiersch, T. R. 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology*, 53(1), 128–138.
- Paredes, E. 2015. Exploring the evolution of marine invertebrate cryopreservation - landmarks, state of the art and future lines of research. *Cryobiology*, 71(2), 198–209.
- Pegg, D. 2007. Principles of cryopreservation. En: Day, J. y Stacey, G. (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Second Edition, Methods in Molecular Biology*. Humana Press New Jersey. pp. 9-57.
- Pegg, D. 2015. Principles of Cryopreservation. En W. F. Wolkers y H. Oldenhof (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Third Edition, Methods in Molecular Biology*. Humana Press New Jersey. pp. 3-20.
- Ponce-Díaz, G., Chávez, E. A., Ramade-Villanueva, M. 2000. Evaluation of the green abalone *Haliotis fulgens* fishery in Bahía Asunción, Baja California Sur, Mexico. *Ciencias Marinas*, 26(3), 393–412. doi:10.7773/cm.v26i3.598
- Renard, P., Cochard, J. 1989. Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), manila clam *Ruditapes philippinarum* (Reeve) and king scallop *Pecten maximus* (L) embryos: influence of the biochemical and osmotic effects, *Cryo-Letters* 10:169–180.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2016. Norma Oficial Mexicana NOM-009-SAG/PESC-2015, que establece el procedimiento para determinar las épocas y zonas de veda para la captura de las diferentes especies de la flora y fauna acuáticas, en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos. *Diario Oficial (México)*.
- Salinas-Flores, L. 2003. Criopreservación de esperma del abulón rojo *Haliotis rufescens*. 119 pp.
- Salinas-Flores, L., Paniagua-Chavez, C., Jenkins, J., Tiersch, T. 2005. Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*). *J Shellfish Res* 24:415–420.
- Salvi, D., Bertsch, H., Cáceres-Martínez, J., Cruz-Flores, R., Del Rio-Portilla, M. A., Eernisse, D. J., Healy, J. M., Lafarga-De La Cruz, F., Londoño-Cruz, E., McDougall, C., Oliver, G. P., Oliverio, M., Paniagua, C., Willan, R. C., Zacherl, D. C., Mariottini, P. 2021. Taxonomic discussion on scientific names for Pacific oysters requires evidence-based arguments and pluralism. *Aquaculture*, 546.

- Sansone, G., Nascimento, I., Leite, M., Araujo, M., Pereira, S., Mariani, A. 2005. Toxic Effects of Cryoprotectants on oyster gametes and embryos: A preliminary step towards establishing cryopreservation protocols. *Biociencias*, 13(1), 11–18.
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M. R., Altamira, B., 2010. Current status of abalone fisheries and culture in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 573-576.
- Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C., Tiersch, T. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia, *Theriogenology*, 53, 1489-1499.
- SEPESCA (Secretaría de Pesca). 1993. Norma Oficial Mexicana NOM 005-PESC- 1993, para regular el aprovechamiento de las poblaciones de las distintas especies de abulón, en aguas de jurisdicción federal de la península de Baja California. *Diario Oficial (México)*.
- Smith, J. F., Adams, S. L., Gale, S. L., McGowan, L. T., Tervit, H. R., Roberts, R. D. 2012. Cryopreservation of Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) sperm. I. Establishment of freezing protocol. *Aquaculture*, 334–337, 199–204.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, third ed. W.H. Freeman and Company, New York, NY.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31:231–243.
- Tiersch, T. R. 2000. Introduction. En T. R. Tiersch y P. M. Mazik (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. pp. xix-xxvi
- Tiersch, T. R., Yang, H., Jenkins, J. A., Dong, Q. 2007. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Spermatology*, 65, 493–508.
- Tsai, H. P., Chao, N. H. 1994. Cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor*) sperm - Technique and its significance. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 21(4), 347–360.
- Uki, N., Kikuchi, S. 1984. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture*, 39(1–4), 247–261.
- Vega, V. A., León, G., Muciño, M. 1994. Sinopsis de información biológica, pesquera y acuacultural de los abulones (*Haliotis* spp.) de la península de Baja California, México. Centro Regional de Investigación Pesquera en La Paz. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (inédito)

- Vega-García, D. 2016. Cambios históricos en las poblaciones de abulón azul y amarillo en la Península de Baja. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, México. 70 p
- Vélez-Arellano, N., García-Domínguez, F. A., Lluch-Cota, D. B., Gutiérrez-González, J. L., Sánchez-Cárdenas, R. 2015. Histological Validation of Morphochromatically-Defined Gonadal Maturation Stages of Green Abalone (*Haliotis fulgens*) Philippi, 1845 and Pink Abalone (*Haliotis corrugata*) Wood, 1828. *International Journal of Morphology*, 33(3), 1054–1059.
- Vélez-Arellano, M. N. 2016. Tácticas reproductivas de *Haliotis fulgens*. PHILIPPI, 1985 y *Haliotis corrugata* W. WOOD, 1828 (GASTROPODA: ARCHAEOGASTROPODA) en dos zonas de pesca en la costa Occidental de Baja California Sur. Tesis de doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 88 pp.
- Vitiello, V., Carlino, P. A., Del Prete, F., Langellotti, A. L., Sansone, G. 2011. Effects of cooling and freezing on the motility of *Ostrea edulis* (L., 1758) spermatozoa after thawing. *Cryobiology*, 63, 118–124.
- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891.
- Xu, F., Moon, S., Zhang, X., Shao, L., Seok, Y., Demirci, U. 2010. Multi-scale heat and mass transfer modelling of cell and tissue cryopreservation *Phil. Trans. R. Soc. A*. 368: 561–583.
- Yao, Z., Crim, L., Richardson, G., Emerson, C. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, 181(3–4), 361–375.
- Zhang, M., Li, X., Clarke, S., Li, X. 2012. The development of Pacific oysters *Crassostrea gigas* produced using cryopreserved sperm. En: Qin, J. (Eds.), *Oysters: physiology, ecological distribution and mortality*. Nova Science Publishers, New York, pp. 1–18.
- Zhu, W., Li, X., Qu, D., Liu, Y., Clarke, S. 2014. Cryopreservation of sperm from wild greenlip abalone (*Haliotis laevigata*) in Australia. *Aquaculture*, 432:60–66.

Anexos

Anexo A. Inducción a la liberación de gametos

El procedimiento de inducción a la liberación de gametos (ILG) fue el utilizado por el laboratorio de cultivo de abulón del Departamento de Acuicultura del CICESE. Los organismos seleccionados deben de ser sometidos a un ayuno 48 h antes para reducir la presencia de heces durante la ILG, asimismo es conveniente cepillar la concha para eliminar la mayor cantidad de epibiontes. Se recomienda utilizar organismos con un IVG 2 o IVG 3 y separar por sexo, preferentemente en contenedores individuales al momento de que inicie la liberación de gametos.

Protocolo 1

1. Colocar a los organismos en tanques de 300 L cubiertos con plástico negro y desecar durante dos horas.
2. Transcurridas las dos horas, agregar AMF e irradiada con una lámpara UV 130 W, hasta que cubra por completo a los organismos (1 cm aproximadamente por encima de la concha).
3. Mantener en oscuridad y monitorear cada 30 min si se observan movimientos en los organismos o pulsos de esperma.
4. Una vez que el pulso de esperma sea constante colocar individualmente en recipientes de 1 L.
5. Cambiar el agua cada 30 min procurando que el esperma utilizado sea lo más fresco posible.

Protocolo 2

1. Colocar a los organismos en charolas de 30 L cubiertos con plástico negro y desecar durante dos horas.
2. Transcurridas las dos horas agregar una solución de Tris base con H₂O₂ hasta que cubra por completo al organismo (1 cm aproximadamente por encima de la concha).

3. Mantener en oscuridad y monitorear cada 30 min si se observan movimientos en los organismos o pulsos de esperma.
4. Una vez que el pulso de esperma sea constante colocar individualmente en recipientes de 1 L.
5. Cambiar el agua cada 30 min procurando que el esperma utilizado sea lo más fresco posible.

Soluciones:

1. Tris base con H_2O_2 : En una cubeta agregar 15 L de AMF agregar 25 g de Trizma base (SIGMA-ALDRICH T1378) para obtener una concentración final de 0.013 M. Una vez disuelto agregar 15 mL de H_2O_2 grado reactivo al 30%.

Anexo B. Determinación de la viabilidad espermática con fluorocromos

En este estudio se evaluó la viabilidad espermática mediante el uso del *LIVE-DEAD Sperm Viability Kit* (Invitrogen™ L7011). El kit incluye SYBR-14 y Yoduro de Propidio (YP), los cuales se han utilizado para verificar la viabilidad del esperma en especies de haliótidos, como *H. rufescens*, *H. laevigata* y *H. discus hannai* (Salinas-Flores *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014b; Kim *et al.*, 2020). Esta técnica consiste en que los espermatozoides con membranas intactas se tiñen con el fluorocromo SYBR-14, ya que al estar disuelto en DMSO puede penetrar la membrana, unirse al ADN y producir fluorescencia verde. Por el contrario, el YP se encuentra disuelto en agua y penetra exclusivamente los espermatozoides con membranas dañadas, produciendo fluorescencia roja.

Protocolo:

1. Una vez descongelado el contenido de una pajilla y diluido en AMF (volumen total de 500 μ L) agregar 2.5 μ L de SYBR 14.
2. Incubar durante 10 min en oscuridad.
3. Agregar 2.5 μ L de YP.
4. Incubar durante 10 min en oscuridad
5. Observar en el microscopio de epifluorescencia con un filtro de excitación de 450-490 nm. La emisión máxima es de 516 nm para el SYBR 14 y 617 nm para el YP.

Soluciones:

1. SYBR 14: preparar una solución 1:50 de SYBR 14 con DMSO (para preparar 100 μ L, mezclar 2 μ L de colorante con 98 μ L de DMSO). Obteniendo una concentración final de 0.5 μ M de SYBR 14 en 500 μ L de esperma.
2. Yoduro de propidio (YP): este colorante se agrega directamente como viene del kit. Obteniendo una concentración final de 1.2 μ M de YP en 500 μ L de esperma.

Anexo C. Concentración de antibiótico antimicótico

La solución de antibiótico antimicótico (SIGMA-ALDRICH A5955) contiene 10,000 unidades de penicilina, 10 mg estreptomina y 25 μg anfotericina B por mL. En la siguiente tabla se observan las concentraciones finales de antibiótico antimicótico para el experimento del esperma de la primera inducción (Experimento A) y de la segunda inducción (Experimento B).

Tabla 4. Concentración de antibiótico antimicótico para los experimentos A y B de la conservación a corto plazo.

Compuestos	Experimento A (20 μL de antibiótico antimicótico)	Experimento B (10 μL de antibiótico antimicótico)
Penicilina	196.07 u/mL	99.009 u/L
Estreptomina	0.196 mg/mL	0.099 mg/mL
Anfotericina	0.490 μg /mL	0.247 μg /mL

Anexo D. Preparación de crioprotectores

1. Las soluciones crioprotectoras (dimetilsulfóxido, propilenglicol, glicerol, metanol y etilenglicol) se prepararon de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5. Preparación de soluciones crioprotectoras para la criopreservación de esperma del abulón azul *Haliotis fulgens*.

Concentración de Crioprotector (%)	Crioprotector (μL)	Esperma (μL)	Volumen total (μL)
5	250	4750	5000
10	500	4500	5000
12	600	4400	5000
15	750	4250	5000
18	900	4100	5000
20	1000	4000	5000

2. El volumen total es suficiente para llenar 20 pajillas de 250 μL .

Nota: Todos los reactivos utilizados en los experimentos fueron grado reactivo (SIGMA-ALDRICH Co., St. Louis, MO).

ANEXO E. Matrices de análisis estadístico

Tabla 6. Análisis de Covarianza para la comparación de la adición de antibiótico antimicótico (20 μ L) sobre la motilidad del esperma de abulón azul a lo largo del tiempo (7 días). Donde se muestra el Estimando, Error estándar, y valor P; ($P < 0.05$).

Coficiente	Estimado	Error estándar	P
Intercepto	0.092	0.003	0.000
Tiempo	0.008	0.000	0.000
Tratamiento	0.002	0.005	0.651
Día*Tratamiento	0.005	0.001	0.000

Tabla 7. Análisis de Covarianza para la comparación de la adición de antibiótico antimicótico (10 μ L) sobre la motilidad del esperma de abulón azul a lo largo del tiempo (7 días). Donde se muestra el Estimando, Error estándar, y valor P; ($P < 0.05$).

Coficiente	Estimado	Error estándar	P
Intercepto	0.102	0.004	0.000
Tiempo	0.0127	0.001	0.000
Tratamiento	0.001	0.006	0.864
Día*Tratamiento	0.000	0.001	0.660

Tabla 8. Resumen del análisis (ANOVA) de la motilidad espermática para la comparación del efecto de los crioprotectores (DMSO, PG, Gly y MeOH) y concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); Gl, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad. Significancia estadística ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	gl	SC	F	P
Concentración	3	0.001	8.389	0.000
Tiempo	3	0.000	2.042	0.109
Crioprotector	3	0.098	576.311	0.000
Concentración*Tiempo	9	0.000	0.865	0.557
Concentración*Crioprotector	9	0.002	5.231	0.000
Tiempo*Crioprotector	9	0.001	2.807	0.004
Concentración*Tiempo*Crioprotector	27	0.001	0.687	0.875
Error	190	0.010		

Tabla 9. Resumen del análisis (ANOVA) de la viabilidad espermática para la comparación del efecto de los crioprotectores (DMSO, Gly y MeOH) y concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); Gl, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad. Significancia estadística ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	gl	SC	F	P
Concentración	3	0.001	3.163	0.026
Tiempo	3	0.002	5.056	0.002
Crioprotector	3	0.096	244.795	0.000
Concentración*Tiempo	9	0.001	0.8099	0.608
Concentración*Crioprotector	6	0.001	1.032	0.407
Tiempo*Crioprotector	6	0.004	3.433	0.003
Concentración*Tiempo*Crioprotector	18	0.001	0.501	0.953
Error	131	0.025		

Tabla 10. Resumen del análisis (ANOVA) de la motilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); Gl, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	gl	SC	F	P
Concentración	3	0.003	6.139	0.001
Tiempo	3	0.001	2.238	0.095
Concentración*Tiempo	9	0.001	0.713	0.694
Error	48	0.008		

Tabla 11. Resumen del análisis (ANOVA) de la viabilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) a lo largo del tiempo (5, 10, 15 y 20 min); Gl, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	gl	SC	F	P
Concentración	3	0.000	1.090	0.362
Tiempo	3	0.001	2.842	0.048
Concentración*Tiempo	9	0.0001	0.642	0.755
Error	45	0.007		

Tabla 12. Resumen del análisis (ANOVA) de la motilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (12%, 15% y 18%) a lo largo del tiempo (8 y 18 min); Gl, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	gl	SC	F	P
Concentración	2	0.003	0.495	0.618
Tiempo	1	0.000	0.256	0.619
Concentración*Tiempo	2	0.000	0.388	0.684
Error	18	0.006		

Tabla 13. Resumen del análisis (ANOVA) de la viabilidad espermática para la comparación del efecto de DMSO a las concentraciones (12%, 15% y 18%) a lo largo del tiempo (8 y 18 min); Gl, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; F, distribución F; P, probabilidad). Significancia estadística ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	gl	SC	F	P
Concentración	2	0.000	0.068	0.935
Tiempo	1	0.000	0.825	0.376
Concentración*Tiempo	2	0.000	0.798	0.465
Error	18	0.008		