



ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

EFFECTO DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES SOBRE LA FECUNDACIÓN
DEL ERIZO PERUANO *Tetrapygus niger* CON FINES DE DESARROLLO DE UN
BANCO DE GERMOPLASMA CRIOGÉNICO

Línea de investigación:

Genética, Bioquímica y Biotecnología

Tesis para optar el grado académico de Maestra en Acuicultura

Autor:

Gamero Collado, Betty Eliseni

Asesor:

Scotto Espinoza, Carlos Jesús
(ORCID: 0000-0003-1592-0419)

Jurado:

Iannacone Oliver, Jose Alberto
Alvarez Verde, Claudio Abdon
Díaz Cachay, Catalina Beatriz

Lima - Perú

2023



Reporte de Análisis de Similitud

Archivo:

[1A_GAMERO_COLLADO_BETTY_ELISENI_MAESTRÍA_2023.docx](#)

Fecha del Análisis:

19/06/2023

Analizado por:

Astete Llerena, Johnny Tomas

Correo del analista:

jastete@unfv.edu.pe

Porcentaje:

7 %

Título:

EFFECTO DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES SOBRE LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO PERUANO *Tetrapygus niger* CON FINES DE DESARROLLO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA CRIOGÉNICO

Enlace:

<https://secure.arkund.com/old/view/163403312-389212-265174#DcYxDslwDEDru2T+QrYTO06vgjggCIAGunRE3J3o/+F9y+cq211QdG2oo4F2NNGBYIptlC xhjkWWMeSSsMJwgin050kg+zkwmAIO+Wa73O+5vE4j2fZ5CbRRTw8R7aIWuvvDw==>



DRA. MIRIAM LILIANA FLORES CORONADO
JEFA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

EFFECTO DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES SOBRE LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO PERUANO *Tetrapygus niger* CON FINES DE DESARROLLO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA CRIOGÉNICO

Línea de Investigación:

2. Genética, Bioquímica y Biotecnología

Tesis para optar el Grado Académico de Maestra en Acuicultura

Autor:

Gamero Collado, Betty Eliseni

Asesor:

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

ORCID: 0000-0003-1592-0419

Jurados:

Iannacone Oliver, Jose Alberto

Alvarez Verde, Claudio Abdon

Díaz Cachay, Catalina Beatriz

Lima-Perú

2023

A mis padres

A mi amado esposo Armando

Agradecimientos

- A Dios, por permitirme continuar trabajando en el área que me encanta, la Genética Aplicada.
- A Mg. Catalina Díaz, por todo el apoyo brindado durante este periodo de trabajo arduo y en pandemia, con materiales, bibliografía y en especial por su amistad.
- Al Dr. Walter Zambrano por sus consejos y apoyo en la redacción.
- Al Ing. Walter Blas, por su desinteresada colaboración en el diseño estadístico.
- A mi asesor Mg. Carlos Scotto Espinoza por sus sabios y pertinentes consejos en el desarrollo de la investigación como en la redacción.
- A mis hermanas Ana y Dery por siempre estar dándome ánimos para seguir adelante y vencer las dificultades.
- En especial agradecimiento a mi hija Teresa, por compartir conmigo y mejorar mi existencia.

INDICE DE CONTENIDO

	RESUMEN	9
	ABSTRACT	10
I.	INTRODUCCIÓN	11
	1.1 Planteamiento del problema	11
	1.2 Descripción del problema	12
	1.3 Formulación del problema	14
	1.3.1 Problema general	14
	1.3.2 Problemas específicos	14
	1.4 Antecedentes	14
	1.5 Justificación de la investigación	17
	1.6 Limitaciones de la investigación	17
	1.7 Objetivos de la investigación	18
	1.7.1 Objetivo general	18
	1.7.2 Objetivos específicos	18
	1.8 Hipótesis	19
	1.8.1 Hipótesis nula	19
	1.8.2 Hipótesis alterna	19
II.	MARCO TEÓRICO	20
	2.1 Bancos de germoplasma	20
	2.2 Inicios de la criopreservación y de los bancos de germoplasma	20
	2.3 Principios de la criopreservación de gametos	22
	2.4 Agentes crioprotectores (CPA)	24
	2.5 Organismo de ensayo <i>Tetrapygus niger</i> - erizo negro	29

2.6 Marco conceptual	31
III. MÉTODO	33
3.1 Tipo de investigación	33
3.2 Población y muestra	33
3.3 Operacionalización de las variables	33
3.4 Instrumentos	34
3.4.1 Materiales de bioseguridad	34
3.4.2 Materiales para el acondicionamiento de los especímenes	34
3.4.3 Materiales para la biometría de los especímenes	35
3.4.4 Materiales para el desove	35
3.4.5 Materiales para exposición al agente crioprotector	35
3.4.6 Materiales para la evaluación de la fertilización	37
3.4.7 Reactivos	37
3.4.8 Equipos	37
3.5 Procedimientos	38
3.5.1 Obtención de la muestra	38
3.5.2 Obtención de los espermatozoides	40
3.5.3 Obtención de ovocitos	40
3.5.4 Efecto de los agentes crioprotectores (CPA) DMSO y Glicerol sobre los gametos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.	42
3.5.5 Procedimiento de fertilización	42
3.6 Análisis de los datos	44
3.7 Consideraciones éticas	44

IV.	RESULTADOS	45
4.1	Efecto del crioprotector DMSO sobre los gametos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	48
4.1.1	Efecto en el Esperma	49
4.1.2	Efecto en los ovocitos	52
4.2	Efecto del crioprotector Glicerol sobre los gametos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	55
4.2.1	Efecto en el esperma	55
4.2.2	Efecto en los ovocitos	58
4.3	Evaluación de los crioprotectores DMSO y Glicerol para esperma	60
4.4	Evaluación de los crioprotectores DMSO y Glicerol para ovocitos	61
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
5.1	Efecto del crioprotector DMSO sobre los gametos de <i>T. niger</i> a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	63
5.2	Efecto del crioprotector Glicerol sobre los gametos de <i>T. niger</i> a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	65
5.3	Evaluación de los crioprotectores DMSO y Glicerol para los gametos	66
VI.	CONCLUSIONES	68
VII.	RECOMENDACIONES	69
VIII.	REFERENCIAS	70
IX.	ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Porcentajes de fecundación obtenidos con espermatozoides tratados con DMSO a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	49
Tabla 2	Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de DMSO para el espermatozoides	51
Tabla 3	Valores NOEC y LOEC para los crioprotectores (CPA) ensayados	52
Tabla 4	Porcentajes de fecundación obtenidos con ovocitos tratados con DMSO a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	53
Tabla 5.	Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de DMSO para ovocitos	54
Tabla 6	Porcentajes de fecundación obtenidos con espermatozoides tratados con Glicerol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	56
Tabla 7	Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de Glicerol para espermatozoides	57
Tabla 8	Porcentajes de fecundación obtenidos con ovocitos tratados con Glicerol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición	59
Tabla 9	Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de Glicerol para Ovocitos	60
Tabla 10	Porcentajes de fecundación promedio por CPA para espermatozoides	61
Tabla 11.	Porcentajes de fecundación promedio por CPA para ovocitos	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Propiedades fisicoquímicas de los agentes crioprotectores (CPA) más utilizados con invertebrados marinos	28
Figura 2.	Acondicionamiento de erizos	39
Figura 3.	Biometría de los erizos	39
Figura 4.	Desove de esperma	40
Figura 5.	Desove de ovocitos	41
Figura 6.	Huevos no fertilizados, fertilizados en división de 2 y 4 células de <i>T. niger</i>	43
Figura 7.	Peso de los especímenes ensayados (g)	45
Figura 8.	Diámetro de testa de los especímenes ensayados (mm)	45
Figura 9.	Porcentajes de desove del erizo <i>T. niger</i>	46
Figura 10.	Desove de erizos por sexo	46
Figura 11.	Volúmenes de desove (mL) por sexo en <i>Tetrapygyus niger</i>	47
Figura 12.	Huevos fertilizados y desarrollo embrionario en el <i>Tetrapygyus niger</i>	48

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos agentes crioprotectores, Dimetilsulfóxido (DMSO) y Glicerol, sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *Tetrapygus niger*, determinando la concentración, tiempo de exposición y tipo de agente crioprotector (CPA) a utilizar posteriormente en la crioconservación de los gametos (esperma y ovocitos), con fines de desarrollo de un banco de germoplasma criogénico. Se usó tratamiento osmótico (KCl) para liberar los gametos y se verificó la calidad. Se ensayaron concentraciones de 0,5, 1, 1,5 y 2 M, tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos, 3 repeticiones y controles negativos por prueba. Se fertilizó usando 10 μ L de solución espermática (10 μ L masa espermática con 200 μ L de agua de mar microfiltrada esterilizada con luz ultravioleta) y 1000 μ L de suspensión de ovocitos. Se fijó con formalina tamponada al 10% y se contabilizó el número de huevos fertilizados y no fertilizados, diferenciándolos por la presencia de la membrana de fertilización y/o segmentación del cigoto en 2, 4 y 8 células. Se encontró que el DMSO es mejor CPA que el Glicerol para la criopreservación de esperma y ovocitos con porcentajes de fecundación de 89,9% y 73,8% respectivamente. Se encontraron valores NOEC (concentración a la cual no se observa efecto) y LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto) de 1,5M /2M para esperma y 0,5M /1M para ovocitos con DMSO y de 0,5M/1M con Glicerol para esperma. Se recomienda utilizar estos resultados en ensayos de criopreservación para *T. niger*.

Palabras claves: agente crioprotector, criopreservación, DMSO, glicerol, *Tetrapygus niger*

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the effect of two cryoprotective agents, Dimethyl sulfoxide (DMSO) and Glycerol, on fecundation percentage of peruvian sea urchin *Tetrapygyus niger* by determining the concentration, exposure time and type of cryoprotective agent (CPA) to be used later in the cryopreservation of gametes (sperm and oocytes) for the purpose of developing a cryogenic germplasm bank. An osmotic treatment (KCL) was used to release the gametes and the quality was verified. Concentrations of 0.5, 1, 1.5 and 2 M, exposure times of 5, 10, 15 and 20 min, 3 repetitions and negative controls per test were tested. Fertilization was carried out using 10 μ L of sperm solution (10 μ L sperm mass with 200 μ L of microfiltered seawater sterilized with ultraviolet light) and 1000 μ L of oocyte suspension. It was fixed with 10% buffered formalin and the number of fertilized and unfertilized eggs was counted, differentiating them by the presence of the fertilization membrane and / or segmentation of the zygote into 2, 4 or 8 cells. It was found that DMSO is a better CPA than Glycerol for the cryopreservation of sperm and oocytes with fertilization percentages of 89.9% and 73.8% respectively. NOEC (concentration at which no effect is observed) and LOEC (lowest concentration at which effect is observed) values of 1.5M /2 M were found for sperm and 0.5M/1M for oocytes with DMSO, and with glycerol 0.5M/1M for sperm. It is recommended to use these results in cryopreservation assays for *T. niger*.

Keywords: cryoprotectant, cryopreservation, DMSO, glycerol, *Tetrapygyus niger*

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del Problema

La Acuicultura en el Perú, es una actividad muy prometedora tanto para elevar la producción de carne como para la generación de puestos de trabajo ya que se cuenta con una muy buena cantidad de cuerpos de agua naturales además de espacios para el desarrollo de cultivos marinos y dulceacuícolas y está protegida por las leyes del Estado (Ley N° 27460, DL N° 1195) para su promoción y beneficios tributarios (D.S. N.º 001-2023-PRODUCE, 2023).

Dentro de este marco de promociones, beneficios y protección, se debe trabajar pensando en proteger la biodiversidad de nuestras especies, para poder utilizarlas sin diezmar sus poblaciones. Esta actividad presenta un bajo nivel de desarrollo, no solo por el insuficiente número de empresas dedicadas al cultivo sino también por la escasa aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas, trayendo como consecuencia una baja producción acuícola con pérdida de material genético, tanto por una débil eficiencia de producción como por una baja calidad del producto (Aguilera et al., 2021).

La estacionalidad reproductiva de algunas especies ocasiona que la producción comercial acuícola no sea constante todo el año. Adicionalmente el uso de una parte de los gametos producidos durante la reproducción natural o artificial de las especies conlleva a desperdiciar material biológico y no ser eficiente en su utilización. Todo ello genera una baja disponibilidad de gametos tanto de esperma, ovocitos y embriones en cualquier época del año de muchas especies acuáticas en cultivo, con potencial de cultivo, de importancia ecológica y aquellas con importancia para uso en bioensayos de contaminación acuática (Prat, 2013).

Este problema también se genera por la sobreexplotación de algunas especies, por un deficiente manejo de la pesquería o cultivo, por la estacionalidad del ciclo reproductivo, a veces porque no existe sincronía en el desove o liberación de gametos entre el macho y la hembra.

Así mismo existe improvisación en el uso de herramientas biotecnológicas que ayuden a la conservación del material genético y se preserve la biodiversidad (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2019).

Por ello el desarrollo de un banco de germoplasma criogénico de gametos es una alternativa importante en la búsqueda de técnicas para preservar individuos durante todo el año. No sólo para las especies de cultivo sino también para especies que cumplen un rol ecológico muy importante en la naturaleza (como el erizo *Tetrapygus niger*), para fines de repoblamiento, uso en bioensayos u otros relacionados. La existencia de un banco de germoplasma criogénico permitiría la conservación del material genético por lo que es de gran valor para preservar la diversidad genética y mantener la sostenibilidad de un recurso en el tiempo (Diwan et al., 2020).

En el Perú no se ha utilizado la criopreservación como herramienta de conservación y no se han desarrollado bancos de germoplasma de especies marinas, las técnicas de criopreservación de embriones, ovocitos y esperma no han sido investigados o son experiencias muy aisladas y no se cuenta con protocolos desarrollados para especies peruanas (Montes, 2012).

1.2 Descripción del problema

La criopreservación de gametos permite la disponibilidad de los productos sexuales de modo que puedan ser utilizados en la reproducción en cualquier época del año y con una buena calidad. Por ello es importante manejar y seleccionar los factores que potencian el éxito de la criopreservación como es la elección del crioprotector adecuado y las concentraciones a las cuales se permita la conservación de los productos sexuales en nitrógeno líquido, siendo parámetros específicos para cada especie de trabajo (Paredes, 2016).

El erizo de mar *T. niger* es una especie muy bien distribuida en el litoral peruano, que cumple un rol ecológico muy importante en el ecosistema, se utiliza ampliamente en bioensayos toxicológicos como también en el asesoramiento y monitoreo de contaminación marina porque es un método de estudio rápido, simple y confiable (Bellas y Paredes, 2011). Esta especie requiere ser investigada en este aspecto ya que las poblaciones pueden presentar una productividad gonadal (de gametos) diferente y están afectadas por procesos de fotoperiodo, temperatura, exposición al oleaje, profundidad, cantidad y calidad del alimento, predadores, densidad y proporción sexual. Adicionalmente a ello, no presentan dimorfismo sexual por lo que para realizar bioensayos se debe extraer por lo menos el doble de especímenes requeridos para contar con la cantidad de espermatozoides o huevos necesarios para las pruebas. Debido a esta estacionalidad reproductiva se reduce la colecta de productos sexuales de erizo, restringiendo su uso como organismo de ensayo (Prat, 2013).

El conocimiento del efecto de los agentes crioprotectores en el porcentaje de fecundación del erizo, la selección del crioprotector adecuado y las condiciones de su utilización que aseguren una buena criopreservación de los gametos puede mejorar la disponibilidad de embriones, huevos y espermatozoides en cualquier época del año para el erizo *T. niger* lo que facilitaría la utilización de bioensayos estandarizados, realizar pocas colectas; conservando mejor la especie y evitando una reducción en las poblaciones, las cuales se ven afectadas también por otros factores medioambientales (Suquet et al., 2000).

Más importante aún es que todo ello contribuiría a reforzar el proceso de desarrollo de un banco de germoplasma criogénico para esta especie, sirviendo de modelo y punto de partida para su utilización en muchas otras especies acuícolas de interés comercial.

1.3. Formulación del Problema

1.3.1. Problema general

¿Cuál es el efecto de los agentes crioprotectores DMSO y Glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*?

1.3.2. Problemas específicos

- ¿Qué concentración del agente crioprotector DMSO puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger* comparable con el control?
- ¿Qué concentración del agente crioprotector Glicerol puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger* comparable con el control?
- ¿Qué tiempo de exposición del agente crioprotector DMSO puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger* comparable con el control?
- ¿Qué tiempo de exposición del agente crioprotector Glicerol puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger* comparable con el control?
- ¿Qué tipo de gameto tratado con el agente crioprotector DMSO puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger* comparable con el control?
- ¿Qué tipo de gameto tratado con el agente crioprotector Glicerol puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger* comparable con el control?

1.4. Antecedentes

En el Perú, a pesar de la abundancia de este erizo *T. niger* en las costas de nuestro litoral, muy pocos aspectos bioecológicos y de conservación han recibido atención. Con

relación a los aspectos reproductivos existe poca información en el país, principalmente Chile ha dedicado más estudios en esta especie. Dentro de estas investigaciones se encuentran Zamora & Stotz (1993a) quienes han estudiado el ciclo reproductivo en la región de Coquimbo-Chile, proponen un ciclo reproductivo con desoves parciales y mayor desove en el invierno. Se ha evaluado las poblaciones del norte de Chile en función del índice gonádico encontrándose que, las poblaciones que habitan lugares próximos presentan ciertas diferencias intraespecíficas, en relación con el crecimiento gonadal y peso del espécimen desovado, pero estas diferencias a nivel individual cambian cuando se evalúan a nivel poblacional, encontrándose mecanismos de compensación en el proceso reproductivo poblacional (Zamora & Stotz, 1993b).

El conocimiento de los aspectos reproductivos en *Tetrapyrgus niger* es relevante para comprender como funciona sus poblaciones, su rol ecológico y además muy importante para elaborar estrategias de conservación para esta especie y otros equinodermos donde un banco de germoplasma colaboraría a estos fines (Campos et al., 2021; Lago & Paredes, 2023).

Se ha estudiado el efecto de varias sustancias utilizando como organismo de ensayo al erizo negro. Zavaleta et al. (2018) evaluó el efecto del Diclofenaco a diferentes concentraciones sobre la fecundación del erizo. Lumbre (2020) determinó el riesgo ambiental del cadmio y cromo evaluando los efectos en el desarrollo embrionario. Sánchez (2020) evaluó el efecto de la contaminación marina producida por las fábricas de harina de pescado de la zona de Caleta Carquín (Huaura-Lima-Perú) en el desarrollo embrionario de *T. niger*. Latorre-Padilla et al. (2021) estudiaron los efectos negativos en el comportamiento alimenticio, crecimiento, fertilidad y estadios tempranos de desarrollo en el erizo cuando son alimentados con macroalgas *Macrocystis pyrifera* proveniente de lugares con alta contaminación industrial de

la zona de la Bahía Quintero (Valparaíso-Chile), donde operan aproximadamente 15 compañías de diversos rubros.

En relación con los estudios utilizando agentes crioprotectores y a la implementación de la criopreservación en esta especie, Prat (2013) encapsuló blástulas del erizo *T. niger* en alginato de sodio para someterlas al crioprotector DMSO y mejorar la viabilidad post-congelamiento. Barros et al. (1996), ensayó el crioprotector DMSO a 1,2M en esperma de *T. niger* obteniendo un 96% de éxito en la fertilización.

No se han realizado más ensayos en *T. niger* al respecto, por lo que se ha considerado trabajar con Dimetilsulfóxido (DMSO) y Glicerol, compuestos muy utilizados en la criopreservación tanto de peces (Fonseca-González, 2022), moluscos (Castro, 2021; Heres et al., 2019) y otras especies de erizo (Paredes et al., 2022), evaluando su efecto en el porcentaje de fecundación cuando los gametos (esperma y ovocitos) son tratados con estos crioprotectores, ensayo previo necesario para el proceso de criopreservación de gametos y embriones. Estandarizar estos protocolos son fundamentales para iniciar el desarrollo de un banco de germoplasma criogénico que beneficie el proceso productivo acuícola, considerando lo mencionado por Garmendia et al. (2009), quienes indican que, en algunas épocas del año, la mayor dificultad es encontrar ovocitos adecuados para las pruebas de fecundación en bioensayos. En otro aspecto el uso de invertebrados marinos principalmente erizos en bioensayos embrio-larvales es una de las herramientas biológicas más usadas y se han utilizado por décadas para la evaluación y monitoreo de la contaminación marina alrededor del mundo (Paredes, 2016).

1.5. Justificación de la investigación

El erizo negro *T. niger* es una especie que cumple con un rol ecológico muy importante, es un organismo de ensayo toxicológico muy usado y una especie modelo por su facilidad de manejo y alta reproducción (Prat, 2013). Es una especie muy apropiada para desarrollar protocolos de criopreservación en función del desarrollo de un banco criogénico de germoplasma tanto de esperma, óvulos como de embriones, de especies acuáticas y marinas como continentales que ayuden a conservar las especies y sirvan de base para un mejor manejo con fines comerciales y de mejoramiento genético para la acuicultura y propuestas de política de conservación (Paredes, 2016; Dupré & Carvajal, 2019).

Por ello se ha considerado trabajar con dimetilsulfóxido (DMSO) y Glicerol, compuestos muy utilizados en la criopreservación tanto de peces, moluscos y otras especies de erizo (Lago & Paredes, 2023; Paredes et al., 2022; Diwan et al., 2020) evaluando su efecto en el porcentaje de fecundación, como ensayo previo a la criopreservación de los gametos y embriones de erizo negro peruano. De esta forma se contribuirá con proporcionar información para optimizar protocolos de criopreservación para el erizo y con ello mejorar la conservación con miras al desarrollo de un banco de germoplasma criogénico para especies acuáticas.

1.6. Limitaciones de la investigación

Esta investigación está ligeramente limitada por la supervivencia de los erizos en el laboratorio antes, durante y después de la investigación, la cual está en relación a la disponibilidad de alimento fresco (algas), agua de mar fresca para el recambio diario y a la posibilidad que puedan ser liberados al mar.

1.7. Objetivos de la investigación

1.7.1. Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto de los agentes crioprotectores, Dimetilsulfóxido (DMSO) y del glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*.

1.7.2. Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el efecto que ejercen diferentes concentraciones de DMSO sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*.
- ✓ Evaluar el efecto que ejercen diferentes concentraciones de Glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*.
- ✓ Evaluar el efecto que ejercen diferentes tiempos de exposición a DMSO sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*.
- ✓ Evaluar el efecto que ejercen diferentes tiempos de exposición al Glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*.
- ✓ Evaluar el efecto que ejerce el tipo de gameto tratado con DMSO sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*.
- ✓ Evaluar el efecto que ejerce el tipo de gameto tratado con Glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano *T. niger*.

1.8. Hipótesis

1.8.1 Hipótesis nula

La aplicación del crioprotector DMSO sobre los gametos de erizo permitirá obtener un porcentaje de fecundación igual al porcentaje de fecundación obtenido utilizando como crioprotector Glicerol.

1.8.2 Hipótesis alterna

La aplicación del crioprotector DMSO sobre los gametos de erizo permitirá obtener un mayor porcentaje de fecundación en comparación con el porcentaje de fecundación obtenido utilizando como crioprotector Glicerol.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bancos de germoplasma

Un banco de germoplasma viene a ser una “colección administrada de recursos genéticos en los cuales se almacenan organismos enteros, células reproductivas o etapas iniciales de vida”. La tecnología usada para este fin es aplicable tanto a la industria como a la conservación tradicional. Existen bancos de germoplasma *in situ* y *ex situ* cuya diferencia se refiere básicamente a donde se encuentran ubicados. Los bancos *ex situ*, que pueden ser colecciones de ADN, genes, células individuales, semillas u organismos enteros, se encuentran fuera del hábitat del organismo natural o cultivado mientras que los bancos *in situ* son poblaciones de organismos protegidos junto con su hábitat cultivado o natural, estos son menos comunes, pero pueden ser más aceptados por el público en general. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2009). En el Convenio de diversidad Biológica (CDB) y en el Código de conducta para la Pesca responsable se considera muy importante la utilización de estos bancos de germoplasma para procesos de conservación y de producción respectivamente (FAO,2009).

Paredes et al. (2022) menciona que, con el fin de preservar la diversidad genética y biodiversidad, la conservación *in situ* puede estar apoyada con métodos de conservación *ex situ* como la criopreservación y el establecimiento de biobancos y principalmente manteniendo ecosistemas saludables con capacidad para adaptarse.

2.2 Inicios de la criopreservación y de los bancos de germoplasma

Los bancos de recursos genéticos (Genetic Resources Banks - GRBs) se iniciaron a inicios de los años 50, con los primeros experimentos en criopreservación de espermatozoides, estos influyeron en el desarrollo de los procedimientos en fecundación artificial mejorando la

reproducción de los animales domésticos, pero no hubo una amplia aplicación por muchos años (Martínez-Páramo, 2008). La instalación de bancos de esperma es una herramienta muy útil, teniendo en cuenta que puede reducir significativamente la cantidad de animales que se requieren para mantener una población viable, simplificando el manejo de los reproductores y con la ayuda de biotecnologías reproductivas como el trasplante de células germinales, cumple un rol destacado en la programación de procedimientos de selección genética y reproducción asistida por marcadores (Martínez et al., 2016).

La primera criopreservación exitosa utilizó Glicerol, descubriéndose su acción protectora en espermatozoides de diferentes animales domésticos, confirmándose la efectividad del Glicerol como crioprotector para congelar glóbulos rojos cerca de 1950. Posteriormente se descubrió la función crioprotectora del dimetilsulfóxido (Me₂SO), y se introdujo la física, las matemáticas y el concepto de la "hipótesis de dos factores", que establecía dos eventos clave letales en la criopreservación: la lesión mecánica como producto de la formación de hielo intracelular durante la congelación rápida y la lesión por deshidratación por la formación de hielo extracelular durante la congelación lenta (Paredes, 2015).

Los primeros bancos de germoplasma de organismos acuáticos fueron pequeñas colecciones de espermas criopreservados de poblaciones silvestres de peces siendo la principal utilidad mantener los resultados de los programas de crianza de la acuicultura. Posteriormente los bancos de germoplasma perdieron colecciones por un deficiente planeamiento de inversión, poca tecnología y falta de participación del gobierno. Actualmente los bancos de germoplasma *ex situ* en la mayoría de los países son administrados por los gobiernos nacionales, estatales y nativos, compañías privadas, académicos y ONGs (FAO, 2009).

La pérdida de la diversidad genética que se puede presentar en la especies silvestres o agrícolas constituye un grave problema cuya consecuencia final es la extinción de la población. El establecimiento de GRBs contribuye con el mantenimiento de la biodiversidad ya que el material biológico almacenado podría estar disponible cuando se requiera, del mismo modo puede ser transportado de una granja a otra de manera muy fácil permitiendo el inicio de programas de crianza que mejoren la eficiencia de la producción (Afreen & Uçak 2020; Martínez et al., 2016).

2.3 Principios de la criopreservación de gametos

Criopreservar consiste en congelar, almacenar y descongelar organismos vivos, células o tejidos en presencia de agentes crioprotectores (CPA) (Mazur, 2004). Martínez (2016) menciona que es el procedimiento más utilizado para preservar los gametos y embriones, resaltando que la instalación de un GRB para cualquier especie requiere el dominio de esta técnica, considerando que el protocolo para la criopreservación es específico para cada especie y tipo celular por su respuesta particular a la congelación.

La criopreservación es el proceso de preservación de células, tejidos u organismos vivos a temperaturas bajo cero, por lo general $-197\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando nitrógeno líquido (NL) por un gran periodo de tiempo e involucra los procesos de congelamiento, almacenamiento en tanque criogénico con NL y el descongelamiento del material biológico. Se requiere desarrollar un protocolo de criopreservación cuyo objetivo es preservar células u otro material biológico manteniendo su integridad estructural y funcional similar a aquellos no preservados de modo que puedan ser utilizados con porcentajes de eficiencia similares al del material fresco (Montes, 2012).

Mazur (1984, citado por Martínez et al., 2016) describe los eventos que ocurren durante el proceso de congelación:

Cuando una solución es enfriada por debajo de su punto de congelación, permanece en estado líquido a una temperatura inferior a la temperatura real de congelación. Esta es una situación inestable, y a medida que la temperatura desciende incrementa la probabilidad de que ocurra el denominado proceso de nucleación donde comienzan a formarse cristales de hielo. En una solución, el agua pura es lo primero en congelarse, de modo que la solución se hace cada vez más concentrada a medida que el agua pura se congela, alcanzando valores de osmolaridad 20 veces superiores cuando la solución se encuentra a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por debajo de esa temperatura, la solución solidifica totalmente. (pp.33).

Cuando la solución contiene una suspensión celular, tiene lugar el denominado efecto solución, es decir a medida que avanza el proceso de cristalización, se produce una salida de agua del interior celular debido al incremento de la osmolaridad del medio extracelular (Mazur, 1965 citado por Martínez et al., 2016, p.33).

La hipótesis planteada por Mazur et al. (1972, citado por Horvarth & Orbagnii, 2020) indica que la lesión por congelación de una célula puede ocurrir de dos formas, si las células se enfrían demasiado lento o rápido y que lo primordial es encontrar una tasa de enfriamiento óptima para maximizar la crio-supervivencia de las células. Un enfriamiento demasiado lento ocasiona una exposición prolongada de las células a una concentración creciente de solutos (hasta el punto de la citotoxicidad) mientras que un enfriamiento demasiado rápido no permite a las células liberar volúmenes suficientes de agua, por lo tanto, el agua se congela dentro de las células en forma de cristales de hielo letales (Horvarth & Orbagnii,2020).

2.4 Agentes crioprotectores (CPA)

Los agentes crioprotectores se utilizan para conservar la viabilidad de las muestras biológicas criopreservadas y proteger a las células del daño que se produce por la formación de cristales de hielo en el proceso de congelación y descongelación. El éxito en este proceso depende de la adecuada relación entre la concentración de CPA, y la toxicidad del CPA. Los CPAs necesitan tener algunas propiedades específicas como ser altamente solubles en agua e incluso a bajas temperaturas, presentar baja toxicidad para lograr deprimir el punto de congelación de una solución (Muldrew et al. (2004, citado por Paredes et al., 2016). “El CPA ideal debe ser capaz de prevenir la oxidación no deseada y los efectos dañinos del proceso de criopreservación sobre las propiedades físicas y químicas de la membrana” (Marcantonini et al., 2022, p.2).

El mecanismo por el cual ejercen su efecto está relacionado con la reducción de la concentración de electrolitos en el medio extracelular, con la disminución de la formación de cristales de hielo y con la protección de la membrana y sus constituyentes debido a sus propiedades coligativas. Cuando son añadidos, disminuye el punto de congelación de las células en solución, permitiendo que la temperatura sufra un mayor descenso antes de que el medio comience a congelarse (Martínez et al., 2016, p. 35).

Los factores que están involucrados para que el CPA tengan un alto porcentaje de eficiencia depende de la permeabilidad de la membrana plasmática y de la toxicidad que produce al penetrar a la célula tratada. Ello indica que cada célula u órgano responde de diferente manera a los crioprotectores, lo que se traduce en diferentes efectos sobre los organismos cuando se aplican las mismas metodologías, convirtiéndose en una respuesta especie-específica (Fabroccini et al., 2014; Gwo et al., 2002).

La adición o impregnación de la muestra con el crioprotector se puede realizar a diferentes temperaturas dependiendo de la permeabilidad y la citotoxicidad. Pueden añadirse gradualmente, según el método de pasos con volumen fijo (Fixed Molar Step Addittion - FVS) o con molaridad fija (Fixed Molar Step Adittion- FMS), ello reduce el estrés osmótico sobre la célula a congelar, también puede añadirse en un solo paso y ello disminuye el tiempo de exposición al crioprotector. Durante la criopreservación el metabolismo se ve ralentizado, por lo que la acción tóxica o dañina del crioprotector disminuye en gran medida a menos que se utilice altas concentraciones del crioprotector a temperaturas altas (cerca de los 0°C) (Fernández et al., 2009).

Pegg (2007) indica que cuando las células se exponen a una solución que contiene un CPA, las diferencias en la presión osmótica dentro y fuera de la célula causarán una difusión inicial de agua para equilibrar las presiones osmóticas. Cuando la presión osmótica dentro de las células sea igual a la de la solución circundante, y el volumen en equilibrio sea ligeramente mayor que el inicial se detendrá este proceso.

“Estas situaciones se modificarán también en función de la temperatura ya que “cuanto mayor sea la temperatura, más rápido será el proceso, porque a mayor temperatura el agua saldrá de la celda más rápido y el CPA penetrará en la celda más rápido también” (Paredes, 2016, p.5).

“Por otro lado, la toxicidad del CPA aumentará a medida que aumente la temperatura debido a la aceleración del metabolismo con la temperatura, por lo que se necesitaría un período de exposición más corto para compensar el aumento de la toxicidad y evitar daños” (Paredes, 2016, p.5)

Betsy et al. (2021) menciona que, los crioprotectores requieren tiempo para ingresar al esperma sin embargo una exposición prolongada puede resultar tóxica. Por otro lado, a concentraciones muy altas pueden disminuir las crio- lesiones, pero puede llegar a causar daño a las células al mismo tiempo. Para lograr una protección eficaz durante la congelación, se debe determinar una concentración adecuada de crioprotector y un periodo de equilibrio como tiempo óptimo para facilitar el ingreso del crioprotector permeable a las células.

Mazur (2004) resalta que la permeabilidad de la membrana celular a los CPAs es crucial en el proceso, ya que la permeabilidad de la membrana dependerá de la composición lipídica de las membranas y de la temperatura. El agua y los solutos no electrolíticos se transportan por difusión a través de la bicapa lipídica haciendo que la velocidad de este proceso se encuentre en relación al gradiente osmótico, pero estará limitada por la permeabilidad de la membrana. Los transportadores específicos de agua, las acuaporinas, jugaran un papel importante también pero no todas las células tienen acuaporinas en sus membranas (Paredes, 2016).

“Debido al cambio en la composición de la membrana y la complejidad durante el desarrollo, para una especie dada, la permeabilidad cambiará para las diferentes etapas de desarrollo, por lo general la última etapa es la más permeable” (Paredes, 2016, p5).

Los crioprotectores según su capacidad de penetración en las células se clasifican en: permeables y no permeables.

Los crioprotectores permeables pueden atravesar las membranas celulares por ser moléculas no electrolíticas, de bajo peso molecular y anfipáticas. Al penetrar en las células ocasionan la salida del agua intracelular, disminuyendo la formación de cristales de hielo en el interior de la célula. Según la concentración, el tiempo de exposición, o la temperatura pueden

resultar tóxicas para las células, por lo que estos tres factores deben ser combinados con la finalidad que el crioprotector sea efectivo causando el mínimo daño posible (Martínez, 2016).

Por otra parte, los crioprotectores reducen los efectos del estrés osmótico asociado a la deshidratación durante el congelamiento, al interactuar con los grupos polares de los fosfolípidos de las membranas, reemplazando el agua alrededor de la parte hidrofílica del mismo. De este modo la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos disminuye, reduciendo la desorganización inherente a los cambios de fase y convirtiendo a la membrana en una estructura más estable. Los crioprotectores permeables más usados son glicerol, metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, dimetilformamida, dimetilacetamida y dimetil sulfóxido (DMSO) (Martínez et al., 2016).

El dimetilsulfóxido conocido como DMSO es considerado en los protocolos de criopreservación por su capacidad de penetrar fácilmente en los tejidos animales y vegetales, así como por ser un buen disolvente. Tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas, actúa como un crioprotector en ambientes acuáticos o marinos, protegiendo a organismos de temperaturas extremas. El glicerol se encuentra dentro del grupo de los alcoholes, y por ser un CPA permeable y de bajo peso molecular puede atravesar la membrana plasmática del espermatozoide ingresando por los canales de las acuaporinas 7. El Glicerol reemplaza el agua intracelular evitando la deshidratación excesiva y de esta forma reduce la formación de hielo intracelular. Cuando está en solución aumenta el volumen del medio extracelular, reduce la cantidad de electrolitos minimizando el daño celular (Zurita, 2017).

Los crioprotectores no permeables tienen en comparación con los permeables, un elevado peso molecular, siendo los estabilizadores de membrana o modificadores de las propiedades fisicoquímicas del medio de congelación, reduciendo la formación de cristales de hielo y el efecto de los solutos. Adicionalmente favorece un flujo de agua al exterior de la

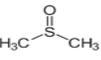
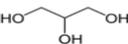
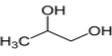
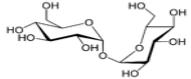
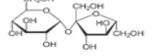
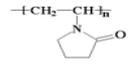
célula logrando que en el interior se inhiba el crecimiento de cristales y aumente la viscosidad del medio extracelular. En este grupo se ubican la polivinilpirrolidona (PVP), los polivinil alcoholes (PVA), compuestos lipídicos como la yema de huevo, proteicos como la albúmina sérica bovina (BSA) y azúcares, sacarosa (Martínez et al., 2016).

“El grado de protección que puede aportar un crioprotector depende en gran medida de sus características propias” (Martínez et al., 2016, p36).

Los CPA más utilizados con organismos marinos dentro de los permeables y no permeables se presentan en la Figura 1.

Figura 1

Propiedades fisicoquímicas de los agentes crioprotectores CPA más utilizados con invertebrados marinos.

CPAs permeables	fórmula molecular	peso molecular g/mol	densidad g/cm ³	aparición	estructura química
DMSO	C ₂ H ₆ OS	78.13	1.1	líquido	
Gly	C ₃ H ₈ O ₃	92.09	1,26	líquido	
EG	C ₂ H ₆ O ₂	62,07	1.11	líquido	
PG	C ₃ H ₈ O ₃	76,09	1,04	líquido	
CPAs No permeables					
TRE	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.29	1.58	sólido	
SUC	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3	1.59	sólido	
PVP	C ₆ H ₉ NO	2500- 2500000	1.2	sólido	

Nota. Los CPAs, agentes crioprotectores: dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLY), etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), trehalosa (TRE), sacarosa (SUC) y polivinil pirrolidona (PVP). Adaptado de Paredes, E. (2014). *Cryopreservation of marine invertebrate early-life stages: applications in marine water quality assessment and aquaculture*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. España.

2.5 El organismo de ensayo erizo negro (*Tetrapygyus niger*).

El erizo negro pertenece al filo Echinodermata, familia Arbaciidae, género *Tetrapygyus* con una única especie *Tetrapygyus niger* la cual fue descrita por primera vez por Juan Ignacio Molina naturalista chileno en 1872 (Kroh & Mooi, 2023).

La superficie oral inferior de la testa del erizo es aplanada, mientras que la superficie aboral (superior) está abovedada superficialmente. Presenta un pequeño disco apical con áreas ambulacrales rectas y cinco tubérculos primarios grandes en filas, en las áreas interambulacrales, intercalados con tubérculos secundarios más pequeños. La boca está rodeada por un peristoma subpentagonal hundido, las espinas primarias son moderadamente largas, mientras que las espinas secundarias son cortas. El color del cuerpo es negro violáceo (Natural History Museum [NHM], s.f.).

El erizo negro *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782), pertenece al ecosistema intermareal rocoso marino, se encuentra en las costas del sureste del Océano Pacífico tanto de Perú y Chile. Se distribuye desde el norte de Perú hasta el estrecho de Magallanes y a profundidades de hasta 40m (Rodríguez & Ojeda, 1993). Es herbívoro y se alimenta principalmente de algas, consume las plantas jóvenes en su totalidad y solo el tallo de las plantas viejas (Perreault et al., 2014).

Según Zamora y Stotz (1993a), presenta un ciclo reproductivo anual, caracterizado por la ausencia de una secuencia temporal de los procesos gametogénicos, una rápida recuperación gonadal post - desove y un extenso período reproductivo (9 meses). De modo que no sigue el patrón general establecido para equinoideos, en donde el ciclo reproductivo cuando es anual presenta distintas fases, como reposo, recuperación, crecimiento, maduración, desove y reabsorción. Este comportamiento, así como su composición dietaria puede verse afectado por

fenómenos como El Niño y el calentamiento global disminuyendo sus poblaciones y modificando la estacionalidad de los erizos maduros (Navarrete et al., 2008).

Este erizo no presenta dimorfismo sexual externo y presenta una coloración definida en estado maduro según el sexo. La gónada masculina es color blanco y la femenina de color rojo oscuro tipo vino o granate. En los erizos desovados ambas gónadas adquieren una coloración café-oscuro por lo que es difícil la identificación para lo cual es necesario realizar un frotis (Zamora y Stotz, 1993a).

Los organismos de esta especie son dioicos, es decir existen dos tipos de individuos macho y hembra por separado. Los gametos son liberados al mar donde la fertilización se realiza en la columna de agua generándose una blástula ciliada y de nado libre. Posteriormente se prosigue con la gastrulación formándose el blastoporo, en donde ocurre el reordenamiento de las células en la parte externa dirigiéndose después hacia el interior de la blástula (invaginación). La larva se vuelve cónica, y uno de los lados se aplanan dando lugar a la superficie oral, esta larva ciliada se denomina Prisma. Seguidamente la larva Prisma inicia la formación de proyecciones, desarrollándose los brazos característicos de la larva Pluteus (Prat, 2013).

Cosson (2020) resalta la importancia histórica que tienen los erizos de mar como organismos de ensayo en el estudio de la reproducción y de los espermatozoides, su motilidad y otras características. Los erizos facilitan las observaciones básicas de los espermatozoides por la gran cantidad de semen por individuo que presentan. Los primeros estudios en espermatozoides fueron realizados en Kewalo Marine Lab (Hawaii) en 1985 mientras que la fertilización de los huevos de erizo de mar fue observada por primera vez en 1879, en la Estación Marina de Villefranche sur mer (Francia). Así mismo menciona que los estudios sobre el movimiento del espermatozoide de erizo de mar realizados por Sir Gray en 1955 siguen siendo un

concepto físico básico y fundamental para la teoría de la fuerza de resistencia (RFT) y del movimiento flagelar mientras que la aplicación del conocimiento en espermatozoides de erizo a estudios de espermatozoides de mamíferos ha sido desarrollada desde hace mucho tiempo por Gagnon en 1995. En el erizo de mar también se ha estudiado ampliamente la participación de los llamados motores moleculares, las dineínas, las cuales son utilizadas para poner en funcionamiento al flagelo del espermatozoide (Gibbons, 2018).

El erizo negro *T. niger* es el más abundante de las especies de erizos de mar que habitan la costa del Pacífico, a pesar de ello, muchas características biológicas claves permanecen desconocidas (Fuentes y Barros, 2000).

Uno de los mayores obstáculos para una criopreservación exitosa de ovocitos, espermatozoides y embriones de especies acuáticas es el desarrollo de un protocolo de impregnación de CPA adecuado. La tolerancia al CPA varía con el tipo de crioprotector y concentración, el protocolo de impregnación, así como de la especie y tipo de estructura reproductiva. Estos aspectos son muy importantes que deben optimizarse antes de realizar ensayos en criopreservación (Rahman et al., 2008).

2.6. Marco conceptual

- Porcentaje de fecundación

Es una relación que indica la eficiencia del proceso reproductivo contabilizando la cantidad de huevos fecundados o en inicio de clivaje de un total de 100 células.

- Agente crioprotector CPA

Es la sustancia que puede ser añadida a una estructura reproductiva o gameto para evitar el daño celular causado por bajas temperaturas.

- Tiempo de exposición

Tiempo en el cual se encuentra sometido el tejido o célula una sustancia o tratamiento.

- Protocolo de impregnación de CPA

Se refiere a la forma como se somete la célula al agente crioprotector.

- Criopreservación

Es el proceso en el cual se congela a muy bajas temperaturas el material biológico, ovocitos, esperma, embriones, cualquier célula o tejido del organismo, para conservarlo de modo que puede utilizarse después de muchos años.

- Banco de germoplasma criogénico

Es el lugar donde se almacena material biológico a bajas temperatura para conservar su viabilidad y preservar la biodiversidad.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

La investigación es de naturaleza experimental, explicativa, aplicada, relacional y cuantitativa. Se evaluó el efecto de la variable independiente (agente crioprotector) sobre la variable dependiente (porcentaje de fecundación).

3.2. Población y muestra

Se colectaron en total 75 especímenes de la zona de Chorrillos; para las pruebas, repeticiones y ensayos adicionales se colectaron de 25 a 30 especímenes por vez. Los especímenes adheridos a las rocas se retiraron de manera aleatoria con una espátula, los cuáles fueron colocados en baldes con agua de mar y algas. Posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Genética Aplicada (LGA-FOPCA-UNFV), donde se acondicionaron en acuarios con agua de mar y aireadores para mantenerlos en buen estado y se alimentaron con algas de la zona de colecta. La muestra fueron los ovocitos y espermias, los cuales fueron sometidos a los tratamientos con los agentes crioprotectores.

3.3.Operacionalización de variables

Variable	Definición	Definición operativa	Dimensiones	Indicadores	Unidades	Criterio	Respuesta
Agente crioprotector (ACP) variable independiente	Sustancia que previene la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana	Sustancia que protege a los gametos del daño causado por la formación de cristales de hielo durante el proceso de criopreservación, esta protección está en relación a la concentración y el tiempo de permanencia de las células en el ACP	-DMSO	- Tiempo de permanencia en DMSO	minutos	5min/10min/15min	
				- concentración del DMSO	moles	0,5M /1.0M /1,5M	
			-GLICEROL	- Tiempo de permanencia en Glicerol	minutos	5min/10min/15min	
				- concentración del Glicerol	moles	0,5M /1.0M /1,5M	

Variable	Definición	Definición operativa	Dimensiones	Indicadores	Unidades	Criterio	Respuesta
Fecundación variable dependiente	Es la unión de una célula reproductora masculina y una femenina (gameto) para formar un embrión	Estado en el cual las células reproductoras masculinas y femeninas se unen y forman una membrana de fecundación iniciando la segmentación (clivaje) del huevo.	-Ovocitos tratado	- Porcentaje de fecundación	Número de huevos con la membrana de fecundación o en inicio del clivaje de un total de 100 células contadas	0-64	Porcentaje Bajo Medio Alto
			-Esperma tratado			65 – 89 90 ≥ 100	
						0-64 65 – 89 90 ≥ 100	Porcentaje Bajo Medio Alto

3.4. Instrumentos

Se utilizó la técnica de la observación experimental únicamente como instrumento para la recolección de datos. Se elaboraron fichas de registro de los datos que se obtuvieron.

La investigación se desarrolló en el LGA-FOPCA-UNFV de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

3.4.1 Materiales de bioseguridad

- ✓ Envase para desechos punzocortante
- ✓ Guantes de nitrilo NITRILECARE talla L ambidiestro sin polvo sin látex.
- ✓ Guardapolvo blanco talla mediana

3.4.2 Materiales para el acondicionamiento de los especímenes

Con estos materiales se recolectó la información sobre el proceso de acondicionamiento como temperatura del agua, temperatura ambiental, salinidad del agua.

- ✓ Acuarios de vidrio de dimensiones 30x18x20cm, 29x20x16cm -06 unid
- ✓ Acuarios de vidrio de dimensiones: 50x25x30cm, 45x20x25cm, 42x16x20cm-04unid
- ✓ Aireadores portátiles SB-960 SOBO-02 unid

- ✓ Baldes de plástico 30L y 20L -06unid
- ✓ Bombas de aire con 4 entradas BOYU S-4000B -03 unid
- ✓ Galoneras de plástico de 20L -06 unid
- ✓ Mangueras de plástico de acuario
- ✓ Papel indicador de pH fix 0-14 MACHEREY-NAGEL -1 caja
- ✓ Piedras difusoras -10unid

3.4.3 Materiales para la biometría de especímenes:

Estos instrumentos sirvieron para la recolección de la información en relación con el tamaño y peso de los especímenes: diámetro de testa y peso total.

- Baldes pequeños 5L -02 unid
- Guantes de tela gruesos -01 unid
- Papel toalla -10 rollos

3.4.4 Materiales para el desove de los especímenes

Estos instrumentos sirvieron para inducir el desove e identificar el sexo de los especímenes.

- Agua de mar microfiltrada y esterilizada con UV (AMMFE) -10L
- Guantes de nitrilo NITRILECARE talla L ambidiestro s/polvo s/látex -1caja
- Jeringas desechables estériles de 1 mL c/ aguja 25G x 5/8" SEGURIMAXX -1caja
- Papel KRAFT -05 pliegos
- Papel toalla -10 rollos
- Vasos de precipitado de 50 mL esterilizados ISOLAB -40 unid

3.4.5 Materiales para exposición al agente crioprotector

Estos materiales sirvieron para la preparación de las soluciones CPA y el tratamiento de los gametos.

- ✓ Baguetas de vidrio -04 unid
- ✓ Caja para puntas autoclavable 100-1000ul -01 unid
- ✓ Cajas para puntas autoclavable 0.5-10ul -01 unid
- ✓ Cajas para puntas autoclavable 10-100ul -01 unid
- ✓ Cinta PARAFILM "M" AMERICAN NATIONAL CANTM -1 caja dispensadora
- ✓ Fiolas de 10mL,25mL,50mL,100mL,250mL ISOLAB $\pm 0.06/\pm 0.15, 20^{\circ}\text{C}$ -10unid
- ✓ Frascos para soluciones 250mL SCHOTT DURAN -06 unid
- ✓ Frascos para soluciones 500mL SCHOTT DURAN -06 unid
- ✓ Gradillas para microtubos -15 unid
- ✓ Micropipetas BOECO volumen ajustable (0.5-10 μL /10-100 μL /100-1000 μL)- 03 unid
- ✓ Microtubos de 1,5 mL BIOLOGIX® bolsa -500 unid
- ✓ Microtubos de 2mL BIOLOGIX® bolsa -500 unid
- ✓ Pipetas graduadas 10 ML /0.1 ISOLAB -04 unid
- ✓ Pipetas graduadas con embolo 5 ml 5/10 ISOLAB -02 unid
- ✓ Pliegos Papel KRAFT -05 pliegos
- ✓ Probetas 100ml 100:1ml $\pm 0,5\text{ml}$ 20°C ISOLAB -04 unid
- ✓ Probetas 50ml 50:1ml $\pm 0,5\text{ml}$ 20°C ISOLAB -04 unid
- ✓ Puntas para micropipetas BIOLOGIX® 10 μL - bolsa -1000 unid
- ✓ Puntas para micropipetas BIOLOGIX® 100 μL - BOLSA -1000 unid
- ✓ Puntas para micropipetas BIOLOGIX® 1000 μL - bolsa- 1000 unid
- ✓ Tubos de centrífuga cónicos con tapa de 15 ml BIOLOGIX® bolsa- 50 unid
- ✓ Tubos de centrífuga cónicos c/tapa de 50 ml c/tapa azul BIOLOGIX® bolsa-50 unid
- ✓ Vasos de precipitado 1000mL KIMAX -04 unid

- ✓ Vasos de precipitado 100mL, 50 mL ISOLAB -40 unid
- ✓ Vasos de precipitado 500ML ISOLAB -04 unid

3.4.6 Materiales para la evaluación de la fertilización:

- ✓ Aceite de inmersión para microscopia MERCK
- ✓ Cámara de Neubauer, luz brillante BRAND® 0.0025mm²/0.100mm Germany
- ✓ Cámara de Sedgwick-Rafter 1mL S50, PYSER-SGI © United Kingdom -1 unid
- ✓ Cubreobjetos 22 x 22 mm BRAND Germany -1caja
- ✓ Cubreobjetos para hemocitómetro 20x26x0.4mm BRAND-Germany -1caja
- ✓ Hisopos COTONETES -1 caja
- ✓ Micropipeta BOECO volumen ajustable 100-1000µL) -1 unid
- ✓ Papel lente WHATMAN® 105 100x150mm – England -1paq
- ✓ Porta objetos PEARL 25.4x76.2mm /1.0-1.2mm grosor bordes redondeados -1caja
- ✓ Puntas para micropipetas BIOLOGIX® 1000µL- bolsa- 1000 unid

3.4.7 Reactivos

- ✓ Buffer Fosfato de sodio pH 6.7-7.2 100mL
- ✓ Cloruro de potasio 0.5M solución 100mL SPECTRUM®
- ✓ DMSO - Dimethyl sulfoxide grado molecular SERVA® frasco 250 ml
- ✓ Formol 40% SPECTRUM® solución 10%
- ✓ Glicerol SPECTRUM ® fw.92.10

3.4.8 Equipos

- ✓ Balanza analítica Aczetx max 2200g min 0.10 g d= 0.00010g
- ✓ Balanza digital. Modelo Explorer OHAUS 2100g MAX d= 0.01mg

- ✓ Calibrador o vernier TRUPER Mod.CALDI-6MP Acero inoxidable/ Pantalla LCD
- ✓ Estufa eléctrica Memmert VENTICELL IL
- ✓ Microscopio Axioscope A1 Carl Zeiss con cámara Canon Powershot A650 IS-6X optical zoom, ocular 25X, 16X
- ✓ Refractómetro VITALSINE SR-6
- ✓ Sonda TERMOCUPLA HI766E1- ROMANIA
- ✓ Termómetro de máxima y mínima SPER SCIENTIFIC 736690 - TAIWAN
- ✓ Termómetro digital HANNA Instruments HI93532 K-THERMOCOUPLE THERMOMETER – ROMANIA

3.5. Procedimientos

3.5.1. Obtención de la muestra

Los erizos fueron colectados de las playas de la zona de Chorrillos y trasladados al laboratorio donde se lavaron varias veces con un cepillo suave con agua de mar filtrada para eliminar algunos de los organismos adheridos a sus espinas. El acondicionamiento de los erizos se realizó en el laboratorio de Genética Aplicada en acuarios, proporcionándoles una buena aireación (Figura 2). Se les alimentó con algas colectadas de la misma zona, y se realizó la limpieza diaria de las excretas y recambio de agua, permaneciendo en esas condiciones no menos de una semana antes de los experimentos. Se midió la temperatura de los acuarios y ambiente del laboratorio.

Los procedimientos descritos se basan en los métodos de referencia estandarizados de ensayo biológico y pruebas de fertilización con erizos de mar (Environmental Canada. 2011). Previamente a cada desove se realizó la biometría de los especímenes (Figura 3) según el

protocolo para muestreo biológico y biométrico del erizo de mar descrito por IMARPE (Galindo et al., 2016).

Figura 2

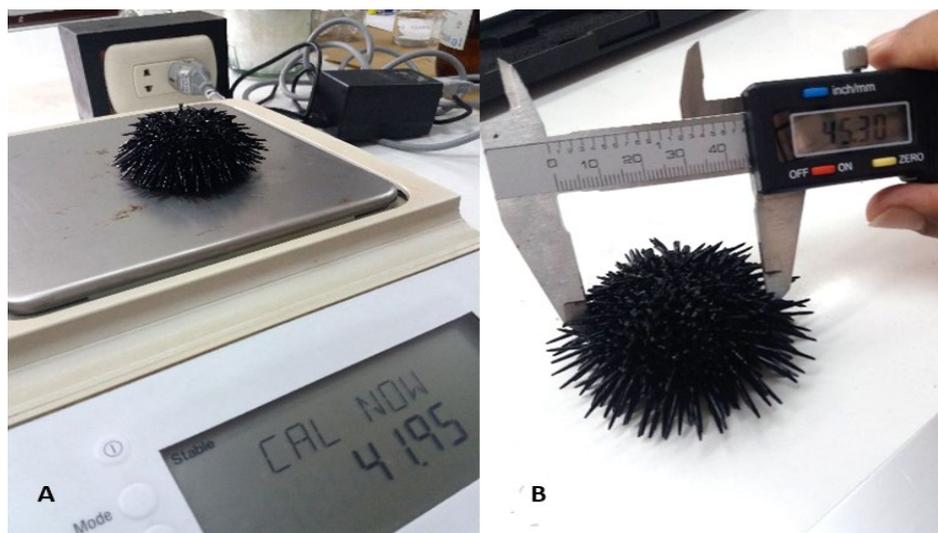
Acondicionamiento de erizos



Nota: Erizos *T. niger* con aireación fuerte y constante durante todo el periodo de los ensayos La adhesión al vidrio y visualización de pies ambulacrales indica el buen estado del ambiente donde se encuentran. Fotografía tomada en el Laboratorio de Genética Aplicada-FOPCA-UNFV.

Figura 3

Biometría de los erizos



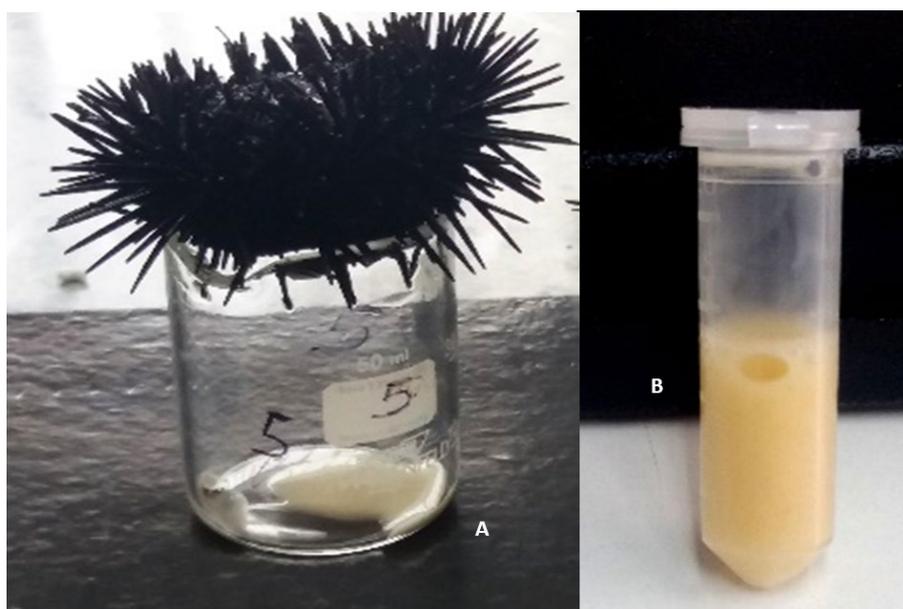
Nota. A. pesada del espécimen al cual se le ha eliminado exceso de agua de mar con papel toalla. B. medición del diámetro de testa con el caliper, vernier o pie de rey.

3.5.2. Obtención de los espermatozoides

Para obtener los espermatozoides se indujo el desove de los especímenes, utilizando cloruro de potasio 0,5M inyectando en la región oral, en la membrana peristomial, de 2 a 3 ml de la solución. Posteriormente se colectaron los espermatozoides en un vaso de precipitado esterilizado con la región oral hacia arriba y el poro genital orientado hacia abajo para la liberación de los gametos (Figura 4). Se mantuvieron sin agua de mar (“en seco”) a 4 °C en un microtubo de 2 mL, hasta su uso por un período no mayor de 24 horas. Se tomaron datos de pH, volumen del esperma y se verificó la movilidad. Inmediatamente después que desovaron, los especímenes machos se trasladaron a un acuario con agua de mar y aireación para su recuperación.

Figura 4

Desove de esperma



Nota: A. erizo liberando esperma B.: volumen de esperma obtenido almacenado a 4°C

3.5.3. Obtención de los ovocitos

Para obtener los ovocitos se indujo el desove de los especímenes. Se utilizó cloruro de potasio 0,5M inyectando en la membrana periostomal, cavidad que rodea la boca, de 2 a 3 mL

de la solución. Posteriormente se colectaron los ovocitos en un vaso de precipitado esterilizado y se realizaron varios lavados o enjuagues con agua de mar microfiltrada y esterilizada con luz ultravioleta (AMMFE) decantando a los ovocitos y eliminando el sobrenadante para volver a colocar AMMFE. Se evaluó la calidad de los ovocitos observando que presenten forma esférica y no dañada. Se conservaron en frío a 4°C hasta inicio del ensayo en un microtubo de 2mL (solución madre de ovocitos) (Figura 5). Los erizos hembra desovados se colocaron en otro acuario, separados de los machos, con aireación y alimento.

Figura 5

Desove de ovocitos



Nota: A. microtubo con ovocitos almacenado a 4°C B. erizo hembra con desove de ovocitos

Una vez desovados los especímenes machos y hembras se realizaron pruebas de fertilización entre los especímenes desovados para encontrar la combinación de esperma y ovocito que ofrecía mayor viabilidad y porcentaje de fecundación. Luego de escoger al espécimen macho y hembra se procedió a someter a los gametos a los tratamientos

programados. De este modo se aseguró una respuesta apropiada a ACP en donde el factor de viabilidad del gameto es minimizado.

3.5.4. Efecto de los agentes crioprotectores (CPAs) DMSO y Glicerol sobre los gametos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

Para someter a los ovocitos a los CPAs, primero se preparó una suspensión de ovocitos en un tubo cónico de 15mL utilizando 250 μ L de solución madre de huevos y adicionando 10 mL de AMMFE. Posteriormente en un microtubo de 2 mL se adicionó 500 μ L de la suspensión de ovocitos y 1 mL de solución del CPA a diferentes concentraciones (0,5M - 1M- 1,5 M - 2M) (preparadas con agua de mar AMMFE), por periodos de exposición diferentes (5, 10, 15, 20 min) y a temperatura ambiente. Una vez que los ovocitos completaron los tiempos de exposición se realizaron 2 lavados con AMMFE permaneciendo un volumen de 500 μ L de ovocitos tratados, listos para la fertilización.

Para el caso del espermatozoide, se colocó 10 μ L de espermatozoide sin diluir en microtubos con 200 μ L de ACP por el tiempo de exposición y concentración correspondiente. Luego se utilizó 10 μ L para fertilizar 1000 μ L de solución de ovocitos.

3.5.5. Procedimiento de fertilización

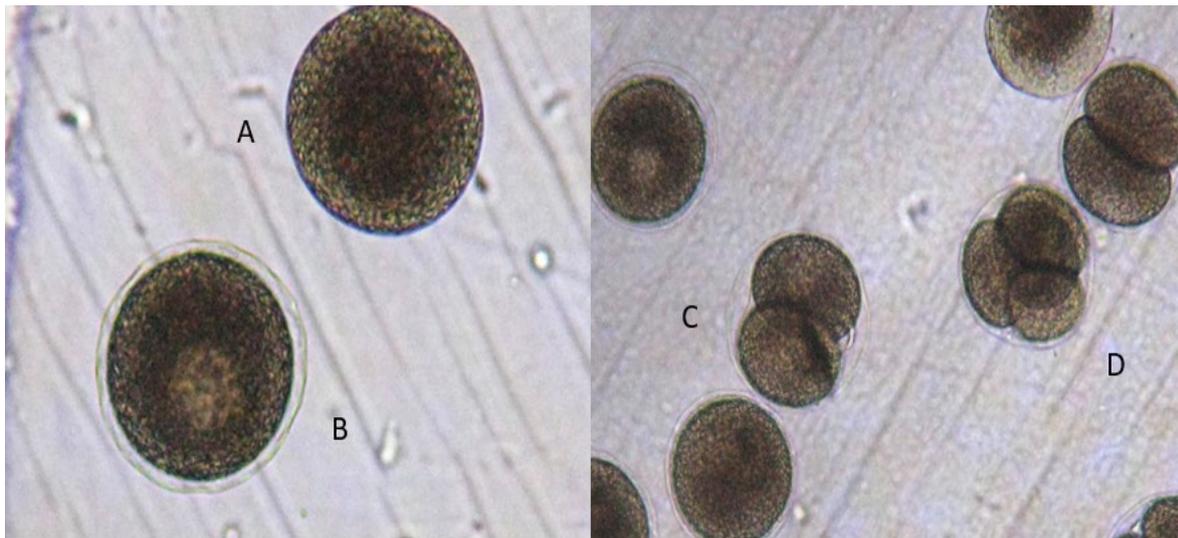
El procedimiento utilizado se basó en el protocolo propuesto por Olaechea et al. (2006). Se preparó en un microtubo una solución espermática agregando 10 μ L de la masa espermática a 200 μ L de AMMFE. Por otro lado, en un microtubo de 2 mL se colocó 1000 μ L de la suspensión de ovocitos, a la que se agregó 10 μ L de la solución espermática. Después de aproximadamente 1 hora, se lavó con AMMFE y se verificó la presencia de la membrana de fecundación e inicio de la división. Posteriormente se fijó con formalina tamponada al 10%

agregando 500 μ L a cada tubo (1:1) para conservar el material y realizar la evaluación de las muestras posteriormente (Dupré y Carvajal, 2018, Fabrocinni y D'Adamo, 2011, Ribeiro et al. 2018).

Para realizar la evaluación del efecto de los crioprotectores ensayados en el porcentaje de fecundación se contabilizó el número de huevos fertilizados y no fertilizados, diferenciándolos por la presencia de la membrana de fertilización y/o por la segmentación del cigoto en 2, 4 ó 8 células (Figura 6). Se utilizó un 1 mL de muestra fertilizada para la lectura en la cámara de Sedgewick-Rafter.

Figura 6

Huevos no fertilizados, fertilizados en división de 2 y 4 células de T. niger



Nota. Huevos: A. no fertilizado B. fertilizado C. 2 células D. 4 células. Fotografías tomadas con microscopio Axioscope A1 Carl Zeiss con cámara Canon Powershot A650 IS-6X optical zoom, 250X, 1000X y 2500X.

3.6. Análisis de los datos

Se evaluaron 2 CPAs, DMSO y Glicerol, 4 tiempos de exposición (5, 10, 15 20 minutos), 4 concentraciones (0,5,1,0 1.5, 2M) y 2 tipos de gametos (ovocito y esperma), con 3 repeticiones para cada tratamiento (Diseño completamente al azar - DCA) siendo 192 muestras en total. Adicionalmente se consideraron 3 controles por cada tratamiento teniendo al final 240 muestras para analizar. Para disminuir la variabilidad en los datos, se utilizó para la prueba de fertilización, los productos sexuales de un solo macho y una sola hembra.

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar la ocurrencia de diferencias significativas en los resultados de los tratamientos realizados. También se realizó la prueba de Tuckey para las comparaciones respectivas entre tratamientos y para determinar los valores NOEC y LOEC relacionando con el control. Se utilizó el software Statgraphics Centurion 16.1 para las pruebas estadísticas.

3.7. Consideraciones éticas

Los especímenes fueron tratados con mucho cuidado, se les administró el alimento que requieren, así como condiciones de oxigenación que aseguraron un buen acondicionamiento a las condiciones de laboratorio. Asimismo, el procedimiento del desove se realizó con mucho cuidado. Posteriormente los erizos desovados y recuperados se liberaron de vuelta al mar.

IV. RESULTADOS

El muestreo de los erizos se realizó al azar en la zona de Chorrillos, la cantidad total usada de machos y hembras fue muy similar (33 hembras /36 machos). El peso promedio fue de 36,04 g. \pm 12,16, siendo el rango más frecuente entre 30 y 40 gramos (Figura 7). En relación con el diámetro de testa, el promedio fue de 43,73mm \pm 5,50 con rango frecuente entre 40 y 50 mm (Figura 8). Las medidas biométricas fueron muy variables encontrándose pesos entre un rango de 10,29g y 82,13g, y para el diámetro de testa entre 29,9mm y 61,4mm.

Figura 7

Peso de los especímenes ensayados (g)

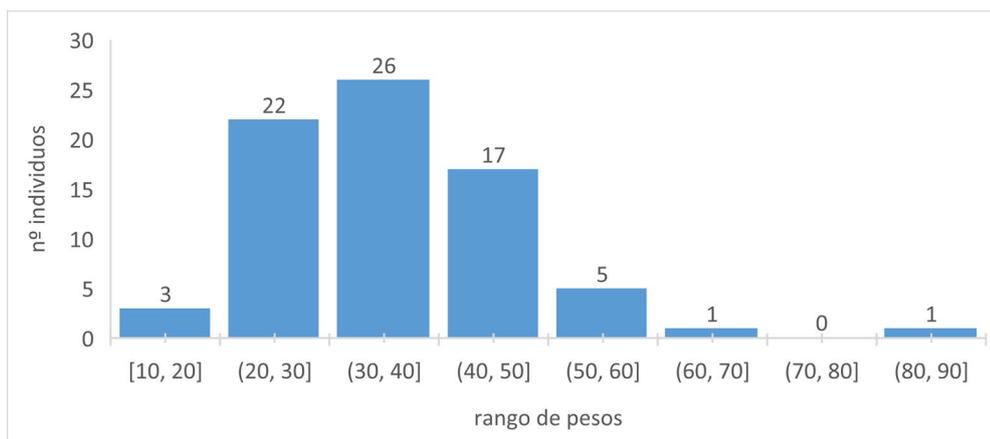
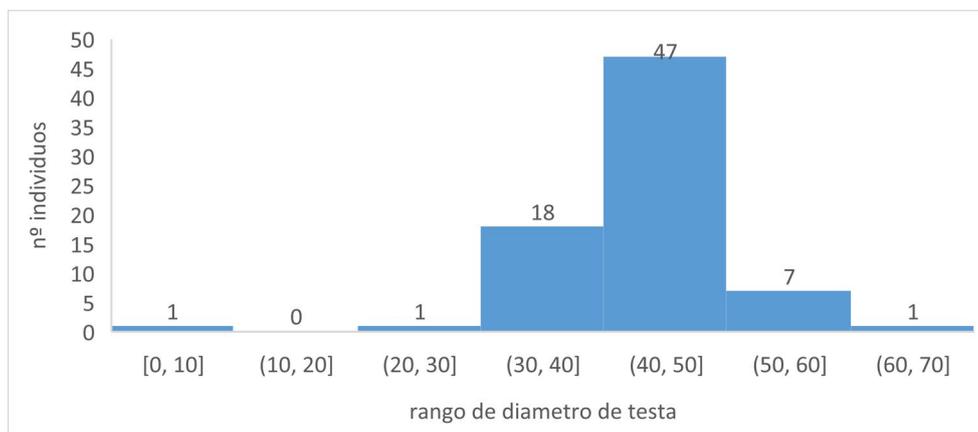


Figura 8

Diámetro de testa de los especímenes ensayados (mm)



En la figura 9 se muestra los porcentajes de desove obtenidos por los especímenes durante el desarrollo de la investigación. Algunos erizos no lograron desovar y en otros especímenes, los desoves fueron muy reducidos de modo que no permitió el registro del volumen desovado. Mas del 50% del total de erizos logró un desove normal caracterizado por prontitud del desove y buen volumen; esfericidad del huevo y membranas lisas para las hembras y alta motilidad de los espermias para los machos; siendo las hembras en mayor número que los machos. El desove reducido se presentó en mayor número en los machos (Figura 10).

Figura 9

Porcentajes de desove del erizo T. niger

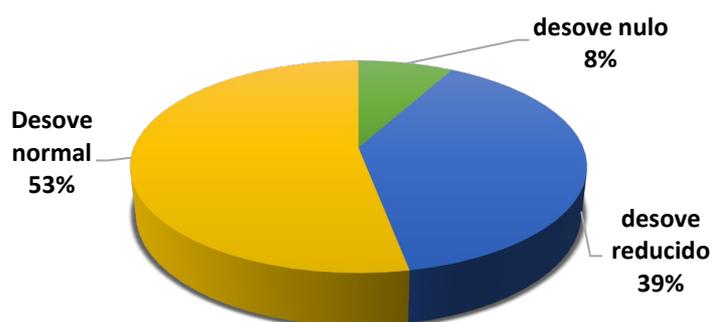


Figura 10

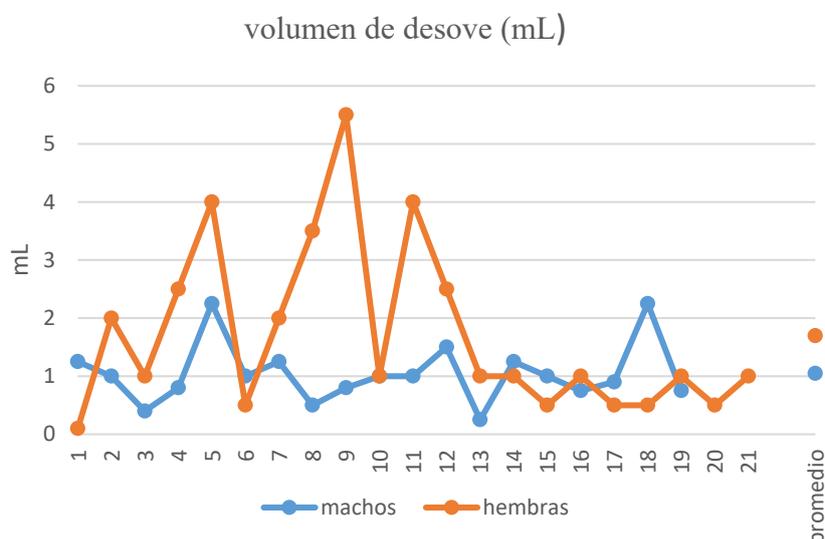
Desove de erizos por sexo



Los volúmenes de desove (mL) fueron muy variables también, tanto para las hembras como para los machos, pero el volumen promedio alcanzado por la hembra fue mayor al volumen promedio desovado por los machos (figura 11), con rangos de 0,25-2,25mL para los machos y de 0,1- 5,5mL para las hembras y con un volumen promedio de 1,05 ($\pm 0,5$) mL para los machos y 1,7 ($\pm 1,5$) mL para las hembras.

Figura 11

Volúmenes de desove (mL) por sexo en Tetrapigus niger



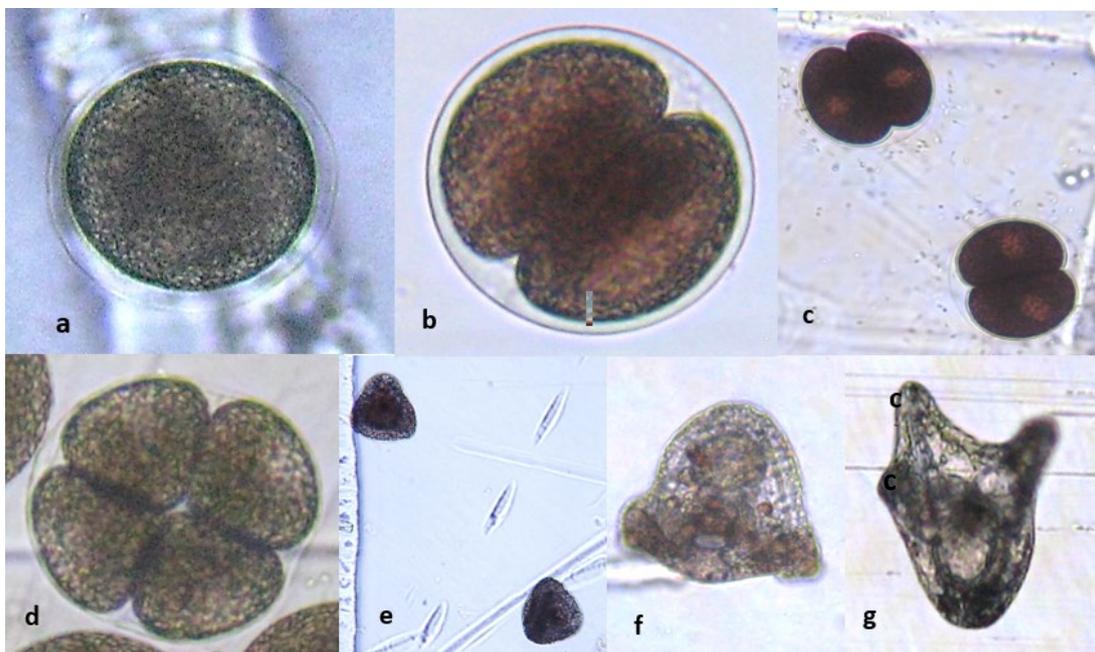
Durante la investigación la temperatura de los acuarios de acondicionamiento de erizos estuvo en promedio en 17,9 °C, la temperatura del laboratorio en 18,5°C y la temperaturas máxima y mínima en 17,8 y 15,9 respectivamente.

Los especímenes permanecieron en acondicionamiento en los acuarios antes del desove en promedio 21 días, con un rango de 7 a 28 días. Después del desove los especímenes permanecieron en los acuarios para su recuperación y posterior liberación al mar en promedio 27 días y algunos especímenes permanecieron tiempos mayores como 34 días para luego ser liberados. En promedio se recuperó el 25% de erizos desovados.

En la figura 12 se muestra las estructuras observadas durante la investigación, el huevo no fecundado, huevo fecundado con la membrana de fecundación, y las células en división que nos aseguraron el éxito de la fecundación y posterior avance del proceso embrionario. Se observaron células con dos, cuatro, ocho células y en algunos casos larvas prisma y etapas tempranas de larva pluteus.

Figura 12

Huevos fertilizados y desarrollo embrionario en el Tetrapigus niger



Nota: a. huevo con membrana de fecundación. b. 2 células. c. 2 células. d. 4 células. e. prisma. f. larva 2 brazos. g. larva temprana 4 brazos. Fotografías tomadas con Microscopio Axioscope A1 Carl Zeiss con cámara Canon Powershot A650 IS-6X optical zoom, 250X, 1000X y 2500X.

4.1. Efecto del crioprotector DMSO sobre los gametos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

4.1.1. Efecto en el Esperma

El resultado obtenido luego de someter al espermatozoides del erizo a diferentes concentraciones de DMSO y tiempos de exposición se presenta en la tabla 1.

Se obtuvieron valores altos de porcentaje de fecundación muy similares con los logrados con el control.

Tabla 1

Porcentajes de fecundación obtenidos con espermatozoides tratado con DMSO a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Concentración	Tiempos de exposición				
	5 min	10 min	15 min	20 min	Control
0,5M	97,5 ± 1,8	91,8 ± 1,1	95,4 ± 5,4	88,2 ± 9,9	97,1 ± 1,6 ^a
1M	91,4 ± 9,1	91,0 ± 3,7	94,8 ± 5,4	89,9 ± 14,5	100,0 ± 0 ^a
1,5M	89,9 ± 8,9 ^b	81,3 ± 2,2 ^a	80,1 ± 1,0 ^a	75,4 ± 0,8 ^{ab}	99,5 ± 0,3 ^a
2M	57,7 ± 16,4 ^{ab}	47,5 ± 7,8 ^{ac}	29,8 ± 5,9 ^{abc}	27,7 ± 7,0 ^{abc}	100,0 ± 0 ^a

Nota: La tabla muestra los porcentajes de fecundación promedios para cada tiempo de exposición y concentración. La letra “a” representa las diferencias significativas DVS-Tuckey (0,05) en comparaciones con el control. La letra “b y c” representa las diferencias significativas DVS-Tuckey (0,05) en las comparaciones entre los tiempos de exposición. En anexo B se presentan las pruebas de ANOVA y DVS -Tuckey.

Para una concentración de 0,5M DMSO se obtuvieron valores de 97,5%, 91,8%, 95,4% y 88,2% a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. No se encontraron

diferencias significativas ($P= 0,05$) entre todos los valores del porcentaje de fecundación obtenidos.

No se encontraron diferencias verdaderamente significativas (DVS-Tuckey) al comparar los porcentajes de fecundación de los tiempos de exposición con los porcentajes de fecundación del control. Asimismo, no se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición ensayados.

Para una concentración de 1M DMSO se obtuvieron valores de porcentaje de fecundación de 91,4%, 91,0% 94,8% y 89,9% para tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. No se encontraron diferencias significativas (0,05) entre todos los valores del porcentaje de fecundación obtenidos.

No se encontraron diferencias verdaderamente significativas (DVS-Tuckey) al comparar los porcentajes de fecundación de los tiempos de exposición con los porcentajes de fecundación del control. Asimismo, no se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición ensayados.

Para una concentración de 1,5M DMSO se obtuvieron valores de 89,9%, 81,3%, 80,1% y 75,4 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. En este caso, si se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos (ANOVA).

Al comparar los porcentajes de fecundación obtenidos en cada tiempo de exposición con el control se encontraron diferencias significativas para tiempos de exposición de 10 min, 15 min y 20 min (DVS-Tuckey, 0,05) y para 5 min las diferencias no fueron significativas.

Asimismo, al hacer la comparación de las diferencias en los valores de porcentaje de fecundación entre los tiempos de exposición ensayados se encontró Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) solo entre 5min y 20 min.

Para una concentración de 2M DMSO se obtuvieron valores de 57,7%, 47,5%, 29,8% y 27,7 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. Estos valores están muy por debajo del valor promedio del porcentaje de fecundación del control presentando diferencias significativas al compararlos con los porcentajes de fecundación del control. Asimismo, se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) en los porcentajes de fecundación entre los tiempos de exposición de 5 con 15 y 20 minutos y entre 10 con 15 y 20 minutos.

En relación con las concentraciones ensayadas, se compararon los porcentajes de fecundación más altos (tabla 2), encontrándose que, a la concentración de 0,5M se obtuvo el mayor porcentaje de fecundación (97,5) seguido de 1M (94,8) y 1,5M (89,9) hallándose que entre estas tres concentraciones no existían diferencias significativas (DVS-Tuckey), mientras que comparando con 2M, si se presentaron DVS diferencias significativas.

Tabla 2

Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de DMSO para el esperma

Concentración del crioprotector DMSO			
0,5M	1M	1,5M	2M
97,5 ± 1,8 ^b	94,8 ± 5,4 ^c	89,9 ± 8,9 ^d	57,7 ± 16,4 ^{bcd}

Nota. Se presentan los valores promedio obtenidos. La letra “b, c, d” representa la DVS-Tuckey (<0,05) entre las concentraciones ensayadas.

Asimismo, se encontró que la concentración más alta a la cual no se observa efecto sobre en el porcentaje de fecundación (NOEC) es 1,5M. La concentración más baja a la cual se observa efecto sobre el porcentaje de fecundación (LOEC) se encontró en 2M (tabla 3).

Tabla 3

Valores NOEC y LOEC para los crioprotectores (CPA) ensayados

ACP	NOEC		LOEC	
	esperma	ovocito	esperma	ovocito
DMSO	1,5M	0,5M	2M	1M
Glicerol	0,5M	-----	1M	-----

Nota. NOEC (No Observed Effect Concentration) concentración a la cual no se observa efecto, LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) concentración más baja a la cual se observa efecto, DVS - Tuckey ($p < 0.05$).

4.1.2. Efecto en los ovocitos

El resultado obtenido luego de someter a los ovocitos a diferentes concentraciones de DMSO y tiempos de exposición se presenta en la tabla 4.

Se obtuvieron valores de porcentaje de fecundación comparables con los logrados con el control a la concentración de 0,5M DMSO con valores de 73,2%, 73,2%,73,8% y 73,5% a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. No se encontraron diferencias significativas al comparar los porcentajes de fecundación de los tratamientos con los porcentajes de fecundación del control. Asimismo, no se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición ensayados.

Para una concentración de 1M DMSO se obtuvieron valores de porcentaje de fecundación de 72,4%, 65,5%, 62,0% y 53,8% para tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20

minutos respectivamente. Se encontraron diferencias significativas (DVS-Tuckey) entre los porcentajes de fecundación de todos los tratamientos con el control. Asimismo, se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre todos los tiempos de exposición ensayados.

Tabla 4

Porcentajes de fecundación obtenidos con ovocitos tratados con DMSO a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Concentración	Tiempos de exposición				Control
	5 min	10 min	15 min	20 min	
0.5 M	73,2 ± 8,9	73,2 ± 3,6	73,8 ± 7,7	73,5 ± 4,9	79,6 ± 0,6 ^a
1 M	72,4 ± 1,5 ^{ab}	65,5 ± 0,6 ^{abc}	62,0 ± 1,5 ^{abcd}	53,8 ± 1,0 ^{abcd}	79,6 ± 0,6 ^a
1.5 M	49,5 ± 0,8 ^{ab}	46,9 ± 1,1 ^a	46,9 ± 2,0 ^a	45,4 ± 1,9 ^{ab}	79,6 ± 0,6 ^a
2 M	28,7 ± 7,3 ^{ab}	29,0 ± 0,7 ^{ac}	15,5 ± 1,8 ^{abc}	12,2 ± 6,0 ^{abc}	79,6 ± 0,6 ^a

Nota. la tabla muestra los porcentajes de fecundación promedios para cada tiempo de exposición y concentración. La letra “a” representa las diferencias significativas DVS-Tuckey (0,05) en las comparaciones de los tiempos de exposición con el control. Las letras “b” y “c” representan las diferencias significativas DVS-Tuckey (0,05) en las comparaciones entre los diferentes tiempos de exposición.

Para una concentración de 1,5M DMSO se obtuvieron valores de 49,5%, 46,9%, 46,9% y 45,4 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de fecundación obtenidos con todos los tratamientos de DMSO ensayados con el control. Al comparar los tratamientos, únicamente se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición de 5 y 20 min.

Para una concentración de 2M DMSO se obtuvieron valores de 28,7%, 29,0%, 15,5% y 12,2 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. Si se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar los porcentajes de fecundación con los obtenidos con el control para todos los tratamientos. Asimismo, se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición de 5 y 10 con 15 y 20 minutos.

En relación con las concentraciones ensayadas, se compararon los valores más altos de porcentajes de fecundación (tabla 5). Para la concentración de 0,5M se obtuvo el mayor porcentaje de fecundación (73,8) seguido de 1M (72,4) encontrándose que no existen diferencias significativas (DVS-Tuckey) entre estas dos concentraciones, por lo que se puede concluir que el efecto del DMSO es el mismo, mientras que las demás comparaciones entre 0,5M, 1M, 1,5M y 2M arrojaron diferencias verdaderamente significativas (DVS-Tuckey).

Tabla 5

Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de DMSO para ovocito

concentración del crioprotector DMSO			
0,5M	1M	1,5M	2M
$73.8 \pm 7,7^b$	$72.4 \pm 1,5^c$	$49.5 \pm 0,8^{bcd}$	$29 \pm 0,7^{bcd}$

Nota. Se presentan los valores promedio obtenidos. La letra “b, c, d” representa las diferencias verdaderamente significativas DVS- Tuckey ($<0,05$) entre las concentraciones ensayadas.

Se determinó la concentración más alta a la cual no se observa efecto en el porcentaje de fecundación (NOEC) en 0,5M y la concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC) en 1M (tabla 3).

4.2. Efecto del crioprotector Glicerol sobre los gametos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

4.2.1. Efecto en el esperma

El resultado obtenido luego de someter al esperma del erizo a diferentes concentraciones de Glicerol y tiempos de exposición se presenta en la tabla 6.

A una concentración de 0,5M Glicerol, se obtuvieron valores de 97,3%, 96,1%, 78,4% y 70,6% a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. Mediante el ANOVA realizado se encontraron diferencias significativas entre los valores de los porcentajes de fecundación de los tratamientos utilizados. En las pruebas de comparación de los tratamientos, también se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición de 5 y 10 con 15 y 20 minutos. Asimismo, no se encontraron DVS significativas entre los porcentajes de fecundación obtenidos con 5 y 10 minutos con el control y entre ellos, pero si se presentaron DVS entre 15 y 20 minutos con el control.

Para una concentración de 1M Glicerol se obtuvieron valores de porcentaje de fecundación de 74,5%, 59,7% 52,3% y 45,1% para tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de fecundación de los tratamientos ensayados (ANOVA). En las comparaciones de tratamientos se presentaron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición de 5 con 10,15 y 20 minutos y entre 10 con 20 minutos. Del mismo modo se presentaron DVS entre todos los tiempos de exposición con el control.

Tabla 6

Porcentajes de fecundación obtenidos con espermatozoides tratados con Glicerol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

Concentración	Tiempos de exposición				
	5 min	10 min	15 min	20 min	Control
0,5M	97,3±1,1 ^b	96,1±2,0 ^c	78,4±9,3 ^{abc}	70,6±2,4 ^{abc}	98,4±2,4 ^a
1M	74,5±4,6 ^{ab}	59,7±1,6 ^{abc}	52,3±6,1 ^{ab}	45,1±3,9 ^{abc}	98,4±2,4 ^a
1,5M	7,9±2,6 ^{ab}	1,6±1,3 ^{ab}	0,9±0,2 ^{ab}	1,0±0,2 ^{ab}	97,2±2,8 ^a
2M	4,7±2,3 ^a	1,8±1,8 ^a	1,2±0,6 ^a	0,7±1,0 ^a	97,2±2,8 ^a

Nota. La tabla muestra los porcentajes de fecundación promedios para cada tiempo de exposición y concentración. La letra “a” representa las diferencias significativas DVS-Tuckey (0,05) en las comparaciones de los tiempos de exposición con el control. Las letras “b” y “c” representan las diferencias significativas DVS-Tuckey (0,05) en las comparaciones entre los diferentes tiempos de exposición.

Para una concentración de 1,5M Glicerol se obtuvieron valores de 7,9%, 1,6%, 0,9% y 1,0% a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente.

El ANOVA arrojó diferencias significativas entre los porcentajes de fecundación de los tratamientos ensayados. Asimismo, se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) entre los tiempos de exposición de 5 con 10,15 y 20 minutos. No se hallaron DVS entre los tiempos de exposición de 10, 15 y 20 minutos. Por otro lado, se encontraron DVS entre cada uno de los tiempos de exposición ensayados con el control.

Para una concentración de 2M Glicerol se obtuvieron valores de 4,7%, 1,8%, 1,2% y 0,7 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. Se encontraron

diferencias significativas usando el ANOVA entre los porcentajes de fecundación de los tiempos de exposición ensayados y el control. Asimismo, al comparar usando DVS-Tuckey, los porcentajes de fecundación de los tratamientos ensayados, no se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas entre los tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos. Al comparar cada tratamiento con el control si se encontraron diferencias verdaderamente significativas DVS con todos ellos.

En relación con las concentraciones ensayadas, se compararon los porcentajes de fecundación (tabla 7), encontrando que, a la concentración de 0,5M se obtuvo el mayor porcentaje de fecundación (97,3) seguido de 1M (74,5) y con porcentajes muy bajos para 1,5M y 2M. Se presentaron DVS (Tuckey) entre las concentraciones 0,5M con 1M; 1,5M y 2M, así como entre 1M con 1,5 M y 2M. No se encontró DVS entre 1,5M y 2M.

Tabla 7

Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de Glicerol para espermatozoides

Concentración del crioprotector Glicerol			
0,5M	1M	1,5M	2M
97,3 ± 1,1 ^b	74,5 ± 4,6 ^{bc}	7,9 ± 2,6 ^{bc}	4,7 ± 2,3 ^{bc}

Nota. Se presentan los valores promedio obtenidos. La letra “b y c” representa las diferencias verdaderamente significativas DVS- Tuckey ($p < 0,05$) entre las concentraciones ensayadas.

Se determinó la concentración más alta a la cual no se observa efecto en el porcentaje de fecundación (NOEC) en 0,5M y la concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC) en 1M (tabla 3).

4.2.2 Efecto en los ovocitos

El resultado obtenido luego de someter a los ovocitos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de Glicerol se presenta en la tabla 8. En todas las concentraciones y tiempos ensayados se obtuvieron porcentaje de fecundación muy bajos comparados con los logrados con el control.

A una concentración de 0,5M Glicerol se obtuvieron valores de 32,3%, 29,3 %, 27,0% y 28,9% a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente.

En el ANOVA, se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de fecundación de los tratamientos ensayados y el control. Asimismo, al realizar las comparaciones correspondientes mediante la prueba de Tuckey, no se encontraron DVS entre los 4 tratamientos ensayados, pero si se presentaron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) en la comparación del control con cada uno de los tiempos de exposición ensayados.

Para una concentración de 1M Glicerol se obtuvieron valores de porcentaje de fecundación de 27,4%, 27,5%, 27,7% y 25,8% para tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. El ANOVA arrojó diferencias significativas entre los tratamientos ensayados mientras que al hacer la comparación a través de la prueba de Tuckey entre cada uno de los tratamientos no se encontraron Diferencias Verdaderamente Significativas (DVS-Tuckey) pero si entre cada uno de los tiempos de exposición y el control.

Para una concentración de 1,5M GLICEROL se obtuvieron valores de 24,9%, 26,9%, 26,8% y 26,9 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición ensayados. Asimismo, se encontraron diferencias verdaderamente significativas (DVS-Tuckey) entre todos los tiempos de exposición ensayados con el control.

Tabla 8

Porcentajes de fecundación obtenidos con ovocitos tratado con Glicerol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

Concentración	Tiempos de exposición				
	5 min	10 min	15 min	20 min	Control
0,5M	32,3 ± 1,2 ^a	29,3 ± 7,1 ^a	27,0 ± 1,7 ^a	28,9 ± 2,4 ^a	87,4 ± 5,8 ^a
1M	27,4 ± 4,4 ^a	27,5 ± 1,4 ^a	25,7 ± 6,0 ^a	25,8 ± 3,6 ^a	87,4 ± 5,8 ^a
1,5M	24,9 ± 5,7 ^a	26,9 ± 3,1 ^a	26,8 ± 4,9 ^a	26,9 ± 4,1 ^a	87,4 ± 5,8 ^a
2M	11,7 ± 3,8 ^a	11,3 ± 4,6 ^a	12,2 ± 6,0 ^a	11 ± 1,2 ^a	87,4 ± 5,8 ^a

Nota. la tabla muestra los porcentajes de fecundación promedios para cada tiempo de exposición y concentración. La letra “a” representa las diferencias significativas DVS-Tuckey ($p < 0,05$) en las comparaciones de los tiempos de exposición con el control.

Para una concentración de 1,5M GLICEROL se obtuvieron valores de 24,9%, 26,9%, 26,8% y 26,9 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición ensayados. Asimismo, se encontraron diferencias verdaderamente significativas (DVS-Tuckey) entre todos los tiempos de exposición ensayados con el control.

Para una concentración de 2M GLICEROL se obtuvieron valores de 11,7%, 11,3%, 12,2% y 11,0 % a tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente. El ANOVA arrojó diferencias significativas entre los tratamientos ensayados incluido el control. Al realizar la prueba de Tuckey comparando cada tratamiento con el control se encontraron DVS (0.05) pero no existieron estas DVS entre los diferentes tiempos de exposición ensayados.

En relación con las concentraciones ensayadas, se compararon los porcentajes de fecundación (tabla 9), encontrándose que, a la concentración de 0,5M se obtuvo el mayor porcentaje de fecundación (32,3%) seguido de 1M (27,5%) y 1,5M (26,9%) y con porcentajes muy bajos para 2M. Existen DVS – Tuckey entre cada una de las concentraciones de 0,5M, 1M, 1,5M con 2M, pero no se presentan diferencias entre ellas.

No se pudo determinar los valores NOEC y LOEC ya que los porcentajes de fecundación obtenidos estuvieron muy por debajo del control en todas las concentraciones ensayadas con Glicerol.

Tabla 9

Porcentajes de fecundación en función de las concentraciones de Glicerol para Ovocitos

Concentración del crioprotector Glicerol			
0,5M	1M	1,5M	2M
32,3 ± 1,2 ^b	27,5 ± 1,4 ^c	26,9 ± 3,1 ^d	12,2 ± 6,0 ^{bcd}

Nota. La tabla muestra los porcentajes de fecundación promedios. Las letras “b, c y d” representan las diferencias significativas DVS-Tuckey (0,05) en las comparaciones entre las concentraciones ensayadas.

4.3. Evaluación de los crioprotectores DMSO y Glicerol para espermatozoides

Se compararon los porcentajes de fecundación de mayor valor obtenidos por concentración y crioprotector encontrando que a la concentración de 0,5M no se presentan diferencias significativas en ANOVA y en la prueba de Tuckey-DVS entre DMSO y Glicerol. Para las demás concentraciones de 1M, 1,5M y 2M si se encontraron diferencias significativas (0,05) en los porcentajes como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10*Porcentajes de fecundación promedio por CPA para espermia*

Concentración	Crioprotectores (ACP)	
	DMSO	GLICEROL
0,5M	97,5 ± 1,8	97,3 ± 1,1
1M	94,8 ± 5,4 ^b	74,5 ± 4,6 ^b
1,5M	89,9 ± 8,9 ^c	7,9 ± 2,6 ^c
2M	57,7 ± 16,4 ^d	4,7 ± 2,3 ^d

Nota. la tabla muestra los porcentajes de fecundación promedios. Las letras “b, c y d” representan las diferencias significativas DVS-Tuckey (p 0,05) en las comparaciones entre los crioprotectores para cada una de las concentraciones ensayadas.

4.4. Evaluación de los crioprotectores DMSO y Glicerol para OVOCITOS

Se compararon los porcentajes de fecundación de mayor valor obtenidos por concentración y crioprotector encontrando diferencias significativas en ANOVA y con la prueba de Tuckey-DVS entre DMSO y Glicerol, para todas las concentraciones ensayadas como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11*Porcentajes de fecundación promedio por CPA para ovocitos*

Concentración	Crioprotectores (ACP)	
	DMSO	Glicerol
0,5M	73,8 ± 7,7 ^b	32,3 ± 1,2 ^b
1M	72,4 ± 1,5 ^c	27,5 ± 1,4 ^c
1,5M	49,5 ± 0,8 ^d	26,9 ± 3,1 ^d
2M	29 ± 0,7 ^e	12,2 ± 6,0 ^e

Nota. la tabla muestra los porcentajes de fecundación promedios. Las letras “b, c, d y e” representan las diferencias significativas DVS-Tuckey (p0,05) en las comparaciones entre los crioprotectores para cada una de las concentraciones ensayadas.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se ha utilizado como temperatura de ensayo la temperatura ambiente del laboratorio buscando la exigencia de las pruebas. Lin y Chao (2011), indican que a temperaturas fisiológicas se presenta la toxicidad de los crioprotectores y que disminuye a temperaturas bajas. Los resultados obtenidos a esta temperatura podrán ser potenciados fácilmente a las temperaturas bajas de la criopreservación.

Los rangos de temperaturas ($15.9^{\circ}\text{C} - 18.5^{\circ}\text{C}$) en los cuales se desarrolló la experiencia estuvieron de acuerdo con las condiciones naturales y con otros trabajos de reproducción realizados con *T. niger* (Barros y Fuentes, 2000; Zamora y Stotz, 1993a). El erizo negro exhibe un ciclo reproductivo anual con una ausencia temporal de gametogénesis, una breve recuperación post desove y un extenso periodo reproductivo aproximadamente de 9 meses, no presentándose una secuencia estacional como en otros erizos; llegando a finales del invierno con un desove total (Zamora y Stotz, 1993a). Se cree que lo más probable para justificar esta diferencia con otros erizos con relación a la liberación de gametos durante todo el año, adicionalmente a la temperatura, fotoperíodo y productividad primaria, es la ocurrencia de desoves parciales. Por lo expuesto se entiende porque en nuestra experiencia, a pesar de que los erizos se encontraban en época de reproducción, se presentó una gran variación en los volúmenes de desove, así como volúmenes muy reducidos que no permitió cuantificar.

Esto nos indica de todos modos la estacionalidad de la disponibilidad del recurso para fines de experimentación, como organismos modelo y también en los bioensayos toxicológicos, resaltando la importancia del desarrollo de crio-bancos de especies de importancia ecológica, farmacéutica, toxicológica, genética, que ponga a disposición los gametos para las experiencias requeridas y del desarrollo de protocolos de criopreservación

para cada especie de modo que asegure contar con gametos de calidad en cualquier época del año.

El éxito en la criopreservación de gametos y estadios de desarrollo larval depende de la selección de los agentes crioprotectores CPA adecuados considerando la toxicidad que puedan ejercer a las células como su eficiencia para evitar o minimizar la formación de cristales de hielo durante el proceso, pero manteniendo intacta su capacidad fertilizadora (Rahman et al., 2008). En este estudio se ha evaluado el efecto de dos CPA permanentes DMSO y Glicerol en el esperma y ovocitos.

5.1. Efecto del crioprotector DMSO sobre los gametos de *T. niger* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

Los porcentajes de fecundación promedio para esperma (97,5% - 88,2%) estuvieron muy cercanos a los valores obtenidos con el control (100% - 97.1%) para ambas concentraciones, 0,5M y 1M, demostrando que utilizar DMSO a estas concentraciones y a tiempos de exposición de hasta 20 minutos no afectará el porcentaje de fecundación y pueden considerarse condiciones adecuadas para una posterior crioconservación de *T.niger*. Este resultado es muy similar al obtenido por Barros et al. (1996) quienes utilizando DMSO 1M y 15 minutos de exposición encontraron para esperma de *T. niger*, porcentajes de fecundación del 100%.

Adams et al. (2004) concluyó que concentraciones bajas de DMSO (0,35 – 1,06M) son más efectivas en preservar la habilidad fertilizadora, mientras que altas concentraciones preservan mejor la función mitocondrial y la integridad de la membrana, características determinantes en la motilidad espermática y reconocimiento esperma- ovocito. En este estudio se encontró que es posible utilizar hasta una concentración de 1,5M DMSO y 5 min de

exposición para la criopreservación del esperma del erizo ya que constituye el valor NOEC, siendo fundamental buscar un balance en donde el ACP tenga una mayor concentración para que ejerza su efecto protector, pero al mismo tiempo no cause daño celular (Paredes y Bellas, 2009; Paredes, 2014). A mayores tiempos y concentraciones ensayados, los porcentajes de fecundación fueron disminuyendo, resultados que aparecen similares con los obtenidos por Barros et al. (1996).

DMSO es un crioprotector que ha sido utilizado para la criopreservación de esperma en diferentes especies de erizo de mar, (Barros et al.,1996; Asahina y Takahashi,1979; Fabroccini et al., 2014; Adams et al.,2004) y en condiciones muy similares a las ensayadas en el presente trabajo. Por lo que se sugiere que DMSO a 1,5M y 5 min no ejerce efecto dañino al esperma en su capacidad fertilizadora y puede ser empleado para los procesos de criopreservación de *T. niger* con éxito.

En relación al efecto de DMSO en los ovocitos, los porcentajes de fecundación promedio obtenidos (73,5% - 73,2%) estuvieron muy cercanos a los valores obtenidos con el control (79,6%) para la concentración de 0,5M, demostrando que utilizar DMSO a esta concentración y a tiempos de exposición de hasta 20 minutos no afectará el porcentaje de fecundación y puede considerarse como condición adecuada para una posterior crioconservación de *T. niger*. Para las soluciones ensayadas de 1M, 1,5M y 2M, los porcentajes de fecundación fueron significativamente menores que el control, indicando que el DMSO no es un buen crioprotector para ovocitos, excepto a 0,5M.

Los valores de NOEC y LOEC encontrados en el presente trabajo para ovocitos de *T. niger* fueron más altos (0,5M y 1M) en comparación con los encontrados para *Sphaerechinus granularis* (0M y 0.05M) por Paredes et al. (2021) e iguales a los valores para *Paracentrotus lividus* encontrados por Paredes y Bellas (2009). En varias investigaciones con otros erizos se

ha encontrado que los ovocitos y huevos fertilizados tienen menor resistencia y tolerancia a los ACPs que otros estadios de desarrollo como la blástula o larvas (Paredes, 2016; Campos et al., 2021). En este trabajo los ovocitos de *T niger* mostraron una mejor tolerancia a DMSO 0,5M, de hasta 20 minutos de exposición y con porcentajes de fecundación similares al control. Este resultado puede ser el punto de partida para iniciar el proceso de criopreservación de ovocitos y evaluar su sobrevivencia y capacidad fertilizadora después el proceso.

5.2. Efecto del crioprotector GLICEROL sobre los gametos de *T niger* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición

Con la finalidad de iniciar bancos de esperma de invertebrados principalmente de interés comercial y ecológico se han realizado muchas investigaciones ensayando varios ACP como Glicerol y DMSO encontrando un alto grado de protección a temperaturas muy bajas. Chow et al. (1985) preservó exitosamente espermátóforos de langostinos usando Glicerol y nitrógeno líquido a temperaturas de -196 °C. En abalones también se ha ensayado Glicerol en la conservación del esperma, encontrándose baja o ninguna motilidad cuando se usó en un rango de 5% a 25% (1M- 5M) (Gwo y Lei, 2023). En nuestros ensayos de toxicidad con erizo *T.niger*, el Glicerol fue un buen agente crioprotector solo a tiempos de exposición y concentración bajos (0,5M - 10min) indicando que no se podría utilizar con éxito para posteriores ensayos de criopreservación dado que a tiempos y concentraciones mayores no se logró buenos porcentajes de fecundación. En estudios con abalones de borde verde y negro se encontró también efectos tóxicos en el esperma a concentraciones tan bajas como 4% y más aún a una concentración del 5% el glicerol era el responsable del 25% de la disminución en la motilidad del esperma (Gwo et al., 2002).

Para el caso de los ovocitos tratados con Glicerol, se encontró que ejerce un efecto dañino al ovocito siendo este muy sensible en todas las concentraciones y tiempos ensayados

ya que los valores encontrados de porcentaje de fecundación fueron significativamente menores que el control. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Paredes et al. (2022), en ensayos de toxicidad con Glicerol para los erizos *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*, siendo igualmente los ovocitos significativamente sensibles a todas las concentraciones ensayadas (0,5M – 2M).

Los valores NOEC y LOEC para espermatozoides y ovocitos en respuesta al Glicerol han sido bajos en comparación con los encontrados para DMSO, resaltando que los ovocitos se han mostrado muy sensibles a este CPA.

5.3 Evaluación de los crioprotectores DMSO y Glicerol para los gametos

Encontrar el CPA apropiado que tenga un poder protector al daño por la formación de hielo en el proceso de criopreservación y que al mismo tiempo no ejerza un efecto tóxico a las células es indispensable para lograr un éxito en el proceso de criopreservación dado que ello se logra con niveles altos de crioprotector, pero al aumentar la concentración el CPA se incrementa su toxicidad (Best, 2015).

En el trabajo se ha encontrado que para el espermatozoide de *T. niger*, el DMSO a una concentración de 1,5M y 5 minutos es el más apropiado para ser utilizado en el proceso de criopreservación.

Para ovocitos el CPA más apropiado para uso en los protocolos de criopreservación es el DMSO a concentraciones de 0,5M y hasta 20 minutos. Este es un avance importante dado que los ovocitos son estructuras muy sensibles a los CPAs.

Es importante considerar que para desarrollar criobancos hay que establecer protocolos para cada uno de los pasos de la criopreservación (Heres et al., 2019), en este trabajo se ha abordado la elección del crioprotector adecuado.

Castro (2021) menciona la importancia del equilibrio entre la salida de agua del interior de la célula y el ingreso del crioprotector hasta que la célula alcance el balance osmótico para que el CPA ejerza una acción crioprotectora óptima. Es por ello que la selección del CPA y su concentración, donde se halle un balance entre toxicidad y protección, es fundamental antes de iniciar procesos de congelamiento para permitir a los crioprotectores el tiempo adecuado para el ingreso a la célula.

Las técnicas de criopreservación se pueden utilizar para la acuicultura como un medio para obtener una copia de seguridad de referencia de una familia u organismo reproductor, para realizar un cruce selectivo mejorando la flexibilidad del diseño reproductivo, teniendo en cuenta la estacionalidad, permitiendo suministrar repetidamente los gametos de un individuo específico. Así mismo refuerza el aspecto de la conservación de especies a través de los criobancos que facilitan el acceso a los recursos para ser estudiados y utilizados (Paredes, 2022).

En este trabajo se aporta conocimiento importante sobre el efecto de dos conocidos agentes crioprotectores en el porcentaje de fecundación del erizo de mar *Tetrapigus niger* determinando que el DMSO es el más apropiado para espermatozoides y ovocitos, del mismo modo se presenta el manejo apropiado de los especímenes para llevar a cabo este procedimiento siendo un aporte para iniciar el desarrollo de criobancos de especies acuáticas tanto de interés comercial como ecológico.

VI. CONCLUSIONES

- Con CPA-DMSO se obtienen porcentajes altos de fecundación de 94,8 % utilizando hasta 1M por 20 minutos para esperma de *T. niger*.
- El DMSO utilizado a concentraciones de hasta 1,5M y con tiempo de exposición de 5 minutos no afecta el porcentaje de fecundación cuando son tratados los espermatozoides.
- Para espermatozoides se obtiene un mayor porcentaje de fecundación de 89,9 % con DMSO en comparación con el porcentaje de fecundación de 7,9% obtenido con Glicerol a una misma concentración de 1,5M .
- Para los ovocitos se obtiene un mayor porcentaje de fecundación de 73,8% con DMSO en comparación con el porcentaje de fecundación de 32,3% obtenido con Glicerol.
- Para los ovocitos de *T. niger*, el DMSO utilizado a una concentración de 0,5M y hasta 20 minutos no disminuye el porcentaje de fecundación.
- Utilizando Glicerol para espermatozoides a una concentración de 0,5M y hasta 10 min de exposición, no afecta significativamente el porcentaje de fecundación.
- Para los ovocitos el Glicerol presenta un mayor efecto dañino en los porcentajes de fecundación.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar las pruebas de criopreservación utilizando los resultados obtenidos en este trabajo (CPA-DMSO, con concentraciones hasta 1,5M) y establecer protocolos de congelación y descongelación.
- Continuar las pruebas de citotoxicidad con los CPAs permeables, DMSO, incluyendo combinaciones con CPAs no permeables para mejorar la respuesta a la criopreservación.
- Hacer pruebas de citotoxicidad y criopreservación con otros estadios embrionarios como larvas y embriones.
- Utilizar el procedimiento desarrollado para la colecta, transporte, acondicionamiento de los erizos y manejo para el proceso de fertilización en el laboratorio para facilitar la obtención de huevos y espermatozoides de buena calidad para trabajos de investigación.

VIII. REFERENCIAS

- Adams, S.L., Hessian, P.A., & Mladenov, P.V. (2004). Cryopreservation of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) sperm. *Cryo Letters*, 25 (4), pp. 87 – 99.
DOI:[10.1201/9780849380549.ch41](https://doi.org/10.1201/9780849380549.ch41)
- Afreen, M. & Uçak, I. (2020). Significance of Cryopreservation Biotechnology for Protection of Aquatic Species. *Eurasian Journal of Agricultural Research*, 4 (2), pp. 64-71.
<https://dergipark.org.tr/en/pub/ejar/issue/58112/649714>
- Aguilera, C., Molares, Y., Gomez, C., Sanjuan, A., Castellacci, A.A., Ferreyros, P., Lujan, M., Flores, F. y Gómez, H. (2021). Hoja de ruta para una acuicultura de precisión en el Perú. Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura [PNIPA].
<https://hdl.handle.net/20.500.12864/214>
- Asahina, E., & Takahashi, T. (1979). Cryopreservation of sea urchins embryos and sperm. *Development, Growth & Differentiation*, 21(5), pp. 423–430.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1979.00423.x>
- Barros, C., Muller, A., Wood, M.J., Whittingham, D.G. (1996). High survival of sea urchin semen (*Tetrapigus niger*) pluteus larvae (*Loxechinus albus*) frozen in 1.0 M Me₂SO. En [Abstracts of Papers Presented at the Thirty-Third Annual Meeting of the Society for Cryobiology] *Cryobiology*, 33 (6), pp. 646–651.
<https://doi.org/10.1006/cryo.1996.0065>.
- Bellas, J. & Paredes, E. (2011). Advances in the cryopreservation of sea-urchin embryos: Potential application in marine water quality assessment. *Cryobiology*, 62, pp. 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.02.005>
- Best, B.P. (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Question. *Rejuvenation research*, 18 (5), pp. 422 - 436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>

- Betsy C, J., Siva, C. & Sampath Kumar J, S. (2021). Cryopreservation and Its Application in Aquaculture . En Y. Bozkurt & M. Numan Bucak (Eds.), *Animal Reproduction* (pp. 1-27) IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99629>
- Campos, S., Troncoso, J. & Paredes, E. (2021). Major challenges in cryopreservation of sea urchin eggs. *Cryobiology*, 98, pp.1-4. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.008>
- Castro Acevedo E. (2021). *Criopreservación del esperma de abulón azul Haliotis fulgens: Efecto de los crioprotectores y la tasa de enfriamiento en la viabilidad espermática*. [Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. CICESE]. Repositorio institucional CICESE. México. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3636>
- Chow, S., Taki, Y., & Ogasawara, Y. (1985). Cryopreservation of Spermatophore of the Fresh Water Shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biological Bulletin*, 168 (3), pp. 471–475. <https://doi.org/10.2307/1541526>
- Cosson, J. (2020). Introduction to Sperm Motility of Aquatic Animals. En M. Yoshida, J.F. Asturiano (eds), *Reproduction in Aquatic Animals* (pp. 25-29) © Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2290-1_3
- Decreto supremo N° 001-2023-PRODUCE. (26 de enero de 2023) Ministerio de la Producción. Política Nacional de Acuicultura al 2030. Resumen ejecutivo. Diario oficial El Peruano. 26 de enero 2023. <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/decreto-supremo-que-aprueba-la-politica-nacional-de-acuicult-decreto-supremo-n-001-2023-produce-2145839-1>
- Decreto Legislativo N° 1195 - Decreto Legislativo que aprueba la Ley General de Acuicultura. (Domingo, 30 agosto, 2015). <https://sinia.minam.gob.pe/normas/decreto-legislativo-que-aprueba-ley-general-acuicultura>

- Diwan, A.D., Harke, S.N., Gopalkrishna & Panche, A.N. (2020) Cryobanking of Fish and Shellfish Egg, Embryos and Larvae: An Overview. *Front. Mar. Sci.*, 7, pp.1-18. Art 251. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00251>
- Dupré, E. & Carvajal, J. (2019). Cryopreservation of embryos and larvae of the edible sea urchin *Loxechinus albus* (Molina, 1782). *Cryobiology* 86, pp. 84-88.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.11.005>
- Environmental Canada. (2011). *Biological test method: Fertilization Assay using Echinoids (Sea urchins and Sand Dollars)*. Second Edition. Ontario, Canada.
- Fabbrocini, A. & D'Adamo, R. (2011). Gametes and embryos of sea urchins (*Paracentrotus lividus*, Lmk., 1816) reared in confined conditions: their use in toxicity bioassays. *Chemistry and Ecology*, 27 (Sup 2), pp.105-115.
<https://doi.org/10.1080/02757540.2011.625931>
- Fabbrocini, A., D'Adamo, R., Pelosi, S., Oliveira, L. F. J., Silvestri, F., & Sansone, G. (2014). Gamete cryobanks for laboratory research: Developing a rapid and easy-to-perform protocol for the cryopreservation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816) spermatozoa. *Cryobiology*, 69(1), pp. 149–156.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.009>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. (2009). *Desarrollo de la acuicultura. 3. Gestión de recursos genéticos*. Orientaciones técnicas para la Pesca Responsable. No. 5, Supl. 3. 148p.
<https://www.fao.org/3/i0283s/i0283s01.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. (2019). *The State of the World's Aquatic Genetic Resources for Food and Agriculture*. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome.
<https://doi.org/10.4060/CA5256EN/https://www.fao.org/documents/card/es/c/ca5256en/>

Fernández, A., Gonzalvo, M^a C., Clavero, A., Ruiz de Assín, R., Zamora, S., María Roldán, M^a., Rabelo, B., Ramírez, J.P., Yoldi, A, Castilla, JA. (2009). Fundamentos de Criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR [Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción]*, 14(1), pp. 17- 25.

<https://revista.asebir.com/fundamentos-de-criobiologia-espermatologica-para-bancos-de-semen/>

Fonseca - González, G. D. J. (2022). *Criopreservación de tejido gonadal del robalo blanco Centropomus viridis: efecto de crioprotectores penetrantes y no penetrantes en la viabilidad de las células germinales*. [Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California - CISECE].

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3796>

Fuentes, I. & Barros, C. (2000) Larval development and metamorphosis of cultured *Tetrapygus niger* (Echinodermata Echinoidea): an uncommon form of echinoplutei. *Invertebrate Reproduction & Development*, 37(3) pp. 201-209.

<https://doi.org/10.1080/07924259.2000.9652420>

Galindo, O., Ramírez, A., Campos, S., Quispe, S. y Argüelles J. (2016). Protocolo para muestreo biológico y biométrico del erizo de mar *Loxechinus albus* (Molina, 1782). *Inf Inst Mar Perú*, 43(4), pp. 425-430. <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3127>

Garmendia, J.M., Menchaca, I., Belzunce, M.J. y Revilla, M. (2009). Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Revista de Investigación Marina*, 11, pp. 1-25.

https://www.azti.es/rim/wp-content/uploads/2014/01/revista_marina_11.pdf

Gibbons, I. (2018). Discovery of dynein and its properties: A personal account. En Stephen King (Ed.), *Dyneins: Structure, Biology and Disease* (Second Edition, Volume 1: The

- Biology of Dynein Motors, pp. 3-87) Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382004-4.10001-9>
- Gwo, J.C., Chen, C.W. & Cheng, H, Y. (2002). Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology*, 58, pp. 1563 – 1578.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01055-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01055-5)
- Gwo, J.C., & Lei, S.Y. (2023). Evaluation of cryodamage in small abalone, *Haliotis diversicolor*, spermatozoa by using a flow cytometer. *J World Aquac Soc.*, 54(1), pp.181–192. <https://doi.org/10.1111/jwas.12930>
- Heres, P., Rodríguez-Riveiro, R., Troncoso, J. & Paredes, E. (2019). Toxicity tests of cryoprotecting agents for *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) early developmental stages. *Cryobiology*, 86, pp. 40-46.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.001>
- Horváth, A. & Urbányi.B. (2020). Sperm Cryopreservation of Aquatic Species. En M. Yoshida, J. F. Asturiano (eds.), *Reproduction in Aquatic Animals* (pp. 321-334) © Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2290-1_16
- Joo, R., & Dupré, E. (2002). Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca,Bivalvia). *Invest. Mar., Valparaíso*, 30 (2), pp.75-79. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-71782002000200008>
- Kroh, A. & Mooi, R. (2023). Base de datos mundial de Echinoidea. *Tetrapyrgus niger* (Molina, 1782). Accedido a través de: Registro Mundial de Especies Marinas (WoRMS) en: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=513606> el 2023-05-17
- Lago, A. & Paredes, E. (2023). Modulation of stress factors for cryopreservation of *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) larvae. *Cryobiology*, 110, pp.8-17.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.01.006>

- Latorre-Padilla, N., Meynard, A., Oyarzun, F. X., & Contreras-Porcia, L. (2021). Ingestion of contaminated kelps by the herbivore *Tetrapygyus niger*: Negative effects on food intake, growth, fertility, and early development. *Marine Pollution Bulletin*, 167, pp. 1-8. 112365. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112365>
- LEY N° 27460. Ley de Promoción y Desarrollo de la Acuicultura - PRODUCE
https://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/1/jer/PROPESCA_OTRO/marco-legal/1.2.%20Ley%20Acuicultura%20127460.pdf
- Lin, T. T., & Chao, N. H. (2011). Cryopreservation of eggs and embryos of shellfish. En T. R. Tiersch and C. C. Green (eds), *Cryopreservation in aquatic species* (Second edition pp. 604-615). The World Aquaculture Society Baton Rouge, LA, USA.
https://www.researchgate.net/publication/285818492_Cryopreservation_of_eggs_and_embryos_of_shellfish
- Lumbre, S. (2020). *Determinación del riesgo ambiental del Cadmio y Cromo utilizando como bioindicador la especie Tetrapygyus niger (Molina 1782) y sus efectos en su desarrollo embrionario*. [Tesis de grado. Universidad Católica Sedes Sapientiae]. Repositorio institucional. UCSS.
https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/905/Tesis%20-%20Lumbre%20Soles%2C%20Oswaldo%20Andree_compressed.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Marcantonini, G., Bartolini, D., Zatini, L., Costa, S., Passerini, M., Rende, M., Luca, G., Basta, G., Murdolo, G., Calafiore, R., & Galli, F. (2022). Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin. *Molecules* 27, 3254. 1-17. <https://doi.org/10.3390/molecules27103254>

Mazur, P. (2004). Principles of Cryobiology. En B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson (Eds.), *Life in the frozen state*. (First edition pp: 3-65). CRC Press.

<https://doi.org/10.1201/9780203647073>

Martínez-Páramo, S. (2008). *Bases para la elaboración de bancos de germoplasma de peces: aplicación a la trucha leonesa*. [Tesis doctoral. Universidad de León]. Buleria. Repositorio institucional. Universidad de León. <http://hdl.handle.net/10612/1827>

Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbe, C., Zhang, T., Robles, V., Herraéz, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T. & Cabrita, E. (2016). Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture* 472(15). DOI:[10.1016/j.aquaculture.2016.05.042](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042)

Montes, M. (2012). *Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en criopreservación de espermatozoides de Lenguado Paralichthys Adspersus (Steindachner 1867)*. [Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/575>

Natural History Museum [MHN] (s.f.). *The Echinoid Directory* <http://www.nhm.ac.uk/our-science/data/echinoid-directory/taxa/taxon.jsp?id=1504>

Navarrete, N., Camus, P. & Opazo L.F. (2008). Variación ambiental y patrones dietarios del erizo negro *Tetrapygus niger* en costas intermareales rocosas del norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 81(3), pp. 305-319.

<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2008000300001>

Olaechea, P., Panes, J.J. y González-Figueroa, H. (2006). Desarrollo embrionario de *Tetrapygus niger* (Molina, 1782) “erizo negro” en diferentes temperaturas. *Biotempo*, 6, pp. 27-31. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v6i0.879>

Paredes, E. (2014). *Cryopreservation of marine invertebrate early-life stages: applications in marine water quality assessment and aquaculture*. [Tesis doctoral. Universidad de Vigo-España] Repositorio institucional. <http://hdl.handle.net/11093/226>

- Paredes, E. (2016). Biobanking of a Marine Invertebrate Model Organism: The Sea urchin. *J. Mar. Sci. Eng.*, 4 (1) 7. <https://doi.org/10.3390/jmse4010007>
- Paredes, E. & Bellas, J. (2009). Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies. *Cryobiology*, 59, pp.344-350.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.09.010>
- Paredes, E., Bellas, J., & Costas, D. (2015). Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval rearing — Culture from cryopreserved embryos. *Aquaculture* 437, 366–369.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.022>
- Paredes, E., Campos, S., & Costas, D. (2021). *Informe técnico sobre potencial de cultivo en hatchery de especies de erizo de mar*. (Proyecto OCIMER: FV 6.3.) Universidad de Vigo. <https://cim.uvigo.gal/wp-content/uploads/2022/04/FV6.3-Informe-sobre-Potencial-de-Cultivo.pdf>
- Paredes, E., Campos, S., Lago, A., Bueno, T., Constensoux, J., & Costas, D. (2022). Handling, Reproducing and Cryopreserving Five European Sea Urchins (Echinodermata, Klein, 1778) for Biodiversity Conservation Purposes. *Animals*, 12. (22) pp. 1-13. 3161
<https://doi.org/10.3390/ani12223161>
- Pegg, D.E. (2007). Principles of cryopreservation. En. G.Day, G.N.Stacey (Eds). *Cryopreservation and Freeze-Drying protocols*. [Methods in Molecular Biology 368, pp; 39-57]
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18080461/#:~:text=doi%3A%2010.1007/978%2D1%2D59745%2D362%2D2_3.
- Perreault, M.C., Borgeaud, I. A., & Gaymer, C. F. (2014). Impact of grazing by the sea urchin *Tetrapygus niger* on the kelp *Lessonia trabeculata* in Northern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 453: 22-27.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2013.12.021>

- Prat Tasso N.N. (2013). *Encapsulación de blástulas de Tetrapygus niger (Molina 1782) (echinodermata: echinoidea) en gel de alginato de sodio*. [Tesis de grado. Universidad Austral de Chile]. Cybertesis Universidad Austral de Chile.
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcp912e/doc/fcp912e.pdf>
- Rahman, S.M., Majhi, S.K., Suzuki, T., Matsukawa, S., Strüssmann, C.A. & Takai, R. (2008). Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. *Cryobiology*, 57(2), pp.170–174.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.08.002>.
- Ribeiro, R.C., Da Silva, A.C., Tovar, T.T., Adam, S., Bartolomeu, D., Peronico, C. & Furley, T.H. (2018). Cryopreservation: Extending the viability of biological material from sea urchin (*Echinometra lucunter*) in ecotoxicity tests. *Cryobiology*, 80, pp.139-143.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.002>
- Rodríguez, S. R. & Ojeda, F. P. (1993). Distribution patterns of *Tetrapygus niger* (Echinodermata: Echinoidea) off the central Chilean coast. *Marine Ecology Progress Series*, 101(1/2), pp. 157–162. <http://www.jstor.org/stable/24840605>
- Sánchez, Ch. K.Y. (2020). Efectos de la contaminación marina producida por las fábricas de harina de pescado en el desarrollo embrionario del “Erizo de mar” *Tetrapygus niger* (Molina, 1782). [Tesis de grado. Universidad Católica Sedes Sapientiae]. Repositorio institucional. UCSS.
<https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/810/Tesis%20-%20S%C3%A1nchez%20Chinga,%20Keyla%20Yashira.pdf?sequence=1>
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., & Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31(3), pp. 231- 243.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x>

Zamora, S. y Stotz, W. (1993a). Ciclo reproductivo de *Tetrapygyus niger* (Molina 1782) (Echinodermata: Echinoidea) en dos localidades de la IV Región, Coquimbo, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 66, pp. 155-169.

https://rchn.biologiachile.cl/pdfs/1993/2/Zamora_&_Stotz_1993a.pdf

Zamora, S. y Stotz, W. (1993b). Variabilidad reproductiva del erizo negro *Tetrapygyus niger* (Molina 1782) en dos localidades del norte de Chile: Implicancias a nivel individual y poblacional. *Revista Chilena de Historia Natural*, 66, pp. 171- 176.

https://rchn.biologiachile.cl/pdfs/1993/2/Zamora_&_Stotz_1993b.pdf

Zavaleta-Espejo, G., Saldaña-Jiménez, J., Blas-Cerdán, W. y Meléndez –Rodríguez, D. (2018). Efecto del Diclofenaco sobre la fecundación de *Tetrapygyus niger* “erizo negro de mar”. *REBIOL*, 38(1), pp. 73 – 82.

<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2151>

Zurita, B. R. (2019). *Evaluación de glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida como agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca*. [Tesis de grado. Universidad Científica del Sur. Lima – Perú] Repositorio académico. UCS. <https://doi.org/10.21142/tl.2020.1335>

ANEXO A. MATRIZ DE CONSISTENCIA

Efecto de dos agentes crioprotectores, Dimetilsulfóxido (DMSO) y Glicerol sobre la fertilización del erizo peruano *Tetrapygus niger* con fines de desarrollo de un banco de germoplasma

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES
¿Cuál es el efecto de los agentes crioprotectores (DMSO y Glicerol) sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> ?	Evaluar el efecto de los agentes crioprotectores, dimetilsulfóxido (DMSO) y Glicerol, sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i>	Hipótesis nula: La aplicación del crioprotector DMSO sobre los gametos de erizo permitirá obtener un porcentaje de fecundación igual al porcentaje de fecundación obtenido utilizando como crioprotector Glicerol.	Independiente: Crioprotector -Tipo de crioprotector -Concentración -Tiempo de exposición
¿Qué concentración del agente crioprotector DMSO puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> comparable con el control?	Evaluar el efecto que ejercen las diferentes concentraciones de DMSO sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> .	H alterna: La aplicación del crioprotector DMSO sobre los gametos de erizo permitirá obtener un mayor porcentaje de fecundación en comparación con el porcentaje de fecundación obtenido utilizando como crioprotector Glicerol	Dependiente: porcentaje de fecundación 1. Ovocito tratado 2. Esperma tratado 3. Ambos gametos tratados
¿Qué concentración del agente crioprotector Glicerol puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> comparable con el control?	Evaluar el efecto que ejercen las diferentes concentraciones de Glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> .		
¿Qué tiempo de exposición al agente crioprotector DMSO puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> comparable con el control?	Evaluar el efecto que ejercen los diferentes tiempos de exposición a DMSO sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> .		
¿Qué tiempo de exposición al agente crioprotector Glicerol puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> comparable con el control?	Evaluar el efecto que ejercen los diferentes tiempos de exposición a Glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> .		
¿Qué tipo de gameto tratado con el agente crioprotector DMSO puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> comparable con el control?	Evaluar el efecto que ejerce el tipo de gameto tratado con DMSO sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> .		
¿Qué tipo de gameto tratado con el agente crioprotector Glicerol puede utilizarse que permita un porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> comparable con el control?	Evaluar el efecto que ejerce el tipo de gameto tratado con Glicerol sobre el porcentaje de fecundación del erizo peruano <i>T. niger</i> .		

para 0.5M	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		5.7	2.1	9.3	0.4
10 min			-3.6	3.6	-5.3
15 min				7.2	-1.7
20 min					-8.9
n	Tuckey tabla		suma cuadrados/GL	DVS	
3	4.65		26.97	13.94	

H0=el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición DMSO 1 M es igual al control
H1= el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición DMSO 1M es diferente del control
 α : 0.05 5%
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1
F<Fc.. Se acepta Ho

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	274.1	91.3666667	43.1433333
10 min	3	273	91	19.99
15 min	3	284.3	94.7666667	16.2033333
20 min	3	269.7	89.9	142.87
control	3	300	100	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	202.716	4	50.679	1.14035733	0.39199679	3.478049691
Dentro de los grupos	444.413333	10	44.4413333			
Total	647.129333	14				

para 1M	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		0.4	-3.4	1.5	-8.6
10 min			-3.8	1.1	-9.0
15 min				4.9	-5.2
20 min					-10.1
n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS		
3	4.65	26.97	13.94		

H_0 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 1.5 M** es igual al control
 H_1 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 1.5 M** es diferente del control
 α : 0.05 5%
 Si F es mayor que $F_{critico}$ = Se rechaza la H_0 ; se acepta la H_1
 $F < F_c$.. Se acepta H_0

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	269.7	89.9	78.93
10 min	3	244	81.3333333	4.84333333
15 min	3	240.2	80.0666667	0.90333333
20 min	3	226.3	75.4333333	0.58333333
control	3	298.6	99.5333333	0.06333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1092.63067	4	273.157667	16.0072079	0.000239487	3.478049691
Dentro de lo	170.646667	10	17.0646667			
Total	1263.27733	14				

	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		8.6	9.8	14.5	-9.6
10 min			1.3	5.9	-18.2
15 min				4.6	-19.5
20 min					-24.1

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS
3	4.65	17.06	11.09

H0 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 2 M** es igual al control
 H1 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 2 M** es diferente del control
 α : 0.05 5%
 Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1
 F > Fc ... se rechaza Ho

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	4	230.933333	57.7333333	179.635556
10 min	4	190.133333	47.5333333	40.7022222
15 min	4	119.2	29.8	23.18
20 min	4	110.8	27.7	32.7466667
control	4	400	100	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	13754.4853	4	3438.62133	62.2342361	3.68561E-09	3.055568276
Dentro de lo	828.793333	15	55.2528889			
Total	14583.2787	19				

para 2 M

	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		10.2	27.9	30.0	-42.3
10 min			17.7	19.8	-52.5
15 min				2.1	-70.2
20 min					-72.3
control					

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS
3	4.65	55.25	19.96

}

<p>H0 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición GLICEROL 1.5M es igual al control H1 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición GLICEROL 1.5M es diferente del control α: 0.05 5% Si F es mayor que F crítico = Se rechaza la H0; se acepta la H1 F < Fc .. Se acepta H0</p>						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
5 min	3	23.7	7.9	6.52		
10 min	3	4.7	1.56666667	1.56333333		
15 min	3	2.6	0.86666667	0.05333333		
20 min	3	3	1	0.04		
control	3	291.6	97.2	7.84		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	21475.676	4	5368.919	1676.04131	4.3919E-14	3.478049691
Dentro de los grupos	32.0333333	10	3.20333333			
Total	21507.7093	14				
para 1.5M						
	5 min	10 min	15 min	20 min	control	
5 min		6.3	7.0	6.9	-89.3	
10 min			0.7	0.6	-95.6	
15 min				-0.1	-96.3	
20 min					-96.2	
control						
n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey			
3	4.65	3.20	4.81			

H0=el%de fecundación a diferentes tiempos de exposición **GLICEROL 2M** es igual al control
H1= el%de fecundación a diferentes tiempos de exposición **GLICEROL 2M** es diferente del control
 α : 0.05 5%
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1
 $F < F_c$.. Se acepta Ho

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	14.2	4.73333333	5.50333333
10 min	3	5.5	1.83333333	3.36333333
15 min	3	3.6	1.2	0.37
20 min	3	2.2	0.73333333	1.04333333
control	3	291.6	97.2	7.84

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	21723.256	4	5430.814	1498.56898	7.6779E-14	3.478049691
Dentro de los grupos	36.24	10	3.624			
Total	21759.496	14				

Para 2M	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		2.9	3.5	4.0	-92.5
10 min			0.6	1.1	-95.4
15 min				0.5	-96.0
20 min					-96.5
control					

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey
3	4.65	3.62	5.11

PRUEBAS ESTADISTICAS PARA COMPARACION DE TIEMPOS DE EXPOSICIÓN OVOCITOS

Ho: Todos los tiempos de exposicion para DMSO 0.5M tienen igual efecto en el porcentaje de fecundacion						
Ha: alguno de los tiempos de exposicion para DMSO 0.5M tienen un efecto diferente en los porcentajes de fecundacion						
a: 0.05	5%					
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1						
F<Fc .. Se acepta Ho						
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
5 min	3	219.5	73.16666667	80.02333333		
10 min	3	219.5	73.16666667	12.65333333		
15 min	3	221.5	73.83333333	59.32333333		
20 min	3	220.6	73.53333333	23.54333333		
control	3	238.9	79.63333333	190.89333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	93.44	4	23.36	0.318745395	0.85910638	3.478049691
Dentro de los grupos	732.8733333	10	73.28733333			
Total	826.3133333	14				
prueba Tuckey		Para 0.5M				
	5 min	10 min	15 min	20 min	control	
5 min		0.0	-0.7	-0.4	-6.5	
10 min			-0.7	-0.4	-6.5	
15 min				0.3	-5.8	
20 min					-6.1	
control						
n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey			
3	4.65	73.29	22.98			

H0 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 1M** es igual al control
 H1 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 1M** es diferente del control
 α: 0.05 5%
 Si F es mayor que F crítico = Se rechaza la H0; se acepta la H1
 F < Fc .. Se acepta H0

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	217.2	72.4	2.28
10 min	3	196.6	65.5333333	0.30333333
15 min	3	185.9	61.9666667	2.17333333
20 min	3	161.3	53.7666667	0.92333333
control	3	238.8	79.6	0.39

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1169.77733	4	292.444333	240.893191	6.801E-10	3.478049691
Dentro de lo	12.14	10	1.214			
Total	1181.91733	14				

Tuckey-DVS

	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		6.9	10.4	18.6	-7.2
10 min			3.6	11.8	-14.1
15 min				8.2	-17.6
20 min					-25.8
control					

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey
3	4.65	1.21	2.96

H0 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 1.5M** es igual al control
H1 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 1.5M** es diferente del control
 α : 0.05 5%
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la H0; se acepta la H1
 $F < F_c$.. Se acepta H0

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	148.5	49.5	0.67
10 min	3	140.6	46.8666667	1.10333333
15 min	3	140.7	46.9	4.03
20 min	3	136.1	45.3666667	3.61333333
control	3	238.8	79.6	0.39

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2552.444	4	638.111	325.345513	1.5372E-10	3.478049691
Dentro de lo	19.6133333	10	1.96133333			
Total	2572.05733	14				

Tuckey

	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		2.6	2.6	4.1	-30.1
10 min			0.0	1.5	-32.7
15 min				1.5	-32.7
20 min					-34.2

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey
3	4.65	1.96	3.76

H0 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 2M** es igual al control
H1 = el % de fecundación a diferentes tiempos de exposición **DMSO 2M** es diferente del control
 α : 0.05 5%
Si F es mayor que F crítico = Se rechaza la H0; se acepta la H1
F < Fc .. Se acepta H0

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	86.1	28.7	53.41
10 min	3	87	29	0.49
15 min	3	46.5	15.5	0.57
20 min	3	36.5	12.1666667	0.36333333
control	3	238.8	79.6	0.39

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8838.98267	4	2209.74567	200.07355	1.7E-09	3.478049691
Dentro de lo	110.446667	10	11.0446667			
Total	8949.42933	14				

prueba Tuckey

	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		-0.3	13.2	16.5	-50.9
10 min			13.5	16.8	-50.6
15 min				3.3	-64.1
20 min					-67.4
control					

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey
3	4.65	11.04	8.92

Ho: Todos los tiempos de exposicion para **GLICEROL 0.5M** tienen igual efecto en el porcentaje de fecundacion
 Ha: alguno de los tiempos de exposicion para **GLICEROL 0.5M** tienen un efecto diferente en los porcentajes de fecundacion
 a: 0.05 5%
 Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1
 F < Fc .. Se acepta Ho

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	96.9	32.3	1.33
10 min	3	88	29.33333333	49.70333333
15 min	3	81.1	27.03333333	2.893333333
	3	86.8	28.93333333	5.843333333
control	3	262.3	87.43333333	33.42333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8125.582667	4	2031.395667	108.9882502	3.33821E-08	3.478049691
Dentro de los grupos	186.3866667	10	18.63866667			
Total	8311.969333	14				

prueba Tuckey		Para 0.5M			
	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		3.0	5.3	3.4	-55.1
10 min			2.3	0.4	-58.1
15 min				-1.9	-60.4
20 min					-58.5

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey
3	4.65	18.64	11.59

Ho:	Todos los tiempos de exposicion para GLICEROL 1 M tienen igual efecto en el porcentaje de fecundacion					
Ha:	Alguno de los tiempos de exposicion para GLICEROL 1M tienen un efecto diferente en los porcentajes de fecundacion					
a: 0.05	5%					
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1						
F<Fc .. Se acepta Ho						
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
5 min	3	82.2	27.4	19.63		
10 min	3	82.4	27.46666667	1.923333333		
15 min	3	83	27.66666667	35.62333333		
20 min	3	77.4	25.8	13.08		
control	3	262.3	87.43333333	33.42333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8747.797333	4	2186.949333	105.4663066	3.91695E-08	3.478049691
Dentro de los grupos	207.36	10	20.736			
Total	8955.157333	14				
prueba Tuckey						
Para 1M						
	5 min	10 min	15 min	20 min	control	
5 min		-0.1	-0.3	1.6	-60.0	
10 min			-0.2	1.7	-60.0	
15 min				1.9	-59.8	
20 min					-61.6	
n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey			
3	4.65	20.74	12.23			

Ho: Todos los tiempos de exposicion para **GLICEROL 1,5 M** tienen igual efecto en el porcentaje de fecundacion
 Ha: Alguno de los tiempos de exposicion para **GLICEROL 1,5M** tienen un efecto diferente en los porcentajes de fecundacion
 a: 0.05 5%
 Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1
 F<Fc .. Se acepta Ho

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	74.6	24.86666667	32.50333333
10 min	3	80.6	26.86666667	9.743333333
15 min	3	80.3	26.76666667	23.70333333
20 min	3	80.8	26.93333333	17.00333333
control	3	262.3	87.43333333	33.42333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8961.316	4	2240.329	96.25335835	6.10706E-08	3.478049691
Dentro de los grupos	232.7533333	10	23.27533333			
Total	9194.069333	14				

prueba Tuckey					
	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		-2.0	-1.9	-2.1	-62.6
10 min			0.1	-0.1	-60.6
15 min				-0.2	-60.7
20 min					-60.5
control					

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey
3	4.65	23.28	12.95

Ho: Todos los tiempos de exposicion para **GLICEROL 2 M** tienen igual efecto en el porcentaje de fecundacion
 Ha: Alguno de los tiempos de exposicion para **GLICEROL 2M** tienen un efecto diferente en los porcentajes de fecundacion
 a: 0.05 5%
 Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1
 F<Fc .. Se acepta Ho

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 min	3	35.2	11.73333333	14.24333333
10 min	3	33.8	11.26666667	20.76333333
15 min	3	36.6	12.2	35.49
20 min	3	33	11	1.47
control	3	262.3	87.43333333	33.42333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	13822.38933	4	3455.597333	163.9433216	4.52949E-09	3.478049691
Dentro de los grupos	210.78	10	21.078			
Total	14033.16933	14				

prueba Tuckey					
	5 min	10 min	15 min	20 min	control
5 min		0.5	-0.5	0.7	-75.7
10 min			-0.9	0.3	-76.2
15 min				1.2	-75.2
20 min					-76.4

n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS/HSD Tuckey
3	4.65	21.08	12.33

<p>H0 = el % de fecundación a diferentes concentraciones de GLICEROL son iguales H1 = el % de fecundación a diferentes concentraciones GLICEROL son diferentes α: 0.05 5% Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1 $F < F_{c..}$ Se acepta Ho</p>																																		
<p>Análisis de varianza de un factor</p> <p>RESUMEN</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.5M - 5 min</td> <td>3</td> <td>291.9</td> <td>97.3</td> <td>1.12</td> </tr> <tr> <td>1M - 5 min</td> <td>3</td> <td>223.6</td> <td>74.53333333</td> <td>21.34333333</td> </tr> <tr> <td>1.5M - 5 min</td> <td>3</td> <td>23.7</td> <td>7.9</td> <td>6.52</td> </tr> <tr> <td>2M -15 min</td> <td>3</td> <td>51.6</td> <td>17.2</td> <td>16.57</td> </tr> </tbody> </table>							Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	0.5M - 5 min	3	291.9	97.3	1.12	1M - 5 min	3	223.6	74.53333333	21.34333333	1.5M - 5 min	3	23.7	7.9	6.52	2M -15 min	3	51.6	17.2	16.57			
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																														
0.5M - 5 min	3	291.9	97.3	1.12																														
1M - 5 min	3	223.6	74.53333333	21.34333333																														
1.5M - 5 min	3	23.7	7.9	6.52																														
2M -15 min	3	51.6	17.2	16.57																														
<p>ANÁLISIS DE VARIANZA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de los cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>17055.22</td> <td>3</td> <td>5685.073333</td> <td>499.201522</td> <td>1.95745E-09</td> <td>4.066180551</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>91.10666667</td> <td>8</td> <td>11.38833333</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>17146.32667</td> <td>11</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>							Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Entre grupos	17055.22	3	5685.073333	499.201522	1.95745E-09	4.066180551	Dentro de los grupos	91.10666667	8	11.38833333				Total	17146.32667	11				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F																												
Entre grupos	17055.22	3	5685.073333	499.201522	1.95745E-09	4.066180551																												
Dentro de los grupos	91.10666667	8	11.38833333																															
Total	17146.32667	11																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>0.5M</th> <th>1M</th> <th>1.5M</th> <th>2M</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.5M</td> <td></td> <td>22.8</td> <td>89.4</td> <td>80.1</td> </tr> <tr> <td>1M</td> <td></td> <td></td> <td>66.6</td> <td>57.3</td> </tr> <tr> <td>1.5M</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>-9.3</td> </tr> <tr> <td>2M</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>								0.5M	1M	1.5M	2M	0.5M		22.8	89.4	80.1	1M			66.6	57.3	1.5M				-9.3	2M							
	0.5M	1M	1.5M	2M																														
0.5M		22.8	89.4	80.1																														
1M			66.6	57.3																														
1.5M				-9.3																														
2M																																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>n</th> <th>Tuckey tabla</th> <th>suma cuadrados/GL</th> <th>DVS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>4.53</td> <td>11.39</td> <td>8.83</td> </tr> </tbody> </table>							n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS	3	4.53	11.39	8.83																				
n	Tuckey tabla	suma cuadrados/GL	DVS																															
3	4.53	11.39	8.83																															

OVOCITOS 1M						
H0 =el%de fecundación a diferentes CRIPROTECTORES son iguales						
H1= el%de fecundación a diferentes CRIOPROTECTORES son diferentes						
a: 0.05 5%						
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1						
F<Fc .. Se acepta Ho						
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
DMSO	3	217.2	72.4	2.28		
GLICEROL	3	82.4	27.46666667	1.923333333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3028.506667	1	3028.506667	1441.002379	2.87617E-06	7.708647422
Dentro de los	8.40666667	4	2.101666667			
Total	3036.913333	5				
	GLICEROL	n	TUCKEY tabla	suma cuadrados/GL	DVS	
DMSO	44.9	3	3.93	2.10	3.29	

OVOCITOS 1,5M						
H0 =el%de fecundación a diferentes CRIPROTECTORES son iguales						
H1= el%de fecundación a diferentes CRIOPROTECTORES son diferentes						
a: 0.05 5%						
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1						
F<Fc .. Se acepta Ho						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
48.8	2	99.7	49.85	0.605		
28.2	2	52.4	26.2	16.82		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	559.3225	1	559.3225	64.19770445	0.01522212	18.51282051
Dentro de los	17.425	2	8.7125			
Total	576.7475	3				
	GLICEROL	n	TUCKEY tabla	suma cuadrados/GL	DVS	
DMSO	22.6	3	3.93	8.71	6.70	

OVOCITOS 2M

H0 =el%de fecundación a diferentes CRIPROTECTORES son iguales					
H1= el%de fecundación a diferentes CRIOPROTECTORES son diferentes					
a: 0.05 5%					
Si F es mayor que Fcritico = Se rechaza la Ho; se acepta la H1					
F<Fc .. Se acepta Ho					

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
DMSO	3	87	29	0.49		
GLICEROL	3	36.6	12.2	35.49		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	423.36	1	423.36	23.53307393	0.008332841	7.708647422
Dentro de los grt	71.96	4	17.99			
Total	495.32	5				
	GLICEROL	n	TUCKEY tabla	suma cuadrados/GL	DVS	
DMSO	16.8	3	3.93	17.99	9.62	