

MV
0434

022259

/

EVALUACION DEL USO DE PROPILENGLICOL, ETILENGLICOL
METANOL Y DIMETILSULFOXIDO (DMSO) PARA LA
CRIOCONSERVACION DE SEMEN DE YAMU (*Brycon siebenthalae*)

PAOLA MILENA BOLAÑOS LOPEZ
ORLANDO ROMERO ORTIZ

VILLAVICENCIO
UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
2003

EVALUACION DEL USO DE PROPILENGLICOL ETILENGLICOL
METANOL Y DIMETILSULFOXIDO (DMSO) PARA LA
CRIOCONSERVACION DE SEMEN DE YAMU (*Brycon siebenthalae*)

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
HEMEROTECA



VILLAVICENCIO META

PAOLA MILENA BOLAÑOS LOPEZ
ORLANDO ROMERO ORTIZ

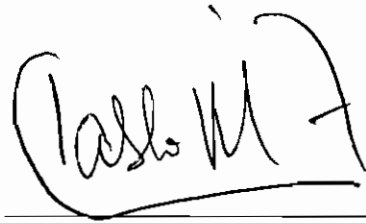
Trabajo de Grado presentado a la Escuela de
Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad
de los Llanos, como requisito parcial para obtener
el Título de Medico Veterinario Zootecnista

Director Dr PABLO EMILIO CRUZ CASALLAS

VILLAVICENCIO
UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECHNIA

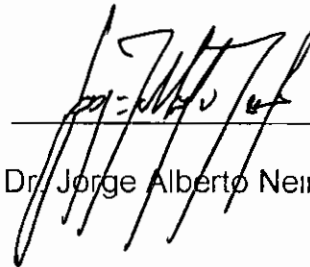
2003

Nota de aprobacion



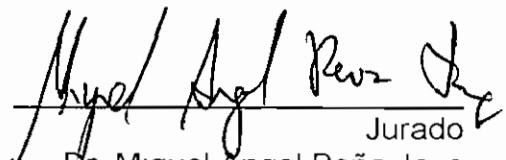
Director

Dr. Pablo Emilio Cruz Casallas



Jurado

Dr. Jorge Alberto Neira Solano



Jurado

Dr. Miguel Angel Peña Joya

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por colmarnos de bendiciones cada día de nuestra existencia

A Camilo Andres el fruto de nuestro amor

A nuestros padres quienes con dedicacion y cariño nos dieron las bases necesarias para forjar un mejor futuro

A mis abuelitos Maximino Q E P D y Vicenta quienes estuvieron deseosos de vernos formados como familia y como profesionales

A Maria Vanessa y Daniela por ser un constante apoyo en los buenos y los malos momentos

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor PABLO EMILIO CRUZ CASALLAS por su colaboracion en la direccion y ejecucion del presente trabajo

A los docentes de la escuela de MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA de la Universidad de los Llanos, que desinteresadamente nos brindaron sus conocimientos en el transcurso de nuestra formacion profesional

A los docentes, tesistas, pasantes y trabajadores del INSTITUTO DE ACUICULTURA DE LOS LLANOS quienes con su aporte hicieron de nuestro trabajo una realidad

A COLCIENCIAS por su aporte financiero para la realizacion de la investigacion

A los Drs JORGE ALBERTO NEIRA y MIGUEL ANGEL PEÑA por su valioso aporte como jurados

A todos los amigos y compañeros por su constante apoyo durante nuestro transcurso por la Universidad



UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

SISTEMA DE BIBLIOTECAS

PRIMERA BIBLIOTECA

Venezuela - Guayana Francesa

DIRECTIVAS

Dr CARLOS ENRIQUE GARZON GONZALES
Rector

Dra ESPERANZA DUQUE MASSO
Vicerrectora Academica

Dr HERNAN GIRALDO VIATELA
Decano Facultad De Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Dr PEDRO ENRIQUE LOMBO
Director Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dr PABLO EMILIO CRUZ CASALLAS
Director del Trabajo

Dr JORGE ALBERTO NEIRA SOLANO
Jurado

Dr MIGUEL ANGEL PEÑA JOYA
Jurado

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCION	1
2	OBJETIVOS	4
3	REVISION DE LITERATURA	5
3 1	Antecedentes	5
3 2	Madurez gonadal	6
3 3	Obtencion del semen	6
3 4	Determinacion de las características seminales	7
3 4 1	Volumen seminal	7
3 4 2	Coloracion y evaluacion morfológica	7
3 4 3	Concentracion espermática	8
3 4 4	Movilidad	9
3 5	Efecto de la temperatura del agua sobre la movilidad espermática	12
3 5 1	El pH	13
3 5 2	Presion osmótica	13
3 5 3	Gases	13
3 6	REPRODUCCION EN PECES	13
3 6 1	Gonadas	13
3 6 2	Obtencion de los Gametos	14

3 6 3	Regulacion del proceso de la reproduccion	15
3 6 4	Problemas en la maduracion a nivel de cultivo	15
3 6 5	Control de la manipulacion	16
3 6 6	Induccion reproductiva	16
3 6 6 1	Inductores	16
3 6 6 2	Dosificacion	17
3 6 6 3	Ovulacion y desove	17
3 6 7	Fertilizacion	18
3 7	Crioconservacion del semen	18
3 7 1	Diluyentes y su composicion	19
3 7 1 1	Diluyentes con yema de huevo	21
3 7 1 2	Diluyentes basados en leche	24
3 7 1 3	El yema con citrato	24
3 7 1 4	Otros diluyentes	25
3 7 2	Crioprotectores	25
3 7 3	Sistemas de envases	29
3 7 3 1	Pajillas	30
3 7 3 2	Curva rapida de congelacion	30
4	MATERIALES Y METODOS	31
4 1	Localizacion	31
4 2	Material biologico	32
4 3	Parametros fisico – quimicos	33
4 4	Obtencion del semen y determinacion de las caracteristicas seminales	34
4 5	Congelacion de semen	35
4 6	Sistemas de envasado	41
4 7	Curva rapida de congelacion	42
4 8	Prueba de fertilidad	42
4 9	Analisis de datos	44

5	RESULTADOS	45
6	DISCUSION	56
7	CONCLUSIONES	60
8	RECOMENDACIONES	61
9	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
HEMEROTECA



VILLAVICENCIO META

LISTA DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1 Composicion de los diluyentes basados en yema de huevo mas empleados en la crioconservacion de gametos masculinos	23
Tabla 2 Caracteristicas morfometricas de los reproductores machos de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>), de los cuales fue obtenido el semen para crioconservacion y semen fresco para muestras control en la prueba de fertilidad	33
Tabla 3 Parametros fisico - quimicos del estanque donde se encontraban alojados los ejemplares de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) utilizados para la obtencion del semen y de los huevos	33
Tabla 4 Composicion de los diluyentes de cada uno de los tratamientos utilizados en las pruebas de congelacion de semen de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>)	40
Tabla 5 Descripcion de los 24 tratamientos de crioconservacion de semen de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) sometidos a prueba indicando el diluyente y crioprotector empleado	41
Tabla 6 Esquema de evaluacion posdescongelacion y fertilizacion del semen de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) para cuatro crioprotectores en diferentes concentraciones	44
Tabla 7 Caracteristicas seminales de ejemplares de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) tratados con extracto de hipofisis de carpa (3 2 mg/Kg i m) n=10	47

Tabla 8	Características de las cinco curvas rápidas de congelación empleadas en la crioconservación de semen de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>)	49
TABLA 9	Porcentaje de motilidad y tiempo de activación de los cuatro tratamientos elegidos para realizar las pruebas de fertilidad de semen de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) ($P < 0.05$)	50
TABLA 10	Resultados de la prueba de fertilidad y valores ajustados al control como 100% realizadas al semen crioconservado de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) ($P < 0.05$)	53

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1 Fotografia de algunos diluyentes a base de yema de huevo utilizados en la crioconservacion de semen de diferentes especies. Se puede observar el empleo de recipientes plasticos y de vidrio	21
Figura 2 Fotografia de la Estacion piscicola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL)	31
Figura 3 Fotografia de un ejemplar reproductor de Yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>)	32
Figuras 4 y 5 Fotografia de los estanques en tierra donde permanecieron los ejemplares de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) durante el transcurso de su vida hasta 24 horas antes de la recoleccion del semen (izquierda). Piletas de manejo de los reproductores para la induccion a la extraccion de semen y huevos (derecha)	35
Figura 6 Fotografia en la que se observa el interior de un tanque de nitrogeno liquido. En ella visualizamos la mano del operario quien extrae una canastilla conteniendo las pajillas con el semen conservado	37
Figura 7 Diagrama del proceso de crioconservacion empleado en el semen de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>)	39

Figura 8 Las cinco curvas de descenso rapido de la temperatura empleadas en la congelacion de semen de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>) Podemos apreciar cinco fases durante el descenso hasta la inmersión en nitrógeno líquido mostrando gran similitud entre ellas	48
Figuras 9 Fotografía de la extracción manual de huevos de una hembra de yamu (<i>Brycon siebenthalae</i>)	51
Figuras 10 Momento en que se hidratan huevos de yamu fertilizados con los tratamientos estudiados (derecha)	52
Figuras 11 y 12 Fotografías de los tanques experimentales en donde se llevo a cabo la incubación de los huevos de yamu fertilizados A la derecha se observan detalladamente las incubadoras experimentales utilizadas en este estudio	52
Figura 13 Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamu crioconservado durante 72 horas con Dimetil sulfoxido (DMSO) activado con bicarbonato de sodio al 1% (1 10)	54
Figura 14 Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamu crioconservado durante 72 horas con Etilenglicol ETG activado con bicarbonato de sodio al 1% (1 10)	54
Figura 15 Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamu crioconservado durante 72 horas con metanol MET activado con bicarbonato de sodio al 1% (1 10)	54
Figura 16 Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamu crioconservado durante 72 horas con propilenglicol PPG activado con bicarbonato de sodio al 1% (1 10)	54

Figura 17 Movilidad espermatica posdescongelacion de semen de yamu crioconservado con cuatro crioprotectores durante 72 horas a diferentes concentraciones activado con bicarbonato de sodio al 1%

55

Figura 18 Tiempo de Activacion posdescongelacion de semen de yamu crioconservado durante 72 horas con cuatro crioprotectores a diferentes concentraciones) y activado con bicarbonato de sodio al 1% (1 10)

55

Figura 19 Porcentaje de fertilidad despues de emplear semen fresco y semen descongelado yamu (*Brycon siebenthalae*) activado con bicarbonato de sodio al 1% (1 10)

55

Figura 20 Microfotografia de un espermatozoide de yamu (*Brycon siebenthalae*)

46



1 INTRODUCCION

Para los proximos 10 años se estima que para abastecer la demanda mundial de proteina de origen animal se requeriran 150 millones de toneladas de carne de pescado. Teniendo en cuenta que la pesca extractiva, tanto artesanal como industrial, estara apenas en capacidad de producir aproximadamente 100 millones de toneladas, los restantes 50 millones deben ser aportados por la industria de la acuicultura (Harvey 1983).

Varios factores han determinado la disminucion de los recursos pesqueros: entre ellos, la sobrepesca, la polucion, perdida de agua e inundaciones y el clima. Ante esta circunstancia, el crecimiento de la acuicultura constituye una respuesta, al igual que a la disminucion de la captura en los mares ocasionadas por las fluctuaciones estacionales.

La acuicultura se presenta como una nueva alternativa de produccion en el sector agropecuario, con excelentes perspectivas para nuestro pais. Sin embargo, es necesario desarrollar tecnologias en este campo que optimicen los sistemas de produccion y transformacion de las especies acuicolas. Nace entonces la necesidad de profundizar en los conocimientos de las caracteristicas seminales de las especies y en la crioconservacion de sus gametos, siendo esto ultimo muy importante para brindar mejores posibilidades a la piscicultura, al permitir conservar material genetico durante periodos prolongados e independizandolos de la maduracion sincronica de machos y hembras.

Colombia en su region amazonica y orinocense posibilita el desarrollo de la acuicultura continental, basada principalmente en sus especies nativas. El yamu (*Brycon siebenthalae* - Eigenmann 1912) ha sido estudiado solo parcialmente. Es un pez de escama nativo de los Llanos Orientales, omnivoro y de rapido crecimiento (Arias 1995, Lugo 1989) de excelente calidad y aceptacion comercial de su carne, util para la pesca deportiva y con excelentes condiciones para cultivo.

El Instituto de Acuicultura de los Llanos Orientales (IALL, Universidad de los Llanos) y el Instituto Nacional de Pesca (INPA) y piscicultores empiricos de los Llanos Orientales (Prieto, 1997), indican que el Yamu alcanza un peso corporal de 400- 450 g a los 6 meses de edad, acepta concentrados comerciales, semillas, hojas, frutas y subproductos de matadero, ademas resiste variaciones amplias de pH, temperatura y oxigeno disuelto (Arias y Pardo 1997).

Los primeros trabajos fueron realizados hacia finales de la decada de 1980 y se orientaron hacia los aspectos basicos de la biologia reproductiva y de los habitos alimenticios en su habitat natural (Hurtado y Useche, 1986; Arias 1988, Lugo 1989). Actualmente investigadores del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos adelantan proyectos de investigacion para definir la escala de maduracion gonadal, evaluar practicas de reproduccion inducida, alevinaje y establecimiento de planteles de reproductores, lo cual contribuira a solucionar los problemas de baja produccion de ovulos y de alta mortalidad durante el proceso de alevinaje, registrados con el uso de ejemplares extraidos de su habitat natural (Landinez 1995). Por otra parte hay coincidencia en la necesidad de profundizar en el conocimiento de la fisiologia reproductiva de la especie y en los factores que puedan afectar su eficiencia como alternativa para solucionar problemas de disponibilidad permanente de los gametos masculinos.

La crioconservación de gametos y embriones es un proceso mediante el cual se logra su conservación en el tiempo sin que sufran cambios en la integridad de su estructura minimizando el daño que podría producir la formación de hielo intracelular para lo cual se deshidratan las células antes del enfriamiento y se exponen a crioprotectores. Las etapas del proceso son la exposición inicial a crioprotectores, enfriamiento a t° bajo cero, almacenamiento, descongelación y dilución y remoción del crioprotector para volver a las condiciones fisiológicas que permiten continuar su desarrollo.

Esta tecnología constituye un requisito para el establecimiento de bancos genéticos (Claude *et al* 1990), los cuales permiten mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de la especie. Además, permiten aumentar el tamaño genético de la población y mantener su diversidad genética especialmente de aquellas especies mantenidas en cautiverio (Phronen, 1994).

Por otro lado, en aquellas especies con reproducción estacional, los bancos genéticos facilitan el desarrollo de programas de reproducción durante todo el año. En ese sentido, este estudio pretende contribuir al conocimiento de la crioconservación de espermatozoides de Yamu (*Brycon siebenthalae*), buscando la disponibilidad de gametos masculinos durante todo el año.

Por otra parte, los estudios de crioconservación de gametos en yamu (*Brycon siebenthalae*) son escasos y los resultados experimentales de crioconservación de semen en otras especies nativas sugieren que son necesarios trabajos adicionales que permitan aportar soluciones alternativas a la reproducción confinada de especies tropicales con ajustes especie-específicos a los protocolos existentes en virtud de la alta variabilidad de los resultados observados (Gwo *et al*, 1991; Ciereszko y Dabrowski, 1993).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de protocolos para la crioconservacion de semen de peces tropicales de agua dulce que permitan realizar los ajustes necesarios hasta obtener una tasa de fertilidad satisfactoria

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1 Contribuir al desarrollo de un protocolo de laboratorio para la crioconservacion de semen de yamu (*Brycon siebenthalae*) ajustando los protocolos de crioconservacion experimentados en otras especies
- 2 Evaluar la utilizacion de dimetil sulfoxido (DMSO), metanol propilenglicol y etilenglicol, como sustancias crioprotectoras para la conservacion de semen de yamu (*Brycon siebenthalae*) con base en los indices de movilidad sobrevivencia y morfologia determinadas despues de la descongelacion
- 3 Observar la fertilidad *in vitro* del semen de yamu (*Brycon siebenthalae*) que presente los mejores indices de movilidad, sobrevivencia y morfologia posdescongelacion, despues de la crioconservacion con dimetil sulfoxido (DMSO), metanol, propilenglicol o etilenglicol

3 LITERATURA

3.1 ANTECEDENTES

El genero *Brycon* es considerado uno de los generos de caracidos neotropicales mas numerosos, con mas de 60 especies descritas (Howes, 1982) *Brycon siebenthalae* fue propuesta como una nueva especie por (Eigenmann 1982) basado en la descripcion de un unico ejemplar procedente de la Guayana Britanica. En 1982 Howes describio las especies *Brycon siebenthalae* y *Brycon siebenthalae iquitensis*, encontradas en la parte alta del rio Amazonas las cuales inicialmente habian sido clasificadas por Eigenmann y Allen (1942) y Amaral (1944) como *Brycon sp*. Useche et al (1993) reportaron diferencias morfometricas entre los especimenes amazonicos y aquellos del rio Cafre de la Cuenca del Rio Orinoco. Por su parte Alvarez de Leon (1991), no logro clasificar con seguridad ejemplares de yamu capturados en la parte alta del rio Guaviare, los cuales, cuando adultos, presentan longitud estandar de 33 a 47 cm, cuerpo comprimido cubierto de escamas cicloides, aleta dorsal con 10 a 11 radios, aletas pectorales con 15 radios cada una, anal con 26 a 27 radios y aleta caudal de tipo homocerca con 22 a 23 radios. Presenta la linea lateral curvada hacia abajo la cual comienza desde la parte media del operculo y se extiende hasta la base de la aleta caudal. Arias (1995) reporta una descripcion similar para ejemplares que clasifica como *Brycon siebenthalae*.

3.2 MADUREZ GONADAL

En la literatura consultada no existen estudios sobre la pubertad y escala de madurez gonadal en yamu. Las descripciones de Arias (1988) y Lugo (1989), sobre los ciclos reproductivos y su relacion con el ciclo hidrológico son insuficientes como criterio para determinar el momento adecuado de induccion de la reproduccion en confinamiento. Los trabajos de Zaniboni – Filho y Resende (1988) y Zaniboni – Filho *et al* (1988) realizados en *Brycon cephalus*, constituyen las unicas referencias sobre la escala de madurez sexual del genero, las cuales pueden ser utilizadas como punto de partida para el estudio de las otras especies agrupadas en este genero.

El tamaño y (o) peso corporal, al cual los peces del genero *Brycon* alcanzan la madurez sexual dependen del sexo y de la especie estudiada. Builes y Uran (1974, 1979), reportaron para *Brycon henni* una longitud estandar de 16 a 37 cm para ambos sexos en tanto que Lylyestron y Taphorn (1983), estudiando *Brycon whitei* señalaron una longitud de 25,2 y 28,1 cm para machos y hembras, respectivamente. Trabajos recientes indican que machos *Brycon orbignyanus*, pueden alcanzar la madurez sexual a los 25,1 cm de longitud estandar (Vazzoler, 1996), o con un peso corporal de $0,75 \pm 0,1$ Kg (Dumont - Neto *et al*, 1996).

3.3 OBTENCION DEL SEMEN

En el pez oviparo *Summer whiting* el semen se obtiene por presion abdominal y luego es almacenado a 0°C (Billard *et al* 1971). En pez gato Mekong gigante y *Pangassius gigans* el semen diluido se almacena a temperaturas al rededor de 0°C por dos dias y luego usado en inseminacion artificial ya sea sin o con proceso posterior de congelacion (Rurangwa *et al* , 1999). La espermiacion en la Carpa (*Ciprinus carpio*) fue inducida por una inyeccion intraperitoneal de extracto de pituitaria de carpa comun, preparado

en solución salina (0.85%) a una dosis de 2.0 mg de pituitaria seca por kilogramo de peso corporal. El semen fue recolectado luego de 10-12 horas, (Kavinder *et al*, 1997). También se reporta la inyección intradorsal 24 horas antes de la colección del esperma con CPA (Carp Pituitary Acetone) a la dosis de 1mg/Kg calculado según el peso corporal y a una temperatura de 20°C (Otomar *et al*, 2000).

Antes de recolectar el esperma para la especie Turbot, la vejiga urinaria es aseada y se ejerce presión suave sobre la región próxima al poro genital. El área genital es lavada usando agua destilada y luego secada. El semen es removido presionando sobre los testículos y los conductos espermáticos (Suquet *et al*, 1998).

3.4 DETERMINACION DE CARACTERISTICAS SEMINALES

3.4.1 Volumen seminal

Debido a los mecanismos utilizados para hacer la recolección del semen, el volumen obtenido es un dato subjetivo por la influencia que ejerce la manipulación, estado de madurez, nutrición, temperatura y otros factores medio ambientales, por esto los estudios realizados se han centrado más bien en estudiar el aumento del volumen seminal mediante diluyentes con el fin de facilitar la utilización del esperma (Carolsfeld, 1988).

3.4.2 Coloración y evaluación morfológica

Blom (1950) introdujo en bovinos la técnica de coloración de espermatozoides, empleando eosina B y nigrosina solubles en agua. Por su parte, Fribourgh (1996), utilizó una coloración diferencial supravital para

semen de peces utilizando material fecundante de Goldfish (*Carassius auratus*) Uso tres muestras de cada eyaculado y las sometio a temperaturas diferentes 15°C, 39°C y 55°C y los coloreo con eosina-nigrosina obteniendo espermatozoides coloreados de 97 0, 81 2 y 7 9 % respectivamente

3 4 3 Concentracion espermatica

Billard y Jalaber (1971), obtuvieron de la trucha arco iris y Salmon *gairdneri* una concentracion de espermatozoides por milimetro cubico de $15,3 \times 10^6$, con una variacion de 6×10^6 a 25×10^6 Determinaron que la concentracion espermatica medida en el semen obtenido directamente de los testiculos es superior a aquella medida en muestras tomadas por masaje abdominal

El numero de espermatozoide en un eyaculado puede ser estimado mediante un conteo directo en un hemocitometro (camara de Neubauer) o a traves del "espermato crito" que consiste en la centrifugacion de una muestra del esperma en tubo de hematocrito para separar el fluido seminal (supernadante) de los espermatozoides (Fogli-Silveira *et al*, 1988), los cuales son precipitados al fondo del tubo

Kavamoto *et al* (1985) hicieron ensayos para estandarizar la cantidad y grado de dilucion del semen, mediante el uso de la pipeta para globulos rojos, logrando una mejor utilizacion de la camara con agua ya que los diluyentes, comunmente utilizados provocan aglutinacion y destruccion de los elementos celulares, asi como bajas diluciones usadas, dificultan el conteo de espermatozoides en especies como la trucha arco iris (*Salmo irideus gibbons*)

En muestras frescas antes de congelado y posdescongelacion luego de 2 dias y 5 meses del congelado para determinar la concentracion espermatica y la viabilidad una alicuota de esperma fue diluido en extensor 1/100 marcado con azul trypan 0 4% 10 microlitros de espermatozoides marcados

y en dilucion final 1/1000 fue introducida en una camara de conteo Thoma Despues de 5 minutos de estabilizacion del liquido, los espermatozoides se contaron bajo el microscopio, los no marcados (vivos) y los marcados (muertos) determinandose, luego de tener en cuenta el factor de dilucion tambien la relacion espermatozoides/ huevo para las pruebas de fertilizacion (Rurangwa *et al* , 1999)

3.4.4 Movilidad

El espermatozoide esta usualmente inmovil en los testiculos y conductos y se activa en el ambiente externo al entrar en contacto con el agua La manipulacion del espermatozoide *in vitro* por almacenamiento y en fertilizacion *in vitro* requiere de condiciones optimas de temperatura osmolaridad conductividad y substratos metabolizables para la iniciacion y mantenimiento de la movilidad (Goodall *et al* 1988)

La activacion y duracion de la movilidad espermatica fue estudiada usando soluciones de NaCl, KCl y glucosa con osmolaridades de 150, 300 600, 900 y 1200 miliosmoles donde los resultados obtenidos, demuestran mejor movilidad y osmolaridad a 300 miliosmoles para el semen de *Sillago ciliata* Los iones de potasio tuvieron efecto inhibitorio sobre la duracion de la movilidad (Goodall *et al* 1988)

Despues de activado el espermatozoide de carpa exhibio tres patrones de movilidad lineal circular y aleatoria En la movilidad lineal se desplazo a lo largo de la ruta lineal con movilidad progresiva Los espermatozoides con movilidad circular presentaron movimientos lentos sin desplazarse de lugar mientras que aquellos con movilidad aleatoria exhibieron una ruta erratica

Otras observaciones reportan que los espermatozoides con movilidad progresiva, pueden detenerse cuando su trayectoria es obstruida por otra celula Sin embargo en ocasiones puede detenerse momentaneamente

durante la trayectoria para luego continuar. Los espermatozoides con trayectoria circular se movían en círculos concéntricos u ovalados en sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario. También pueden exhibir una trayectoria lineal transitoria siendo un cambio espontáneo como resultado de una obstrucción por otro espermatozoide. Los de trayectoria casual con movimiento pronunciado de cabeza cambiaron rápidamente la dirección. Los espermatozoides con trayectorias lineales fueron más rápidos y con trayectoria circular fueron más lentos (Kavinder *et al*, 1997).

La corta movilidad espermática observada en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* es debida a consecuencias del daño osmótico cuando el espermatozoide está difundido dentro del agua (Billard, 1978). Los espermatozoides de trucha arco iris que se someten a un tiempo de equilibrio (10 minutos) en el diluyente y bajo refrigeración generalmente bajaron su habilidad fertilizante, excepto en diluyentes basados en DMA (Dimetil acetamida). La adición de yema de huevo al diluyente fue generalmente beneficiosa, especialmente con diluyentes basados en DMA y DMSO (Babiak *et al* 2000).

Otra causa puede ser un inadecuado suministro de energía, particularmente cuando son diluidos en soluciones salinas fisiológicas (Christen *et al*, 1987), los espermatozoides crioconservados de trucha arco iris mostraron una disminución significativa en la viabilidad, movilidad y fertilidad, además mostraron un incremento en la susceptibilidad al estrés osmótico. La movilidad espermática después de descongelado el semen se mejoró significativamente con la adición de estabilizadores como la yema de huevo BSA (Bovine Serum Albumin) y Dan Pro - yema (Anel *et al* 2001). La habilidad de la yema de huevo para incrementar la movilidad espermática en diferentes especies es bien conocida; esta sustancia fue utilizada anteriormente en diluyente para salmonidos y reportaron buenos resultados.

en la movilidad Lahnssteiner *et al* (1996) describieron los efectos positivos de la yema en la movilidad de espermatozoides de trucha post descongelación

Aunque el espermatozoide de pez no está específicamente adaptado para la utilización de fuentes energéticas, ellos poseen metabolismo oxidativo luego la adición de fuentes energéticas podría favorecer su movilidad (Harvey, 1982). La estabilidad de la membrana plasmática es extremadamente importante en espermatozoides de trucha, porque la fertilidad toma lugar en aguas frescas y control osmótico de estrés. Bajo condiciones fisiológicas, la adición de lípidos exógenos, su transporte dentro de la membrana plasmática y la oxidación intracelular de lípidos, son balanceados. Cambios en la permeabilidad de la membrana pueden alterar el flujo de iones de un lado al otro de la membrana plasmática requerido para activar la movilidad celular.

Durante el congelamiento, el equilibrio es destruido produciendo alteraciones de membrana. Estas alteraciones dañan los componentes de la membrana (fosfolípidos o proteínas) o la peroxidación lipídica. Cambios en la estabilidad de la membrana resultan en un incremento de la permeabilidad de la membrana resultando en un incremento en la susceptibilidad a estrés osmótico (Anel *et al* 2001).

Rurangwa *et al* (1999) utilizaron en la especie pez gato africano (*Clarias gariepinus*) un señalizador de espermatozoides Hobson (Hobson tracking Systems LTDA, Sheffield U.K) para evaluar la movilidad espermática en semen fresco con una modificación al montaje reportado por Kime *et al* (citado por Rurangwa *et al* 1999). El análisis inició 5 segundos después de la activación y fueron calculados automáticamente varios parámetros de movilidad durante los 15 segundos siguientes mediante el sistema de Análisis espermático computarizado (CASA) donde se incluye períodos marcados de la velocidad lineal (VSL) en $\mu\text{m}/\text{seg}$ el promedio de la

trayectoria de velocidad (VAP) en Mn/seg velocidad curvilínea (VCL) Mn/seg y el porcentaje de movilidad espermática (MOT%)

3.5 Efecto de la temperatura del agua, sobre la movilidad espermática

Los espermatozoides pueden morir durante la congelación o descongelación aparentemente por ruptura de la membrana celular. Los espermatozoides de todas las especies estudiadas son susceptibles al choque por frío si la temperatura desciende muy rápidamente. El punto más crítico para el choque por frío ocurre cuando se reduce la temperatura de 15 a 0°C.

Una forma de descongelación de semen de ejemplares de carpa común *Cyprinus carpio* es mediante baño María a 35°C durante 110 segundos (Othmar *et al*, 2000). En la especie pez gato africano (*Clarias gariepinus*) se procede de igual manera pero ampliando el tiempo a 2 minutos y disminuyendo la temperatura del agua del baño María a 25°C (Rurangwa *et al* 1999).

Furthermore y Lindroth (1974) sugieren que la duración del tiempo de nado por el espermatozoide de salmón está relacionado con la temperatura del agua. La movilidad en el espermatozoide de salmón fue significativamente mayor a 28°C, comparado con temperaturas de 2, 4 u 8 °C.

La duración de la motilidad espermática es dependiente de la temperatura con aumento en la duración de la motilidad a temperaturas bajas del agua (Lindroth 1947, Billard y Cosson 1992).

Es necesaria una reducción en el metabolismo celular para prolongar el tiempo de almacenamiento del semen. Por lo tanto, se debe controlar la tasa metabólica. En condiciones anaerobias la velocidad de disminución del pH o la determinación química de la acumulación de ácido láctico o la desaparición de fructosa o ambas, pueden utilizarse como medidas de la tasa metabólica.

3 5 1 El pH

Un pH aproximado de 6.9 a 7.5 para las diferentes especies constituye el rango de actividad óptima en la mayoría de las enzimas del espermatozoide. Si el pH del semen se desvía hacia la alcalinidad o hacia la acidez, se reducirá el índice metabólico.

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
HEMEROTECA

3 5 2 Presión osmótica



Tanto las soluciones hipotónicas como hipertónicas reducen la tasa metabólica, pero ninguna prolonga la vida del espermatozoide. Las soluciones hipotónicas e hipertónicas alteran la transferencia de agua a través de la membrana, lesionando la integridad de la célula, por lo tanto es necesario utilizar soluciones isotónicas.

3 5 3 Gases

Si la presión parcial de dióxido de carbono aumenta de 5 a 10% se deprime la tasa metabólica, por lo tanto se ha considerado al dióxido de carbono como el factor que regula la tasa metabólica. El oxígeno es necesario para el metabolismo aeróbico. Por otro lado, niveles muy elevados de oxígeno son tóxicos y también deprimen la tasa metabólica (Bearden, 1982).

3 6 REPRODUCCION EN PECES

En el ambiente natural la especie se reproduce una vez al año, coincidiendo con la estación lluviosa del año, que para el caso de los Llanos Orientales comprende los meses de Febrero a Junio.

3 6 1 Gonadas

Son dos estructuras pares en forma de cinta en animales inmaduros, las cuales aumentan de tamaño a medida que el animal madura. En estado inmaduro en los machos son de color blanco y de sección triangular,

mientras que en las hembras son de color anaranjado y de forma redondeada

El tamaño máximo de la gonada en la hembra puede alcanzar la mitad de su peso corporal en tanto que en el macho puede ser apenas la décima parte. Las gonadas desembocan en dos conductos localizados al lado de los conductos urinarios, aunque algunas especies pueden tener un único conducto. En los salmonidos el oviducto no se comunica directamente con la gonada.

En los peces las estrategias reproductivas son muy diversas. Puede ser bisexual o gonocórica, en donde hay machos y hembras diferentes genotípicamente, pero pueden cambiar el sexo fenotípicamente, un ejemplo lo constituye la trucha, salmón, lubina y rodaballo.

El hermafroditismo es común en los peces. Este puede ser sincrónico en el cual el individuo, al madurar, tiene gonadas que funcionan unas como ovarios y otras como testículos, aunque no presentan autofecundación. Ocurre en especies que viven muy solas y dispersas, como algunas especies marinas del fondo del océano. Otra condición es hermafroditismo secuencial, en la cual primero maduran como un sexo y después maduran el otro sexo. Hay dos tipos de hermafroditismo secuencial: a) Proterandrico (primero funcionan como macho y al cabo de 1-2 años, como hembra), un ejemplo lo constituye la dorada; b) Proterogínico (primero funcionan como hembra y posteriormente como macho) ejemplo el Mero.

3.6.2 Obtención de los Gametos

Una alternativa es capturar animales salvajes que presenten avanzado estado de maduración gonadal para que realicen el desove en la empresa. Sin embargo, se presenta el inconveniente del estrés generado por el cambio de ambiente, siendo necesario un período de adaptación.

3 6 3 Regulacion del proceso de la reproduccion

En el tropico la reproduccion en la mayoria de las especies, suele ser solo una vez al año bajo el control del eje hipotalamo → hipofisis → gonadas. Por su parte la glandula pineal que produce melatonina, tambien interviene inhibiendo el proceso de maduracion gonadal.

En mamiferos, la hipofisis produce FSH, LH y hCG, mientras que en peces se ha visto que hay dos gonadotrofinas Gth I y Gth II. En ambos grupos la secrecion de estas hormonas depende de factores liberados por el hipotalamo (GnRH). Sin embargo, se ha observado que GnRH de mamiferos produce efectos farmacologicos en peces pero que el GnRH obtenido de salmon ha mostrado ser inefectivo en los mamiferos.

3 6 4 Problemas en la maduracion a nivel de cultivo

Varios problemas pueden ocurrir: a) bloqueo de la gametogenesis. Es lo mas habitual en animales jovenes capturados del ambiente. La causa seria el estres generado por la captura. Por lo tanto en especies que quieran ser introducidas debemos evaluar los niveles plasmaticos de cortisol y escoger aquellos animales con los niveles mas bajos. b) bloqueo de la maduracion final. Las causas suelen ser problemas de temperatura que no llegan a bajar lo suficiente. c) bloqueo del desove. Las causas pueden ser varias: manejo por ejemplo las carpas necesitan ponerlos en las plantas o hilos, los salmonidos necesitan un sustrato para evitar problemas de agresividad entonces puede ser importante hacer un masaje abdominal. En las doradas necesitan un volumen, un espacio de agua ya que en el mar tienen mucho espacio. No se suele hacer un masaje abdominal porque se podria hacer salir huevos no maduros del todo ya que tienen sincronia de grupo multiple.

3 6 5 Control de la manipulacion

Existen varios metodos para el control o manipulacion de los procesos reproductivos en peces, entre ellos podemos mencionar a) Induccion del desove mediante tratamientos hormonales. El tratamiento hormonal solo sera eficaz en las fases finales de vitelogenesis o maduracion, el cual puede determinarse por observacion directa o mediante control periodico por biopsia de la gonada, utilizando un cateter a traves de oviducto. El monitoreo del estatus endocrino, particularmente de Gth II o de testosterona, puede tambien ser de utilidad. b) control del sexo en las truchas: las hembras maduran mas tarde. Entonces interesa tener conjuntos de hembras porque crecen mas que los machos.

3 6 6 Induccion reproductiva

3 6 6 1 Inductores

Los inductores disponibles en el mercado interno y externo que se usan con relativo exito son los siguientes:

Conceptal® Es un producto de uso veterinario disponible en el mercado regional. Su presentacion es en solucion inyectable de 10 ml listo para su aplicacion.

Ovudal Es un analogo del LHRH elaborado para la administracion en peces; tambien se le conoce como Ovufish. Su presentacion es en ampollas de 200 microgramos; para su administracion se diluye en agua destilada.

LHRH Es un producto de fabricacion en un laboratorio canadiense, contiene la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) para administracion en peces; su presentacion es en ampollas de 200 microgramos.

Pituitaria de carpa Es el extracto de la hipófisis de "carpa común" *Cyprinus carpio*. Actúa de manera similar a las gonadotropinas endógenas estimulando la producción de esteroides sexuales forzando la actividad del ciclo reproductivo a nivel de gonadas.

3.6.6.2 Dosificación

Los productos que más se han usado son extracto de pituitaria de carpa y Conceptal®. La dosis empleada con el primer producto, es de 5 mg/kg de peso del pez, para las hembras y 0.5 mg para los machos. Para disolver el producto se usa agua destilada.

Cuando se usa Conceptal la dosis total es de 2.6 ml/kg de peso vivo del pez, para la hembra. Para el macho se usa solamente el 25% de la dosis aplicada a la hembra.

La aplicación se hace en una sola dosis, por vía intraperitoneal en la región media lateral del cuerpo a la altura del origen de las aletas ventrales y también en el pliegue que se ubica detrás de la aleta pectoral cuidando que la aguja se dirija hacia la región media y posterior del cuerpo y no hacia la cabeza ya que de este modo se alcanzaría el seno venoso.

La oxigenación de los tanques durante el tratamiento hormonal de los peces ha proporcionado buenos resultados (Dabrowsky no publicado). De esta forma se logra concentraciones de oxígeno entre 5 a 6 ppm favoreciendo que los peces respondan favorablemente al tratamiento hormonal.

3.6.6.3 Ovulación y desove

Tanto en gamitana, como en pacu y bocachico la ovulación y desove se produce entre 11 a 15 horas después de administrada la dosis. Este tiempo

puede variar en un mayor rango particularmente en el limite superior pero las tasas de viabilidad seran mas bajas

El numero promedio de ovulos por gramo en gamitana es de 1042 y en pacu de 944 El peso los ovulos de ambas especies se correlacionan positivamente con el peso de la hembra Ocasionalmente en hembras tratadas cuatro a cinco veces se han observado estructuras residuales de las gonadas de aproximadamente cinco centimetros de longitud de consistencia dura en forma de V y de seccion triangular en cada una de sus ramificaciones Estas estructuras se localizan en la parte inferior del vientre de la hembra, con el vertice orientado hacia la abertura genital, constituyendo un verdadero tapon En estos casos al cumplirse las trece horas despues de inyectada la dosis se le extrae para presionar su vientre ligeramente con lo cual el "tapon" emerge ligeramente para su extraccion total con la mano Luego de la extraccion del tapon, el desove se realiza en forma normal

3 6 7 Fertilizacion

Despues de haber completado su desarrollo y maduracion el espermatozoide debe reconocer al ovulo y penetrar a traves del aparato micropilar A diferencia de los mamiferos el espermatozoide de yamu, como la mayoria de las demas especies de peces carece de acrosoma y aparentemente no requiere de capacitacion apara adquirir capacidad fecundante

3 7 CRIOCONSERVACION DEL SEMEN

La criobiologia es una ciencia relativamente nueva, que permitio en la decada del 50 conservar la capacidad fecundante del semen bovino por periodos prolongados y consecuentemente un impacto en la produccion animal, por la masiva utilizacion de reproductores geneticamente superiores

El objetivo de conservar una célula espermatozoide u ovulo es mantenerlos en estado de animacion suspendido a partir del cual debe ser reactivado despues de un periodo de tiempo determinado (Gordon, 1994) El uso del frio asociado a los conocimientos de los fenomenos fisico-quimicos involucrados en el congelamiento de la materia viva, hizo posible el desarrollo de procedimientos de crioconservacion, el enfriamiento produce una disminucion notable del metabolismo y ahorro energetico, ambos fenomenos constituyen condiciones necesarias para la prolongacion de la vida celular

La crioconservacion cuyo proposito es garantizar su sobrevivida causa sin embargo daño irreversible a las membranas plasmaticas causando ya sea la muerte celular o cambios parecidos a los que se ven durante la capacitacion espermatica que dificultan su capacidad para interactuar con el ovocito durante la fertilizacion (Wilde et al 2002)

Se cree que tanto espermatozoides como células embrionarias pueden permanecer viables a -196°C por mas de 1000 años (Gordon, 1994) Las tecnicas actuales de congelacion permiten la crioconservacion exitosa de embriones de muchas de las especies de animales domesticos por periodos de tiempo bastante largos (Bielanski, 1987) El proceso incluye la deshidratacion de la célula la cual ocurre cuando un diluyente se congela mas rapido que las células en el contenidas causando así la salida de agua de esta (Harvey 1982) De esta manera se evita la formacion de cristales de agua en el interior de la célula lo que usualmente es fatal

Para prevenir la formacion de cristales de hielo, el agua intracelular es usualmente reemplazada por crioprotectores permeables y los espermatozoides son deshidratados a una tasa relativamente lenta de enfriamiento

En principio beneficios similares pueden ser esperados de su aplicacion en la industria piscicola ademas el valor del almacenamiento de gametos por

largos periodos de tiempo como medio para la conservacion de varias especies de peces en via de extincion ha sido ampliamente reconocido puesto que semen congelado de individuos de tales poblaciones puede colectarse para el establecimiento de bancos geneticos (Cloud *et al* , 1990 Bergan *et al* , 1991 Harvey 1991)

Por otra parte el uso de semen congelado es un medio practico para aumentar el tamaño geneticamente efectivo de las poblaciones y mantener su diversidad genetica, especialmente de aquellas mantenidas en cautiverio (Phronen 1994)

El factor que facilita el satisfactorio almacenamiento de los espermatozoides congelados por largo tiempo es la baja temperatura (Carolsfeld 1988) Determinadas velocidades de descenso termico en ciertos rangos de temperaturas produce alteraciones perjudiciales que comprometen seriamente la vida celular, lo que dio lugar a la formulacion de protocolos de congelamiento involucrando uso de distintos aditivos y velocidades de enfriamiento (Wilde *et al* 2002) Se sabe que cuando las celulas son expuestas a descenso de temperatura se producen daños en la membrana celular, cuyo "modus operandi" es desconocido aunque existen evidencias vinculadas al incremento de la concentracion de solutos Sin embargo este daño es convenientemente impedido por el uso de crioprotectores (Leibo 1977)

En los peces la temperatura de almacenamiento del espermatozoide debe ser por lo menos de 50°C bajo cero Por esta razon aunque el nitrogeno liquido (NL) tiene una temperatura de 196°C bajo cero es el medio mas usado para el almacenamiento y transporte de semen en diferentes especies (Ramos, 1986)

3 7 1 DILUYENTES Y SU COMPOSICION

El diluyente debe proteger el espermatozoide de la acción tóxica de los productos de su propio metabolismo, de los cambios bruscos de temperatura y debe aumentar el volumen del semen



UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
HEMEROTECA
VILLAVICENCIO META

Figura 1 Fotografía de algunos diluyentes a base de yema de huevo utilizados en la crioconservación de semen de diferentes especies. Se puede observar el empleo de recipientes plásticos y de vidrio.

3 7 1 1 DILUYENTES CON YEMA DE HUEVO

Fue Phillips (1939) de la Universidad de Wisconsin, quien primero informó sobre las ventajas de la yema de huevo de gallina en la preparación de diluyentes para conservar semen refrigerado. Ese diluyente, con algunas modificaciones, sigue en uso y al grupo se le da la denominación de diluyentes fosfato yema. La composición del diluyente de Phillips se muestra en la Tabla 1.

Este diluyente se prepara mezclando las sales en el agua destilada hervida tibia o pasada por autoclave durante 20 minutos a 15 libras de presión. Inmediatamente antes de su uso se hace la mezcla con la yema de huevo.

El diluyente de citrato - yema posee ventajas sobre el fosfato - yema por ser mas claro el medio y mas util para lecturas de movilidad (Salisbury *et al* 1941) Se prepara con 2.9 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 100ml de agua destilada. Se ha encontrado que el 33% o aun el 20% de yema de huevo son suficientes, dando resultados similares.

Similar a los resultados reportados por Steyn y Vanvuren en semen de pez gato (*Clarias gariepinus*) los criodiluyentes libres de yema de huevo no protegieron suficientemente los espermatozoides. La mejor proteccion provino de criodiluyentes que contenian yema de huevo. Al parecer el factor en el proceso de crioconservacion esta en la asociacion de un crioprotector intracelular (DMSO o Glicerol) con yema de huevo al 10%. Similar mejoramiento del diluyente de Mounib con yema de huevo se reporto en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y en pez gato (*H. Longifilis*) (Rurangwa *et al* 1999). Lahnsteiner *et al* (1996) describieron los efectos positivos de la yema de huevo sobre la movilidad de espermatozoides de trucha posdecongelacion. En el estudio realizado por Babiak *et al* (2000), se demostro que el uso de yema de huevo de gallina fue generalmente benefico para crioconservacion de semen de trucha arco iris en concordancia con las observaciones de Baynes y Scott (1987).

Una yema de huevo contiene en peso la mitad de agua 47.5%, 17.4% de proteinas, y un 33% de grasas y aporta aproximadamente 200 miligramos de colesterol y unas 211 Kcal/100gr. 0.2% de carbohidratos, elementos inorganicos 1.1% y otros componentes 0.8%. La yema del huevo es rica en vitamina B (B1, B2, B12) ademas de vitaminas A (entre 200 a 1000 UI) y E, hierro y fosfato. Su proteina es de un alto valor biologico superando las de la leche y de la carne de vacuno y por supuesto la de cualquier vegetal. Los acidos grasos varian segun la dieta de la gallina hasta un 60% en el caso del

ácido linoleico y un 10% en el ácido oleico. Lo que en ningún caso es manipulable mediante la dieta del animal, es la cantidad de colesterol que posee, pudiendo establecer unos valores de 200 mg por huevo. El huevo contiene concentraciones elevadas de colesterol (Gallardo, 2002).

Dentro de los fosfolípidos se destacan la lecitina (o colina), el inositol y la etanolamina. Son componentes de todos los órganos, especialmente de los tejidos más activos, como el cerebral y el nervioso periférico.

Tabla 1 Composición de los diluyentes basados en yema de huevo, más empleados en la crioconservación de gametos masculinos.

Sustancia	Cantidad
KH_2PO_4	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.0 g
Yema de huevo	10ml
Agua destilada c.s.p.	100ml

En espermatozoides de mamíferos, la yema de huevo mejora la movilidad posdescongelación porque las fracciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se asocian con las membranas celulares y proveen protección contra daños durante el proceso de crioconservación. La LDL probablemente no solo constituye parte de la yema de huevo sino que también juega un papel importante en la protección de espermatozoides de trucha arco iris contra daños durante el congelamiento y descongelamiento. De estas

observaciones se puede concluir que la presencia de yema en diluyentes basados en DMA o DMSO mejora la fertilización de espermatozoides de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Babiak 2000)

3 7 1 2 DILUYENTES BASADOS EN LECHE

En la Universidad de Pennsylvania fueron efectuadas amplias investigaciones sobre el uso de la leche homogeneizada adicionada de antibioticos mostrando ventajas particulares (Almquist, 1954, 1962) Aunque tambien ha sido usada leche descremada fresca que presenta la ventaja de poder observar movilidad lo cual no es posible con los diluyentes basados en yema de huevo debido a los globulos de grasa presentes

La leche pasteurizada a temperaturas normales contiene una sustancia, la lactenina, que es espermicida el calentamiento de la leche a 90°C o 95°C por 10 minutos inactiva la lactenina Lo unico que se tiene que añadir es antibioticos para controlar los contaminantes microbianos y glicerol si es que se va a congelar el semen

3 7 1 3 DILUYENTE BASADOS EN YEMA DE HUEVO CON CITRATO

El diluyente yema - citrato se prepara mezclando partes iguales de yema de huevo fresco con solucion amortiguadora de citrato Antes que se utilizara el semen congelado la proporcion de yema a solucion amortiguadora era de 1 1 La mayor parte de las investigaciones hasta ahora realizadas en bovinos han demostrado que ocurre una ligera disminucion en la proporcion de vacas no repetidoras, cuando los porcentajes de yema de huevo son menores Cuando se va a congelar el semen una combinacion del 20% de yema y 80% amortiguador da los mejores resultados Se debe añadir penicilina y estreptomicina a las concentraciones recomendadas (Bearden, 1982)

3 7 1 4 OTROS DILUYENTES

Se ha investigado la adición de muchos ingredientes, como azúcares simples, aminoácidos, enzimas, etc., así como la combinación de estos ingredientes. Se han probado también varias concentraciones de yema de huevo y varias proporciones de yema - citrato y leche. Algunas de estas combinaciones han resultado superiores en algunos aspectos a la solución original de yema - citrato, las cuales están siendo usadas en la actualidad.

Los diluyentes simples basados en glucosa proveen una similar y, en algunos casos, mejor protección para el espermatozoide que la registrada con diluyentes más complejos. La aplicabilidad de diferentes crioprotectores, así como de varias fórmulas de diluyentes, los cuales pueden tener efectos sinérgicos, pueden también estar asociados con la técnica específica de crioconservación aplicada (Phronon, 1994).

Generalmente dos tipos de diluyentes han sido desarrollados para la crioconservación de espermatozoides de trucha: medio imitador de plasma seminal y soluciones basadas en carbohidratos simples. Los diluyentes pueden ser suplementados con yema de huevo. El DMSO es usado como el agente crioprotector permeable en trucha arco iris, pero otros crioprotectores como dimetil acetamida (DMA), metanol y la mezcla DMSO - glicerol son también eficientes (Babiak *et al*., 2000).

3 7 2 CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores son necesarios en las soluciones para congelar con el objeto de prevenir el daño celular durante el congelado y descongelado. Se utilizan principalmente tres grupos de crioprotectores:

1 Crioprotectores permeables de bajo peso molecular

Las sustancias mas estudiadas han sido entre otras metanol etilenglicol 1,2 propanediol, DMSO, 2,3 Butanediol, glicerol y otros alcoholes

Su presencia es absolutamente necesaria, reemplazan osmoticamente el agua intracelular en las celulas de embriones y espermatozoides antes del enfriamiento y combinado con tasas controladas de enfriamiento reducen los cambios de volumen celular y minimizan la formacion de cristales de hielo dentro de las celulas

2 Crioprotectores no permeables de bajo peso molecular

Entre las sustancias mas utilizadas estan galactosa, glucosa sucrosa, tetralosa y otros azucares Su accion crioprotectora se basa en la deshidratacion de las celulas antes de la congelacion pero deben ser combinados con crioprotectores de bajo peso molecular para proteger efectivamente las celulas durante la congelacion

3 Crioprotectores no permeables de alto peso molecular (>50 000 daltons)

Entre estas sustancias, se incluye polivinilpirrolidona alcohol polivinilo almidon hidroxietilico hialuronidato de sodio y otros polimeros Estos protegen a las celulas embrionarias durante la congelacion y calentamiento alterando la formacion de cristales de hielo a un tamaño y forma inocuos

Las propiedades de los diferentes crioprotectores sugieren que cada uno protege las celulas y embriones contra el daño por congelacion en una forma especifica y la mas efectiva solucion crioprotectora sera una mezcla de crioprotectores aun por encontrar

Las soluciones crioprotectoras se preparan usualmente en medios bufferados con un pH entre 7.2 y 7.4, los mas usados son PBS, TCM-199 o solucion fisiologica

Un crioprotector debe tener características tales como relativo bajo peso molecular, soluble en soluciones acuosas de electrolitos, atravesar las membranas celulares, ligar una parte de las moléculas y reducir los movimientos de agua a través de la membrana celular

Polialcoholes como el glicerol, regulan la deshidratación y protegen la estructura proteica, mientras que disacáridos como la tetralosa estabilizan la estructura de la membrana. El glicerol por si mismo no solo es un pobre estabilizador de la estructura de la membrana sino que además induce la fusión de la membrana a altas concentraciones y temperaturas (Womersley *et al* 1986). Esto solo se puede superar mediante una remoción rápida del crioprotector luego de la descongelación

El metanol, dimetil sulfoxido (DMSO), ethylenglicol, 1,2 propanediol y glicerol protegen al espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación, por su alta solubilidad en el agua lo que facilita la formación de enlaces de hidrógeno y agua, lo cual le permite mantenerse en solución a temperaturas en que se forman los primeros cristales de hielo. Esta propiedad altera las condiciones físicas del hielo y las soluciones que rodean las células favoreciendo la sobrevivencia celular minimizando los daños electrolíticos causados en la membrana celular por la mayor concentración de iones en la fase líquida (Graham, 1978)

Un factor muy importante a tener en cuenta en el proceso de crioconservación está en la asociación de un crioprotector intracelular (DMSO- Glicerol) o la mezcla de los dos con yema de huevo al 10% (Rurangwa *et al* , 1999)

Stoss y Holts (1983), almacenaron exitosamente semen de Trucha Arco Iris a 0°C durante 34 días en una atmosfera saturada de oxígeno, el semen se hallaba sin diluir pero suplementado con penicilina estreptomicina. En ese año, los mismos autores trabajando en aquella especie compararon la acción de diferentes proteínas adicionadas al diluyente discutiendo la incidencia del uso de material seminal de varios machos en la fertilización de ovas. Igualmente, mostraron las características seminales de la especie antes de congelar y sus muchos efectos post-descongelamiento. En 1983, estudiaron el efecto del DMSO al 20% obteniendo fertilidad del 71 y 51% muestra la importancia de la sucrosa y del KCl en el diluyente, observando que la adición de estas sustancias aumenta la supervivencia espermática.

Cognie *et al* (1989) analizaron el semen de 'carpa común' determinando los efectos que producen las soluciones salinas los crioprotectores (glicerol, propanediol, ETG y DMSO), los diluyentes (Menezo-Inra B2, yema de huevo, urea), la dilución y la tasa de descongelación, concluyendo que el mejor crioprotector es el DMSO, el medio Menezo es el más efectivo, la temperatura de congelación óptima es de -75°C /min de 2 hasta -7°C y de -25°C/min de -7 a -70°C. Bajo estas condiciones la fertilización se encuentra entre 30 y 40 % concluyendo que la célula no sufre mayores efectos en la congelación.

Phronen (1994) observó que los 2 crioprotectores probados en su experimento de composición y crioconservación de espermatozoides de algunos peces teleosteos de agua dulce finlandeses fueron glicerol y DMSO, como se esperaba el potencial de ambos agentes para su uso como crioprotector dependen de su concentración.

El DMSO no mostró un óptimo resultado en *white fish* y *artic charr* pero la concentración óptima del glicerol para estos fue del 20% en volumen correspondiendo también con las observaciones en trucha marrón. También

que el DMSO es el agente crioprotector mas comun para espermatozoides de pez y usualmente es añadido a una tasa de 5 a 15% y fue adoptada para experimentos con salmon donde obtuvo optimos resultados. Por el contrario la aplicabilidad de glicerol ha sido reportada como toxica para espermatozoides no congelados de salmon.

El DMSO se ha usado como crioprotector durante el congelamiento y descongelamiento y provee buena proteccion para espermatozoides de trucha. Este crioprotector reduce la cantidad de hielo que se forma durante el congelamiento, la adicion de algun protector externo (proteinas, fosfolipidos, azucares) puede incrementar la proteccion celular durante el congelamiento y descongelamiento. Se conoce que los crioprotectores externos juegan un papel importante en la estabilizacion de la estructura de la membrana y ellos reducen daños causados por *shock* frio o estres osmotico. La forma como estas sustancias actuan no se conoce bien pero ellos se asocian con la prevencion de la peroxidacion lipidica, daños de fluidez de la membrana y estabilizacion de proteinas de membrana (Anel et al/ 2001).

3.7.3 SISTEMAS DE ENVASE

En la congelacion de muestras es necesario el envasado en recipientes asepticos y seguros donde no exista posibilidad de contaminacion bacteriana o mezcla con otras sustancias. El semen puede ser envasado en ampollas, frascos bien sellados, bolsas plasticas especiales, empaques metalicos o pajillas (Erdahl y Graham 1980).

Una delgada capa de espermatozoides permite una buena oxigenacion evitando un incremento de la glucolisis para que baje el metabolismo espermatico y no disminuya la movilidad espermatica al igual que la fertilidad. Por tanto se recolecta el semen en recipientes plasticos de 200 ml para cultivo celular y

dentro del recipiente usualmente tenidos en refrigeración con capas de espermatozoides individuales de 1-3 mm (Otomar *et al* 2000)

3 7 3 1 Pajillas

La pajilla de plástico de 0,5 ml ha sido el envase de preferencia desde aproximadamente 1970. Las pajillas de plástico con capacidad de 0,25 y 0,3 ml se utilizan en Europa pero no son populares en América.

Una de las mayores ventajas de la pajilla, es el espacio necesario para su almacenamiento. Se pueden almacenar tres veces más pajillas que ampollas en una unidad de campo o de congelación. La mayor parte de los estudios indican que la pajilla de 0,25 ml tiene la ventaja adicional de que incrementa la supervivencia de los espermatozoides debido a que estas pajillas presentan mejor homogeneidad durante el proceso de congelación.

3 7 3 2 Curva rápida de congelación

Este sistema de congelación no es una vitrificación pero al contrario que las técnicas de equilibración lenta, no requiere biocongelador y es notablemente más rápida que la congelación convencional, un proceso de unos 10 a 30 minutos en vez de 2 horas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, localizada a 12 Km. de la ciudad de Villavicencio, capital del departamento del Meta, ubicada a 420 m sobre el nivel del mar. El clima se caracteriza por una temperatura promedio anual de 25°C, precipitación pluvial de 4050 mm y humedad relativa de 75%.



Figura 2. Fotografía de la Estación Piscícola Instituto de Acuicultura de la universidad de los Llanos (IALL).

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 10 machos de yamú, seleccionados con base en su desarrollo corporal (más de 25cm de longitud estándar y 750 gr. de peso corporal), de tres años de edad y condición de madurez sexual. Esta última se evaluó por la presencia de semen en la papila urogenital después de un leve masaje cráneo-caudal del abdomen.

Los ejemplares fueron identificados mediante marquillas plásticas de diferentes colores ubicadas en la aleta dorsal y caudal, fijadas con nylon. A cada animal se le registró sus características morfométricas las cuales se muestran en la Tabla 2.



Figura 3. Fotografía de un ejemplar reproductor de Yamu (*Brycon siebenthalae*).

Tabla 2. Características morfométricas de los reproductores machos de yamú (*Brycon siebenthalae*), de los cuales fue obtenido el semen para crioconservación y semen fresco para muestras control en la prueba de fertilidad, (LT= Largo total, LS= Largo estándar).

Macho	Peso (g)	LT (cm.)	LS(cm.)
1	1720	50.4	46.2
2	1800	49.7	43.6
3	1490	46	38.8
4	1275	44.5	38.1
5	1270	44.6	38.4
6	1230	44.7	36.8
7	1530	46.9	40.2
8	1260	45	36.5
9	1660	49.9	42.4
10	2590	56.1	42.6
Promedio	1430	47.78	40.36

4.3 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA

Tabla 3. Parámetros físico - químicos del agua de estanque donde se encontraban alojados los ejemplares de yamú (*Brycon siebenthalae*) utilizados para la obtención del semen y de los huevos.

PARAMETRO	MEDIA $\pm$ SEM
Dureza (ppm)	17.0 $\pm$ 0.3
Oxígeno disuelto (ppm)	4.5 $\pm$ 0.4
pH	6.5 $\pm$ 0.2
Temperatura (°C)	26.1 $\pm$ 2.8

Todos los parámetros se tomaron en el mismo horario del día (07:00 a 08:00 horas) a una profundidad de 20 cm siempre en la misma margen del estanque. Igualmente, estos parámetros se registraron en las piletas de manejo.

4.4 OBTENCIÓN DE SEMEN Y DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES

Obtención del semen. Los animales se pescaron en las horas de menor intensidad solar para minimizar los efectos adversos de la radiación. Posteriormente fueron trasladados a las piletas de manejo y reproducción (las cuales fueron llenadas previamente con agua de estanque en tierra), 24 horas antes de la extracción del semen. El manejo de los animales se programaron de conformidad con los protocolos de la estación piscícola para esta especie utilizando la inducción hormonal con extracto de hipófisis de carpa (EPC) utilizando una dosis total de 3.2 mg/Kg. dividida en dos aplicaciones de 0.2 y 3 mg/kg. El semen fue extraído ocho horas después de la última inyección.

Los animales se tranquilizaron levemente con tricaina metano sulfonato, (MS-222). (Thompson y Joseph Ltda, U.K). Después de lavado y secado el poro genital se procedió a realizar un masaje cráneo - caudal del abdomen del pez con el fin de producir la salida del semen, el cual se colectó en un tubo de vidrio graduado. El masaje fue suspendido al hallar evidencia de presencia de sangre en el eyaculado. En todos los casos, muestras contaminadas con agua, orina, materia fecal o sangre, fueron descartadas.



Figuras 4 y 5. Fotografía de los estanques en tierra donde permanecieron los ejemplares de yamu (*Brycon siebenthalae*) durante el transcurso de su vida hasta 24 horas antes de la recolección del semen (izquierda). Piletas de manejo de los reproductores para la inducción a la extracción de semen y huevos (derecha).

Evaluación del semen. Inmediatamente después de colectada la muestra se registró las siguientes variables: volumen, color y viscosidad. El volumen se midió en forma directa dentro del recipiente de recolección, expresado en ml y se utilizó para calcular el volumen de semen y el número total de espermatozoides contenidos en la muestra. La viscosidad se calificó subjetivamente en una escala de 0 – 4, siendo 0 el menor grado de viscosidad. Evaluadas las variables anteriores, el tubo permaneció a temperatura ambiente del laboratorio (24.5°C).

Dentro de los 30 minutos siguientes a la colección del semen se evaluó, por triplicado, las siguientes variables.

- **Concentración espermática:** se evaluó el número de células espermáticas por unidad de volumen. Se expresó en millones por mililitro (ml). Para este propósito se utilizó el método del hemocitómetro, el cual ha sido empleado con éxito en muchas especies domésticas (Sorensen, 1982) y en varias de peces (Kavamoto *et al*, 1985; Fogli da Silveira *et al*, 1985; Neira *et al*, 1992). Este método consiste en diluir una muestra de semen (1:800), empleando micropipetas convencionales y luego hacer un conteo individual de los espermatozoides en una cámara de Neubauer. Como diluyente se utilizó solución salina-formol, para causar la muerte e inmovilidad de los espermatozoides (Hickman, 1958).

- **Movilidad:** Después de colectado el semen se tomó una gota y fue colocada en una lámina excavada (5,0 μ m de profundidad), instalada en un microscopio óptico (10X – 40X). La activación de la motilidad se efectuó adicionando 50 μ l de solución de bicarbonato al 1% (solución activadora). Tanto la suspensión de espermatozoides, como la lámina excavada y la solución activadora se mantuvo a la misma temperatura del laboratorio.

- **Viabilidad:** determinó el porcentaje de células muertas en cada muestra de semen. Por medio del método de coloración diferencial, empleando una solución de eosina y como colorante de contraste nigrosina (Swanson y Bearden, 1951) La lámina se observó con microscopio óptico (10X-40X), para estudiar 200 espermatozoides por lámina y realizar la diferenciación correspondiente. El método se basa en que los espermatozoides muertos son permeables a los colorantes y por lo tanto aparecen coloreados en el micro preparado.

4.5 CONGELACIÓN DEL SEMEN

Se utilizaron alícuotas de semen (1 parte), con movilidad superior a 80%. Las muestras se diluyeron en tres volúmenes de solución diluidora (3 partes),

cuya composición fue ajustada a partir de aquellas usadas para otras especies como Tilapia (Harvey, 1983), trucha (Kavamoto *et al*, 1985), cachama (Neira *et al*, 1992), Salmón (Phronen, 1994) y Yamú (Pardo, 2000). Luego el semen fue empacado, posteriormente se procedió a una congelación rápida; primero en vapores de nitrógeno liquido (NL), durante 30 minutos en un termo seco de 5 litros de capacidad y luego sumergidos a -196°C en termos criogénicos (Taylor - Wharton) de NL (Figuras 6 y 7).

Diez días después de la congelación, las muestras de semen se descongelaron y se les realizaron las pruebas de fertilización, siguiendo el protocolo propuesto por Vladic y Jarvi, (1997).

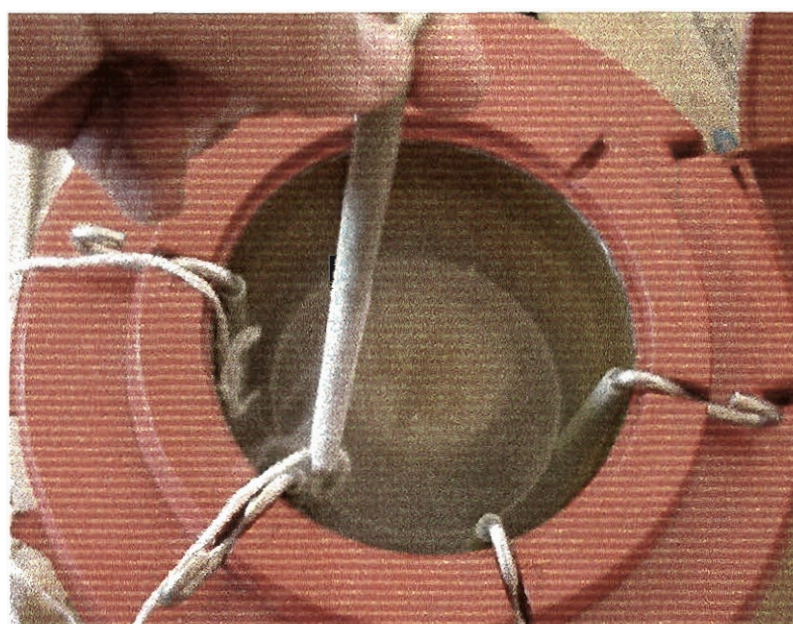


Figura 6. Fotografía en la que se observa el interior de un tanque de nitrógeno líquido. En ella visualizamos la mano del operario quien extrae una canastilla conteniendo las pajillas con el semen conservado.

Se emplearon como crioprotectores el dimetil sulfóxido (DMSO) muy utilizado en estudios de congelación de semen, en los cuales se reporta la observación de efectos positivos en la descongelación del semen (Neira, 1991) demostrando ser el crioprotector de elección en salmónidos, utilizando concentraciones de 5 a 15% (Munkittrick, 1984, citado por Gallant y Richardson 1993). También se usó el Metanol, Propilenglicol y Etilenglicol: en todos ellos se utilizó como diluyente la yema de huevo al 12% y solución glucosada 5.5%. Se evaluaron 24 protocolos de congelación como se encuentran en la (tabla 4 y 5).

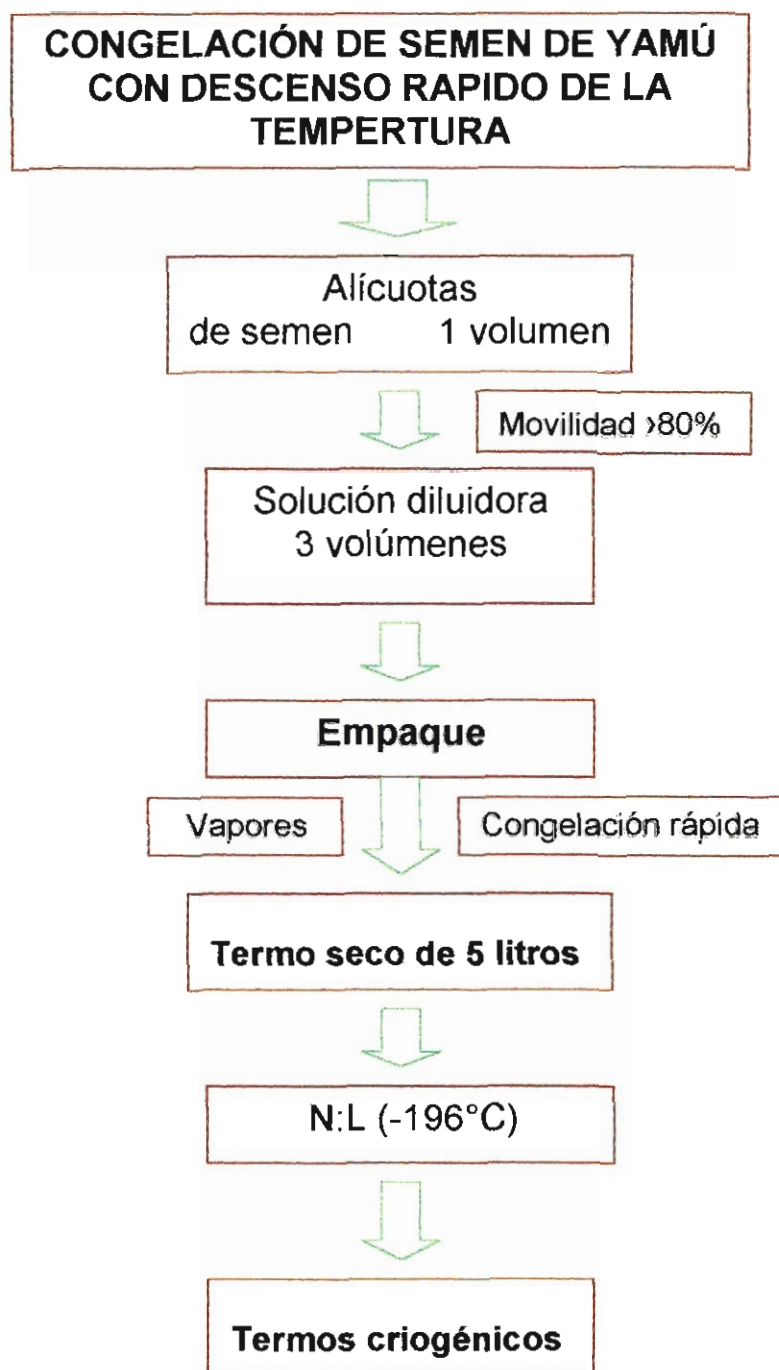


UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

SISTEMA DE BIBLIOTECAS

HEMEROTECA

Viravacento - Meta



- La temperatura fue medida cada 30 seg. durante 30 minutos con termómetro digital (Wbrand)

Figura 7. Diagrama del proceso de crioconservación empleado en el semen de yamú (*Brycon siebenthalae*).

Tabla 4. Composición de los diluyentes de cada uno de los tratamientos utilizados en las pruebas de congelación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*).

	CRIOPROTECTOR	DILUYENTE
Tratamientos	Dimetilsulfóxido (DMSO) (MERCK) 3.75%-5%-7.5%-10%-11.25%-15%	Yema de huevo al 12% Glucosa 5.5% Agua destilada hasta completar el volumen deseado.
	Etilenglicol (SIGMA) 3.75%-5%-7.5%-10%-11.25%-15%	Yema de huevo al 12% Glucosa 5.5% Agua destilada hasta completar el volumen deseado.
	Propilenglicol (SIGMA) 3.75%-5%-7.5%-10%-11.25%-15%	Yema de huevo al 12% Glucosa 5.5% Agua destilada hasta obtener el volumen deseado
	Metanol (MERK) 3.75%-5%-7.5%-10%-11.25%-15%	Yema de huevo al 12% Glucosa 5.5% Agua destilada hasta obtener el volumen deseado

Tabla 5. Descripción de los 24 tratamientos de crioconservación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*) sometidos a prueba, indicando el diluyente y crioprotector empleado.

TRAT.	DILUYENTE Y CRIOPROTECTOR	TRAT.	DILUYENTE Y CRIOPROTECTOR
1	Yema DMSO 3.75%	13	Yema PPG 3.75%
2	Yema DMSO 5%	14	Yema PPG 5%
3	Yema DMSO 7.5%	15	Yema PPG 7.5%
4	Yema DMSO 10%	16	Yema PPG 10%
5	Yema DMSO 11.25%	17	Yema PPG 11.25%
6	Yema DMSO 15%	18	Yema PPG 15%
7	Yema ETG 3.75%	19	Yema Metanol 3.75%
8	Yema ETG 5%	20	Yema Metanol 5%
9	Yema ETG 7.5%	21	Yema Metanol 7.5%
10	Yema ETG 10%	22	Yema Metanol 10%
11	Yema ETG 11.25%	23	Yema Metanol 11.25%
12	Yema ETG 15%	24	Yema Metanol 15%

4.6 SISTEMAS DE ENVASADO

Se utilizaron pajillas de 0.5 ml (IMV), previamente identificadas mediante una marca con marcador permanente y posteriormente selladas con polivinilo, de acuerdo a la experiencia citada por diferentes autores en otros trabajos de

investigación (Bearden, 1982; Fogli da Silveira *et al*, 1985, Vladic y Jarvy, 1997).

4.7 CURVA RÁPIDA DE CONGELACION:

Se empleó la curva de congelación rápida, así:

Descenso rápido de temperatura: primero fue colocado el semen en tubos de ensayo graduados junto con los diluyentes y se mantuvo a temperatura ambiente ($\pm 24.5^{\circ}\text{C}$). Bajo estas condiciones el semen fue diluido y empacado en pajillas plásticas de 0,5ml. Luego se llevaron directamente a vapores de nitrógeno líquido en un termo seco de 5 litros, colocando las pajillas en una canastilla. La temperatura se midió (precisión $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$) cada 30 segundos durante 30 minutos, utilizando un termómetro digital (W Brand). Al cabo de los 30 min. las pajillas se sumergieron en NL (-196°C).

4.8 FERTILIZACIÓN

Después de identificar dentro de cada uno de los tratamientos los mejores índices de movilidad, viabilidad y duración de la movilidad (tiempo de activación) se seleccionó de cada crioprotector el mejor resultado (tabla 6): se realizó la prueba de fertilidad con tres repeticiones por cada uno de ellos, utilizando semen crioconservado durante un periodo de 10 días de los tratamientos antes mencionados, y se evaluó posdescongelación en baño María a temperatura de 35°C durante 1 minuto y activado con solución de bicarbonato al 1% y como referencia o tratamiento control se utilizó semen fresco de otros ejemplares de yamú con huevos de la misma hembra.

Para estas pruebas de fertilización fueron seleccionadas hembras sexualmente maduras vírgenes de 3 años de edad, que presentaron ovocitos con predominancia de posición excéntrica de la vesícula germinativa (Bruzka, 1979). La ovulación fue inducida hormonalmente con extracto de hipófisis de

carpa (5.75mg.kg^{-1} de EPC) dividida en tres dosis: preparatoria (0.25 mg.kg^{-1}), primera (0.5 mg.kg^{-1}) y definitiva (5.0 mg.kg^{-1}). Los huevos se obtuvieron por estrujamiento abdominal dirección cráneo - caudal, se colocó la hembra sobre una espuma plástica y con toallas suaves se procedió a secar el poro genital para evitar el contacto de los óvulos con agua, ya que al contacto se inicia la hidratación favoreciendo el cierre del micrópilo, lo que impide el ingreso del espermatozoide, en consecuencia no se produce la fecundación y luego fertilizados con el semen descongelado y semen fresco como muestra control.

Se realizaron las pruebas de fertilidad dependiendo de la cantidad de huevos colectados por cada hembra y teniendo en cuenta que para estas pruebas no se mezclaron huevos de dos hembras diferentes ya que podrían alterar los resultados, utilizando una proporción correspondiente a 3.0 g (4200-4500 aproximadamente) de huevos por prueba, los cuales se fertilizaron con 0.5 ml de semen descongelado e incubados en recipientes plásticos de 2.5 litros. Simultáneamente la prueba control fue realizada con la misma cantidad de huevos y 0.17ml de semen fresco correspondientes aproximadamente a la misma proporción del semen congelado.

Los huevos se mezclaron con el semen agitándolos suavemente, luego se activó el semen con solución de bicarbonato de sodio al 1% en cantidad suficiente para cubrir completamente los huevos durante 1 minuto a partir del cual se comienzan a lavar con agua de las incubadoras por seis a siete veces para retirar de ellos cualquier residuo, tanto de los crioprotectores como del bicarbonato; se dejaron hidratar durante 20 minutos tiempo durante el cual se agitaron suavemente mediante el uso de una pluma y se sembraron en las incubadoras experimentales, a las 6 horas después se evaluó la fertilidad tomando una muestra de 100 huevos con un tubo de vidrio haciendo esto por triplicado.

Tabla 6. Esquema de evaluación posdescongelación y fertilización del semen de yamú (*Brycon siebenthalae*) para cuatro crioprotectores en diferentes concentraciones.

TRAT.	DILUYENTE Y CRIOPROTECTOR	MOVILIDAD (%)	T.A (Seg.)	VIABILIDAD (%)	FERTILIDAD (%)
1-6	Y – DMSO 3.75-15%				
7-12	Y –ETG 3.75-15%				
13-18	Y –PPG 3.75-15%				
19-24	Y-MET 3.75-15%				

Trat = Tratamiento

T.A= Tiempo de Activación

DMSO=Dimetilsulfóxido

GLY= Glicerol

ETG=Etilenglicol

PPG= Propilenglicol

MET=Metanol

Y=Yema de huevo

4.9 ANÁLISIS DE LOS DATOS

En el análisis de los datos pre y posdescongelación se incluyeron los datos de todos los protocolos, con excepción de las pruebas de fertilidad en las cuales solamente se estudió el tratamiento con mejor resultado de cada uno de los crioprotectores. Los resultados de las características seminales se analizaron estadísticamente, calculándose la media, la desviación estándar y el error estándar de la media. Los resultados de los tratamientos de congelación se sometieron a análisis de varianza, seguido de la prueba de Tukey. Para este propósito se utilizó el software SYSTAT, versión 7.0 (1997), SPSS Inc. En todos los casos, se consideró un $p < 0.05$ como suficiente para revelar diferencias estadísticas significativas.



5 RESULTADOS

Fueron utilizados 7 reproductores machos vírgenes de tres años de edad de los cuales fueron recolectadas siete muestras de semen para congelación, y 3 machos de las mismas características como pruebas control en fertilización, a partir de las cuales se obtuvo los datos de características seminales de la especie. Previo a la extracción del semen los animales fueron inducidos hormonalmente (3.2 mg/Kg) con extracto de hipófisis de carpa (EPC). Los muestreos fueron realizados en los meses de Marzo a Mayo del 2002.

CARACTERISTICAS SEMINALES

Macroscópicas

El volumen seminal promedio por ejemplar fue de 10.7 ml, medido directamente en el tubo graduado de recolección. El color predominante fue blanco de apariencia lechosa y de consistencia semidensa. Las características de las muestras son presentadas en la (Tabla 7).

Microscópicas

El promedio de la concentración espermática de los 10 ejemplares fue de 7.598×10^6 espermatozoides por mililitro de semen, la movilidad del semen fresco fue superior al 90%. El tiempo de activación promedio se calculó después de la activación con agua apirógena o solución de bicarbonato de

sodio al 1% los resultados se presentan en la (Tabla 7). La figura 20 muestra un espermatozoide de Yamú.

La viabilidad del semen fresco, estimada mediante coloración supravital de eosina-nigrosina, fue de 97.2%, fluctuando entre 96% y 98%. La viabilidad del semen posdescongelación fue del 90.75% fluctuando entre el 96% y 79%.

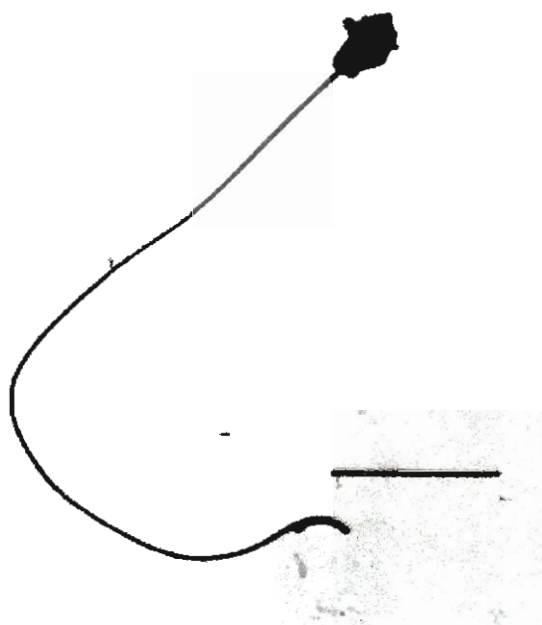


Figura 20. Microfotografía de un espermatozoide de yamú (*Brycon siebenthalae*). Barra=5 micras.

Tabla 7. Características seminales de ejemplares de yamú (*Brycon siebenthalae*) tratados con extracto de hipófisis de carpa (3.2 mg/Kg, i.m.) n=10.

Característica	Medias	SD	SEM	Valor mínimo	Valor máximo
Peso (gr.)	1582.5	410.8	129.9	1230	2590
LT (cm.)	46.8	0.8	46	44.5	50.4
LS (cm.)	40.1	3.3	1.1	36.5	46.2
Volumen (ml)	10.6	0.9	0.6	7	13.5
Color	Blanco	----	----	----	----
Apariencia	Lechoso	----	----	----	----
Movilidad (%)	91.6	2.5	1.0	90	95
T.A (seg.)	39.8	2.7	1.1	37	45
(sptz/ml)x10 ⁶	7598	4180.9	1322.1	4080	16920
Sptz/Kg. peso x10 ⁶	54600	34700	10900	21300	129200
Sptz/eyaculado x10 ⁶	82300	47500	15000	36700	164100

CURVAS DE CONGELACION

Para todos los casos se empleó la curva de descenso rápido de la temperatura. Se realizó de la forma como se describe en la metodología de congelación rápida. El empacado se realizó en pajillas de 0.5ml y selladas con polivinil. La velocidad de descenso de la temperatura desde 24.3°C hasta -51°C fue de 150°C. min⁻¹, desde -51°C hasta -142°C fue de 60.6°C. min⁻¹, desde -142°C hasta -169°C de 7.7°C. min⁻¹ y desde -169°C hasta -189°C fue de 0.8°C. min⁻¹

según la ilustración (Figura 8 y tabla 8) de las curvas rápidas de congelación.

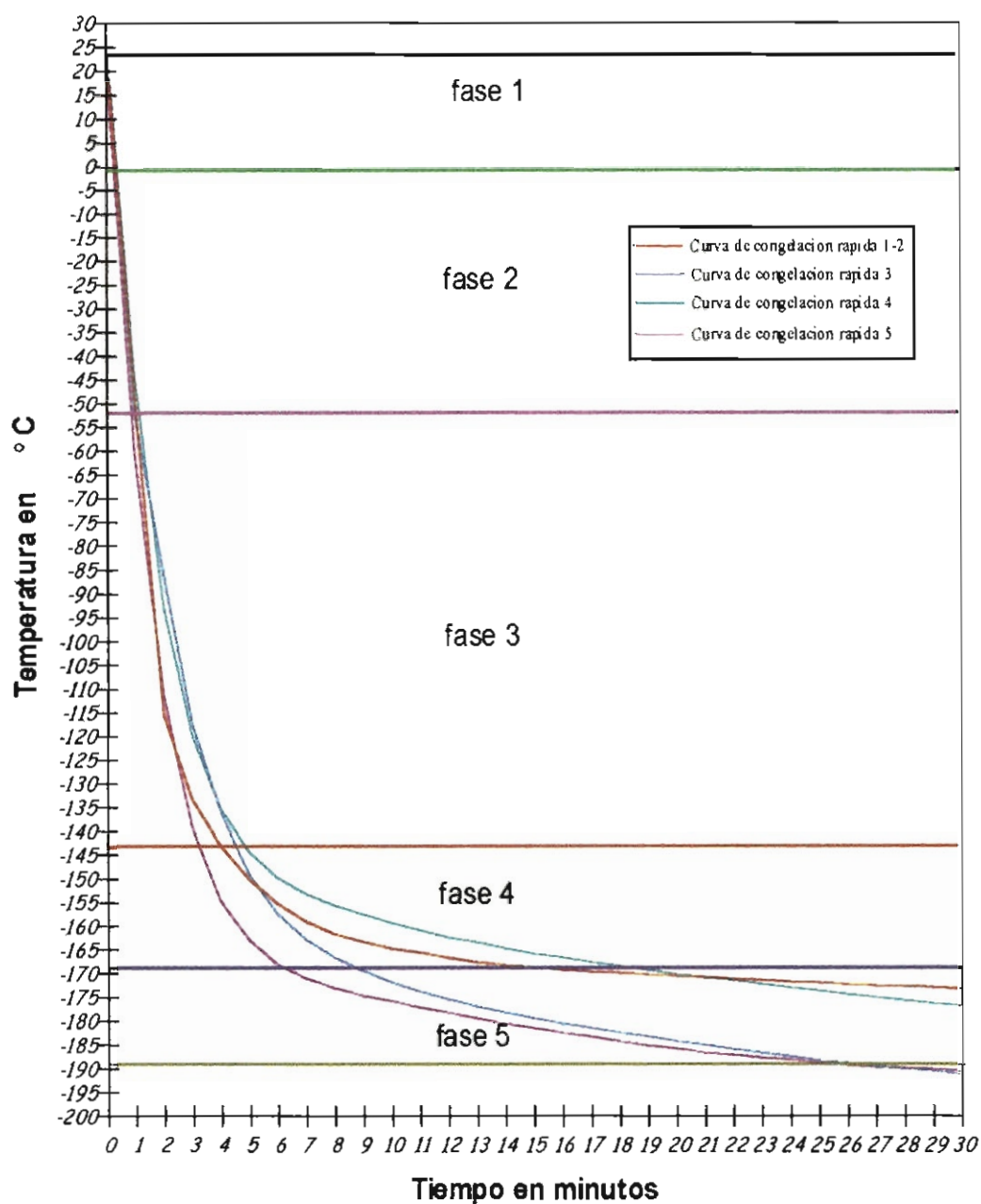


Figura 8. Las cinco curvas de descenso rápido de la temperatura empleadas en la congelación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*). Podemos apreciar cinco fases durante el descenso hasta la inmersión en nitrógeno líquido mostrando gran similitud entre ellas.

Tabla 8. Características de las cinco curvas rápidas de congelación empleadas en la crioconservación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*).

Tiempo (min.)	Media	SD	SEM	Valor mínimo	Valor máximo
0	24.3	2.2	1.1	21.1	26.1
0.5	-51	6.8	3.4	-60.1	-44
2	-142.2	8.9	4.4	-154.6	-135.5
5.5	-169.3	7.4	3.7	-177.1	-160.8
30	-189.7	7.2	3.6	-195.6	-179.9

Tres días después se evaluaron 5 pajillas de semen de cada uno de los tratamientos formulados en la (Tabla 5), mostrando diferentes % de movilidad y tiempo de activación.

CONGELACIÓN DE SEMEN

El semen de yamú (*Brycon siebenthalae*) diluido en una solución de glucosa con yema de huevo y DMSO 5%, congelado por el método de descenso rápido de la temperatura, presentó una movilidad posdescongelación de $76 \pm 2.4\%$, y tiempo de activación de 88 ± 6.1 segundos, cuando se empleó el etilenglicol al 3.75% la movilidad fue de $67 \pm 2.2\%$ y el tiempo de activación de 80 ± 3 segundos; para el propilenglicol al 3.75 la movilidad fue de $62 \pm 2.6\%$ y tiempo de activación 84 ± 4.1 segundos. Así mismo, cuando se empleó el metanol al 3.75% la duración del tiempo de activación fue de $43 \pm 3.1\%$ y la duración de la movilidad de 74 ± 3.8 segundos.

En todos los casos fue utilizada solución de bicarbonato de sodio al 1% como solución activadora.

Posteriormente con los resultados obtenidos se procedió a elegir un tratamiento de cada uno de los crioprotectores teniendo en cuenta el porcentaje de motilidad sin que en algunos casos hayan demostrado

diferencias significativas estadísticamente, únicamente de tipo numérico. Con estos tratamientos se realizaron las pruebas de fertilidad del semen crioconservado, al igual que a una muestra de semen fresco como tratamiento control. Los cuatro tratamientos elegidos se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9. Porcentaje de motilidad y tiempo de activación de los cuatro tratamientos elegidos para realizar las pruebas de fertilidad de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*). ($P < 0.05$).

CRIOPROTECTOR	CONCENTRACION	% MOVILI	SEM % MOVILI.	T. ACTIVAC Segundos	SEM T.A
DMSO	5.00%	76.0	2.4	88.2	6.1
ETG	3.75%	67.5	2.3	83.4	3.1
PPG	3.75%	62.0	2.6	83.9	4.1
MET	3.75%	43.5	3.1	73.7	3.8

Podemos observar el Metanol que presentó los más bajos porcentajes de motilidad posdescongelación ($43.5\% \pm 10$) y más aún no se observó motilidad cuando se utilizaban altas concentraciones, presentó porcentajes de fertilidad altos ($47.8\% \pm 8.4\%$) Como lo podemos observar en la figura 19; siendo el segundo dato más alto luego del Propilenglicol.

Pasados 10 días de la congelación de las pajillas bajo los protocolos 2, 7, 13 y 19 (Tabla 5); los cuales habían demostrado los mayores porcentajes de movilidad posdescongelación, fueron realizadas dos pruebas de fertilidad organizadas en: un grupo control semen fresco activado con bicarbonato ($n=10$), semen crioconservado con DMSO 5% activado con bicarbonato ($n=10$), semen crioconservado con etilenglicol 3.75% activado con solución de bicarbonato de sodio ($n=10$), semen crioconservado con propilenglicol

3.75% activado con bicarbonato ($n=10$) y semen crioconservado con metanol 3.75% activado con bicarbonato ($n=10$).

Cada prueba consistió en fertilizar 3 g de huevos con 0.5 ml de semen congelado y la misma cantidad de huevos con 0.17 ml de semen fresco y fueron incubados en recipientes plásticos de 2.5 l, la fertilidad fue evaluada 6 horas después de incubados los huevos, el grupo control presentó el porcentaje de fertilidad más alto ($64.7\% \pm 1.7\%$), seguido del propilenglicol 3.75% ($50\% \pm 1.4\%$) y el metanol al 3.75% ($47.8\% \pm 1.4\%$). El grupo control tuvo diferencias altamente significativas con todos los tratamientos evaluados ($p < 0.001$, ANOVA seguido de Tukey-Kramer). El DMSO 5% además de su diferencia con el grupo control, presentó la misma con los otros tres tratamientos (MET, ETG, PPG).

Los resultados de la prueba de fertilidad se observan en la tabla 10.



Figura 9. Fotografía de la extracción manual de huevos de una hembra de yamú (*Brycon siebenthalae*).

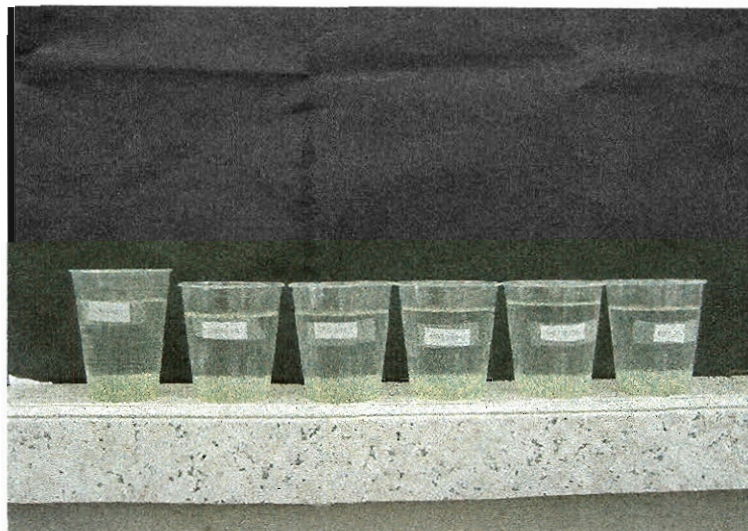


Figura 10. Fotografía del momento en que se hidratan huevos de yamú fertilizados con los tratamientos estudiados.



Figuras 11 y 12. Fotografías de los tanques experimentales en donde se llevo a cabo la incubación de los huevos de yamú fertilizados. A la derecha se observan detalladamente las incubadoras experimentales utilizadas en este estudio.

TABLA 10. Resultados de la prueba de fertilidad y valores ajustados al control como 100% realizadas al semen crioconservado de yamú (*Brycon siebenthalae*). ($P<0.05$).

TRATAMIENTO	% FERTILIDAD	SEM % FERTILIDAD	PORCENTAJE DEL CONTROL
CONTROL	64.7	1.7	100.0%
DMSO 5%	19.5	2.9	30.0%
ETG 3.75%	41.8	2.4	64.6%
PPG 3.75%	50.0	1.4	77.3%
MET 3.75%	47.8	1.4	73.9%

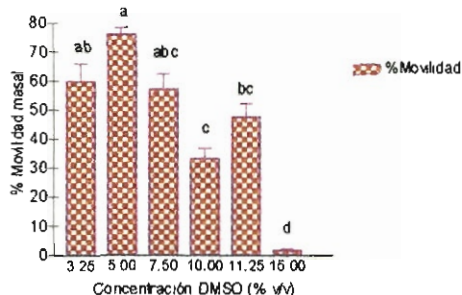


Figura 13. Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamú criopreservado durante 72 horas con diferentes concentraciones de dimetilsulfóxido (DMSO) y activado con bicarbonato de sodio al 1% (1;10). Grupos con superscripción común no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

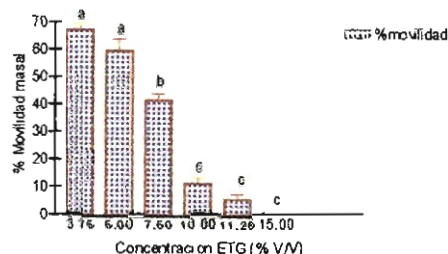


Figura 14. Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamú criopreservado durante 72 horas con diferentes concentraciones de etilenglicol (ETG) y activado con bicarbonato de sodio al 1% (1;10). Grupos con superscripción común no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

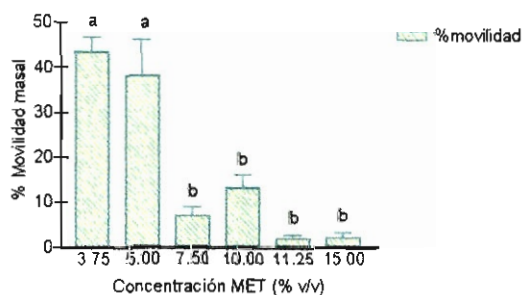


Figura 15. Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamú criopreservado durante 72 horas con diferentes concentraciones de metanol (MET) y activado con bicarbonato de sodio al 1% (1;10). Grupos con superscripción común no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

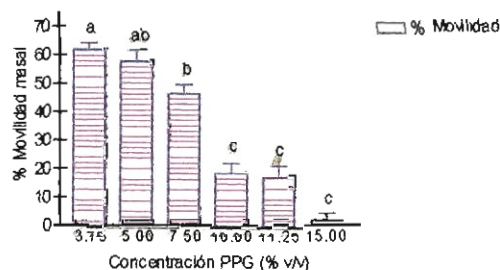


Figura 16. Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamú criopreservado durante 72 horas con diferentes concentraciones de propilenglicol (PPG) y activado con bicarbonato de sodio al 1% (1;10). Grupos con superscripción común no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

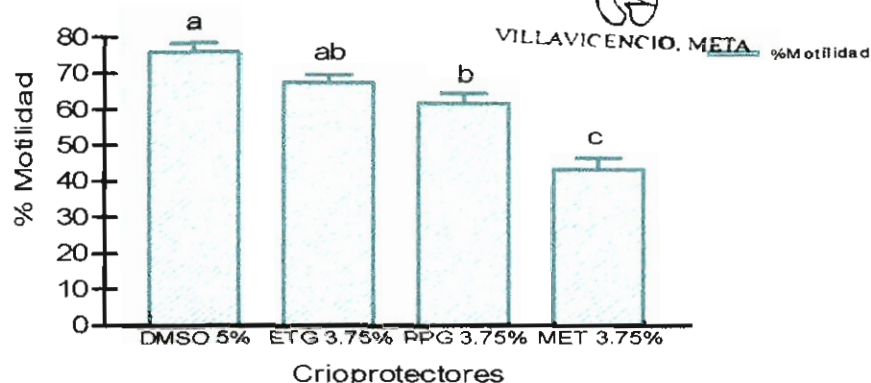


Figura 17. Movilidad espermática posdescongelación de semen de yamú crioconservado durante 72 horas con diferentes crioprotectores y activado con bicarbonato de sodio al 1% (1:10) Grupos con superscripción común no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

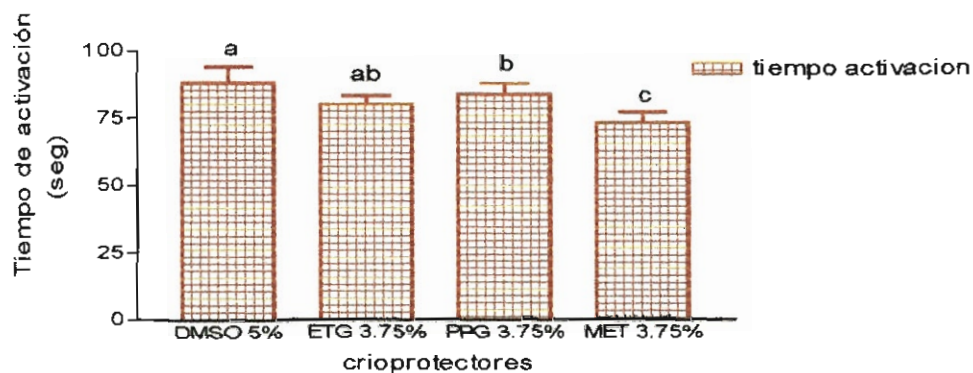


Figura 18. Tiempo de activación posdescongelación de semen de yamú crioconservado durante 72 horas con diferentes crioprotectores y activado con bicarbonato de sodio al 1% (1:10) Grupos con superscripción común no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

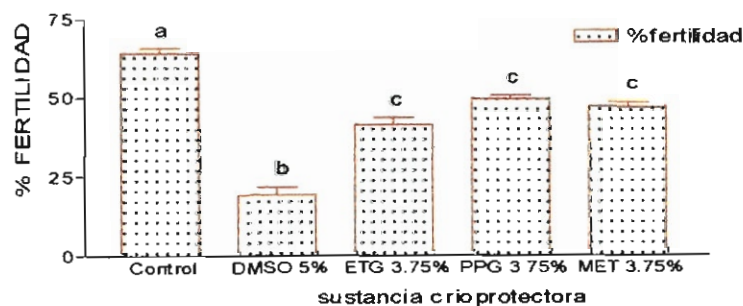


Figura 19. Porcentaje de fertilidad después de emplear semen fresco y semen descongelado (873000 espermatozoides por huevo) activado con bicarbonato de sodio al 1% (1:10) Grupos con superscripción común no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

DISCUSION

El semen de yamú (*Brycon siebenthalae*) no manifestó variación marcada entre los diez individuos estudiados respecto al color blanco y apariencia lechosa, sin embargo encontramos diferencia con los reportes de (Pardo, 2000) quien encontró una apariencia cremosa para esta misma especie. Es debido a mayor producción de liquido seminal producido por las glándulas en cada uno de los reproductores a consecuencia de la terapia hormonal. En otra especie como bagre rayado (*Pseuplatystoma fasciatum*) se reportan similares estas características (Pinzón y Mojica, 2001).

Según el estudio de Pardo (2000) reporta volúmenes entre 0.9 y 3 ml para yamú, muy por debajo de los registrados en este estudio en el que se obtuvo valores de 7 y 13.5 ml., debido a la inducción previa a la colecta realizada con EPC (extracto de hipófisis de carpa). Podemos deducir que posiblemente los ejemplares han logrado una mayor adaptación al cautiverio que los trabajados por Pardo hace dos años. Ya que en otros reportes en especies como cachama blanca, Cortés (1991) se observan volúmenes mayores (11.3 ml) en animales de río con respecto a (2.1 ml) para animales en cautiverio. Neira *et al.* (1991) encontraron volúmenes de 0.61 ml en cachama (*Piaractus brachypomus*), Silveira *et al.* (1994) reportaron para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) un volumen de 8.0 ml.

La concentración espermática ($7.598 \times 10^6 \pm 1322$ spz/ml) mostró datos inferiores a los obtenidos por Pardo (2000) cuya concentración media es 13.306×10^6 spz/ml en semen de yamú, posiblemente por encontrar

mayores proporciones de líquido seminal y se correlaciona con la apariencia lechosa que indica menor concentración del semen.

De la misma forma con la movilidad espermática, se obtuvo valores superiores (91.6%), ya que Lombo (2000) en yamú muestra valores de 88% y Pardo (2000) para la misma especie obtuvo valores de 86% el mayor valor de movilidad es atribuible a la solución activadora (bicarbonato de sodio al 1%) , al igual que se encuentran menor número de espermatozoides inmersos en el líquido seminal que pueden aprovechar la energía que este les suministra.

En cuanto al tiempo de activación en semen fresco se vio disminuido (28 seg.) al emplear agua destilada como solución activadora y presentó valores superiores (39.8 seg.) al utilizar bicarbonato de sodio al 1%, probablemente porque las soluciones salinas evitan la muerte por choque osmótico (Baynes & Scott, 1987) lo que no ocurre con el agua dulce. Sin embargo Lombo (2000) reporta que la solución salina fisiológica al 0.9% no induce la activación espermática en yamú.

La viabilidad observada concuerda con los reportes hechos por Pardo (2000), cuyo valor es del 95% para semen criopreservado en DMSO 10% con yema de huevo y donde queda demostrado el potencial de fertilización de la especie. Valores muy similares (91%) fueron observados por Brand Op. cit, para bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y de 92% según Pinzón y Mojica (2001).

Los valores de movilidad posdescongelación de los tratamientos 1 yema-DMSO3.75% ($60\% \pm 6.3\%$) y 2 yema-DMSO5% ($76\% \pm 2.4\%$) no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos; pero superan a los demás tratamientos criopreservados con la misma solución (tratamientos 3, 4, 5 y 6), no obstante elegimos el segundo tratamiento para las pruebas de fertilidad por presentar el valor más alto.

En cuanto al ETG los tratamientos 7 yema-ETG3.75% ($67.5\% \pm 2.3\%$) y 8 yema-ETG5% ($60\% \pm 4.5\%$) presentaron los valores más altos de movilidad con este crioprotector no presentando diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$) y superan a los tratamientos 9, 10, 11 y 12 en los que se utilizó la misma solución diluidora y crioprotector, de ellos seleccionamos el tratamiento 7 cuyo valor fue el más alto.

De la misma manera, los tratamientos 13 yema-PPG3.75% ($62\% \pm 2.6\%$) y 14 yema-PPG5% ($58\% \pm 3.7\%$) mostraron los valores más altos no presentando diferencias significativas ($P > 0.05$), de ellos elegimos el tratamiento 13 para realizar las pruebas de fertilidad.

Los tratamientos 19 yema-MET3.75% ($43.5\% \pm 3.2\%$) y 20 yema-MET5% ($38\% \pm 8\%$) igualmente presentaron los mejores valores sin diferencias significativas ($P > 0.05$); siendo seleccionado el tratamiento 19 para efectuar las pruebas de fertilidad.

Entre los cuatro tratamientos elegidos el tratamiento 2 (Yema - DMSO 5%) presentó el mejor porcentaje de motilidad ($76\% \pm 2.4\%$) superando al reportado por Pardo (2000) para yamú (*Brycon siebenthalae*) ($35\% \pm 15\%$); se atribuye a las diferencias en las curvas de congelación ya que en este estudio se utilizó un termo seco de nitrógeno líquido que permitió mayor homogeneidad de la temperatura y eficiencia de la curva rápida (descensos hasta de 150°C por minuto) en la primera fase, pero no presenta diferencias significativas ($p > 0.05$) con el tratamiento 7 (Yema - ETG 3.75%) obtenido en el presente estudio, los tratamientos 7 (yema-ETG 3.75%) y 13 (yema-PPG 3.75%) tampoco presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos. Presentándose diferencias entre los tratamientos 2 y 13 ($p < 0.05$), 2 y 19 ($p < 0.001$), 7 y 13 ($p < 0.001$).

En estudios realizados por Fabroclini et al (2000), determinaron que el etilenglicol y propilenglicol al 10%, y DMSO 5% mostraron los menores

efectos tóxicos sobre la movilidad precongelamiento en semen de seabream (*Sparus aurata*), en nuestro estudio para yamú se encontró que los crioprotectores estudiados a concentraciones de 10 % y 15% no juegan papel importante en crío preservación de semen para esta especie.

Entre el MET3.75%, PPG 3.75%, ETG3.75% (según el test de múltiples comparaciones de Tukey-Kramer, $p > 0.05$) no mostraron diferencias significativas.

El grupo control con el 64.7% de fertilidad fue similar al registrado por Pardo 2000 (71.6%) para semen de yamú (*Brycon siebenthalae*) y a la fertilidad para semen de *Cyprinus carpio* (68%) Otomar *et al.* (2000), pero inferior al registrado por Babiak *et al.*, 2000 (92-93%) en semen fresco de trucha arco iris y (89%) para la misma especie según Cabrita *et al.*, 2001.

En cuanto al semen congelado el porcentaje de fertilidad del ETG, PPG y MET es similar al registrado para semen congelado de carpa común ($56\% \pm 10\%$) Otomar *et al.*, 2000 en el que se utilizó el DMSO, a pesar de que en nuestro estudio el DMSO presentó la fertilidad más baja (19.5%) que es cercana a la obtenida por Pardo (2000) para yamú (25.5%) debido a daños en la integridad de la membrana que son imperceptibles al microscopio óptico utilizado en este estudio. Cabrita *et al.*, (2001) reportaron valores similares a los del presente trabajo en semen de carpa común (61%, 73.9%, 71%, 62% y 65%) cuando adicionaron yema de huevo a los tratamientos.

CONCLUSIONES

Un protocolo que puede ser eficiente para la congelación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*), consiste en utilizar una curva rápida de congelación, mediante inmersión en vapores de nitrógeno líquido empleando un termo seco, el cual proporciona homogeneidad en el descenso de la temperatura.

La utilización de El DMSO puede producir porcentajes de movilidad posdescongelación significativamente altos ($76\% \pm 5.4\%$); sin embargo, la fertilidad es menor ($19.5\% \pm 2.9\%$), cuando comparada con otras sustancias crioprotectoras, lo cual puede sugerir la ocurrencia de daños irreversibles sobre la membrana plasmática del espermatozoide.

Por su parte, el uso Metanol puede ser útil como crioprotector para semen de yamú, siempre y cuando su concentración en el diluyente sea cercana al 5%.

Los cuatro crioprotectores estudiados, con adición de yema de huevo y glucosa permiten la congelabilidad de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*), al usarse en proporciones menores o iguales al 5%.

Los resultados obtenidos indican que es posible crioconservar semen de yamú (*Brycon siebenthalae*), sin necesidad de la utilización de costosos aparatos computarizados.

RECOMENDACIONES

Precisar los requerimientos del número mínimo de espermatozoides para fertilizar una cantidad conocida de huevos de la especie, así como el posible efecto de la relación volumen de la dosis inseminante y volumen de huevos a fertilizar, con el propósito de estandarizar una dosis de semen de utilización práctica a nivel de granja.

Con base en los resultados que se obtengan del desarrollo de la recomendación anterior, evaluar otros sistemas de empaque, tales como pajillas de 0.25 ml, que permiten una mayor homogeneidad de temperatura en la congelación, así como la utilización de empaques mayores (macrotubos de 1.8 y 5.0 ml), para obtener dosis inseminantes apropiadas para fines comerciales.

Realizar protocolos en los que se estudie la utilización de sustancias crioprotectantes alternativas, o mezclas de ellas, con el propósito de mejorar los índices de fertilidad reportados en este trabajo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ DE LEÓN, M. 1991. Contribución al conocimiento de los peces de los Llanos, Anatomía e histología básica del Yamú. *Brycon* sp. Villavicencio, 1991. 95p. Trabajo de grado (Médico Veterinario y Zootecnista). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad de los Llanos
- AMARAL, C. A. 1994. Sobre la subfamilia Bryconinae. Dissertação de mestrado, INPA/FUA, Manaus, 104p.
- ANEL, L. Cabrita, E. 2000. Effect of external cryoprotetants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. Departament of animal pathology Leon University, Spain. Theriogenology march 13, 2001, pp 623-635.
- APHA-AWWA-WPCF. 1992. Standard methods for the examination of waters and wastewater (17 ed). Díaz de Santos. Madrid, 750p.
- ARIAS, C.J.A. 1995. Contribución al conocimiento biológico de los peces de los Llanos, yamú (*Brycon siebenthalae*) y sapuara (*Semaprochilodus laticeps*), con fines de cultivo. Infor. Final. UNILLANOS-COLCIENCIAS. Villavicencio, 65p.
- ARIAS, C.J.A. 1988. Contribución al conocimiento biológico de los peces de los Llanos, yamú (*Brycon* sp) y sapuara (*Semaprochilodus* sp), con

- fines de cultivo. Infor de Avanc. UNILLANOS-COLCIENCIAS. Villavicencio, pp. 18-22.
- ARIAS, C.J.A. 1996. Contribución al conocimiento de los peces de los Llanos, anatomía, histología y fisiología del yamú *Brycon siebenthalae*. Eingenmann, 1912. En Mem. 3er. Simp. Col. de Ictiol. Barranquilla. Pp51.
- ARIAS, C.J.A; PARDO, C.S.C. 1997. Estimación de parámetros básicos del cultivo y alimentación del yamú. Proy. de Inv. UNILLANOS-IALL-PLANTE. Villavicencio, 11p.
- BABIAK, I. GLOGOWSKY, J. 2000. Effect or extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. Departament of animal Biocheistry, Warmia and mazury University in Olsztyn, Poland. Theriogenology december 29, 2000, pp 177-192
- BELMONT, R. A. F. 1986. Reprodução induzida de Pirapitinga do Sul, *Brycon sp.*, metodología e retrospectiva da produção de alevinos pela CESP. En: res. IV Simp. Bras. De Aquic, Cuiabá, 34p.
- BERGAN, P.y; GAUSEN, D; HANSEN, L. P. 1991. Attempts to reduce the impact of rered Atlantic salmon on wild in Norway. *Aquaculture* 98, 319-324.
- BIELANSKI A. 1987. Survival in vitro of bovine demi-embryos after freezing by slow cooling rates and vitrification. Theriogenology 29:223 abstr.
- BILLARD, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition and Development*, 26, 877-920.

- BILLARD, R.; COSSON, M. P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261:122-131.
- BRAND, B. 1996. Caracterización y preservación del semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linnaeus, 1766). Santa fe de Bogotá D.C. Trabajo de grado (Biólogo marino). Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina.
- BRUZKA, E. 1979. The in vivo Method of estimating the stages of maturation in carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Hydrobiol.* V. 21. p. 243-433.
- BUILES, J; URAN, A. 1974. Estudio del ciclo sexual de la sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, su comportamiento y fecundación artificial. *Actu. Biol. Univ. de Antioquia*, Medellín 3(7)5-7.
- BUILES, J; URAN, A. 1979. Estudio del ciclo macro-microscópico de la gónada de la sabaleta *Brycon henni* Eigenman, su comportamiento, fecundación artificial y primeras etapas del desarrollo. Univ. de Antioquia-Colciencias. Pp 1-4
- CIERESZKO, A; DABROWSKI, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109, 367-373.
- CLOUD, J.G.; MILLER, W. H.; LEVANDUSKI, M. J. 1990. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. *Prog. Fish Cult.* 52, 51-53.
- DUMONT-NETO, R; PELLI, A; LUCAS, J. LEMOS, C.; EMIDIO, A; DULCE, N. 1996. Primeira maturação sexual e reprodução inducida de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849, Eigenmann, 1903) cultivada en cautiverio, na Estação de pesquisa e

- desenvolvimiento Ambiental de Volta Grande-CEMI/EPDA/VG. En: resumos do IX Simp. Bras. de Aqüi. Sete Lagoas. Edit ABRA SP. 180p
- ECKMANN, R. 1884^a. Reproducción inducida mediante hipofización en *Prochilodus of nigricans* y *Brycon cf. Erythropterus*. En: Mem. 5 Simp. Asoc. Lat. Acuic., Valdivia, 5: 563-566.
- ECKMANN, R. 1984b. Induced reproduction in *Brycon cf. Erythropterus*. *Aquaculture*, 38(4):379-382.
- EINGENMANN, C. H. 1912. The Freshwater Fishes of British Guayana. *Canegie Ins. Pittsburch.*, 5: 370-372.
- EIGENMANN, C. H.; ALLEN, W. R. 1942. Fishes of Western South America Lexington, 494 pp. (Citado por Howes, G., 1982).
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y. 1985. Avaliação da qualidade e crio-preservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (valenciennes, 1840). B. Inst. Pesca. 12 (4): 7-11.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; ISHISUKA, M. M.; PENTEADO, L. A. 1986. O acul de metileno como indicador da qualidade do semen da truta Arco iris, *Salmo irideus* Gibbons. B. Inst. Pesca, 13 (1), 89-94.
- FREDRICH, F. 1984. Spermatokonevierung bei Salmoniden. *Zeitschr. Binnenfischerei DDR* 31, 48-51.
- GARCIA, J. OTÁLORA, F. Cristalización de proteínas en medios Difusivos. *Physica*. Julio 2002.
- GINZBURG, A.S. 1972. *Fertilization in Fishes and the problem of Polyspermy*. Jerusalem; Israel Program of Scientific Translation.

- GIRALDO, R. M.; NEGRET, E. 1977. Contribución al conocimiento de la reproducción artificial y piscicultura de la dorada (*Brycon moorei sinuensis*, Dahl, 1955) en el río Sinú. Trab. De grado. Univ. J. T. Lozano, Bogotá, 173p.
- GORDON I, 1994. Laboratory Production of Cattle Embryo. 293-328
- GWO, J. C.; STRAWN, K.; LONGNECKER, M. T.; ARNOLD, C. R. 1991. Cryopreservation of Atlantic coaker spermatozoa. *Aquaculture*. 94, 335-375.
- HANCOCK, J. L. 1957. The morphology of the boar spermatozoa. *J. Roy Micro. Soc.* 76,p.84.
- HARVEY, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32: 313-320.
- HARVEY, B. 1991. Gene banking for pacific salmon: technology assessment and applications in British Columbia. *Aquaculture Industry Development Report* p.1400-1404.
- HICKMAN, C. G. 1958. Spermatocrit values in facilitating the estimation of spermatozoa concentrations. *Journal of Dairy Science*, 41:318-319.
- HOWES, G. 1982. Review of the genus *Brycon* (teleostei: Characoidei). *Bull. Br. Mus Nat. Hist (Zool)*, 43 (1): 1-47.
- HURTADO, R. H.; USECHE, L. C. A. 1986. Estudio sobre la biología del "Yamú" *Brycon siebenthalae* Eingenmann, 1912 y de la palometa, *Mylossoma duriventris* Cuvier, 1818, (Pisces: *Characidae*), en la parte baja del río Cafre, sistema del río Guaviare. Trab. De grado. Univ. Nal., Bogotá, 115p.

- JOHNSON, N; LEONE, F. 1974. Statistics and experimental Design. En: Engineering and physical sciences. New York, John Wiley. P. 241-244
- KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M. G.; CARVALHO FIHLO, A. C. 1985. Avalicao macro e microscópica do sêmen da truta Arco-Iris, *Salmo irideus* Gibbons. *B. Inst. Pesca*, 12 (3), 73-81.
- LAHANSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WELSMANN, T. 1991. Energy metabolism in spermatozoa of the grayling (*Thymallus thymallus*). In: SCOTT, A. P.; SUMPTER, J. P. K.; KIME, D. E.; ROLFE, M. S. (Eds). *Proceedings of the fourth international symposium of the reproductive physiology of fish*. Norwich, U, K., 7-12 July 1992, Sheffield, FishSymp 91. p. 279.
- LANDINEZ, P. M. A. 1995. Inducción de la reproducción del Yamú *Brycon siebenthalae* a partir de extracto de hipófisis de carpa (EPC). *Bol. Cient. INPA*. Bogotá, 3:5-17.
- LEIBO S.P.(1977). Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. The freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation Symposium 52. Elsevier. Amsterdam, : 69 - 92.
- LEIBO S.P.(1984). A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21 : 767-790.
- LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. 1991. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESSON, B. G. M. (de). *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain. p. 245-269.
- LOMBO, A. 2000. Caracterización del semen de yamú (*Brycon siebenthalae*). Trabajo de grado. (Medicina Veterinaria y Zootecnia). Universidad de

los Llanos. Villavicencio. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

LUGO, R. L. M. 1989. Determinación de hábitos alimenticios, madurez sexual y desove en tres especies ícticas de la cuenta del río Tomo Vichada y consideraciones para el mantenimiento de padrotes. Inf. Final Univ. Tec. De los Llanos-COLCIENCIAS-Coinco. Villavicencio, 137p.

LYLYESTROM, C.; TAPHORN, D. 1983. Aspectos sobre la biología y conservación de la palambra *Brycon whitei*, Wwyers y Witzman, 1960. *Rev. Cien. Y Tec. Unillez.*, Caracas, pp.5-10.

MAURICE, J. B.; Van DEN HOFF; MOORMAN, A. F. M.; LAMERS, W. H. 1992. Electroporation in intracellular buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Research*. 20:2902-2906.

MUNKITTRICK, K.R; MOCCIA, R.D. 1984. Advances in the Cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production – scale artificial fertilization program. *Theriogenology*. 21 (4), 645-659

NARAHARA, M.Y. 1986. Observações preliminares sobre a reprodução induzida da pirapitinga do sul, *Brycon* sp. In : *Resumos do XIII. De zoología*, CUIABA, MT 150p.

NEIRA, J.; CRUZ, C. P. E.; JIMENEZ, J.; MUÑOS, D. Caracterización y congelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). En: *programa nacional de ciencia y tecnología del mar – Investigación y Desarrollo Tecnológico en acuicultura*. p. 141-145, 1992.

OTOMAR, L. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41, 241-250.

- PARDO, J. 2000. Congelación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*). Villavicencio. Trabajo de grado (Medico Veterinario Zootecnista). Universidad de los Llanos. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- PETER, R.E.; LIN, H. R.; VAN DER KRAAK, G. 1988. Induced ovulation and spawning of cultures freshwater fish in china: advances in application of GnRh analogues and dopamine antagonist. *Aquaculture*, 74: 1-10.
- PHRONEN, J. 1993. Cryopreservation of fish eggs and sperm. *Nordiske Seminar og Arbejdsrapporter 1993*. 589, 28 p.
- PHRONEN, J. 1994. Composition and Cryopreservation of sperm from some finnish teleost fish. *Finnish fish research*. 15, 27-48.
- PRIETO, C. 1997. Avances con una especie promisorio, el yamú. En: *Bol. Acuoriente*, (2)3.
- SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of fish biology*. 17, 707-739.
- SHAW, J. 1996. Ultrarapid embryo-freezing protocol. *Human Reproduction*. Vol 3, pp 621-626.
- SIEGEL, S. Nonparametric statistics for the behavioral science. New York, McGraw-Hill, 1956, p. 117-127.
- SORENSEN Jr., A. M. 1992. Reproducción animal, principios y prácticas, México, McGraw-hill, 539 p.
- STOSS, J. 1983a. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: *Fish Physiology. Vol. IX. Reproduction part B. Behavior and fertility control* (Hoar, W. S. Randall, D.J.; Donaldson, E.M., eds). Pp.305-350. New York: Academic Press.

- SWANSON, E. W.; BEARDEN, H.J. 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *Journal of animal science*, 10:981-987.
- SUAREZ, S.S. Op. Cit. Canales Iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *J. Androl.*, 17 331 (1996). *Avance y perspectiva vol 21*. Marzo-abril 2002
- USECHE, C., HURTADO, H.; CALA, P. 1993. Sobre la ecología de *Brycon siebenthalae* y *Milossoma duriventris* (Piscis: Characidae) en el río cafre, Orinoquía. *Caldasia* 17:341-352.
- VANEGAS, S.; LOMBO, A. 1996. Larvicultura y alevinaje del yamú *Brycon siebenthalae* (Eigenmann, 1912). Trab. De grado. Univ. De la salle-IALL. Bogotá, 67p.
- VASQUEZ, T W. 1994. Efeito de dietas com níveis crescentes de proteína e energia na evolução ovocitaria da piraptinga. *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). Dissertacao de mestrado. U.F.S.C pp. 18 y ss.
- VAZZOLER, A. E .A de M. 1996. Biología da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Nupelia. Maringá-PR. 169p.
- VEGA, A. TREVIÑO, C. FELIX, R. 2002. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. Departamento de Genética y fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM.
- VLADIC, T.; JÄRVI,. 1997. Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout-the effect of water temperature. *Journal of fish biology*, 52 1088-1093.

- WILDE, O. et al. 2002. Efectos de dos Métodos manuales de criopreservación en la ultraestructura de ovocitos foliculares bovinos. Universidad de Tucumán. Facultad de agronomía y zootecnia.
- WOMERSLEY C, USTER P, RUDOLPH, CROWE J.1986. Inhibition of dehydration-induced fusion between liposomal membranes by carbohydrates as measured by fluorescence energy transfer. *Cryobiology* 23:245-255
- WOOTON, R.J. 1990. *Ecology of teleost fishes*. London: Chapman and Hall.
- WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L 1983. A propagação artificial de peixes de águas tropicais-manual de extensao. FAO/CODEVASF/CNPq-Brasilia, 220p.
- YOUNG, J. A.; CPRA, M. F.; BLACKSHAW, A. W. 1992. Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa. *Aquaculture* 102.p. 155-160.
- ZANIBONI-FILHO, E., CARVALHO, J.L. de, VILLACORTA-CORREA, M.A. 1988. Caracterização morfológica do matrinxá, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Teleostei: Characidae). *R. Brasil. Biol.*, 48(1):41:50 Minas Gerais. Pp:36-42.
- ZANIBONI-FILHO, E.; RESENDE, E.K. 1988. Anatomía de gónadas, escala de maturidade e tipo de desova do matrinxá, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Teleostei: Characidae). *R. Bras: Biol.*, 48(4):833-844.