

Caracterización Seminal y Ensayos Preliminares de
Crioconservación de Semen de Bagre Rayado
(*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus 1766)

Melissa Guarnizo Pineda

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Producción Animal
Sede Palmira
2007



**CARACTERIZACIÓN SEMINAL Y ENSAYOS PRELIMINARES DE
CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE BAGRE RAYADO (*Pseudoplatystoma
fasciatum* - Linnaeus 1766)**

MELISSA GUARNIZO PINEDA

0202521

Trabajo de grado presentado para optar al título de **ZOOTECNISTA**

Dirigido por:

Víctor Mauricio Medina Robles M.V.Z., M.Sc

Pablo Emilio Cruz Casallas M.V.Z., M.Sc, PhD

Codirector:

José Ader Gómez Peñaranda Zoot., PhD

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL
PALMIRA, 2007**



CARACTERIZACIÓN SEMINAL Y ENSAYOS PRELIMINARES DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE BAGRE RAYADO (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus 1766)

RESUMEN

La crioconservación seminal es usada actualmente como una herramienta biotecnológica para la conservación de las especies, así como para el uso eficiente de los gametos dentro de los procesos de reproducción artificial. El bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) es un silúrido nativo de las cuencas del río Orinoco y Amazonas, con alto potencial para la diversificación de la piscicultura nacional. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el semen de bagre rayado y realizar ensayos preliminares de su crioconservación, tendientes a optimizar los procesos de reproducción de la especie. Fueron utilizados machos sexualmente maduros, el semen fue obtenido 18 horas después de la administración de 4 mg.kg⁻¹ de extracto de hipófisis de carpa. Para la caracterización seminal ($n = 9$) fue determinado el volumen, movilidad, tiempo de activación, concentración espermática, espermatocono, vigor y viabilidad. Muestras con movilidad masal mayor a 80%, fueron mezcladas con 24 diferentes diluyentes a base de glucosa, yema de huevo o leche entera en polvo y dimetilsulfóxido, metanol o etilenglicol en concentraciones de 5, 10, 12 y 15%, como crioprotectores. El semen diluido fue empacado en pajillas de 0.5 mL y congelado en vapores de nitrógeno líquido. La descongelación fue realizada en baño de agua a 35°C por 60 segundos y la activación espermática realizada con 6 diferentes soluciones. En conclusión, la calidad seminal encontrada en bagre rayado es adecuada para procesos de fertilización artificial y crioconservación; sin embargo, los protocolos de congelación y post-descongelación deben aun ser ajustados para mejorar los porcentajes de movilidad espermática.

Palabras claves: bagre rayado, caracterización seminal, crioconservación, *Pseudoplatystoma fasciatum*, semen.



SUMMARY

Nowadays, the sperm cryopreservation is used as a biotechnology tool for the species conservation as well as the efficient use of gametes in the artificial reproduction. Bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) is a native siluride fish of the Orinoco and Amazon river basin with high potential in the national aquaculture diversification. The aim of the present study was characterized the bagre rayado sperm and carried out preliminary assays of its cryopreservation in order to improve the reproduction of this species. Sexually mature males, the sperm was obtained after 18 hours of carp pituitary extract injection (4 mg.kg^{-1}). The volume, motility, activation time, sperm concentration, spermatocrit, vigour and viability were determined in order to characterize the sperm ($n = 9$). Sperm samples with motility higher than 80% were mixed with 24 different combinations of diluents contained glucose and egg yolk or powder whole milk. As cryoprotectants, 5%, 10%, 12% and 15% of dimethyl sulfoxide, methanol or ethylenglicol were used. Diluted sperm was packaged in 0.5 mL straws and frozen in vapours of liquid nitrogen. Sperm thawing was done in water bath 35°C for 60 sec and six different solutions were used to activate the sperm. In conclusion, the sperm quality observed in bagre rayado is suitable for the artificial insemination and cryopreservation; nevertheless, frozen and post-thawing protocols should be standardized to improve the sperm motility percentage.

Key words: bagre rayado, seminal characterization, cryopreservation, *Pseudoplatystoma fasciatum*, sperm.



DEDICATORIA:

A Dios, que gracias a su inmenso amor y misericordia me permitió fortalecerme más en mi crecimiento espiritual a lo largo de este camino.

A mis padres Mario y Doriz por su valioso e incondicional apoyo, voces de aliento y respaldo en todas mis decisiones y actuaciones.

A mi adorada hermana Marcela con quien comparto mis satisfacciones y sinsabores, pero a quien quiero y admiro secretamente.

A mis amigos de verdad y a la memoria de "Pipo Alexander", noble y singular mascota por su fidelidad canina y acompañamiento en mis quehaceres de campo.



AGRADECIMIENTOS

A Dios porque fue gracias a su inmenso amor que pude vivir esta enriquecedora experiencia y conocer a personas maravillosas las cuales me permitieron crecer tanto profesional como personalmente.

A mis padres Mario Guarnizo Martínez y Doriz Pineda Ocampo y a mi hermana del alma Marcela los cuales nunca me dejaron sola a pesar de la distancia.

A mi tío Fernando Diaz Bolívar por su irrestricto apoyo y voz de aliento durante todas las fases de este proceso.

A Víctor Mauricio Medina Robles por la dirección, orientación, asesoría, solidaridad, cooperación, disposición y consejos ofrecidos durante la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros: Luz Stella Vásquez, Agelica M^a Otero, Carlos A. David y Germán Castañeda por su acompañamiento y asistencia en los momentos de "crisis".



A Shirley Home Mendoza por su tiempo y apoyo prestado y concretamente la realización del diseño gráfico del trabajo.

A Ricardo Murillo Pacheco por su constante apoyo y sapiencia en la consecución de los ejemplares de “bagre rayado”.

A la memoria de mi compañero canino fiel Pipo Alexander por alegrar mis días con sus hazañas y travesuras.

Al IALL como institución y puntualmente al grupo GRITOX dirigido por el doctor Pablo E. Cruz Casallas por la oportunidad de permitirme realizar el trabajo, contando con su completo apoyo.



TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GENERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1. BIOECOLOGÍA DEL BAGRE RAYADO <i>(Pseudoplatystoma fasciatum)</i>	5
3.1.2. CARÁCTERÍSTICAS GENERALES	5
<i>Descripción de la especie</i>	6
<i>Hábitos alimenticios</i>	8
3.1.3. TAXONOMÍA	9
3.1.4. SINONIMIAS	10
3.1.5. NOMBRES COMUNES	11
3.1.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	12
3.1.7. REPRODUCCIÓN NATURAL	12
<i>Aparato reproductor masculino</i>	14
<i>Estadios de madurez sexual</i>	15
<i>Generalidades del semen</i>	16
<i>Características físicas y químicas del semen</i>	17



	<i>Activación de la movilidad espermática</i>	19
3.2.	INDUCCIÓN HORMONAL	21
3.3.	CARACTERIZACIÓN SEMINAL	22
3.3.1.	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	24
	<i>Volumen seminal</i>	24
3.3.2.	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	25
	<i>Concentración espermática</i>	25
	<i>Movilidad espermática</i>	26
	<i>Tiempo de activación</i>	28
	<i>Viabilidad espermática</i>	28
3.4.	CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN DE PECES	29
3.4.1.	DILUYENTES Y CRIOPROTECTORES	35
	<i>Crioprotectores no permeables</i>	35
	<i>Yema de huevo</i>	36
	<i>Glucosa</i>	37
	<i>Leche</i>	37
	<i>Crioprotectores permeables</i>	37
	<i>Dimetil sulfóxido (DMSO)</i>	38
	<i>Metanol (MET)</i>	39
	<i>Etilenglicol (ETG)</i>	39



3.5.	CONGELACIÓN – DESCONGELACIÓN DEL SEMEN	40
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
4.1.	LOCALIZACIÓN	41
4.2.	MATERIAL BIOLÓGICO	42
4.3.	CAPTURA, SELECCIÓN DE LOS PECES, INDUCCIÓN HORMONAL Y OBTENCION DEL SEMEN	43
	<i>Captura de los peces</i>	43
	<i>Inducción hormonal</i>	44
	<i>Obtención del semen</i>	44
4.4.	EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LAS CARÁCTERÍSTICAS SEMINALES	45
4.4.1.	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	45
	<i>Volumen seminal</i>	45
4.4.2.	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	46
	<i>Movilidad global o masal</i>	46
	<i>Tiempo de activación</i>	46
	<i>Concentración espermática</i>	46
	<i>Espermatocrito</i>	48
	<i>Viabilidad</i>	49
	<i>Vigor de la movilidad espermática</i>	49



4.5.	PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN	50
4.5.1.	PREPARACIÓN DEL DILUYENTE	50
4.5.2.	EVALUACIÓN DE LOS DILUYENTES	53
4.5.3.	EMPACADO Y CONGELACIÓN DEL SEMEN	53
	<i>Empacado en pajillas</i>	53
4.5.4.	DESCONGELACIÓN DEL SEMEN	54
4.6.	ANÁLISIS DE DATOS	55
5.	RESULTADOS	56
5.1.	CARACTERÍSTICAS SEMINALES	56
5.2.	EFFECTO DEL TIPO DE DILUYENTE SOBRE LA MOVILIDAD PRECONGELACIÓN	60
5.3.	MOVILIDAD MASAL POST-DESCONGELACIÓN	61
6.	DISCUSIÓN	61
7.	CONCLUSIONES	67
8.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	68



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características morfométricas de los individuos de bagre rayado (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>) utilizados en el estudio. Valores mostrados como la media \pm SEM. $n = 11$.	43
Tabla 2.	Composición de los diluyentes utilizados para la congelación de semen de bagre rayado (<i>P. fasciatum</i>).	51
Tabla 3.	Características seminales del bagre rayado (<i>P. fasciatum</i>). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 9$	56



Tabla 4. Porcentaje de movilidad espermática pre congelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) diluido activado con bicarbonato de Sodio al 1 %. Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 24$

57

Tabla 5. Porcentaje de movilidad post-descongelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) activado con diferentes soluciones . Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 12$

60



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje de movilidad masal precongelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) diluido con DMSO en diferentes proporciones y en relación al porcentaje de movilidad del semen fresco (SF). Entre columnas letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 6$. 58
- Figura 2.** Movilidad precongelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) diluido con metanol (MET) en diferentes proporciones y en relación al porcentaje de movilidad del semen fresco (SF) Entre columnas letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 6$. 59



Figura 3. Movilidad masal precongelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatum*) diluido con ETG en diferentes proporciones y en relación al porcentaje de movilidad del semen fresco (SF). Entre columnas letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 6$.



1. INTRODUCCIÓN

Los Siluriformes son un orden de peces de gran importancia neotropical, su distribución es muy amplia al igual que una gran diversidad de formas; después de los Carácidos es el grupo con mayor número de especies de agua dulce en América (Galvis *et. al.*, 1997).

En las cuencas de Amazonas y Orinoco, los Silúridos son especies de gran importancia comercial y se agrupan en grandes, medianos y pequeños bagres que son el soporte de la pesquería de estas regiones. Como consecuencia de la pesca y el deterioro ambiental de las cuencas, las poblaciones naturales se han venido disminuyendo y se ha mirado a la acuicultura como una alternativa, no sólo para la producción de peces en cautiverio sino como un vía para la producción de semilla destinada al repoblamiento del medio natural que de alguna manera contribuya a la permanencia de las especies y sostén de la pesca comercial y artesanal.

Con los bagres a pesar de su importancia comercial, el desarrollo piscícola ha sido más lento y mientras que en Norteamérica, Europa y Asia se han desarrollado industrias piscícolas con bagres nativos de esas latitudes como el *Ictalurus punctatus* y los *Clarias africanos*, en países como Brasil, Argentina, Venezuela y Colombia, entre otros, se han venido realizando tecnologías de producción en cautiverio de algunos bagres suramericanos como el rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*), sorubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), cajaro (*Phractocephalus hemioliop*), blanquillo (*Sorubim lima*), yaque (*Leiarius marmoratus*), amarillo (*Zungaro zungaro*), tigrito (*Pimelodus blochii*) y barbilla (*Rhamdia sebae*); entre otros.



Actualmente el bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) constituye un importante componente en los desembarques en los principales puertos, debido a que es uno de los grande peces de mayor explotación dentro de las pesquerías de agua dulce en Suramérica. Este pez es de amplio consumo humano, su carne es muy apreciada por ser magra, sin espinas intramusculares y de buen sabor, además, también es comercializado como un animal ornamental (Rodríguez, 1991). Esta gran presión de pesca que recibe la especie en Colombia, especialmente en el complejo inundable del río Magdalena ha llevado a declarar a esta especie en peligro de extinción, debido a que en la mayoría de las capturas de estos peces se hace por debajo de los 80 a 100 centímetros de longitud estándar; talla necesaria para alcanzar su madurez sexual (Moreno *et. al.*, 1993), esto sumado al creciente aumento en su demanda, a su estacionalidad reproductiva y asincronismo en la maduración gonadal presentado entre machos y hembras, nos lleva a implementar estrategias que permitan disponer permanentemente de gametos potencialmente fértiles, para el proceso de fertilización artificial.

La crioconservación es una herramienta biotecnológica importante para el almacenamiento de gametos por tiempo indefinido, que permite la preservación de los espermatozoides y constituye una alternativa efectiva para contribuir a la conservación de las especies ícticas (González-Sarmiento y Díaz-Sarmiento, 2001), en especial, aquellas que poseen estacionalidad reproductiva y maduración gonadal asincrónica, como el bagre rayado. Durante los últimos 20 años se han realizado algunos trabajos donde se reportan distintos procedimientos para la crioconservación de los espermatozoides. Varios autores (Fogli da Silveira *et. al.*, 1990; Carolsfeld *et. al.*, 2003; Cruz-Casallas *et. al.*, 2004, Velasco-Santamaría *et. al.*, 2006) reportan resultados con gran variabilidad entre especies principalmente con



relación a los porcentajes de fertilidad, lo cual hace necesario realizar ajustes a los diferentes protocolos utilizados.

Aunque esta técnica de crioconservación es relativamente nueva, actualmente en Colombia se han realizado algunos trabajos en especies nativas como la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*); yamú (*Brycon amazonicus*); bocachico (*Prochilodus reticulatus*), entre otras, los cuales han generado resultados satisfactorios. Por lo tanto, el presente trabajo busca lograr nuevos avances en la reproducción artificial de la especie; contribuyendo al conocimiento de las características seminales y a la estandarización de un protocolo para la crioconservación de semen del bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*).



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de las características seminales y a la estandarización de un protocolo para la crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*), como base para la optimización de este proceso en la especie.

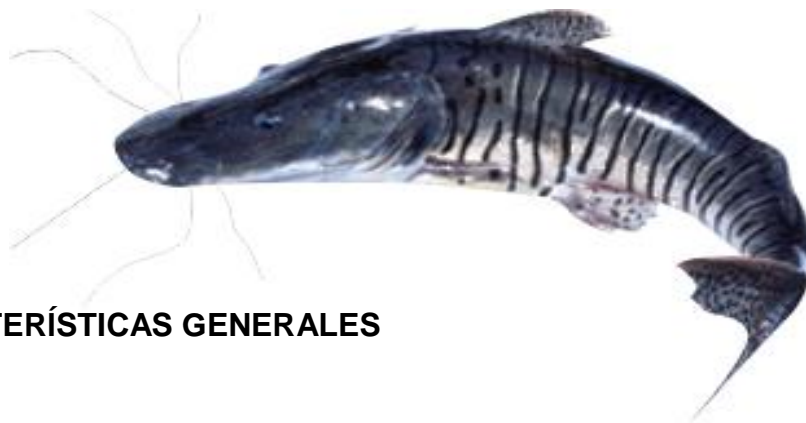
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características seminales de la especie (*Pseudoplatystoma fasciatum*).
- Evaluar el uso de diferentes crioprotectores (dimetil sulfóxido (DMSO), metanol (MET) y etilenglicol (ETG)) a diferentes concentraciones (5, 10, 12 y 15%) para la crioconservación de semen de bagre rayado (*P. fasciatum*).
- Analizar la efectividad de dos diluyentes basados en yema de huevo y leche entera en polvo, para la crioconservación de semen de bagre rayado (*P. fasciatum*).



3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. BIOECOLOGÍA DEL BAGRE RAYADO (*Pseudoplatystoma fasciatum*)



3.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los Siluriformes representan el cuarto orden dentro de los vertebrados y dentro de los *Ostariophysii*; son el grupo de peces más diversificado y extensamente distribuidos a nivel mundial, sobre todo en las aguas continentales, con más de 30 familias, 412 géneros y cerca de 2400 especies (Pinna, 1998).

Pseudoplatystoma es un grupo de bagres neotropicales de la familia Pimelodidae, la cual es una de las familias más representativas dentro de los Siluriformes, que contienen tres especies reconocidas: *P. fasciatum*, *P. tigrinum* y *P. corruscans*. Después de la familia Loricariidae es ecológicamente la más rica en especies y al mismo tiempo la más importante como recurso pesquero (Escobar, 2001). Se conocen más de 60 géneros que abarcan más de 300 especies distribuidas desde México hasta Argentina (Tallarico, 1997 y Galvis *et. al.*, 1997) y a esta pertenecen los bagres más grandes conocidos. Estos bagres alcanzan tallas que



sobrepasan los 1.3 m, viven en diversas hábitats exclusivas de agua dulce tales como grandes ríos, lagos y bosques inundados del neotrópico (Burgess, 1989 y Reid, 1983). Entre los grupos de especies cultivadas en el mundo los Siluriformes se destacan, debido a la textura y excelente sabor de su carne y buen rendimiento de su canal. El cultivo de estas especies va creciendo rápidamente, en función a su rusticidad (Narahara *et. al.*, 1988).

La mayoría de los Pimelodidae frecuentan los fondos de río y quebradas de aguas turbias, suelen realizar migraciones alimenticias o reproductivas y son de hábitos nocturnos, seminocturnos o crepusculares. Entre los bagres de mayor valor económico en las pesquerías del Orinoco y Amazonas se encuentran representados generalmente los de gran tamaño entre los cuales se encuentran los pertenecientes al género *Pseudoplatystoma*. Todos ellos con hábitos predominantes carnívoros, con dietas piscívoras (Winemiller y Taphorn, 1989; Ramírez y Ajiaco, 1995 y Agudelo *et. al.*, 2000). *Pseudoplatystoma fasciatum* alcanza un gran tamaño, esto ha despertado, en estos últimos años, un creciente interés por este pez en la piscicultura. Además, está considerado como un pez ornamental y está entre las especies que presentan mayor demanda en los mercados de Colombia, Venezuela y Brasil (López *et. al.*, 1996). Su importancia económica es significativa; estos bagres son fuente importante de proteína para las poblaciones humanas de Suramérica.

Descripción de la especie: el bagre rayado (*P. fasciatum*) se caracteriza por carecer de escamas, cuerpo desnudo, cilíndrico, alargado y fusiforme; cabeza más larga que ancha, deprimida, casi recta a los lados; con fontanela corta y superficial que no alcanza la base de la cabeza. Posee tres pares de barbillones peribucales, un par maxilar negro y dos pares mentonianos blancos más largos que la longitud de la cabeza (Campos,



2002; Ramírez y Ajiaco, 1995 y Ajiaco *et. al.*, 2002). La boca es subterminal estando el premaxilar ligeramente proyectado delante de la mandíbula inferior y la abertura bucal abarca el frente del hocico; los dientes son vellosidades pequeñas y numerosas dispuestas como cerdas de un cepillo que se encuentran dispuestos en forma de parches o almohadillas. El bagre rayado (*P. fasciatum*) se caracteriza porque posee una cintura escapular bien desarrollada y unida al cráneo, ojos pequeños en posición dorsal (Lammus, 1975).

La aleta caudal es de tipo homocerca, tiene lóbulos redondeados o terminados en punta y siempre presenta puntos negros (Miles, 1974); las aletas pélvicas se ubican en posición abdominal y también son de tipo homocerca. La aleta adiposa tiene igual longitud a la base de la aleta anal y se caracteriza por encontrarse siempre bien desarrollada, la cual presenta de 11 a 14 radios y carecen de espina (Galvis *et. al.*, 1997); el cuerpo presenta una coloración gris oscura en la región dorsal con 10 a 16 bandas verticales claras y oscuras, las aletas tienen pequeñas manchas oscuras, la zona ventral es blanca; la aleta dorsal está unida al cráneo y esta junto con las aletas pectorales presentan seis radios y el primero de estos se encuentra modificado en una espina dura, punzante, aserrada y venenosa que inyecta una ictiotoxina, la cual tiene efecto desconocido por cuanto no se ha podido determinar sus componentes (Campos, 2002 y Ajiaco *et. al.*, 2002).

Pseudoplatystoma fasciatum alcanza tallas de hasta 1.5 m de longitud estándar y 75 kg de peso. Realiza migraciones y se reproduce en el canal principal del río (Ramírez y Ajiaco, 1995 y Castro, 1994). Presenta diferentes coloraciones, pero generalmente son grises en el dorso y blancos ventralmente, con bandas claras y oscuras transversales perpendiculares al cuerpo y separadas entre sí, que pueden estar



bordeadas dorsalmente adelante y atrás por unas pequeñas franjas más angostas blancas. En la Orinoquía las mayores capturas se registran durante la época reproductiva que se inicia con el comienzo del período lluvioso en abril-mayo de cada año (Ramírez y Ajiaco, 1995).

Hábitos alimenticios: El bagre rayado es un pez que presenta actividad crepuscular y seminocturna; tradicionalmente se considera que los miembros del género *Pseudoplatystoma* son animales que se alimentan durante la noche; sin embargo se ha demostrado que *P. fasciatum* esta activo y caza durante el día, especialmente en la mañana. Este comportamiento es diferente al *P. tigrinum* que tiene alimentación nocturna (Reid, 1983).

El bagre rayado (*P. fasciatum*) es de hábitos alimenticios carnívoros que se alimenta principalmente de peces y camarones en algunas ocasiones; esta característica es limitante para su producción comercial. Reid (1983) reporta que para el género *Pseudoplatystoma*, los peces representan más del 99% del contenido estomacal, luego reporta 78% de material animal y 22% de material vegetal en contenido estomacal de *P. fasciatum*. El contenido vegetal, comprende en su mayoría fragmentos de hojas y detritos vegetales que parecen ser captura al azar junto con las presas. Los insectos acuáticos menores de 1 centímetro son importantes en la alimentación de juveniles (animales pequeños, menores de 10 cm); el material vegetal aparece en forma muy ocasionalmente en su dieta (Cortés-Millán, 2003).

Las observaciones realizadas por Reid (1983) de *P. fasciatum* han demostrado que es un depredador activo, que busca su presa desplazándose y probando los alrededores con sus largas barbillas. Tiene



ojos notablemente más activos que muchos de los demás bagres. *P. fasciatum* puede incluir miembros de su mismo género en su dieta. Además es capaz de consumir presas que midan hasta por lo menos 30% de su longitud estándar. A pesar de que son peces de substrato no se limitan a él, pues también se le puede encontrar alimentándose en otros niveles de la columna de agua.

Los camarones son importantes en la dieta de los bagres rayados hasta que alcanzan 50 centímetros de longitud. El bagre adulto prefiere las presas de tamaño medio (mayores a 10 cm de longitud total), la forma de los peces que hacen parte de la dieta de los bagres es muy variada, prefiriendo los de forma fusiforme principalmente de las familias Characidae y Curimatidae, los cuales tienden a formar cardúmenes. Las presas de los bagres son principalmente micrófagas, es decir, se alimentan de detritos que contienen algas, bacterias, hongos y animales de pequeños tamaños. El bagre rayado tiende a alimentarse de peces que habitan en la superficie del agua (Cortés-Millán, 2003).

3.1.3. TAXONOMÍA

De acuerdo con Nelson (1984) y Cala (1990), el bagre rayado silúrido de la cuenca del Orinoco se clasifica de la siguiente manera:

Phyllum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Serie	Pisces



Superclase	Gnathostomata
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterygii
Superorden	Teleostei
Orden	Siluíformes
Suborden	Nematognathina
Familia	Pimelodidae
Subfamilia	Sorubiminae
Género	<i>Pseudoplatystoma</i> (Bleeker, 1863)
Especie	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (Linnaeus, 1766)

3.1.4. SINONIMIAS

Según Miles, 1974; citado por Lammus, 1975.

<i>Siluruo fasciatus</i>	Linnaeus, 1774
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Linnaeus, 1766
<i>Pimelodus fasciatum</i>	Lacépede, 1803
<i>Platystoma punctifer</i>	Gastelnau, 1855
<i>Platystoma fasciatum</i>	Steindachner, 1878
<i>Silurus fasciatus</i>	Linnaeus, 1974



3.1.5. NOMBRES COMUNES

“Bagre”, “bagre pintado”, “bagre tigre”, “bagre rayado”, “pintadillo”, “pintadillo tigre”, “sorubim” (Castro, 1986).

“Bagre”, “bagre pintadillo”, “bagre tigre”, “bagre rayado”, “bagre cazón”, “bagre de laguna”, “bagre tumame”, “bagre cabezón”, “bagre porra de Chalana” (Ajiaco y Ramírez, 1989).

En Colombia: “bagre” (Cuenca del Magdalena, Amazonas), “bagre cazón”, “bagre cabezón”, “bagre de laguna”, “bagre porra de chalana” (Orinoquia), “bagre negro” (Córdoba, Sucre), “bagre pintado” (cuenca del Magdalena, Vichada, Arauca), “bagre rayado” (cuenca del Magdalena, Casanare, Arauca, Meta), “bagre tigre” (cuenca del Magdalena, Vaupés, Meta), “machito” (Caldas, Cundinamarca, Tolima, Antioquia), “panche” (Cundinamarca), “pintado”, “pintadillo rayado” (Amazonía), “pintadillo” (Vaupés, Meta, Amazonas), “pintadillo tigre” (Amazonía y Orinoquía), “sorubim”, “surubim” (Amazonía, Leticia), “rayado” (Llanos Orientales, Tolima), “rayao” (Llanos Orientales), “bunuju” (Guahibo, Sikuaní), “culirri” (Achagua), “kajuyalitopa”, “kuliri” (Sikuaní), “kuriri”, “kaporari” (Yukuna), “mulja” (Guayabero), “orero” (Tucano), “toicu” (Cubeo), “coridutoicu” (Cubeo), “sehwa” (Sáliba) y “waipa” (Tuyuca) (Cortés-Millán, 2003).

En inglés se le llama Barred Sorubim, Tiger Catfish, Tiger Shovelnose y Tiger Shovelnose Catfish. (Cortés-Millán, 2003)

Es importante señalar que muchos nombres son compartidos por el bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y por el bagre tigre (*Pseudoplatystoma tigrinum*).



3.1.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Pseudoplatystoma fasciatum se encuentra en todas las cuencas hidrográficas de Sur América desde Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam y la Guayana Francesa hasta la cuenca de los ríos La Plata y Paraná. Incluyendo las cuencas del Amazonas (Exceptuando la cuenca del río San Francisco) y el Orinoco, ocupando el segundo lugar después de los Caraciformes (Escobar, 2001). En Colombia Pardo (1995) y Cala *et. al.* (1996) reporta 12 de las 14 familias que se encuentran en Sudamérica, siendo que las 18 restantes están distribuidas en otras regiones del mundo.

En Colombia habita en todas las cuencas, principalmente en el Amazonas y el Orinoco, abundantemente en el río Magdalena, menos en el bajo Magdalena en la zona del canal del Dique, ya que no tolera aguas salobres; no se encuentra en el alto Cauca, ni en la cuenca del Sinú. También abunda en el Atrato, Catatumbo y la vertiente del Pacífico (Pardo, 1995). En el bajo río Caquetá su abundancia está relacionada con los periodos hidrográficos (Rodríguez, 1991).

3.1.7. REPRODUCCIÓN NATURAL

La reproducción natural de los bagres está relacionada con periodos hidrológicos que determinan los niveles del río y las migraciones características de los grandes bagres (Rodríguez, 1991). El período de reproducción natural ocurre entre los meses de marzo y julio para las cuencas de los ríos Magdalena y Orinoco. Para la Amazonia peruana se



reporta la época de reproducción entre noviembre y abril, con un pico máximo de enero y marzo (Cortés-Millán, 2003).

Según Quintero (1994), citado por Pardo, (1995) se presentan dos migraciones anuales: la primera corresponde a la concentración de los bagres en las desembocaduras de los ríos y caños llaneros (aguas bajando Enero-Marzo), donde salen grandes cardúmenes de juveniles de diversas especies que se hallaban en esteros, lagunas y caños, el cual es un movimiento netamente alimentario. También se observa la salida de grandes cardúmenes de bagres, los cuales ocupan esteros y lagunas (sistemas lenticos) en aguas altas (Junio-Noviembre). La segunda es una migración ascendente (aguas subiendo), que ocurre durante los meses de Abril y Mayo, durante la cual se observan estrategias alimentarias y reproductivas. Paralelo a estas migraciones los animales sufren cambios y acondicionamientos físicos por medio de los cuales son estimuladas las gónadas, empezando así su desarrollo, de tal forma que al llegar a las partes más altas de su recorrido están listos para efectuar el desove (Brand, 1996).

El desove se lleva a cabo durante la época de bonanza, la cual es llamada por los pescadores como “candelero”, que ocurre cuando aparece el invierno y el río vuelve a inundar nuevamente las ciénagas, a donde son enviadas la mayoría de las larvas en donde encuentran condiciones optimas para su desarrollo (Lammus y Beltrán, 1975).

Durante el año se presentan estas migraciones siguiendo los patrones de las lluvias y los movimientos de los peces que le sirven de presa (Cortés-Millán, 2003). y se presentan aproximadamente cuatro estaciones llamadas vulgarmente “subiendas” y “bajanzas”, la subienda principal ocurre entre Enero y Marzo seguida por la “bonanza” en Abril a Junio; la



segunda subienda de menos intensidad llamada “mitaca” o “veranillo” que ocurre de Junio a Septiembre y de Octubre a Diciembre (Miles, 1974).

Reid (1983) expresó que no considera migraciones estos desplazamientos de las poblaciones de bagres sino por estímulos alimentarios, de una parte de la población, que aprovecha la situación para dispersar los huevos en las partes superiores del río, mientras otra parte se queda en las zonas bajas.

Aparato reproductor masculino: en los peces machos, el desarrollo testicular está regulado por el eje hipotalámico-pituitario-testicular. La estructura, desarrollo y la endocrinología en los peces teleósteos fueron revisados por Billar *et. al.* (1982). El rango de hormonas que pueden inyectarse para la espermatogénesis y/o la espermiación es relativamente limitado comparado con la situación de las hembras, debido a la simplicidad del control endocrino comparado con las hembras que no responden con tanta facilidad al tratamiento.

Los testículos son en forma de racimos, presentan gran variedad de vesículas, algunas de ellas ramificadas. En estado inicial de maduración sexual, las gónadas tienen apariencia de dos vesículas alargadas, cuya superficie está tapizada de pequeñas estructuras vesiculares. En los estados avanzados de madurez sexual las gónadas ocupan más de las tres cuartas partes de la





cavidad abdominal (Lammus, 1975).

Generalmente los teleósteos presentan testículos pares de forma alargada, localizados en posición ventral a la columna vertebral y a la vejiga hidrostática, prolongándose en dirección caudal por el canal deferente. De cada testículo se origina un espermiducto que desemboca en la papila urogenital, ubicada entre el recto y los ductos urinarios (Carrillo y Rodríguez, 2001).

Estadíos de madurez sexual:

- a. ***Estadío I:*** testículos en forma de dos vesículas alargadas, color rojo pálido, adheridos a la parte dorsal, en la región posterior de la cavidad abdominal. Las estructuras vesiculares únicamente alojan líquido seminal.

- b. ***Estadío II:*** aún existe dependencia con la pared dorsal de la cavidad abdominal; las vesículas empiezan su desarrollo y se hacen visibles, su color cambia a rosado tenue, no hay líquido seminal, los capilares son poco notorios.

- c. ***Estadío III:*** las vesículas son más grandes, algunas ramificadas, color blanco lechoso, hay secreción en poca cantidad de líquido seminal, de color blanco, denso y pegajoso. La gónada llega a la mitad de la cavidad abdominal.

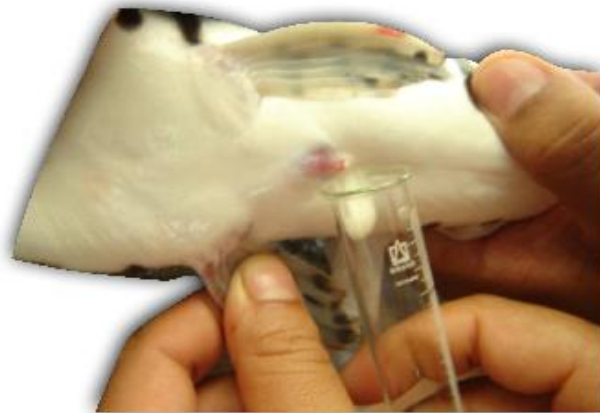
- d. ***Estadío IV:*** las vesículas son más consistentes y al presionarlas hay gran cantidad de líquido seminal blanquecino. Su longitud sobrepasa la mitad de la cavidad abdominal y hay mayor irrigación.



e. Estadío V: ocupa toda la cavidad abdominal, las vesículas presentan gran rigidez de repleción, la secreción de líquido seminal, se efectúa por simple gravedad

f. Estadío VI: es el estado de reabsorción, se torna rosado pálido, no homogéneo, no hay secreción de líquido seminal, las vesículas presentan relajación completa.

Generalidades del semen: el estudio de las características del semen de peces comenzó en el siglo XIX. Varias características de la biología del semen de peces fueron rápidamente identificadas: la inmovilidad del espermatozoide en el semen, la corta duración de su movimiento después de su activación y la necesidad de dilución en agua para el inicio del movimiento del espermatozoide (Billard y Cosson, 1992).



Los espermatozoides de los peces tienen una estructura simple de tipo primitivo (Andrade *et. al.*, 2001). Los principales tipos de espermatozoides en peces son: espermatozoides de fertilización externa, con o sin acrosoma, uniflagelados o biflagelados (aquaespermatozoides) y espermatozoides de fertilización interna con o sin acrosoma, uniflagelados o biflagelados (introespermatozoides) (Jamieson y Leung, 1991). La forma de la cabeza del espermatozoide varía ampliamente en la mayoría de las especies de peces (Billard, 1990a).



La carencia de acrosoma en la mayoría de los teleósteos es compensada con la presencia de micrópilo, un orificio en el corión del oocito que permite la entrada del espermatozoide (Cosson *et. al.*, 1999).

La producción espermática en peces es muy alta debido al gran número de divisiones espermatogónicas. Entre tanto es difícil observarse un verdadero análisis cuantitativo de espermatogénesis en teleósteos especialmente en aquellas en que los testículos son lobulares (Billard, 1990b).

La gran diferencia con el espermatozoide de los mamíferos, radica en que la secreción espermática de los peces permanece inmóvil en la gónada y al ser expulsada, su movilidad se activa cuando entra en contacto con el agua, debido a la disminución de la presión osmótica y por la disminución de las altas concentraciones de potasio existentes en la secreción testicular a este proceso se le denomina activación (Billard, 1988); los espermatozoides permanecen móviles por un corto periodo de tiempo, raras veces superiores a 50 segundos.

Características físicas y químicas del semen: el semen está compuesto por el plasma seminal y por los espermatozoides. La concentración de los componentes del plasma seminal pueden variar de individuo a individuo dentro de una misma especie. Cabe destacar que su función es proveer un ambiente óptimo para el almacenamiento de los espermatozoides dentro y fuera de los testículos (Cierreszko *et. al.*, 2000).





El plasma seminal contiene principalmente compuestos minerales y bajas concentraciones de sustancias orgánicas; predominan tres iones en su composición: sodio, potasio y cloro, sus concentraciones pueden variar entre 75 a 175 mM, 32 a 86 mM y 112 a 183 mM, respectivamente (Suquet *et. al.*, 1994). Los iones de calcio y magnesio también contribuyen significativamente en la composición del plasma seminal y sus concentraciones están entre 1 a 2 mM (Ciereszko *et. al.*, 2000). Estos iones son importantes en la regulación de la movilidad espermática, así mismo como en la osmolaridad del plasma seminal, más allá de su efecto directo en la activación espermática (Billard y Cosson, 1992).

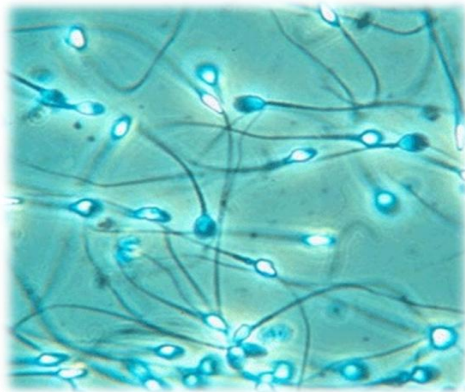
Hasta el momento, han sido considerados dos mecanismos que mantienen inmóviles los espermatozoides en el fluido seminal, en peces de agua dulce. El primer mecanismo, observado en salmones principalmente, está basado en la concentración del potasio; cuando su concentración está elevada (por encima de 40 mM), la motilidad es inhibida y posteriormente activada cuando su concentración disminuye (menos de 25 mM). Y el segundo mecanismo, presente en la mayoría de las especies, está basado en la diferencia de la osmolaridad del plasma seminal con la del medio ambiente. La osmolaridad espermática, en especies de agua dulce, es inhibida cuando la osmolaridad del medio es mayor en relación con la del plasma seminal (encima de 300 mOsm.kg⁻¹), y activada cuando la osmolaridad ambiental es menor a 200 m Osm.kg⁻¹ (Ciereszko *et. al.*, 2000).

Estudios sobre la composición del semen también han demostrado grandes variaciones intraespecíficas e interespecíficas, principalmente en la concentración espermática y en la composición del plasma seminal. Estas variaciones han sido a factores como variables genéticas, envejecimiento de los espermatozoides en el testículo, estado



reproductivo y estrategia reproductiva (Rana, 1995, Shangguan y Crim, 1995). Al respecto de la calidad de la composición del plasma seminal. Lahnsteiner *et. al.*, (1995), establecen que el semen apto para la crioconservación debe contener osmolaridad elevada (encima de 320 mOsm.kg⁻¹) y pH menor que 8.2.

Activación de la movilidad espermática: la activación de la movilidad espermática ocurre en respuesta a los cambios del medio externo, tales como: concentración de los iones, osmolaridad y pH (Morisawa y Susuki, 1980, Hamamah y Gatti, 1998).



Los espermatozoides de los teleósteos marinos y de agua dulce permanecen inmóviles en soluciones con o sin electrolitos, cuando la osmolaridad es isotónica al plasma seminal. Entretanto, cuando el semen se encuentra diluido en una solución hiposmótica, para las especies de agua dulce, e hiperosmótica para especies marinas, los espermatozoides inician su movilidad (Morisawa, 1994).



Un incremento en la osmolaridad en torno a los espermatozoides provoca aumento en las concentraciones intracelulares de potasio, y que afecta el axonema flagelar, induciendo el inicio de la movilidad del flagelo, en espermatozoides de especies marinas. También se ha observado que el volumen celular es menor cuando los espermatozoides se encuentran en soluciones hipertónicas, esto quiere decir, que el aumento de potasio intracelular ocurre en repuesta del agua de la célula. En los espermatozoides de los teleósteos de agua dulce, el volumen celular aumenta en condiciones hipertónicas y posiblemente, ocurre disminución en la concentración de potasio intracelular (Morisawa *et. al.*, 1983).

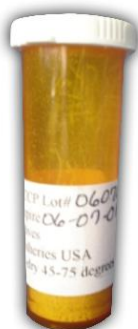
Cambios en la osmolaridad externa es ampliamente perjudicial en la estructura y función celular. En general la hiper e hipo osmolaridad provocan alteraciones en el tamaño de las células, aumentándolas o disminuyéndolas (Morisawa, 1994). Estas perturbaciones drásticas en la homeóstasis en las células espermáticas pueden modificar las propiedades mecánico-químicas del dispositivo móvil en el axonema flagelar conduciendo al inicio de la motilidad espermática (Morisawa, 1994).

Hasta ahora no se conoce el mecanismo por el cual el aumento o la disminución de las concentraciones intracelulares de potasio inducen la cascada de eventos que inician la motilidad espermática, en peces de agua dulce o teleósteos marinos (Oda y Morisawa, 1993).



3.2. INDUCCIÓN HORMONAL

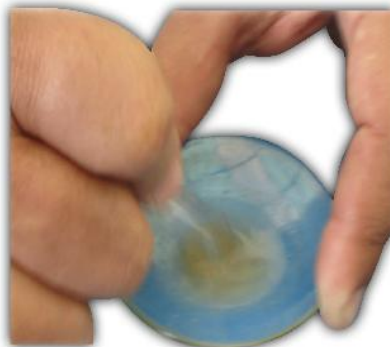
La hormona más utilizada para inducir con éxito la maduración final y el desove en cautiverio de los bagres es el extracto de hipófisis de carpa



(EHC) que se adquiere con relativa facilidad en el comercio. Las dosis hormonales varían entre 5.5 y 6.6 miligramos de hormona por kilogramo de peso vivo o biomasa en dos inyecciones que se aplican con intervalos de 12 horas; sin embargo, se ha obtenido éxito en la reproducción de *Pseudoplatystoma fasciatum* utilizando Primogonyl, LHRs (Luteinizig Hormone Receptor), Acetato de buserelina

combinadas con EHC de acuerdo con lo descrito por Contreras y Contreras (1989).

Harvey y Carlosfeld (1993) reportan resultados aceptables en la reproducción en cautiverio de cuatro especies de *Clarias* y dos de *Pangasius* en el sureste de Asia y la India, utilizando hipofisación y Gonadotropina Coriónica Humana con un GnRHa preferiblemente combinado con Dopamina; además los bagres pueden ser estimulados por manipulación de temperatura para acelerar la maduración final.



Las hormonas se deben disolver en solución salina al 0.09% (suero fisiológico) o en agua destilada tratando de utilizar la menor cantidad de líquido que sea posible y su aplicación puede ser intramuscular o intraperitoneal dependiendo de la habilidad y experiencia del personal encargado de la reproducción. A los machos generalmente se les aplica una dosis de 1-2 mg.kg⁻¹ de biomasa con la segunda dosis de la hembra,



para asegurar la espermiación satisfactoria del macho en el momento de ovulación de la hembra (Vinatea, 1987).

3.3. CARATERIZACIÓN SEMINAL

En todas las especies animales, evaluar la calidad espermática es requisito indispensable para asegurar el éxito de la inseminación artificial y para monitorear los procedimientos de manipulación del material seminal, tales como su almacenamiento en fresco (Cruz-Casallas *et. al.*, 2004), junto con la movilidad y el tiempo de activación; la concentración espermática es una de las variable más utilizadas para determinar la calidad seminal en peces (Billard *et. al.*, 1995, Lahnsteiner y Patzner, 1998 y Honeyfield y Krise, 2000). La evaluación de la calidad seminal ha sido objeto de numerosos estudios y según Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría (2005) comprender las siguientes etapas:

- Obtención de la muestra de semen.
- Determinación de las características macroscópicas.
- Evaluación de las características microscópicas.
- Pruebas bioquímicas.
- Pruebas de fertilidad.

En el presente estudio sólo determinadas y evaluadas las tres primeras etapas.

Tanto las variables evaluadas como los procedimientos utilizados para determinar la calidad seminal en los peces, han sido adaptados de aquellos empleados en animales de granja como bovinos, ovinos y



equinos. Sin embargo, en los peces, aún no han sido establecidos parámetros que permitan clasificar el potencial reproductivo de un individuo en particular, debido principalmente a que las características seminales difieren considerablemente entre las especies; luego la información disponible constituye apenas una referencia de las características seminales consideradas propias de la especie (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005).

Para poder obtener éxito en el proceso de congelamiento de semen, es preciso tener un material fresco y de buena calidad, aliado a una apropiada técnica de crioconservación. La calidad del semen puede ser afectada por condiciones adversas, tanto en el proceso de espermatogénesis, almacenamiento intratesticular, así mismo por el tiempo de permanencia de los espermatozoides en los testículos (Ciereszko *et. al.*, 2000).

Toth *et. al.* (1997) y Lahnsteiner (2000), resaltan la importancia de conocer las características morfológicas y funcionales de los espermatozoides, para el estudio básico de la biología reproductiva y para la producción en cautiverio de cualquier especie íctica, así mismo, como para el desarrollo de la técnica dirigida hacia la conservación de las especies nativas.

Suquet *et. al.* (1993) destaca que la descripción de las características físicas y químicas del plasma seminales un prerequisite importante en la implementación de diluyentes para la inseminación y almacenamiento de los espermatozoides.

La calidad del semen se puede evaluar en diferentes niveles de complejidad: espermatozocrito, viabilidad espermática, porcentaje de movilidad espermática, intensidad de movilidad espermática,



ultraestructura de los espermatozoides, composición química del plasma seminal o la capacidad de fertilización que poseen los espermatozoides (Rurangwa *et. al.*, 2001). El objetivo es evaluar las características seminales, teniendo en cuenta, que los criterios utilizados para la evaluación de semen de los peces, hasta el momento, han sido basados en exámenes de movilidad, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Kavamoto *et. al.*, 1985).

Es importante anotar que el presente trabajo fue efectuado con individuos inducidos hormonalmente con EHC, con el propósito de obtener mayor cantidad de material fecundante.

3.3.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

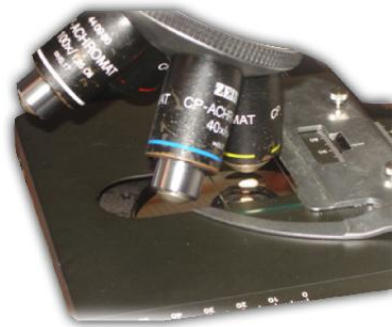
Volumen Seminal: se mide directamente dentro del recipiente de recolección, por lo cual se recomienda siempre utilizar un tubo aforado para recibir el semen. Esta característica se expresa en mL y su valor puede utilizarse posteriormente para calcular el número de espermatozoides presentes en la muestra, así como la cantidad de espermatozoides obtenidos por kilogramo de reproductor (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005).

La cantidad de semen producida por un reproductor depende de muchos factores, incluyendo desde la especie hasta la habilidad del técnico que realiza su extracción (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005).



3.3.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Las características microscópicas del semen deben determinarse dentro de las 8 horas siguientes a su recolección, ya que a medida que pasa el tiempo su calidad disminuye considerablemente, especialmente la movilidad espermática.



Concentración espermática: varios factores pueden afectar la concentración espermática de los peces, entre los cuales se pueden mencionar los factores ambientales y la época de la estación reproductiva. La concentración espermática es una de las medidas cuantitativas más importantes utilizadas en la investigación y la rutina de la evaluación del semen de peces de fecundación externa e interna, para maximizar el aprovechamiento del material fecundante y para así obtener mejores resultados en la fertilización (Fogli da Silveira *et. al.*, 1987).

Los peces producen cantidades viables de gametos. En algunas especies, el macho produce 100 billones de espermatozoides/año/kg de peso corporal o más de 1×10^9 espermatozoides/gramo de testículo/día, siendo diez veces mayor de la producción relatada en mamíferos (Billard, 1990b).

En peces teleósteos la concentración espermática puede variar de 2×10^6 a 6.5×10^{10} espermatozoides por mililitro de semen, según datos obtenidos por (Leung y Jamieson 1991).



Movilidad Espermática: el parámetro más utilizado para la evaluación seminal es la movilidad y, dentro de esta variable, las células espermáticas presentan características, como por ejemplo: el inicio, duración y parada de la motilidad (Cosson *et. al.*, 2000). Sin embargo, espermatozoides infértiles también presentan algún tipo de movilidad (Billard *et. al.*, 1995).

Como característica general los espermatozoides de los peces son inmóviles e inactivos en cuanto permanezcan en la luz testicular. La movilidad ocurre en un medio acuoso o, en especies con fertilización interna, dentro del tracto reproductor femenino, sugiriendo que la movilidad es inhibida en la mayoría de las especies estudiadas, por factores químicos específicos de los testículos o del plasma seminal (Stoss, (1983) y Morisawa, (1985)). Los cambios en las concentraciones del plasma seminal, tales como en la concentración de iones, en el pH y en la osmolaridad, pueden despolarizar la membrana celular e inducir la movilidad o activación espermática. En algunas especies, altas concentraciones de cationes (potasio), pH ácido y condiciones isotónicas podrían ser las responsables de la inhibición de la movilidad espermática. Mientras en algunos de estos factores, tales como la dilución de iones, variaciones de pH y el aumento de la osmolaridad en los teleósteos marinos o la disminución en teleósteos de agua dulce, activan la movilidad (Morisawa y Morisawa, 1990, Cosson *et. al.*, 2000).

Durante la reproducción natural, en las especies con fecundación externa, la movilidad es inducida por el simple contacto del semen con el medio acuoso. Por lo tanto, para evaluar la movilidad espermática es necesario adicionar a la muestra de semen agua o una solución hiposmótica que active el movimiento de los espermatozoides (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005).



Los principales problemas limitantes de la investigación en la movilidad espermática consisten en su corta duración y la dificultad de obtener una mezcla homogénea de semen con la solución activadora en el momento del análisis (Cosson *et. al.*, 1999).

Inicialmente puede estimarse el porcentaje de movilidad global o en masa, el cual consiste en observar una gota de semen inmediatamente después de adicionarle agua u otra solución activadora, la cual debe tener una osmolaridad menor a la del plasma seminal, como por ejemplo bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 1% en proporción 1:10 a 1:100 (semen : solución activadora). La solución de bicarbonato de sodio es especialmente útil para activar la movilidad espermática de semen crioconservado (Cruz-Casallas *et. al.*, 2004). La muestra así diluida debe observarse con objetivo de bajo aumento (máximo 10X) y la movilidad masal se califica subjetivamente con base en la amplitud de las ondas o remolinos que despliegan las células en movimiento. Su valor puede expresarse directamente en porcentaje o en una escala de 1 a 4, donde 1≈0-25%; 2≈25-50%, 3≈50-75% y 4≈75-100% de espermatozoides móviles (Suquet *et. al.*, 1992).

Lahnsteiner *et. al.*, (1995) consideraba que el valor del porcentaje de movilidad debería ser exhibidos junto con el tipo de movimiento de los espermatozoides, por ejemplo, porcentaje de espermatozoides con movimiento circular, con movimiento no lineal, porcentaje de espermatozoides con movimiento lineal y dentro de estos últimos, la velocidad de movimiento.



Tiempo de Activación: la duración e intensidad de la movilidad espermática permite inferir sobre la capacidad fecundante del semen estudiado. Esta variable es evaluada junto con la movilidad, cronometrando el tiempo transcurrido desde el momento en que se adiciona al semen la solución activadora, hasta la verificación de ausencia de movilidad espermática en la muestra. La duración de la movilidad espermática varía ampliamente entre las especies de peces (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005). Y coincide en general con el periodo fértil del espermatozoide. Las características químicas, así como el volumen de la solución activadora utilizada determinan la duración de la movilidad del espermatozoide. Por ejemplo, una solución de bicarbonato al 1% aumenta el tiempo de activación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*) y cachama (*Piaractus brachypomus*) (Navarro-Poveda *et. al.*, 2000). Por su parte, la temperatura también afecta la duración de la movilidad; por ejemplo, en *Mugil capito* bajas temperaturas resultan en prolongada movilidad, pero con menor velocidad de las células (Hines y Yashouv, 1971).

Viabilidad Espermática: determina el porcentaje de células espermáticas muertas o con graves daños en la integridad de su membrana celular. Para el cálculo se utilizó el método de la coloración diferencial, empleando una solución de eosina y como colorante de contraste nigrosina (Swanson y Bearden, 1951), basada en que los espermatozoides muertos son permeables a los colorantes y por lo tanto aparecen coloreados en el micropreparado.

La técnica consiste en mezclar cuidadosamente una pequeña gota de semen (2-5 μ L) con la solución de los dos colorantes mencionados



anteriormente (50 μ L), sobre una lámina portaobjetos limpia y seca. Posteriormente se realiza un extendido, se deja secar al ambiente y luego es analizada al microscopio óptico (100X) para estudiar 200 espermatozoides por lámina y realizar la diferenciación correspondiente.

3.4. CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN DE PECES

Investigadores han observado como ciertas formas de vida pueden vivir congeladas durante algún tiempo y luego al descongelarse continúan con sus funciones vitales normales (Chaparro, 1994). La tecnología de crioconservación (criobiología) de semen se revolucionó hace 50 años aproximadamente, por el descubrimiento que el glicerol podía actuar como crioprotector. Esta importante observación facilitó la congelación de espermatozoides y su almacenamiento por largos periodos, para luego usarlos en programas de inseminación artificial (Holt, 2000). La crioconservación requiere de la deshidratación de las células, inducidas por un diluyente que debe congelarse más rápido que las células en él contenidas (Harvey *et. al.*, 1982), evitando así la formación de cristales de hielo y la concentración de los solutos intracelulares, lo cual es deletéreo para la célula (Hafez, 1986).



La crioconservación es una técnica de conservación de tejidos, células u otros materiales biológicos a muy bajas temperaturas, en la cual los materiales permanecen genéticamente estables y metabólicamente inertes (Hafez, 1986). Además, es la rama de la criobiología (estudio de la vida a bajas temperaturas) por medio de la cual se espera prolongar



indefinidamente el potencial de vitalidad y las funciones metabólicas normales de las células a temperaturas criogénicas generalmente de -196°C , permitiendo su conservación (Ramos, 1986). La Criobiología se refiere a la ciencia que estudia los sistemas celulares, ya que esta puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar las membranas celulares y los organelos (Ávila *et. al.*, 2006).

Los avances en la tecnología de crioconservación han permitido la conservación a bajas temperaturas de una gran variedad de especímenes, incluyendo desde células aisladas, hasta organismos multicelulares más complejos como embriones.

El dramático descenso en los *stocks* naturales de peces y de la presión antrópica ejercida sobre los hábitats naturales de las especies, ha generado la creación de bancos genéticos para la conservación de sus genotipos, práctica que se ha tornado relevante para la acuicultura (Harvey, 2000). Se ha reportado la congelación de semen de aproximadamente 200 especies de peces (Rana, 1995), con resultados altamente variables (Billard *et. al.*, 1995).

El desarrollo de esta técnica ha permitido cambios dramáticos en la industria pecuaria. Semen congelado es usado mundialmente, como una herramienta esencial en los programas de mejoramiento animal. En principio, beneficios similares pueden ser esperados de su aplicación en la industria piscícola, además, el valor del almacenamiento de gametos por periodos indefinidos de tiempo, como medio para la conservación de varias especies de peces en peligro de extinción, ha sido ampliamente reconocido, puesto que semen congelado de individuos de tales poblaciones puede colectarse para el establecimiento de bancos genéticos



(Asturiano, 2003 y Medina *et. al.*, 2005). La disponibilidad continua de semen que ofrece la crioconservación, facilita el manejo de la asincronía reproductiva de algunas especies ícticas, en las cuales las hembras presentan maduración gonadal aun cuando los machos no se encuentran en actividad reproductiva, ya sea por inmadurez o por disminución de la calidad seminal hacia finales de su periodo reproductivo (González y Díaz, 2000).

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

En general, los efectos benéficos de la preservación de gametos en peces teleósteos, citado por Lubzens *et. al.* (1997) incluyen:

- Facilitar la selección de reproductores a través del almacenamiento de gametos de individuos genéticamente mejorados.
- Incrementa la protección sanitaria, permitiendo la introducción de nuevas líneas genéticas reduciendo el peligro de transmisión de patógenos desconocidos en los cultivos de peces (Asturiano, 2003).
- Suministro permanente de gametos para la óptima utilización de criaderos o para investigación.
- Economía para el mantenimiento de criaderos proporcionando un resguardo por pérdidas en líneas genéticas.
- Facilidad de transporte de material genético entre criaderos realizando protección genética con gametos y embriones crioconservados.



Por otro lado se sabe que el daño a las células espermáticas crioconservadas es inducido por la formación de hielo, lo cual ocurre más frecuentemente durante la descongelación que durante la congelación. También es conocido que a menor velocidad de descongelación, la formación de pequeños cristales de hielo es más común. Sin embargo, células de algunas especies pueden tolerar una mayor gama de velocidad de descongelación que otras (Bolla *et. al.*, 1987).

Los efectos perjudiciales del hielo intracelular, se deben al aumento del volumen del agua al congelarse, a la recristalización durante el descongelamiento y al estrés osmótico celular, al fundirse el hielo intracelular. Sin embargo, cuando una suspensión de células se enfría por debajo de 0°C, se forman cristales de hielo extracelulares lo cual hace que los solutos se concentren en el agua líquida restante. De este modo, la membrana celular actúa como una barrera impidiendo la diseminación de los cristales de hielo hacia los compartimentos intracelulares (Hafez, 1986).

Los procedimientos de crioconservación para semen de peces incluye la dilución del semen en un diluyente, un periodo corto de equilibrio, congelación del semen diluido, almacenamiento en nitrógeno líquido y descongelación en soluciones apropiadas (Cloud *et. al.*, 1990).

La calidad del semen es también crítica para el éxito de la crioconservación (Billard *et. al.*, 1992). Las muestras de semen contaminadas con orina, materia fecal o bilis, y almacenadas por periodos prolongados antes de la congelación, son más difíciles de crioconservar (Rana, 1995).

En el proceso de la crioconservación usualmente se producen daños en un gran número de espermatozoides. Por consiguiente, sólo una pequeña



fracción de espermatozoides es viable después de los procesos de congelación y descongelación. Por esta razón, se requiere de mayor cantidad de semen crioconservado que de semen fresco (alrededor de 10 veces) para fertilizar un número igual de oocitos (Billar *et. al.*, 1992).

De igual manera, un aumento en el número de espermatozoides crioconservados, no siempre provee igual éxito en la fertilización, como en el semen fresco. Este bajo éxito en la fertilización de semen crioconservado no es económicamente factible para los criaderos por los altos costos de almacenamiento de esperma y baja eficiencia. Por esto, los esfuerzos deben estar dirigidos a conseguir porcentaje de fertilización con semen crioconservado, similares a aquellos obtenidos con semen fresco.

Según Medina-Robles *et. al.* (2005) se busca que los diluyentes utilizados en la crioconservación de células espermáticas deben cumplir las siguientes condiciones:

- a. Ser isotónica en el plasma seminal cuando es utilizado en refrigeración para no producir cambios iónicos membranales y la consecuente activación espermática.
- b. Tener capacidad tampón con el fin de mantener el pH cerca de la neutralidad.
- c. Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.



- d. Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se pueden utilizar antibióticos en su composición, siendo los más utilizados penicilina G-sódica y sulfato de dihidro-estreptomicina.
- e. Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples seminaciones.
- f. Contener moléculas que protejan a los espermatozoides contra el frío, clasificada en función de su capacidad de atravesar la membrana plasmática en sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.

La causa de pérdida de la movilidad y mayor mortalidad espermática durante la crioconservación se debe al aumento en la concentración de sales, formación de cristales de hielo en el interior del espermatozoide, cambios en el pH, desnaturalización de proteínas, aumento del tamaño de la mitocondria y rotura mecánica de elementos estructurales, durante el proceso del cambio de estado (Yao *et. al.*, 1999).

La mayoría de los medios utilizados para la crioconservación espermática son hipertónicos con respecto al plasma seminal. El aumento de la presión osmótica de los medios facilita la salida del agua al medio extracelular con el fin de equilibrar las concentraciones a ambos lados de la membrana plasmática, produciendo un mayor grado de deshidratación en el espermatozoide y por consiguiente reduciendo la formación de hielo en su interior, obteniendo unos resultados mejores tras la descongelación.



3.4.1. DILUYENTES Y CRIOPROTECTORES

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen de peces, con los cuales se busca prolongar la viabilidad de la célula espermática por un período corto de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación) y aumentar el número de dosis inseminantes de un reproductor; además proteger el esperma de la acción tóxica de agentes extraños y de los cambios bruscos de temperatura (Cortés, 2000).



Crioprotectores no permeables: son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática de los espermatozoides protegiendo su estructura de la acción del frío. No atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular, además, previene el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Medina-Roble *et. al.*, 2005).

Los compuestos que no atraviesan la membrana celular o extracelular, entre los cuales se encuentran azúcares como la glucosa o sacarosa;



proteínas y glicoproteínas como las contenidas en la yema de huevo, su función es la de cubrir la superficie de la célula estabilizando su membrana, e interactuando con los crioprotectores que se traspasan la membrana celular, para inhibir el punto de congelación y aumentar la temperatura de transición del estado de líquido a sólido de los cristales de hielo (Shlafer, 1981).

Yema de huevo: los huevos han de ser frescos, no trascurrido más de cuatro días desde la postura hasta el momento de su utilización. La incorporación de la yema se realiza sobre el volumen final del diluyente base homogenizándose adecuadamente. Para eliminar las partículas gruesas se realiza centrifugación del diluyente. La yema de huevo posee acción termoprotectora, la cual es ejercida por la fracción lipídica compuesta por la lecitina y cefalina y una acción conservadora, dada por la acción de la lipoproteína (Ramos, 1986 y Medina-Robles, 2005).

La adición de la yema de huevo como estabilizador de la membrana fue investigado por Cabrita *et. al.*, (1998), quienes observaron que esta proporcionó una mayor supervivencia post-descongelación. Otros estudios demuestran que la adición de huevo de gallina a la muestra congelada protege la membrana de la célula espermática durante los procesos de congelación y mejora significativamente los porcentajes de fertilización post-descongelación (Babiak *et. al.*, 1995)

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo, se adhieren a las membranas celulares durante la congelación y descongelación, han sido consideradas como el principal factor crioprotector en la crioconservación de espermatozoides en mamíferos (Babiak *et. al.*, 1999).



Glucosa: los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido al aporte energético al espermatozoide, ya que estos son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa, esta última por la vía oxidativa; y su acción como crioprotectores contribuye a mantener el equilibrio osmótico. Tal como afirma Ramos (1986), quien reafirma que los azúcares (fructosa y glucosa) suministran energía a los espermatozoides en los procesos vitales y aportan sustitutos de electrolitos para el mantenimiento de la presión osmótica.

Leche: es muy utilizada la leche descremada, la cual también ejerce un efecto termoprotector y proporciona nutrientes a los espermatozoides. El uso de la leche descremada mejora la visibilidad de la movilidad espermática, lo cual no es posible en la leche entera, debido a la presencia de glóbulos de grasa (Bearden y Fuquay, 1982).

Crioprotectores permeables: la elección del crioprotector ha sido asunto de ensayo y error en la mayoría de las investigaciones, quizá porque aún no existe una explicación satisfactoria para la acción de los mismos sobre la célula espermática (Holt, 2000). Aunque Schlafer (1981) afirma que los crioprotectores permeables como el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol (MET) son extensamente usados para disminuir el punto de congelación del medio extracelular,





minimizando los efectos deletéreos de los cristales de hielo y regulando la tasa de deshidratación celular. Estas sustancias protegen los espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación, por su alta solubilidad en el agua, lo cual permite la formación de enlaces de hidrógeno y agua, permitiendo 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 la células, favoreciendo la sobrevivencia celular al disminuir los daños electrolíticos causados en la membrana celular por la mayor concentración de iones en la fase líquida (Graham, 1978).

Medina-Robles *et. al.*, (2005) aclara que los crioprotectores permeables son aquellos que penetran al interior de la célula, evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos de medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en su interior. Son sustancias que poseen un bajo peso molecular y se destacan por su amplia utilización el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2 propanodiol, butenediol, acetamina, propilenglicol, etilenglicol (ETG), metanol (MET) y etanol.

Sin embargo, la exposición del esperma a los crioprotectores por tiempos prolongados, y a altas concentraciones puede causar desnaturalización de las proteínas celulares (Shlafer, 1981).

Dimetilsulfóxido (DMSO): el DMSO ha sido muy utilizado en el estudio de congelación de semen, en los cuales se reporta la observación de efectos positivos en la descongelación del semen (Neira *et. al.*, 1992); además, ha demostrado ser el crioprotector de elección en la



conservación se semen en salmónidos usado a concentraciones de 5 a 15% (Munkittrick, (1984), citado por Gallant y Richardson, (1993)).

La interacción del DMSO con la célula puede tener diferentes mecanismos y se ha sugerido que existe una interacción electrostática entre el grupo sulfóxido polar del DMSO y la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática (Anchordoguy, 1991).

En estudios realizados por Yao *et. al.*, (1999), estos investigadores mencionan que el DMSO fue esencial para evitar la muerte del semen durante la crioconservación, utilizándolo al 20%, mostró la más alta movilidad (20-25%) después de la descongelación, además se demostró que la seminación artificial *in vitro* de óvulos frescos con semen crioconservado produjo una fertilidad del 33% vs 48% con semen fresco.

Metano (MET): el metanol suele ser menos tóxico en unas especies que en otras y su efecto suele ser atribuido a su capacidad de salir y entrar más rápidamente de la célula que otros crioprotectores, lo cual podría conducir a un menor daño de la membrana espermática por formación de cristales de hielo (Tiersch *et. al.*, 1998).

Etilenglicol (ETG): en los trabajos realizados con etilenglicol se evidencia que dentro de los crioprotectores evaluado (DMSO, glicerol, ETG), el ETG presenta un mayor efecto protector para la preservación del acrosoma (Deppe *et. al.*, 2003), lo cual no es relevante para la crioconservación de semen de peces, ya que esta estructura esta ausente en el espermatozoide de la mayoría de las especies.



3.5. CONGELACIÓN - DESCONGELACIÓN DEL SEMEN



El proceso de congelación debe ser lo suficientemente rápido como para que el choque térmico sea mínimo y sin embargo, no tan rápido como para permitir la formación de cristales de hielo intracelular (Baynes y Scott, 1987). De igual manera se recomienda que el semen crioconservado se descongele lo más rápidamente posible para evitar la recrystalización del agua intracelular (Harvey y Hoar, 1980).





4. MATERIALES Y METODOS

4.1. LOCALIZACIÓN



La investigación se desarrolló en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL), ubicado en el kilómetro 4 sobre la vía Puerto López, en la vereda Barcelona de la ciudad de Villavicencio, capital del Departamento del Meta, localizada a 418 m.s.n.m., presentando una temperatura ambiente anual de 25°C y una temperatura promedio del agua de 27°C. Su clima se



caracteriza por tener una humedad relativa promedio de 75% y una precipitación pluvial de 4050 mm.

4.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 11 machos de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) sexualmente maduros extraídos del río Meta y mantenidos en diferentes estaciones piscícolas localizadas en municipios aledaños al Instituto de Acuicultura (IALL) de la Universidad de los Llanos. Los machos de bagre rayado presentaron los signos de maduración descritos por Woynarovich y Horváth (1983), papila urogenital entumecida y fácil liberación del semen a través de una leve presión en el abdomen en sentido cráneo-caudal (Fabrocini *et. al.*, 2000 y Gwo *et. al.*, 2005).



Los bagres rayados fueron mantenidos en estanques en tierra donde se alimentaban con peces vivos. Los animales que presentaron signos de maduración fueron trasladados a piletas circulares de concreto donde fueron identificados mediante *microchips* de 15 dígitos implantados en la parte derecha de la porción craneal subyacente a la aleta dorsal. A cada uno de los ejemplares se les registró sus características morfométricas, como se presenta a continuación:



Tabla1. Características morfométricas de los individuos de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) utilizados en el estudio. Valores mostrados como la media \pm SEM. $n = 11$.

Características Morfométricas					
Peso (kg)	LT(cm)	LC (cm)	PP (cm)	PA (cm)	AC (cm)
2.3 \pm 0.3	61.3 \pm 2.9	31.3 \pm 2.1	25.4 \pm 1.4	21.1 \pm 1.4	9.0 \pm 0.6

LT: longitud Total, LC: longitud Cloacal, PP: perímetro pectoral, PA: perímetro anal, AC: ancho de cabeza.



4.3. CAPTURA, SELECCIÓN DE LOS PECES, INDUCCIÓN HORMONAL Y OBTENCION DEL SEMEN

Captura de los peces: los animales fueron pescados con un “chinchorro” de 1 cm de ojo de malla, en horas del día de menor intensidad solar, para minimizar los efectos adversos de la radiación. Posteriormente los machos fueron



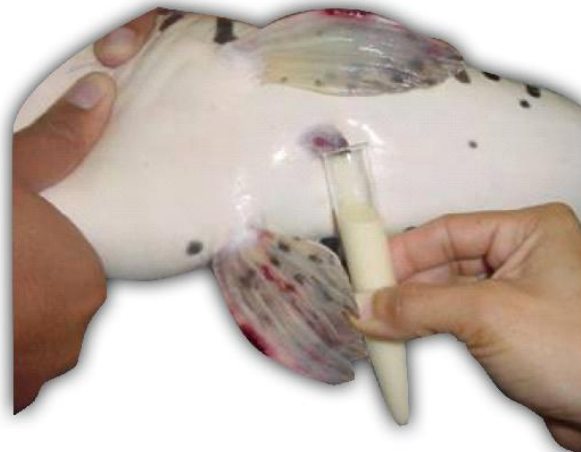


evaluados antes de ser trasladados a las piletas de manejo, la valoración de la madurez sexual se realizó haciendo una leve presión, en sentido cráneo-caudal, sobre la región abdominal, verificando la presencia de semen en la papila urogenital.

Inducción hormonal: la maduración final de las gónadas fue inducida hormonalmente con Extracto de Hipófisis de Carpa (EHC), empleando una dosis única de 4 mg.kg^{-1} de peso corporal vía intramuscular, diluida con suero fisiológico y aplicada en la parte posterior de la base de la aleta dorsal. El semen fue extraído 18 a 20 horas post-inducción.



Obtención del semen: antes de obtener el semen los animales fueron tranquilizados en una solución de agua que contenía 300 ppm de 2-fenoxietanol (0.3 mL.L^{-1} de agua), donde fueron sumergidos hasta la pérdida de su eje de nado, posteriormente los animales fueron extraído de la solución y secados muy cuidadosamente para evitar que el semen fuera activado durante la recolección, de igual forma, se realizó un masaje abdominal para evacuar restos de agua, orina, heces y bilis (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005) que pudieran contaminar la muestra, ya que





varios estudios han mostrado disminución en algunos parámetros como son: porcentaje de movilidad, velocidad espermática, frecuencia de remolino y posible activación de la célula espermática (Perchec *et. al.*, 1998). Finalmente el semen fue obtenido mediante una leve presión abdominal en sentido cráneo-caudal y recolectado en tubos de vidrio aforados de 15 mL secos y estériles, colocados en la parte caudal de la papila urogenital.

4.4. EVALUCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES

Inmediatamente después de obtenido el semen se evaluó la calidad seminal que comprende tanto la determinación de las características macroscópicas, observables a simple vista, como la medición de variables que requieren ayuda del microscopio óptico (características microscópicas) así:

4.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Volumen Seminal: se determinó directamente en el tubo de ensayo aforado de recolección y se expreso en mL.





4.4.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Movilidad Global o Masal: la movilidad masal fue estimada en porcentaje y se evaluó subjetivamente con base en la amplitud de las ondas o remolino que despliegan las células en movimiento con la ayuda de un microscopio óptico (Axiostar Zeiss, Alemania) a un aumento de 10X. Para lo anterior se utilizó una lámina excavada (1.0 a 1.2 mm de profundidad, Premiere, China) sobre la cual se colocó una gota de semen (20 μ L) que fue activada con 180 μ L de agua libre de cloro. Muestras con movilidad masal superior a 80% fueron consideradas aptas para congelación.

Tiempo de Activación: es la duración de la intensidad de la movilidad espermática que permite inferir sobre la capacidad fecundante del semen estudiado, para la determinación del tiempo de activación se cronometra el tiempo transcurrido desde el momento en el que se activo el semen hasta la inmovilidad del 90% de los espermatozoides, esta variable se expreso en segundos y se observo en un microscopio óptico a (Axiostar Zeiss, Alemania) a un aumento de 10X.

Concentración Espermática: consiste en el número de células espermáticas por unidad de volumen y se expresa en millones de espermatozoides por microlitro (μ L) o mililitro (mL). Su determinación se realizó dentro de las 8 horas siguientes a la colección del semen, previamente se hizo una dilución de 1:4000 de la muestra de semen empleando pipetas de precisión (micro pipetas) y una solución salina formolada que contenía en 0.9% de solución salina y 3% de formol.



Posteriormente una gota (20 μL) de semen diluido fue colocada en la cámara de Neubauer, la cual ha sido empleada con éxito en varias especies de peces (Neira *et. al.*, 1992 y Cruz-Casallas y Velaso-Santamaría, 2005). La cámara fue mantenida en atmósfera húmeda durante al menos 10 minutos para permitir que los espermatozoides se ubiquen por decantación en un mismo plano focal; luego se observó al microscopio con un aumento de 40X y se realizó el recuento de las células espermáticas colocadas en cinco (0.2 mm^2) de los 25 sub-cuadros del cuadro central (1.0 mm^2). Como no se tenían referencias sobre la concentración espermática del bagre rayado (*P. fasciatus*) se estableció una dilución (1:4000) que nos permitía contar de 30 a 40 espermatozoides en cada sub-cuadro (0.04 mm^2) de la cámara de Neubauer. Para cada muestra se realizó el conteo en las dos cuadrículas de la cámara y se utilizó el promedio para los cálculos posteriores.

Una vez contados los espermatozoides, la concentración espermática fue calculada aplicando la siguiente fórmula:

$$CE = \frac{n}{A \times P \times D}$$

Donde:

n: número promedio de espermatozoides contados en los cinco sub-cuadros de las dos cuadrículas.

P: profundidad de la cámara (0.1 mm).

A: área de la cámara de Neubauer contada (generalmente 0.2 mm^2).

D: dilución del semen (en este caso 1:4000).



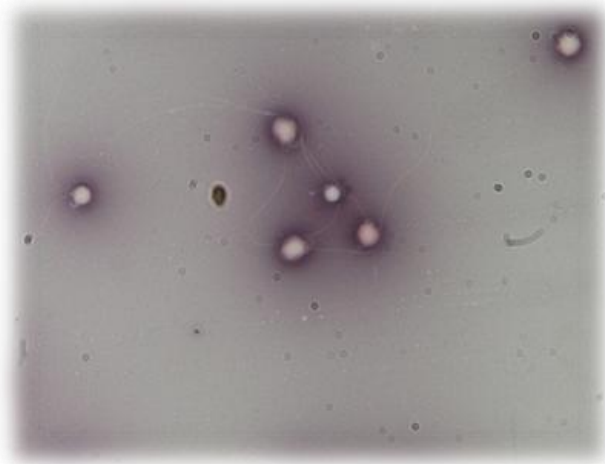
Espermatocrito: el espermatocrito es un método más rápido e indirecto de medir la concentración espermática y consiste en estandarizar una curva de relación con el espermatocrito, definido como la relación entre volumen de las células empacadas y el volumen total de la columna de semen sometida a centrifugación, multiplicada por cien (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005). El método para calcular el espermatocrito se basó en el mismo principio del hematocrito estimado en hematología (Hickman, 1958).

Su determinación consiste en llenar con semen cerca del 90% (Velasco-Santamaría y Cruz-Casallas, 2003) de los tubos microcapilares (VITREX), que poseen una medida de 75 mm de longitud y 1.1 mm de diámetro interno, posteriormente las muestras fueron sometidas a centrifugación (12000 r.p.m., Microcentrífuga EBBA12, Alemania) a 14000 gravedades de fuerza centrífuga durante 15 minutos, para lo cual fue necesario estandarizar tanto el tiempo como la fuerza centrífuga ya que para esta especie aún no se encontraba ningún reporte. La lectura del espermatocrito se realizó por medio de la utilización de una regla milimetrada, relacionando la columna blanca (paquete celular) y la columna trasparente (plasma seminal), y expresándolo en porcentaje.





Viabilidad: se determinó el porcentaje de células espermáticas muertas con grandes daños en la integridad de su membrana celular en cada muestra de semen, por medio de la tinción con eosina-nigrosina (OMS, 1987), observándose en un microscopio óptico (Axiostar Zeiss, Alemania) a un aumento de 100X, para evaluar 200 espermatozoides por lámina. Teniendo en cuenta que los espermatozoides vivos conservan su forma, mientras que los muertos toman la coloración de la eosina debido a que su membrana se vuelve permeable, absorben el colorante y aumentan de tamaño.



Vigor de la Movilidad Espermática: esta característica se determinó subjetivamente en el microscopio (Axiostar Zeiss, Alemania) a un aumento de 10X, en escala de 0 a 5, con base en la observación de la velocidad de las ondas formadas por el movimiento de los espermatozoides.



4.5. PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

Únicamente muestras de semen con movilidad superior a 80% fueron utilizadas para crioconservación ($n = 6$).

4.5.1. PREPARACIÓN DEL DILUYENTE

Los crioprotectores permeables utilizados en la congelación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) fueron dimetilsulfóxido (DMSO) (Merk, Germany), Metanol (MET) (Merk, Germany) y Etilenglicol (ETG) (Sigma, Germany) en diferentes proporciones (5, 10, 12 y 15%) y como crioprotectores no permeables se empleó glucosa (GL) (5.5%), yema de huevo (YH) de gallina de campo (12%) y leche entera en polvo (LE) (5%). Se prepararon 24 diluyentes a base de los crioprotectores (DMSO, MET, ETG) en sus diferentes proporciones (5, 10, 12 y 15%), leche entera en polvo (LE), yema de huevo (YH) y glucosa (GL). Las proporciones son mostradas en la Tabla 2.



Tabla 2. Composición de los diluyentes utilizados para la congelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*).

N° Diluyente	DMSO	MET	ETG	YH	LE	GL
	%					
1	5			12		5.5
2		5		12		5.5
3			5	12		5.5
4	5				5	5.5
5		5			5	5.5
6			5		5	5.5
7	10				5	5.5
8		10			5	5.5
9			10		5	5.5
10	10			12		5.5
11		10		12		5.5
12			10	12		5.5
13	15			12		5.5
14		15		12		5.5
15			15	12		5.5
16	15				5	5.5
17		15			5	5.5
18			15		5	5.5
19	12			12		5.5
20		12		12		5.5
21			12	12		5.5
22	12				5	5.5
23		12			5	5.5
24			12		5	5.5

DMSO: dimetilsulfóxido, MET: metanol, ETG: etilenglicol, YH: yema de huevo, LE: leche entera en polvo, GL: glucosa.



Para la preparación de los diluyentes se marcaron tubos aforados de 15 mL con los nombres de cada diluyente, colocados en una gradilla. Luego en cada uno de los tubos se mezcló la glucosa con aproximadamente 2 mL de agua destilada previamente calentada en microondas por 10 segundos, para una mejor dilución de la glucosa, posteriormente se agregó el volumen total del crioprotector según el protocolo descrito anteriormente.

Posteriormente, fueron adicionados los crioprotectores no permeables (yema de huevo (YH 12%) y leche entera en polvo (LE 5%)), teniendo en cuenta que para los diluyentes que poseían como crioprotector el dimetilsulfóxido (DMSO) se debía esperar a que la reacción exotérmica del DMSO con el agua haya terminado, para evitar la coagulación de la yema. La dilución de la leche entera en polvo (LE) se realizó mezclando la misma en los tubos de ensayo aforados con un agitador hasta que se disolviera completamente.

Para los diluyentes que estaban compuestos por yema de huevo (YH), ésta se obtuvo después de lavar y desinfectar el huevo con metanol, posteriormente se rompió su cáscara y se separó cuidadosamente la yema de su clara. Por último la yema fue colocada sobre un papel absorbente para eliminar los residuos sobrantes, el contenido de la yema fue separado de la membrana vitelina por medio de una punción sobre la yema con una aguja; la yema se incorporó previo a la utilización de los diluyentes. Finalmente, se adicionó la cantidad suficiente de agua destilada para completar 10 mL de volumen final. Antes de la incorporación del semen con el diluyente, éste último fue agitado nuevamente para tener una mejor homogenización de sus componentes. Es recomendable no almacenar diluyentes, ya que se favorece la proliferación de bacterias (Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría, 2005).



4.5.2. EVALUACIÓN DE LOS DILUYENTES

Para la evaluación de los diluyentes el semen y los diluyente se mezclaron a temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) en proporción 1:6 (1 parte de semen y 5 partes de diluyente) utilizando micropipetas y tubos ependorff (50 μL de semen con 250 μL del diluyente a evaluar). El porcentaje de movilidad masal precongelación (%) del semen fue evaluado inmediatamente después de diluido. Para este propósito se utilizaron láminas excavadas, colocando 20 μL de semen diluido y 180 μL de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 1% como solución activadora. La movilidad fue evaluada como fue descrita anteriormente.

4.5.3. EMPACADO Y CONGELACIÓN DEL SEMEN

Previo a la congelación del semen, se verificó la no activación espermática por parte del diluyente.

Empacado en pajillas: para cada diluyente se emplearon 12 pajillas francesas de 0.5 mL, debidamente identificadas. Estas pajillas poseen un tapón de algodón que permite el llenado por aspiración hasta el extremo superior. El extremo libre fue sellado con polivinilo; luego se limpiaron y se ubicaron en posición vertical en un soporte de polímero de PVC y aluminio en el cual se realizó la primera fase de congelación que se describe posteriormente.





El proceso de congelación de las pajillas se realizó en dos fases, así:

Primera fase: una vez ubicadas las pajillas en el soporte, estas fueron introducidas en un termo seco de vapores de nitrógeno líquido (NL) (Taylor-Wharton, CP 100, Theodore, AL, USA) y expuestas a estos vapores durante 30 minutos, tiempo en el cual alcanzan una temperatura de -196°C .



Segunda fase: inmediatamente después de que las pajillas fueron expuestas a los vapores de nitrógeno, las pajillas fueron trasladadas y sumergidas en un termo de nitrógeno líquido (NL) (Taylor-Wharton, Hc 35) hasta su evaluación. Estas pajillas fueron ubicadas en posición vertical en un soporte de PVC, diseñado según la longitud de la pajilla. La evaluación de la movilidad masal post-descongelación se realizó ocho días después del proceso de congelación.



4.5.4. DESCONGELACIÓN DEL SEMEN

La descongelación se realizó en un baño de agua a 35°C durante 60 segundos. Las pajillas fueron sumergidas en el baño de agua inmediatamente después de ser extraídas del termo de congelación. Para este propósito se preparó previamente el baño de agua y se procuro que el intervalo entre el retiro de la pajilla del nitrógeno líquido (NL) y la inmersión en el baño de agua fuera en el menor tiempo posible (máximo 5 segundos).



Una vez que la pajilla fue descongelada se secó y uno de sus extremos fue abierto con un cortapajillas y el semen fue depositado en un tubo ependorff seco y estéril. La movilidad masal fue inducida con seis diferentes soluciones activadoras así: bicarbonato (NaHCO_3) al 0.5 y 1%, agua destilada estéril, cloruro de sodio (NaCl) al 0.045 y 0.09% y una solución de NaCl 34 mmol y TRIS 30 mmol (hidroximetil aminometano), de la misma forma como se describió anteriormente.



4.6. ANÁLISIS DE DATOS

Los valores obtenidos fueron sometidos a estadística descriptiva y expresados como media \pm error estandar de la media (SEM). Diferencias estadísticas para la variable movilidad precongelación al interior de cada crioprotector con respecto al semen fresco fueron dilucidadas por medio de análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por prueba de comparación de Tukey o Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparación Duncan, según los datos resultaran paramétricos o no paramétricos, respectivamente. Previo a cada análisis, la homogeneidad de las varianzas fue establecida por medio de la prueba de Bartlett. En todos los casos $p < 0,05$ reveló diferencia significativa. Todos los procedimientos estadísticos fueron realizados empleando el software GraphPad InStat versión 3.06 para Windows.



5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS SEMINALES

Los valores de las características seminales del bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) son presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Características seminales del bagre rayado (*P. fasciatum*). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 9$

Característica Seminal	Media \pm SEM
Volumen total (mL)	9.9 \pm 3.2
Movilidad (%)	95.0 \pm 0.0
Tiempo de activación (seg)	50.2 \pm 1.3
Concentración (sptz $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	31.9 \pm 4.4
Espermatocrito (%)	48.0 \pm 1.7
Viabilidad (%)	92.6 \pm 0.5
Vigor (escala 0-5)	5.0 \pm 0.0



5.2. EFECTO DEL TIPO DE DILUYENTE SOBRE LA MOVILIDAD PRECONGELACIÓN

Tabla 4. Porcentaje de movilidad espermática precongelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) diluido activado con bicarbonato de sodio al 1%. Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 24$

N° Diluyente	Movilidad Precongelación
	%
1	23.3 \pm 13.3
2	1.6 \pm 1.6
3	11.6 \pm 11.6
4	86.4 \pm 2.3
5	77.5 \pm 15.5
6	76.6 \pm 3.3
7	63.7 \pm 6.5
8	88.1 \pm 2.4
9	26.6 \pm 4.4
10	72.5 \pm 2.5
11	7.2 \pm 2.7
12	8.5 \pm 2.7
13	5.0 \pm 0.0
14	5.0 \pm 0.0
15	10.0 \pm 0.0
16	40.0 \pm 0.0
17	0.0 \pm 0.0
18	5.0 \pm 0.0
19	54.3 \pm 2.0
20	3.0 \pm 1.2
21	32.8 \pm 8.1
22	70.0 \pm 6.3
23	14.0 \pm 6.8
24	7.1 \pm 1.0



La movilidad espermática precongelación del semen diluido (Tabla 4) con los diluyentes 4 ($86.4 \pm 2.3\%$), 10 ($72.5 \pm 2.5\%$) y 22 ($70.0 \pm 6.3\%$), los cuales corresponden a DMSO 5% LE, DMSO 10% YH y DMSO 12% LE, respectivamente (Figura 1), y los diluyentes 5 ($77.5 \pm 15.5\%$), 8 ($88.1 \pm 2.4\%$) y 6 ($76.6 \pm 3.3\%$) correspondientes a MET al 5 y 10% (Figura 2) y ETG 5% LE (Figura 3), respectivamente, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en comparación con el semen fresco que mostró una movilidad del 95%.

Los menores porcentajes de movilidad masal precongelación cuando comparados con el semen fresco fueron obtenidas con los diluyentes 13 ($5.0 \pm 0.0\%$), 17 ($0.0 \pm 0.0\%$) y 18 ($5.0 \pm 0.0\%$), correspondientes a DMSO 15% YH, MET y ETG al 15% LE, respectivamente (Tabla 4, Figura 1, 2 y 3). En general, las movilidades precongelación más bajas fueron observadas con los crioprotectores a concentraciones de 15%.

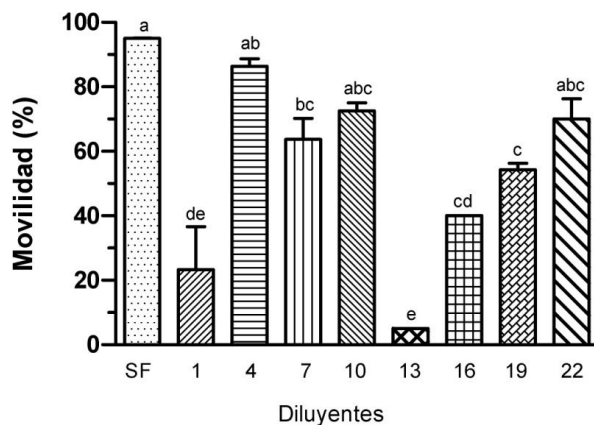


Figura 1. Porcentaje de movilidad masal precongelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) diluido con DMSO en diferentes proporciones y en relación al porcentaje de movilidad del semen fresco (SF). Entre columnas letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 6$.

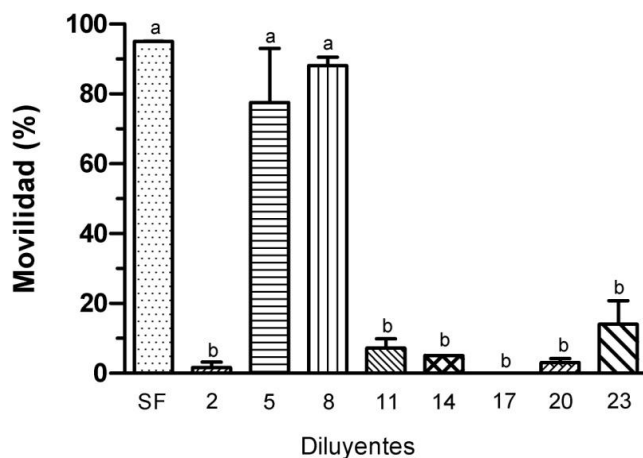


Figura 2. Movilidad pre congelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) diluido con metanol (MET) en diferentes proporciones y en relación al porcentaje de movilidad del semen fresco (SF). Entre columnas letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 6$.

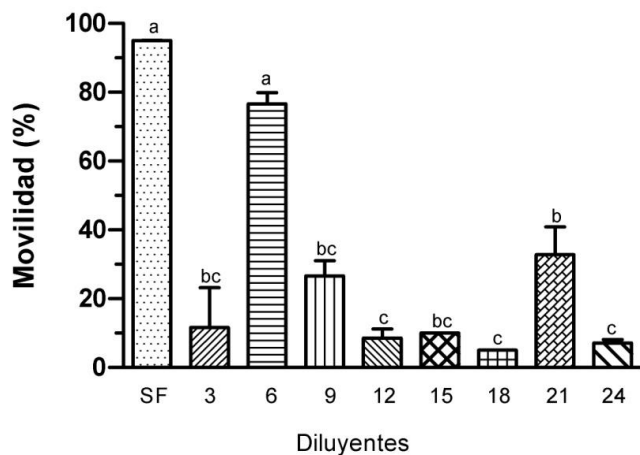


Figura 3. Movilidad masal pre congelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) diluido con ETG en diferentes proporciones y en relación al porcentaje de movilidad del semen fresco (SF). Entre columnas letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 6$.



5.3. MOVILIDAD MASAL POST-DESCONGELACIÓN

De los 24 diluyentes evaluados utilizando las 6 soluciones activadoras sólo el semen diluido utilizando como crioprotector MET 10 y 12% correspondiente a los diluyentes 8 (MET 10% LE), 11 (MET 10% YH), 20 (MET 12% YH) y 23 (MET 12% LE), presentaron movilidades post-descongelación (Tabla 5).

De las 6 soluciones activadoras evaluadas, solo bicarbonato (NaHCO_3) 0.5% y NaCl-TRIS presentaron activación en todos los casos para los diluyentes que mostraron movilidad post-descongelación. La movilidad post-descongelación más alta fue determinada en los diluyentes 20 y 23, correspondientes a MET 12% YH y LE respectivamente, con un valor de $11.6 \pm 1.6\%$, en ambos casos activadas con NaCl-TRIS. Al utilizar como solución activadora el cloruro de sodio al 0.09% no se presentaron movilidades post-descongelación en ninguno de los diluyentes (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de movilidad post-descongelación de semen de bagre rayado (*P. fasciatus*) activado con diferentes soluciones. Valores mostrados como media \pm SEM. $n = 12$

Diluyente	Solución Activadora					
	B 0.5 %	B 1 %	AD	NaCl 0.045%	N + T	NaCl 0.09%
8	7.2 ± 1.0	5.0 ± 0.0	6.6 ± 1.6	8.0 ± 1.2	8.6 ± 0.9	---
11	5.0 ± 0.0	---	---	---	9.0 ± 1.0	---
20	8.3 ± 1.6	7.5 ± 2.5	---	---	11.6 ± 1.6	---
23	7.5 ± 2.5	5.0 ± 0.0	8.3 ± 1.6	7.5 ± 2.5	11.6 ± 1.6	---

B: bicarbonato, AD: agua destilada, N+T: cloruro de sodio-TRIS, ---: no presenta movilidad



6. DISCUSIÓN

Los factores más críticos en la crioconservación de semen de peces que necesitan ser optimizados son la composición de los diluyentes, el tiempo de equilibrio y las velocidades de congelación y descongelación para perfeccionar y establecer los protocolos específicos para cada especie.

Las muestras seminales de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) obtenidas en el presente estudio presentaron condiciones aptas para su crioconservación, presentado una movilidad masal del $95.0 \pm 0.0\%$ en semen fresco. Estos valores son iguales a los reportados por Pinzón-Arciniegas *et. al.*, en el 2005, pero mayores a los mostrados por Brand (1996) ($92.0 \pm 4.7\%$, valores mostrados como media \pm desviación estándar) en la misma especie. Igualmente, evaluaciones realizadas en otros silúridos como la barbilla (*Rhamdia sebae* c. f.) reportan una movilidad del semen fresco de $94.0 \pm 0.7\%$ (Villalobos-Sánchez y Osorio-Velandia, 2007) y $91.0 \pm 2.3\%$ (Velasco-Santamaría *et. al.*, 2004). Ferreira *et. al.* (2001) reportan para el bagre sapo (*Rhamdia quelen*) una movilidad masal del semen del $80.0 \pm 1.0\%$. Y Araújo *et. al.* (2003) reporta una movilidad masal promedio de 87.0% para *Sorubim cuspicaudus*, un poco más baja que la reportada anteriormente para los otros silúridos.

La concentración espermática (31.9 ± 4.4 sptz $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) y tiempo de activación (50.2 ± 1.3 seg) encontradas en el presente estudio, fueron cercanas a las reportadas por Pinzón-Arciniegas *et. al.* (2005) en la misma especie, con valores de 23.4 ± 1.7 sptz $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ y 57 ± 2.1 seg.,



respectivamente. Otro estudio realizado en caracterización y preservación del semen de bagre rayado por Brand (1996) reporta un tiempo de activación superior (198.4 ± 49.7 seg.) cuando utiliza cloruro de sodio (NaCl) al 0.45% como solución activadora y una concentración espermática de 80.0 ± 11.3 sptz $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ (valores mostrados como la media \pm desviación estándar), significativamente elevada en comparación con los valores encontrados en este estudio teniendo en cuenta que Brand (1996) no utilizó la inducción hormonal y para la concentración realizó una dilución de 1:5000. Para *Sorubim cuspicaudus* (silúrido) se reporta una concentración espermática de 22.0 ± 1.2 sptz $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ y un tiempo de activación de 118.6 ± 34.2 segundos (valores reportados como media \pm SD) (Araújo *et. al.*, 2003). Las concentraciones espermáticas son similares en todos los estudios pero el tiempo de activación es relativamente alto, similar al reportado por *Rhamdia quelen* por Ferreira *et. al.*, (2001) de 121.3 ± 31.0 segundos (valores reportados como media \pm SD). Brand (1996) presenta en *Pseudoplatystoma fasciatum*.

Estudios anteriores sobre evaluación de las características seminales en bagre rayado, realizadas por Pinzón-Arciniegas *et. al.* (2005), obtuvieron un volumen promedio de 3.7 ± 0.3 mL, bajo cuando comparado con el volumen promedio obtenido en este estudio (9.9 ± 3.2 mL), aunque el volumen encontrado por Brand (1996) en la misma especie fue significativamente alto en comparación con los reportados anteriormente (24.5 ± 21.7 mL, valores mostrados como la media \pm desviación estándar).

La congelación espermática utilizando vapores de NL es la técnica más utilizada en peces (Linhart *et. al.*, 2000; Cruz-Casallas *et. al.*, 2004). Durante este proceso el espermatozoide esta sujeto a cambios drásticos en su medio físico y químico, como formación de cristales de hielo, estrés mecánico y



osmótico y desestabilización de la membrana plasmática (Lahnsteiner *et. al.*, 1992; Labbe *et. al.*, 1997). Pajillas de menor diámetro como 0.5 mL proporcionan un índice de congelación más alto en relación con los macro-tubos (2.5 y 5.0 mL), los cuales proporcionan índices más bajos de congelación y una meseta más larga (Bwanga *et. al.*, 1991). Lahnsteiner *et. al.* (2000) y Cabrita *et. al.* (2001), reportan un índice de congelación alto para semen de ciprinidos y trucha arco iris empacado en pajillas de 0.5 mL ($80^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de -4 a -50°C y $92.8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de -20 a -100°C , respectivamente). Aunque en el presente estudio no se determinó la tasa de congelación y descongelación, Velasco-Santamaría *et. al.* (2006) reporta tasas de congelación total de $93.1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 28 a -140°C usando vapores de NL y pajillas de 0.5 mL y de descongelación de $552.4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de -196 a 35°C empleando baño de agua a 35°C por 60 seg, situación experimental similar a la reportada en el presente estudio.

Los porcentajes de movilidad masal precongelación más altos alcanzados para bagre rayado (*P. fasciatus*) en este estudio fueron obtenidos por los diluyentes a base de DMSO 5% LE ($86.4 \pm 2.3\%$), DMSO 10% YH (72.5 ± 2.5), MET 5% LE ($77.5 \pm 15.5\%$) y MET al 10% LE ($88.1 \pm 2.4\%$). En comparación con los ensayos preliminares de crioconservación realizado por Villalobos-Sánchez y Osorio-Velandia en barbilla (*Rhamdia sebae* c. f.) que pertenece al mismo orden (Siluriforme) que el bagre rayado (*P. fasciatus*), arrojaron valores similares de movilidad masal precongelación al utilizar DMSO como crioprotector. Los mayores resultados de movilidad masal precongelación obtenidos para barbilla se presentaron al utilizando como diluyentes DMSO 5% YH ($95.0 \pm 0.0\%$), DMSO 5% LE ($93.0 \pm 1.2\%$), ETG 5% LE ($92.5 \pm 1.4\%$) y DMSO 10% LE ($89.0 \pm 3.6\%$).



De los 24 tratamientos evaluados se pudo evidenciar que el aumento en la concentración de los crioprotectores cuando comparados con el semen fresco ocasionó disminución en los porcentajes de movilidad masal precongelación. Obteniéndose los resultados más bajos al utilizar una concentración del 15% para todos los crioprotectores, esto tal vez se debe a que esta concentración pudo haber causado un efecto tóxico sobre la célula espermática.

En general, todo crioprotector ejerce efecto tóxico sobre el espermatozoide y se cree que las altas concentraciones de estos y durante periodos prolongados puede desnaturalizar las proteínas celulares reduciendo la viabilidad durante la precongelación (Shlafer, 1981). Estudios con espermatozoides de tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) sugiere que el DMSO tiene mayor efecto tóxico que el MET (Rana y Mc Andrew, 1989). La toxicidad de los crioprotectores y su efecto en la disminución de la movilidad y del tiempo de activación espermático se encuentran relacionados con el estado bioenergético del espermatozoide después del proceso de congelación. Crioprotectores como DMSO o glicerol pueden interferir en el balance entre la síntesis y la utilización de ATP, ocasionando una inapropiada activación de fosfolipasas, proteasas y un daño celular irreversible (Hammerstedt y Graham, 1992; Holt, 2000). El aumento en la concentración del crioprotector podría agudizar este evento disminuyendo así la movilidad y el tiempo de activación espermática.

La efectividad de la protección de cada una de las sustancias crioprotectoras está ligada a su capacidad de entrada y salida de la célula espermática a favor de su gradiente de concentración y la tasa de congelación-descongelación utilizada durante el proceso (Vincent *et. al.*, 1998). La velocidad de difusión del crioprotector a través de la membrana plasmática



puede verse afectada también por el aumento en la proporción de colesterol en la membrana durante el descenso de temperatura, ya que al aumentar para proporcionarle una mayor estabilidad mecánica su permeabilidad a pequeñas moléculas disminuye, afectando así la penetración del crioprotector a la célula (Spinel, 2002).

Por otro lado sólo cuatro de los diluyentes que contenían como crioprotector el MET al 10 y 12% presentaron porcentajes de movilidad masal post-descongelación (8, 11, 20 y 23) siendo superiores a los evaluados por Brand (1996) en la misma especie, empleando diluyentes a base de MET 5%, DMSO 9%, LE (15%) y (YH 10%) sin resultados de movilidad post-descongelación. En contraste, Pinzón-Arciniegas *et. al.* (2005) reportan movilidades post-descongelación de $35.0 \pm 1.0\%$ para bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) superior al obtenido en el presente trabajo, usando un diluyente a base de DMSO 7.5% YH. Estudios realizados con metanol concluyeron que es efectivo para la congelación de semen de pez gato africano (Steyn y Van Vuren, 1987; Steyn, 1993), coincidiendo con los únicos porcentajes de movilidad masal post-descongelación obtenidos en el presente trabajo.

En el caso de barbilla (*Rhamdia sebae* c. f.) los porcentajes de movilidad masal post-descongelación más altos fueron encontrados para el diluyente a base de MET 10% YH ($35.0 \pm 3.4\%$) y MET 10% LE ($24.3 \pm 4.8\%$) (Villalobos-Sánchez y Osorio-Velandia, 2007); Similar a los únicos resultados de movilidad masal post-descongelación observados en este estudio los cuales también corresponden a los diluyentes a base de MET (los porcentajes de movilidad masal post-descongelación reportados en este estudio para MET 10% corresponden a 8.6 ± 0.9 y $9.0 \pm 1.0\%$, para LE y YH, respectivamente). Adicionalmente, estos autores afirman que los diluyentes a



base de MET tardan un poco más (periodo de latencia) en iniciar su movilidad post-descongelación después de ser activados cuando comparados con el resto de los diluyentes donde la activación se inicio inmediatamente después de agregar la solución activadora.

Los resultados de movilidad post-descongelación determinados en el presente estudio, contrastan con otras especies en las cuales se ha podido reportar movilidades post-descongelación muy altas como lo encontrado en yamú (*Brycon amazonicus*) de $69.0 \pm 3.3\%$ (Pardo, 1998) utilizando como crioprotector el DMSO 10% YH y lo reportado por Cruz-Casallas *et. al.* (2006) de $76.0 \pm 2.4\%$, empleando el mismo crioprotector a una concentración del 5%. Estudios de crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) realizados por Fresneda *et. al.* (2004) utilizando como crioprotector el DMSO y MET mostraron movilidades post-descongelación cercanas a 80.3 y 78.0%, respectivamente.



7. CONCLUSIONES

- Entre las especies los resultados de crioconservación son altamente variables, por lo cual se puede inferir que aún cuando las condiciones de congelación-descongelación sean similares, el efecto del crioprotector sobre la célula espermática presenta variación entre estas, lo cual no permite generalizar los protocolos de crioconservación.
- Los resultados alcanzados en el presente trabajo aun deben ser ajustados especialmente en el uso de tasas de congelación-descongelación diferentes, con el objetivo de determinar su eficiencia real durante el proceso de crioconservación y ajustar un protocolo definitivo para la especie.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO E.C., SALINAS Y., SÁNCHEZ C.L., MUÑOS D.L., ALONSO J.C., ARTEAGA M.E., RODRÍGUEZ O.J., ANZOLA N.R., ACOSTA L.E., NÚÑEZ M. y VALDÉS H. 2000. Bagres de la Amazonía Colombiana: un recurso sin fronteras. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. SINCHI.

AJIACO-MARTÍNEZ R.E. y RAMÍREZ- GIL H. 1989. Algunos aspectos biológicos- pesqueros del bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum*) en el alto Meta. Instituto Nacional de los Recursos Naturales y del Ambiente (INDERENA). Proyecto pesca regional Llanos Orientales Villavicencio.

AJIACO-MARTÍNEZ R.E., RAMÍREZ-GIL H. y ÁLVAREZ-LEÓN R. 2002. *Pseudoplatystoma fasciatum*. 97-101p. En: MOJICA J.I., CASTELLANOS C., USMA S. Y ÁLVAREZ R. (Eds.). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, D.C., Colombia. 288p.

ANCHORDOGUY T. 1991. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethylsulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology*. 28:467-473p.

ANDRADE R.F., BAZZOLI N., RIZZO E. y SATO Y. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (pisces: Characidae). *Tissue & Cell*. 33: 524 – 532p.



ARAÚJO H. CORDERO W. RUGELES C. y ATENCIO V. 2003. Evaluación de las características seminales de Blanquillo *Sorubim cuspicaudus* inducido con ovaprim®. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 16 (suplemento): 78p.

ASTURIANO J. 2003. El control de la reproducción de peces. Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas, Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia: FEDER. Valencia, España. 1-2p.

ÁVILA P., MADERO J., LÓPEZ C., LEON M., ACOSTA L., GÓMEZ C., DELGADO L., GÓMEZ C., LOZANO J. y REGUERO M. 2006. Fundamentos de crioconservación. Revista Colombiana de obstetricia y ginecología. Vol. 57. No. 4. Bogotá (Colombia). 291-300p.

BABIAK J., GLOGOWSKI M., LUCZYNSKI D., KUCHARCZY K. y LUCZYNSKI M. 1995. Cryopreservation of the milt of the northern pike. Journal of Fish Biology. Department of Animal Biochemistry. Fisheries and Basic Fishery Sciences, Olsztyn. Poland. 819-828p.

BABIAK J., GLOGOWSKI M., LUCZYNSKI M. y DEMIANOWIZ. 1999. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. Theriogenology. 52:473- 479p.

BAYNES S. M. y SCOTT A.P. 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa; the influence of sperm quality and extender composition on post-thaw fertility. Aquaculture. 66: 53-67p.



BEARDEN H. y FUQUAY J. 1982. Reproducción animal aplicada. Ed. Manual Moderno. 167-185p.

BILLARD R., FOSTIER A., WEIL C. y BRETON B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Aquaculture Sci.* 39:65-79p.

BILLARD R. 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine behavior and physiology.* No14. 3-21p.

BILLARD R. 1990a. Artificial Insemination in Fish. In: LAMMING G. E (Org.). *Marshall's physiology of Reproduction.* 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone. 9: 870-887p.

BILLARD R. 1990b. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING, G. E (ed.). *Marshall' s Physiology of Reproduction.* 4. ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone. 3: 183-213p.

BILLARD R. y COSSON M.P. 1992. Some problems related to the assesment of sperm motility in fresh water fish. *The Journal of Experimental Zoology.* 261: 222-131p.

70

BILLARD R., COSSON J., CRIM L.W. y SUQUET M. 1995. Sperm Phisiology and Quality. in N.R. Bromage and R.J. Roberts, Editors. *Broosdstock management and eggs and larval quality. Blackwell Sciencie,* Cambidge UK. 25-52p.

BOLLA S., HOLMEFJORD I. y REFSTIE T. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture.* 65:371-374p.



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.

BURGESS W.E. 1989. An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriforme. T.F. H. Publications, Inc., Neptune City, N. Jersey.

BWANGA C.O., EINARSSON S. y RODRIGUEZ-MARTINEZ H. 1991. Cryopreservation of boar semen: II. Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.* 32:455-46p.

CABRITA E., ALVAREZ R., ANEL L., RONA K. y HERRAEZ M. 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. Department of cellular biology and anatomy. Pathology Animal, University of Leon, Spain; and fisheries department, food and agriculture organization. Italy. 245-253p.

CABRITA E., ROBLES V., ALVAREZ R. y HERRÁEZ M.P. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture.* 201:301-304p.

CALA P. 1990. Diversidad, adaptación ecológica y distribución geográfica de las familias de peces de agua dulce de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, físicas y naturales.* Vol. 17. 67p.



CALA P., PÉREZ C. y RODRÍGUEZ I. 1996. Aspectos bioecológicos de la población del Capaz, *Pimelodus grosskopffi* (Pices: Pimelodidae), en el embalse de Betania y parte alta del río Magdalena, Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc., 20 (77) : 319-330p.

CAMPOS P.H. 2002. Ontogénesis del tracto digestivo, excluidas glándulas anexas, durante el desarrollo larval del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1776), Tesis de Grado. FMVZ, Universidad Nacional, Bogotá D.C., 101p.

CAROLSFELD J., GODINHO H.P., ZANIBOBI E. y HARVEY B.J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. J Fish Biol. 63:472-89p.

CARRILLO A.M. y RODRÍGUEZ J.A. 2001. Bases fisiológicas de la reproducción de peces tropicales. En: Fundamentos de Acuicultura Continental, capítulo VII, INPA. 189-216p.

CASTRO D. 1986. Los bagres de la subfamilia Sorubiminae de la Orinoquia y Amazonía Colombiana (Siluriformes - Pimelodidae). Boletín Ecotropical. Bogotá. 3: 1-140p.

CASTRO E.D.M. 1994. Peces del río Putumayo, sector de Puerto Leguizamo, Corporación Autónoma del Putumayo. 174p.

CHAPARRO N. 1994. Reproducción artificial y manipulación genética en peces. Editorial Mejoras. Barranquilla. 36p.



CIERESZKO A., GLOGOWSKI J. y DABROWSKI K. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. Cryopreservation in Aquaculture Species. Tiersch T.R. and Mazik P.M. Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 20-48p.

CLOUD J.G., MILLER, W.H. y 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: 51-53p.

CONTRERAS C.P. y CONTRERAS J.C. 1989. Desarrollo embrionario y larval del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1776) (Pisces: Pimelodidae), INDERENA, Movilización Verde: 23-35p.

CORTÉS G. 2000. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Universidad Complutense. Facultad de ciencias biológicas. Madrid-España. 27-32p.

CORTÉS-MILLÁN G.A. 2003. Guía para el manejo, cría y conservación del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). Convenio Andrés Bello, serie: Ciencia y Tecnología No. 125. Bogotá. 56p.

COSSON J., BILLARD R., CIBERT C., DREANNO C. y SUQUET M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (ed.). The male gamete: from basic science to clinical applications. Vienna: Cache River Press. 16:162-186p.

COSSON J., LINHART O., MIMS S., SHELTON W., RODINA M. 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J. Fish Biol.* Vol. 56. 1348-1367p.



CRUZ-CASALLAS P.E., PARDO-CARRASCO S.P., LOMBO-CASTELLANOS P.E., LOMBO-RODRÍGUEZ D.A. y PARDO-MARIÑO J.E. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon Siebenthalae* Milt. World Aquaculture Society, 35(4):529-535p.

CRUZ-CASALLAS P.E. y VELASCO-SANTAMARÍA Y.M. 2005. Determinación de las características seminales y seminación artificial en peces. Reproducción de peces en el trópico. INCODER. Bogotá (Colombia). 175-195p.

CRUZ-CASALLAS P.E., MEDINA-ROBLES V.M. y VELASCO-SANTAMARÍA Y.M. 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 19. No 2. 152-159p.

DEPPE M., ORTLOFF C., SALINAS G., BRAVO D., y SANCHEZ R. 2003. Effect of cryoprotectant substances on acrosome preservation. International Journal of Morphology. Universidad de la Frontera. Temuco (Chile). Vol. 21. No. 2.

ESCOBAR M.D. 2001. Variabilidad genética de los bagres *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* en la Orinoquía Venezolana. Universidad Nacional experimental de los Llanos Orientales Ezequiel Zamora, UNELLEZ. 90p.

FABROCINI A., LUBRADO S., RISPOLI S. y SANSONE G. 2000. Cryopreservation seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Dipartimento di fisiología general ed ambientale, Università Deli Studi di Napoli Federico II, Cryobiology. 40; 46-53p.



FERREIRA A.A., NUÑER DE OLIVEIRA A.P., LUZ R.K., TATAJE R.D.A., ESQUIVEL J.R. y RESTREPO J.B. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do judiá, *Rhamdia quelen*. Boletim do Instituto de Pesca, 27(1):57-60p.

FRESNEDA A., LENIS G., AGUDELO E. y OLIVERA-ANGEL M. 2004. Espermiación inducida y Crioconservación de Cachama blanca (*Piractus brachypomus*). Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Reproducción. Universidad de Antioquía. Rev Col Cienc Pec . Medellín, Colombia. 17(supl):46-52p.

FOGLI DA SILVEIRA W., KAVAMOTO E.T., RIGOLINO M.G. y TABATA Y.A.O. 1987. Método espectrofotométrico na avaliação de espermatozoides da truta arco-iris, *Salmo irideus* Gibbons B. Inst. Pesca. Vol 14. 69-73p. 118p.

FOGLI DA SILVEIRA W., KAVAMOTO E.T. y NARAHARA M.Y. 1990. Avaliação espermática, preservação criogenica do semen do pacu *Piaractus mesopotamicus*, proveniente de reprodução induzida. Bull Inst Pesca. 17:1-13p.

GALLANT R. y RICHARDSON G. 1993. Comparison of different extenders for the cryoprsvervation of Atlantic Salmon spermatozoa. Theriogenology. 40: 479-486p.

GALVIS G., MOJICA I.J. y CAMARGO M. 1997. Peces del catatumbo. COPETROL:OXY:SHELL-Asociación Cravo Norte. D'Vinni Edi. Ltda., Santa Fe de Bogotá. 118p.



GONZÁLEZ S.E. y DÍAZ S.J. 2000. Principios básicos de la crioconservación de semen de peces. Instituto Nacional de pesca y acuicultura. 253-264p.

GONZÁLEZ-SARMIENTO E. y DÍAZ-SARMIENTO J. 2001. Principios básicos de la criopreservación de esperma de peces. En: INPA, editor. Fundamentos de Acuicultura Continental. 2^a ed. 233-63p.

GRAHAM E. 1978. The integrity of frozen spermatozoa. 1-14p.

GWO H., WENG T., FAN L. y LEE V. 2005. Development of cryopreservation procedures for semen of pacific bluefin tuna thunnus orientalis. Departament of leisure planning national formosa university Aquaculture. 2005. 205-21p.

HAFEZ E. 1986. Reproducción e inseminación artificial en animales. México D.F. McGraw-Hill. 483-493p.

HAMAMAH S. y GATTI J.L. 1998. Role of the ionic environment ad internal pH on sperm activity. Hum. Rep. Vol. 13. Supl. 4. 20 -30p..

HAMMERSTEDT R.H. y GRAHAM J.K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology. 29: 26-38p.

HARVEY B. y HOAR S. 1980. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Ottawa, Ont. CIID. 48p.

HARVEY B., ASHWOOD-SMITH M.J. 1982. Cryoprotectant penetration and super cooling in the eggs of salmonid fish. Cryobiology. 19: 29-40p.

HARVEY B. y CARLOSFELD. 1993. Induced breeding in tropical fish culture, Ottawa, Ont., IDRC, III, 144p.



HARVEY B. 2000. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: Cryopreservation in Aquatic species. Tiersch T.R and Mazik P.M. Editores. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana. 332-337p.

HICKMAN C.G. 1958. Spermatocrit values in facilitating the estimation of spermatozoa concentrations. *Journal of Dairy Science*, 41: 318-319p.

HINES R. y YASHOUV A. 1971. Some environmental factors influencing the activity of espermatozoa of *Mugil capito* Cuvier, a grey mullet. *Journal of fish Biology*, 3:123-127p.

HOLT W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 3-22p.

HONEYFIELD D.C. y KRISE W.F. 2000. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. En: Tiersch T.R. y Mazik P.M. (Eds.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 49-58p.

JAMIESON G.M. y LEUNG K.P. 1991. Introduction to fish spermatozoa and themicropyle. In: JAMIESON, B. G. M. (ed.) *Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press. 5: 56-72p.



KAVAMOTO E.T., FOGLI DA SILVEIRA W., RIGOLINO M.G. y CARVALHO FIHLO C. 1985. Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta Arco Iris, *Salmo irideus* Gibbons. Boletim do Institut de Pesca. 12(3): 73-81p.

LABBE C., CROWE L.M. y CROWE J.H. 1997. Stability of the lipid Component of Trout Sperm Plasma Membrane during Freeze-Thawing. *Cryobiology*. 34:176-182p.

LAHNSTEINER F., WEISMANN T. y PATZNER R.A. 1992. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling (*Thymallus thymallus*) (Pisces Teleostei). *Aquaculture*. 103:73-8p.

LAHNSTEINER F., BERGER B., WEISMANN T., PATZNER R.A. 1995. Evaluation of semen fitness of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* for cryopreservation by physiological and biochemical parameters in July Goetz F. W. and Thomas P. Eds. Proceedings of the fish international symposium on the reproductive physiology of fish. University of Texas At Austin. Austin, Texas.

LAHNSTEINER F. y PATZNER R.A. 1998. Sperm motility of the marine teleosts *Diplodus sargas*, *Mullus barbatus* and *trachurus*.

LAHNSTEINER F. 2000. Introduction to the special issue on cryopreservation of gametes in aquatic species. *Aquacul. Res.* Vol. 31. 229p.

LAHNSTEINER F., BERGER B., HORVATH A., URBANYI B. y WEISMANN T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in Ciprinid fishes. *Theriogenology*. 54:1477-1498p.



LAMMUS E. y BELTRÁN C.N. 1975. Contribución al conocimiento de la biología del bagre pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum*, Linnaeus, 1766) y su importancia pesquera. Medellín.

LEUNG K.P. y JAMIESON G.M. 1991. Live preservation of fish gametes. Jamison G.M. Eds. Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press. 245-269p.

LINHART O., RODINA M. y COSSON J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*. 41:241 – 250p.

LÓPEZ M.C., FERREIRE R.A.B., VICENSOTTO J.R.M. y SENHORINI J.A. 1996. Alimentação de larvas de surubim pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829), em laboratório, na primeira semana. En: bol. Tec. CEPTA. Pirassununga, Vol 9. 11-21p.

LUBZENS E. 1997. Carp (*Cyprinus carpio L.*) spermatozoa criobanks strategies in research an application. *Aquaculture*. 155: 13 – 30p.

MEDINA-ROBLES V.M., VELASCO-SANTAMARÍA Y.M. y CRUZ-CASALLAS P.E. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática es peces teleósteos. Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 181. Villavicencio (Colombia). 34-48p.

MILES C. 1974. Los peces del río Magdalena. Universidad del Tolima – Ibagué. 385p.



MORENO T.C., VALDERRAMA B.A. y BELTRÁN G.C. 1993. Épocas de Reproducción, talla media de madurez gonadal y análisis de la problemática con referencia a las tallas de captura del bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*; Linnaeus, 1766) en el medio Magdalena-sector Barrancabermeja. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Santa Fe de Bogotá D.C.

MORISAWA M. y SUSUKI K. 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*. Vol. 210. 1145-1147p.

MORISAWA M., SUSUKI K., MORISAWA S. y YASUDA K. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* Vol. 107. 95-103p.

MORISAWA M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* Vol. 2. 605-615p.

MORISAWA M. y MORISAWA S. 1990. Acquisition and initiation of sperm motility. *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects.* (Ed. C. Gagnon). CRC Press. Boca Raton. FL. 137-151p.

MORISAWA M. 1994. Cell signaling mechanism for sperm motility. *Zoo. Sci.* Vol. 11. 647-662p.

NARAHARA M.Y., BRASILE-MARTINS M.A., GODINHO H.M. y CIPÓLI M.N. 1988. Escala de Madurez, época de reprodução e influencia de factores abióticos sobre o desenvolvimento gonadal de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo.* 15(2): 201-211p.



NAVARRO-POVEDA O.J., LOMBO-CASTELLANOS P.E. y CRUZ-CASALLAS P.E. 2000. Calidad y fertilidad de semen de cachama blanca, *Piaractus brachypomus* crioconservado con etilenglicol. En: Memorias XI Simpósio Brasileiro de Aqüicultura – SIMBRAQ. Florianópolis (SC), Brasil.

NEIRA J., CRUZ-CASALLAS P.E., JIMÉNEZ J. y MUÑOS D. 1992. Caracterización y congelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) P 141-14. Programa Nacional de Ciencia y Tecnología del mar- Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura. 141-146p.

NELSON J. 1984. Fishes of the World. Jhon Wiley y Sons New York, E.E.U.U.

ODA S. y MORISAWA M. 1993. Rises of intracelular Ca^{2+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyoerosmolality in marine teleosts. Cell. Motil. Cytoskel. Vol. 25. 171-178p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1987. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical.

PARDO S.C., ARIAS J.A., ATENCIO V.J. y ZANIBOBI E. 1998. Ensayos de reproducción inducida del yamú, *Brycon siebenthalae* en los llanos colombianos. Memorias I Congreso Suramericano de Acuicultura. Recife, Brasil. 78p.

PARDO B.E. 1995. Revisión y Compilación sobre técnicas de reproducción inducida de silúridos de la cuenca del río Orinoco. Santa Fe de Bogotá.



Trabajo de grado (Zootecnia). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

PERCHEC P., PAXION C., COSSON J., JEULIN G., FIERVIITTE F. y BILLARD R. 1998. Initiatin of the carp spermatozoa motility and earty ATP reduction after milt contamination by urine, laboratoire de biologie de la reproducao et de development, Aquaculture. 160: 317-328p.

PHRONEN J. 1994. Composition and cryopreservation of sperm from some Fin fish teleost fish. *Finnish Fish Research*.15: 27-48p.

PINNA M.C. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii): Historical overview and synthesis of hypotheses. Malabarba L.R., Reis R.R., Vari R. P., Lucena Z.M.y Lucena 279-330p.

PINZÓN-ARCINIEGAS S.M., MOJICA-RODRÍGUEZ J.E. y CRUZ-CASALLAS P.E. 2005. Ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766). Revista Orinoquía, 9(2):28-37p.

RAMÍREZ G.H. y AJIACO R.H. 1995. El bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus) y *Pseudoplatystoma tigrinum* (Valenciennes), aspectos biológicos-pesqueros en el alto río Meta. Bol. Cient. INPA. 3:156-167p.

RAMOS S. 1986. Anotaciones sobre inseminación artificial. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá.

RANA K. y MC ANDREW B. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture. 76: 335-4p.



RANA K. 1995. Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications. Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of fish. University of Texas at Austin. 147p.

REID S. 1983. Biología de los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Pseudoplatystoma tigrinum* en la cuenca del río Apure, Venezuela. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Orientales. Ezequiel Zamora. Serie: Prod. Agric. Año 1/No 1/Barinas.

RODRÍGUEZ C.A. 1991. Bagre malleros y cuerderos en el bajo río Caquetá. Tropenbos-Colombia. Volumen 2. 79-86p.

RURANGWA E., VOLCKAERT F.A.M., HUYSKENS KIME G.D.E. y OTLEVIER F. 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*), Theriogenology. 55:751-769p.

SHANGGUAN B. y CRIM L.W. 1995. The effect of stripping frequency on sperm quantity and quality in Winter flounder (*Pleuronectes americanus* Walbaum) in July Goetz F.W. and Thomas P. Eds. Proceedings of the fish international symposium on the reproductive physiology of fish. University of Texas At Austin. Austin, Texas.

SHLAFER M. 1981. Pharmacological considerations in cryopreservation. Organ Preservation for Transplantation. Segunda edición. 177-212p.

SPINEL C. 2002. Biología molecular de la célula eucariótica animal. 1 ed. Medellín (Colombia): Fondo editorial Biogénesis. 31-68p.



STEYN G. 1993. The effect of freezing rate of the survival of cryopreserved African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). 581-590p.

STEYN G. y VAN VUREN J. 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. 187-193p.

STOSS J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. Hoar W.S., Randall D. J., Donaldson E.M. Eds. Fish physiology. Vol. 9B. New York: Academic Press. 305-351p.

SUQUET M., OMNES M.H., NORMANT Y. y FAUVEL C. 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 101:177-185p.

SUQUET M., DORANGE G., OMNES M.H., NORMANT Y., LE ROUX A. y FAUVEL C. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). Journal of Fish Biology. 42: 509- 516p.

SUQUET M., BILLARD R., COSSON J., DORANGE G., CHAUVAUD L., MUGNIER C. Y FAUVEL C. 1994. Sperm features in turbot *Scophthalmus maximus* a comparison with other freshwater and marine fish species. Aquatic Living Resources 7: 283-294p.

SWANSON E.W. y BEARDEN H.J. 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. Journal of Animal Science. 10:981-987p.



TALLARICO M. 1997. *Sorubim*. Ministerio de Medio Ambiente, dos Recursos Hídricos da Amazonia Legal. Instituto Brasileiro do Medio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil. 156p.

TIERSCH T. 1998. Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127: 95-104p.

TOTH G.P., CIERESZKO A., CHRIST S.A. y DABROWSKI K. 1997. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions. *Aquaculture* 154: 337-348p.

VELASCO-SANTAMARÍA Y.M. y CRUZ-CASALLAS P.E. 2003. Inseminación artificial en yamú (*Brycon siebenthalae*): Efecto de la proporción de espermatozoides/huevos y volumen de la dosis semillante sobre la fertilidad. En: VI Encuentro Nacional de Investigación. Universidad Santiago de Cali (USC). Cali – Valle del Cauca, Colombia.

VELASCO-SANTAMARÍA Y.M., ARIAS-CASTELLANOS J.A. y CRUZ-CASALLAS P.E. 2004. Efecto de la inducción hormonal con extracto de hipófisis de carpa (EHC) sobre algunas características seminales de *Rhamdia sebae* c. f. *Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura, X Jornada de Acuicultura IALL.* 116-117p.

VELASCO-SANTAMARÍA Y.M., MEDINA-ROBLES V.M. y CRUZ-CASALLAS P.E. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization assays. *Aquaculture.* 256 (1): 264-271p.

VINATEA J.E. 1987. Manual de reproducción de peces *Colossoma* sp. “pacu” y “tambaqui” (cont) FAO/GCP/RLA/075/ITA, Brasilia, Brasil.



VINCENT C., PRULIERE G., PAJOT-AUGY E., CAMPION E. y DOUZOU P. 1998. Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophys Chem.* 29: 161-169p.

VILLALOBOS-SÁNCHEZ M.A. y OSORIO-VELANDIA D.M. 2007. Ensayo Preliminares de Crioconservación de Semen de Barbilla (*Rhamdia sebae* c. f.). Villavicencio – Meta. Trabajo de grado (Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia) Universidad de los Llanos Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Humanos. 40p.

WINEMILLER K. y TAPHORN D. 1989. La evolución de las estrategias de vida en los peces de los llanos occidentales de Venezuela. *Unellez.* Guanare. Venezuela. *Biollania*, No6.

WOYNAROVICH E. y HORVÁTH L. 1983. A Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNP. 223p.

YAO Z., CRIM L., RICHARDSON B. y EMERSON C. 1999. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout *Macrozoarce americanus* L. Sperm after cryopreservation. *Ocean Science Center and Department of Biology.* Newfoundland (Canada). 361-375p.



Melissa sosteniendo un Bagre Rayado de 1.20 cms / Abril de 2007



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
COLOMBIA
Sede Palmira



UNIVERSIDAD
DE LOS LLANOS



IALL
INSTITUTO
DE ACUICULTURA
DE LOS LLANOS

GRITOX
Grupo de Investigación en
Reproducción y Toxicología de
Organismos Acuáticos