	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 1 de 8

21.1


FECHA	lunes, 25 de noviembre de 2019
--------------	--------------------------------

Señores
UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
BIBLIOTECA
 Ciudad

UNIDAD REGIONAL	Sede Fusagasugá
TIPO DE DOCUMENTO	Tests
FACULTAD	Ciencias Agropecuarias
NIVEL ACADÉMICO DE FORMACIÓN O PROCESO	Pregrado
PROGRAMA ACADÉMICO	Zootecnia

El Autor(Es):

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS	No. DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN
Morales Palacios	Cristian Alonso	1031139161

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 2 de 8

Director(Es) y/o Asesor(Es) del documento:

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS
Espinoza Araujo	José Alonso

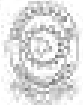
TÍTULO DEL DOCUMENTO
Dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (ETG) en la crioconservación de semen de dorada (Brycon sinuensis Dahl, 1955)

SUBTÍTULO (Aplica solo para Tesis, Artículos Científicos, Disertaciones, Objetos Virtuales de Aprendizaje)

TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Aplica para Tesis/Trabajo de Grado/Pasantía Zootecnista

AÑO DE EDICIÓN DEL DOCUMENTO	NÚMERO DE PÁGINAS
22/08/2019	48

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS (Usar 6 descriptores o palabras claves)	
ESPAÑOL	INGLÉS
1. Movilidad total	total mobility
2. espermatozoides	sperm
3. crio daño	cryo damage
4. descongelación	defrosting
5. precongelación	pre-freezing
6.	

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAR113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 3 de 8

RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS
(Máximo 250 palabras – 1530 caracteres, aplica para resumen en español):

El objetivo fue evaluar la calidad del semen pre congelado y descongelado de dorada Brycon sinuensis criopreservado con dos crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (ETG) a dos concentraciones 5% y 10%. El semen fue obtenido de machos de dorada, mantenidos bajo condiciones de cautiverio en estanques de tierra en el Instituto de Investigaciones piscícolas de la Universidad de Córdoba, CINPIC. Estos se indujeron hormonalmente con extracto pituitario de carpa EPC a dosis de 5 mg/kg de peso. La colecta y extracción del semen se realizó entre las 5-6 horas pos-inducción, en tubos aforados estériles, secos y libres de humedad (tubos falcón). Para el semen fresco, pre congelado y descongelado se evaluaron las variables de calidad espermática movilidad total, tipos de movilidades, progresividad, velocidades, concentración espermática y tiempo de activación, con el programa Sperm Class Analyzer (SCA Versión 6.4.0.65-2018). El semen fue diluido en proporción 1:3 con un diluyente compuesto de Dimetilacetamida y Etilenglicol a dos porcentajes de inclusión 5 y 10 %. El semen fresco reportó la mayor movilidad total ($97.0 \pm 7.0\%$); la cual disminuyó en semen pre congelado a valores entre $32.0 \pm 5.0\%$ (DMA 5%) y $59.9 \pm 11.8\%$ (ETG 5%) y en semen descongelado los valores oscilaron entre $32.2 \pm 6.2\%$ (DMA 10%) y $36.6 \pm 8.4\%$ (ETG 5%) ($p > 0.05$). La movilidad lenta de semen fresco fue de $11.6 \pm 11.8\%$, con semen pre congelado los valores se incrementaron oscilando entre $30.0 \pm 4.6\%$ (DMA 5%) y $47.3 \pm 5.3\%$ (ETG 5%); en semen descongelado osciló entre $20.8 \pm 2.4\%$ (ETG 10%) y $23.2 \pm 2.5\%$ (DMA 5%) ($p < 0.05$). La velocidad curvilínea de semen fresco fue de $92.0 \pm 23\%$, con semen pre congelado los valores fluctuaron entre $20.0 \pm 1.7\%$ (DMA 5%) y $32.3 \pm 4.1\%$ (ETG 5%). En semen descongelado, los valores oscilaron entre $29.0 \pm 6.1\%$ (DMA 5%) y $30.5 \pm 5.0\%$ (ETG 5%) ($p > 0.05$). La concentración espermática fue de 17524.0 millones/ml con un tiempo de activación de 30.7 s. los resultados obtenidos en este estudio podemos decir que la concentración del 5% de inclusión de los crioprotectores presentaron los mayores valores de movilidad, velocidad y progresividad. Con relación a los dos crioprotectores el ETG al 5% presentó los mejores resultados permitiendo sugerir que puede ser una alternativa para la criopreservación de semen Dorada Brycon sinuensis.

The objective was to evaluate the quality of the pre-frozen and thawed semen of golden Brycon sinuensis cryopreserved with two cryoprotectants dimethylacetamide (DMA) and ethylene glycol (ETG) at two concentrations 5% and 10%. The semen was obtained from gillhead males, kept under captive conditions in earthen ponds at the Fish Research Institute of the University of Córdoba, CINPIC. These were hormonally induced with EPC carp pituitary extract at a dose of 5 mg / kg. Semen collection and extraction was performed between 5-6 hours post-induction, in sterile, dry and moisture-free volumetric tubes (falcon tubes). For the fresh, pre-frozen and thawed semen, the variables of sperm quality, total mobility, types of mobility, progressivity, velocities, sperm concentration and activation time were evaluated with the Sperm Class Analyzer program (SCA Version 6.4.0.65-2018). The semen was diluted in a 1 : 3 ratio with a diluent composed of Dimethylacetamide and Ethylene Glycol at two inclusion rates 5 and 10%. Fresh semen reported the highest total mobility ($97.0 \pm 7.0\%$); which decreased in pre-frozen semen at values between $32.0 \pm 5.0\%$ (5% DMA) and $59.9 \pm 11.8\%$ (5% ETG) and in defrosted semen the values ranged between $32.2 \pm 6.2\%$ (10% DMA) and $36.6 \pm 8.4\%$ (5% ETG) ($p > 0.05$). The slow mobility of fresh semen was $11.6 \pm 11.8\%$, with pre-frozen semen the values increased between $30.0 \pm 4.6\%$ (DMA 5%) and $47.3 \pm 5.3\%$ (ETG 5%); In defrosted semen, it ranged between $20.8 \pm 2.4\%$ (10% ETG) and $23.2 \pm 2.5\%$ (5% DMA) ($p < 0.05$). The curvilinear velocity of fresh semen was $92.0 \pm 23\%$, with pre-frozen semen the values fluctuated between $20.0 \pm 1.7\%$ (DMA 5%) and

Diagonal 18 No. 20-29 Fusagasugá – Cundinamarca
Teléfono (091) 8281483 Línea Gratuita 018000876000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 4 de 8

32.3 ± 4.1% (ETG 5%). In defrosted semen, the values ranged between 29.0 ± 6.1% (DMA 5%) and 30.5 ± 5.0% (5% ETG) (p> 0.05). The sperm concentration was 17524.0 million / ml with an activation time of 30.7 s. The results obtained in this study can be said that the concentration of 5% inclusion of the cryoprotectants presented the highest values of mobility, speed and progressivity. In relation to the two cryoprotectants, the 5% ETG presented the best results, suggesting that it may be an alternative for the breeding of golden semen *Brycon sinuensis*.

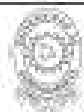
AUTORIZACION DE PUBLICACION

Por medio del presente escrito autorizo (Autorizamos) a la Universidad de Cundinamarca para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mí (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que, en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autoriza a la Universidad de Cundinamarca, a los usuarios de la Biblioteca de la Universidad; así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado una alianza, son: Marque con una "X":

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer.	X	
2. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet.	X	
3. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previa alianza perfeccionada con la Universidad de Cundinamarca para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones.	X	
4. La inclusión en el Repositorio Institucional.	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de acuerdo con los usos



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 4 de 8

32.3 ± 4.1% (ETG 5%). In defrosted semen, the values ranged between 29.0 ± 6.1% (DMA 5%) and 30.5 ± 5.0% (5% ETG) ($p > 0.05$). The sperm concentration was 17524.0 million / ml with an activation time of 30.7 s. The results obtained in this study can be said that the concentration of 5% inclusion of the cryoprotectants presented the highest values of mobility, speed and progressivity. In relation to the two cryoprotectants, the 5% ETG presented the best results, suggesting that it may be an alternative for the breeding of golden semen *Brycon sinuensis*.

AUTORIZACION DE PUBLICACION

Por medio del presente escrito autorizo (Autorizamos) a la Universidad de Cundinamarca para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mí (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que, en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autoriza a la Universidad de Cundinamarca, a los usuarios de la Biblioteca de la Universidad; así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado una alianza, son: Marque con una "X":

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer.	X	
2. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet.	X	
3. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previa alianza perfeccionada con la Universidad de Cundinamarca para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones.	X	
4. La inclusión en el Repositorio Institucional.	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de acuerdo con los usos



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAR113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 6 de 8

LICENCIA DE PUBLICACIÓN

Como titular(es) del derecho de autor, confiero(erimos) a la Universidad de Cundinamarca una licencia no exclusiva, limitada y gratuita sobre la obra que se integrará en el Repositorio Institucional, que se ajusta a las siguientes características:

a) Estará vigente a partir de la fecha de inclusión en el repositorio, por un plazo de 5 años, que serán prorrogables indefinidamente por el tiempo que dure el derecho patrimonial del autor. El autor podrá dar por terminada la licencia solicitándolo a la Universidad por escrito. (Para el caso de los Recursos Educativos Digitales, la Licencia de Publicación será permanente).

b) Autoriza a la Universidad de Cundinamarca a publicar la obra en formato y/o soporte digital, conociendo que, dado que se publica en Internet, por este hecho circula con un alcance mundial.

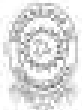
c) Los titulares aceptan que la autorización se hace a título gratuito, por lo tanto, renuncian a recibir beneficio alguno por la publicación, distribución, comunicación pública y cualquier otro uso que se haga en los términos de la presente licencia y de la licencia de uso con que se publica.

d) El(Los) Autor(es), garantizo(amos) que el documento en cuestión, es producto de mi(nuestra) plena autoría, de mi(nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy(somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro(aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos es de mí (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.

e) En todo caso la Universidad de Cundinamarca se compromete a indicar siempre la autoría incluyendo el nombre del autor y la fecha de publicación.

f) Los titulares autorizan a la Universidad para incluir la obra en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

g) Los titulares aceptan que la Universidad de Cundinamarca pueda convertir el documento a cualquier medio o formato para propósitos de preservación digital.

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAR113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 7 de 8

h) Los titulares autorizan que la obra sea puesta a disposición del público en los términos autorizados en los literales anteriores bajo los límites definidos por la universidad en el "Manual del Repositorio Institucional AAAM003"

i) Para el caso de los Recursos Educativos Digitales producidos por la Oficina de Educación Virtual, sus contenidos de publicación se rigen bajo la Licencia Creative Commons: Atribución- No comercial- Compartir Igual.



j) Para el caso de los Artículos Científicos y Revistas, sus contenidos se rigen bajo la Licencia Creative Commons Atribución- No comercial- Sin derivar.




Nota:

Si el documento se basa en un trabajo que ha sido patrocinado o apoyado por una entidad, con excepción de Universidad de Cundinamarca, los autores garantizan que se ha cumplido con los derechos y obligaciones requeridos por el respectivo contrato o acuerdo.

La obra que se integrará en el Repositorio Institucional, está en el(los) siguiente(s) archivo(s).

Nombre completo del Archivo Incluida su Extensión (Ej. Perez.Juan2017.pdf)	Tipo de documento (ej. Texto, Imagen, video, etc.)
1.DMA y ETG en la criopreservación de semillas de dorada.pdf	Texto
2.	
3.	
4.	

En constancia de lo anterior, Firmo (amos) el presente documento:

APELLIDOS Y NOMBRES COMPLETOS	FIRMA (autógrafa)
MORALES PALACIOS Gloria Atocha	

21.1-51-20

**DIMETILACETAMIDA (DMA) Y ETILENGLICOL (ETG) EN LA CRIOCONSERVACION DE SEMEN
}DE DORADA *Brycon sinuensis* Dahl, 1955**

CRISTIAN ALONSO MORALES PALACIOS

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ**

2019

**DIMETILACETAMIDA (DMA) Y ETILENGLICOL (ETG) EN LA CRIOCONSERVACION DE
SEMEN DE DORADA (*Brycon sinuensis* Dahl, 1955)**

CRISTIAN ALONSO MORALES PALACIOS

Director

Prof. José Alonso Espinosa Araujo, MSc

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

FUSAGASUGÁ

2019

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

DEDICATORIA

Gracias a Dios por ayudarme y permitir realizar este trabajo y la oportunidad de conocer y aprender.

Gracias a mi familia por su apoyo, colaboración para poder estudiar.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba CINPIC, por su colaboración y contribución con infraestructura, equipos y materiales que fueron necesarios para realizar esta investigación.

Al director del instituto de investigaciones piscícolas de la Universidad de Córdoba, Víctor Atencio García, Al profesor y orientador José Alonso Espinosa Araujo. A los profesionales en Acuicultura Juan Carlos Salas Villalba, Danilo cogollo Bohorquez, Arnold Luis Roa Lázaro, Iván García, Alonso Ballesteros Niño, Rafael Vergara Moreno.

Y operarios Raúl Banquet, José Flórez Anaya, Ruben González.

A todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible el desarrollo de este logro.

CONTENIDO

	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE TABLAS	
	RESUMEN	
1	INTRODUCCIÓN	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GENERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
3	MARCO TEORICO	17
3.1	BIOECOLOGÍA DE LA DORADA <i>Brycon sinuensis</i>	17
3.2	PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE PECES	20
3.2	CRIOCONSERVACIÓN	22
3.3	CRIOPROTECTORES	23
3.4.	DILUYENTES	23
4	MATERIALES Y METODOS	26
4.1	LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	26
5	MATERIAL BIOLÓGICO	27
5.1	Selección de machos	
5.2	OBTENCIÓN DEL SEMEN	27
5.2.1	EVALUACIÓN MACROSCOPICA	28
5.2.2	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA	28
5.2.2.1	Movilidad total	28

5.2.2.3	Tiempo de activación	28
5.2.2.4	Concentración espermática	29
5.2.2.5	Velocidad espermática	29
5.3	CRIOCONSERVACION DE SEMEN	30
5.3.1	Preparación del diluyente	30
5.3.2	Empacado	
5.3.3	Congelación	
5.3.4	Descongelación	
6	Diseño experimental y análisis estadístico	
7	RESULTADOS	31
7.1	CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE DORADA	31
7.1.1	Tipos de movilidad	32
7.1.1.1	Movilidad rápida	33
7.1.1.2	Movilidad media	36
7.1.1.3	Movilidad lenta	
7.1.1.4	Espermatozoides estáticos	
7.1.2	TIPOS DE VELOCIDAD	39
7.1.2.1	Velocidad curvilínea	
7.1.2.2	Velocidad lineal	
7.1.2.3	Progresividad total	45
8	Discusión	
9	Conclusiones	46
	Bibliografía	

LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1. Ubicación satelital del instituto de investigación piscícola de la universidad de cordoba (CINPIC)
- Figura 2. Movilidad total de semen de *B. sinuensis* fresco, pre congelado y descongelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)
- Figura 3. Movilidad rápida de semen de *B. sinuensis* fresco, pre congelado y descongelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).
- Figura 4. Movilidad media de semen de *B. sinuensis* fresco Y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)
- Figura 5. Movilidad lenta de semen de *B. sinuensis* fresco Y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)
- Figura 6. Espermatozoides estáticos de semen de *B. sinuensis* fresco Y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).
- Figura 7. Velocidad curvilínea (VCL) de semen de *B. sinuensis* fresco, pre congelado y descongelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).
- Figura 8. Velocidad lineal (VSL) de semen de *B. sinuensis* fresco Y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).
- Figura 9. Progresividad total de semen de *B. sinuensis* fresco Y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Características del semen de Dorada <i>Brycon sinuensis</i> obtenidos por inducción hormonal EPC. Datos expresados como media \pm error estándar.	

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la calidad del semen pre congelado y descongelado de dorada *Brycon sinuensis* crioconservado con dos crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (ETG) a dos concentraciones 5% y 10%. El semen fue obtenido de machos de dorada, mantenidos bajo condiciones de cautiverio en estanques de tierra en el Instituto de Investigaciones piscícolas de la Universidad de Córdoba, CINPIC. Estos se indujeron hormonalmente con extracto pituitario de carpa EPC a dosis de 5 mg/kg de peso. La colecta y extracción del semen se realizó entre las 5-6 horas pos-inducción, en tubos aforados estériles, secos y libres de humedad (tubos falcón). Para el semen fresco, pre congelado y descongelado se evaluaron las variables de calidad espermática movilidad total, tipos de movilidades, progresividad, velocidades, concentración espermática y tiempo de activación, con el programa Sperm Class Analyzer (SCA Version 6.4.0.65-2018). El semen fue diluido en proporción 1:3 con un diluyente compuesto de Dimetilacetamida y Etilenglicol a dos porcentajes de inclusión 5 y 10 %. El semen fresco reportó la mayor movilidad total ($97.0 \pm 7.0\%$); la cual disminuyó en semen pre congelado a valores entre $32.0 \pm 5.0\%$ (DMA 5%) y $59.9 \pm 11.8\%$ (ETG 5%) y en semen descongelado los valores oscilaron entre $32.2 \pm 6.2\%$ (DMA 10%) y $36.6 \pm 8.4\%$ (ETG 5%) ($p > 0.05$). La movilidad lenta de semen fresco fue de $11.6 \pm 11.8\%$, con semen pre congelado los valores se incrementaron oscilando entre $30.0 \pm 4.6\%$ (DMA 5%) y $47.3 \pm 5.3\%$ (ETG 5%); en semen descongelado osciló entre $20.8 \pm 2.4\%$ (ETG 10%) y $23.2 \pm 2.5\%$ (DMA 5%) ($p < 0.05$). La velocidad curvilínea de semen fresco fue de $92.0 \pm 23\%$, con semen pre congelado los valores fluctuaron entre $20.0 \pm 1.7\%$ (DMA 5%) y $32.3 \pm 4.1\%$ (ETG 5%). En semen descongelado, los valores oscilaron entre $29.0 \pm 6.1\%$ (DMA 5%) y $30.5 \pm 5.0\%$ (ETG 5%) ($p > 0.05$). La concentración espermática fue de 17524.0 millones/ml con un tiempo de activación de 30.7 s. los resultados obtenidos en este estudio podemos decir que la concentración del 5% de inclusión de los crio protectores presentaron los mayores valores de movilidad, velocidad y progresividad. Con relación a los dos crio protectores el ETG al 5% presento los mejores resultados permitiendo sugerir que puede ser una alternativa para la crio conservación de semen Dorada *Brycon sinuensis*.

Palabras claves: Movilidad total, espermatozoides, crio daño, pre congelación, descongelación.

1. INTRODUCCION

Dorada *Brycon sinuensis* es una especie de importancia comercial en el Caribe colombiano, particularmente en el departamento de Córdoba (Morales & Lasso, 2011), presenta características deseables para la piscicultura continental, en virtud de su rápido crecimiento, fácil adaptación a las dietas comerciales y al cautiverio. Su ciclo de vida depende del río donde se reproduce y las ciénagas donde se alimenta y crece (Atencio, 2005), es una especie de migración mediana (Usma *et al.*, 2009) que se reproduce en el periodo lluvioso, principalmente entre abril y junio (Atencio *et al.*, 2010). Durante el periodo lluvioso, las variaciones de caudal, conductividad eléctrica y sólidos totales disueltos son estímulos importantes para el cortejo, apareamiento y desove de esta especie (Kerguelén *et al.*, 2011).

La construcción de la hidroeléctrica de Urrá afectó la ruta migratoria de la especie en la cuenca alta del río Sinú; así mismo, redujo sus áreas de desove incrementando su vulnerabilidad a la pesca, ya que se concentra entre la presa en Urrá y Tierralta (Atencio, 2000). Igualmente, la construcción de un dique de represamiento en el caño de Betancí, impide las migraciones de la ciénaga de Betancí al Alto Sinú y el ingreso de larvas a continuar con su ciclo biológico (Atencio-García, *et al* 2012). Otras amenazas son la pesca en áreas de veda, la tala de bosque nativo y la contaminación orgánica e inorgánica de su hábitat, la interrupción de la migración de los peces hacia áreas de maduración y desove, pérdida de áreas de desoves aguas arriba se traducen en pérdida de su potencial reproductivo como consecuencia de la construcción de la hidroeléctrica Urrá (Atencio-García *et al*, 2012).

La Dorada *Brycon sinuensis* aparece en la categoría casi amenazada en el Libro Rojo de Peces de Agua Dulce de Colombia (Mojica *et al.*, 2012); por lo que en el río Sinú, en 1999 fueron creadas área de conservación, en las cuales están la pesca y la talla mínima de captura en el embalse se estableció en 35 cm (Atencio-García *et al*, 2012).

En aras de avanzar en estrategias de conservación de Dorada se propone desarrollar protocolos de crioconservación de su semen. Medina *et al.* (2005) Indicaron que la crioconservación trae beneficios a las actividades de reproducción en acuicultura, ya que aumenta la posibilidad de reproducción por fuera de la temporada reproductiva, facilita el movimiento e intercambio de material genético entre productores, mejora la eficiencia en la utilización de los parentales, contribuye a disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores en procura de nuevos reproductores y permite la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Bobe y& Labbé, 2009). Además, la crioconservación ofrece ventajas como optimización de los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal asincrónica y ciclos reproductivos estacionales (Espinosa, 2013), así como un uso eficiente del semen durante los procesos de reproducción artificial (Lahnsteiner *et al.*, 2004).

Las técnicas de crioconservación de semen en peces son muy recientes y ha tenido avances lentos, ya que solo se reportan estándares para un reducido número de aproximadamente 200 especies (Brown. *et al*, 2011;), Haciendo necesario el establecimiento de protocolos para las especies faltantes. Por esta razón, la comercialización de semen crioconservado de peces en la acuicultura es limitada (Asturiano *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2016). Existen muchos factores que influyen en el proceso de crioconservación y que afectan el éxito del semen crioconservado como la calidad inicial del semen, la composición del diluyente, los crioprotectores, el factor de dilución, la velocidad de congelación y descongelación, así como los aspectos fisiológicos del espermatozoide y la especificidad de la especie (Aramli *et al.*, 2015, Linhartova *et al.*, 2013, Shishanova *et al.*, 2012).

El desarrollo de programas de mejoramiento de la productividad en la piscicultura ha llamado la atención durante los últimos años (Lind *et al.*, 2012), razón por la cual, la elaboración de un protocolo para la crio conservación de semen de dorada sería una herramienta importante para la reproducción en cautiverio y una estrategia para la conservación de esta especie. Por tal motivo, el presente estudio tuvo como

objetivo evaluar el uso de los crioprotectores, Dimetilacetamida (DMA) y Etilenglicol (ETG) a dos porcentajes (5 y 10 %) de inclusión, para la criopreservación de semen de Dorada *Brycon sinuensis* para contribuir a ampliar el ciclo reproductivo de la especie, por medio de la disponibilidad de gametos fuera de la estación reproductiva y mejorar los programas de repoblamiento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de los crioprotectores etilenglicol (ETG) y dimetilacetamida (DMA) sobre la calidad seminal en la Dorada (*Brycon sinuensis*).

2.2 Objetivos específicos.

- Determinar las características seminales: concentración, movilidad total y tiempo de activación en Dorada *Brycon sinuensis* en semen fresco.
- Analizar las diferencias de la calidad espermática (movilidad total, tipos de movilidades y velocidades) durante las fases de pre congelación y descongelación de semen de Dorada (*Brycon sinuensis*) según los porcentajes de inclusión de los crioprotectores.
- Estimar la disminución de movilidad total y velocidad curvilínea en semen criopreservado descongelado.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1 Bioecología de la Dorada *Brycon sinuensis*

La Dorada *Brycon sinuensis* pertenece a la familia Characidae, subfamilia Bryconinae, es un pez endémico del río Sinú con importancia comercial en la costa Caribe colombiana, especialmente en el departamento de Córdoba (Atencio-García & Olaya-Nieto, 2012). Alcanza 79.5 cm de LT y 8.97 Kg de peso (LIBP, 2004), siendo generalmente las hembras más grandes y pesadas que los machos (Otero *et al.*, 1986; LIBP, 2004) Es una especie reofílica, su reproducción acontece en el periodo lluvioso (Olaya-Nieto *et al.*, 2005), los adultos prefieren las partes altas y torrentosas de los ríos y quebradas, sus desplazamientos son superficiales y agrupados en cardúmenes en sus diferentes fases de crecimiento. Su temporada reproductiva se ve más marcada entre abril y octubre, con el mayor pico reproductivo entre abril y junio (Atencio-García *et al.*, 2003.) En esta especie es posible la diferenciación sexual en virtud de que los machos adultos maduros presentan una serie de espículas en la primera mitad de los radios de la aleta anal, dándole una sensación rugosa al tacto, mientras que las hembras no lo presentan (Aristizabal & Arabia, 2004).

Es una especie en estado adulto omnívora Olaya-Nieto *et al.* (2007). En su transformación de larva a juvenil es zooplanctófaga con preferencia por cladóceros, copépodos y ostrácodos (Prieto y Atencio-García 2008). Su material vegetal, por preferencia está constituido por restos vegetales, frutas y semillas (73%), como el de mayor ocurrencia durante todo el año, seguido de peces (50%), conformado por una amplia variedad de especies como blanquillo (*Sorubim cuspicaudus*), Cocobolo (*Aequidens pulcher*), Chipe (*Hoplosternum magdalenae*), Lenguado (*Pleuronectiformes*), Sardinias (*Astyanax sp.*), Yalúa (*Cyphocharax magdalenae*) y otros (21%), representado por detritos, madera, materia orgánica no identificada,

restos de insectos, roedores, aves, crustáceos, huesos y serpientes; lo cual demuestra la amplia diversidad de ítems que consume la especie (*Otero et al. 1986*).

3.2 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE PECES

La crioconservación de semen de peces puede ser utilizada como herramienta para la conservación de los recursos genéticos en especies de peces comercialmente importantes y en peligro de extinción (*Tiersch, 2008*), permitiendo un manejo simplificado de los reproductores, disminuyendo el número de reproductores requeridos y facilitando la sincronización de la espermiación y ovulación, haciendo que los gametos de buena calidad estén disponibles durante y fuera del periodo de la época de desove (*Cabrita et al., 2010*).

En los últimos años, la crioconservación ha aumentado rápidamente como un método favorable en la conservación y preservación de los recursos genéticos. Actualmente se han desarrollado muchos protocolos para la crioconservación de germoplasma (gametos y/o embriones) en muchas especies (*Mazur et al., 2008*); sin embargo, todavía existen obstáculos importantes en algunos puntos claves del proceso de crioconservación.

3.3 ESPERMATOZOIDE DE PECES

El espermatozoide en peces se subdivide en cabeza, cuello, pieza media y cola. La longitud de un espermatozoide oscila entre 25 a 100 μm y su anchura es de aproximadamente 2 μm en el centro de la cabeza (Cosson, 2012; Figueroa et al., 2014). Es importante identificar la estrategia reproductiva (fertilización externa o interna) y la composición plasmática seminal de las especies de peces en estudio para comprender su cinemática, ya que esta información es crucial para la fertilización.

La parte media consiste en un flagelo central rodeado por una vaina mitocondrial; el número de mitocondrias presentes es altamente dependiente de la especie (Coward et al., 2002). La cola o flagelo consta de un solo cilindro delgado (o dos en pocos casos) largo que sobresale de la cabeza del espermatozoide, con rango entre 25 y 100 μm de longitud y de 0.4 a 1 μm de diámetro, que contiene el axonema que es el principal orgánulo activo responsable del movimiento del espermatozoide. El axonema está compuesto por nueve microtúbulos dobles en la periferia de esta disposición cilíndrica y dos microtúbulos centrales, formando la estructura clásica 9+2 (Cosson, 2012).

Las especies que exhiben estrategias de fertilización externas producen espermatozoides primitivos de cabeza redonda generalmente; mientras que, hay varias modificaciones morfológicas en aquellas especies con fertilización interna; estas modificaciones suelen implicar el alargamiento del núcleo del espermatozoide y el desarrollo mejorado de la parte media. La membrana plasmática a menudo forma una o dos crestas de tipo aleta a lo largo de la cola, que son en un eje horizontal con los microtúbulos centrales que contribuyen a la eficiencia de la natación (Gillies et al., 2013).

La membrana plasmática es también un componente clave de la fusión de gametos (Yu et al., 2002). Según Bobe y Labbé (2009), los lípidos de la membrana

determinan la fluidez de la misma; mientras que, tanto las proteínas como los lípidos contribuyen a la permeabilidad total al agua y los iones.

Las mitocondrias de espermatozoides en los peces pueden ser cilíndricas, esféricas o irregulares, como en el caso de *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis*, *Thymallus thymallus* (Lahnsteiner & Patzner, 2008). El tamaño y el número de mitocondrias dependen probablemente de las necesidades de bioenergía de los espermatozoides en cada especie; sin embargo, no se ha establecido una relación clara entre el número o la disposición de las mitocondrias y la duración y velocidad de la motilidad (Lahnsteiner & Patzner, 2008).

En peces como Salmoninae, Coregoninae, Thymallinae y Blennidae el complejo mitocondrial puede adherirse a la pieza intermedia en forma helicoidal o cónica, o puede estar contenido en invaginaciones hacia el núcleo de la cabeza del espermatozoide, o libre en la pieza central (Lahnsteiner & Patzner, 2008). El complejo mitocondrial se compone de un número variable de mitocondrias. En peces con fertilización externa, el espermatozoide tiene entre 2-9 mitocondrias (Tabares, et al 2005), y en salmónidos, una mitocondria o dos mitocondrias suministran energía al flagelo durante la motilidad del espermatozoide (Lahnsteiner & Patzner, 2008; Figueroa et al., 2013; Figueroa et al., 2015).

3.4 CRIOPROTECTORES

Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de crioconservación, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado. Estas sustancias cumplen funciones como incrementar el volumen del eyaculado, proteger al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura (Medina-Robles et al., 2007) y para obtener mejores tasas de

supervivencia de células y tejidos a crioconservar, las concentraciones de los crioprotectores debe optimizarse (Yavin & Arav, 2007).

Los crioprotectores pueden ser permeables o internos como Dimetilsulfóxido (DMSO), Dimetilacetamida (DMA), Etilenglicol (EG) Glicerol y 1,2-propanodiol y no permeables a las membranas celulares como 2-metil-2,4-pentanodiol, polivinilpirrolidona y hidroxietilalmidón y a diferencia de los productos químicos sintéticos o biomateriales (alginatos, alcohol polivinílico y quitosano) pueden utilizarse para impedir la formación de cristal de hielo (*Sambu, 2015*); además, se pueden aplicar antioxidantes y otros compuestos buscando intentar reducir la muerte celular de procesos tales como la apoptosis durante el ciclo de congelación y descongelación (*Safa et al., 2016; Krauskova et al., 2016; Amidi et al., 2016*).

Los agentes crioprotectores que permean la membrana celular se han utilizado para aumentar la fluidez de la membrana y deshidratar parcialmente la célula, reduciendo el punto de congelación y reduciendo así el número y el tamaño de los cristales de hielo intracelulares formados. Sin embargo, los crioprotectores mismos pueden tener un efecto tóxico en los espermatozoides siendo este efecto relacionado con la concentración utilizada y el tiempo de exposición celular previo a la congelación (*Swain & Smith, 2010*).

Los crioprotectores internos desplazan parte del agua intracelular, lo que impide el daño de la membrana por aumento del volumen de agua al congelarse y la formación de cristales; lo cual podría causar rompimiento de los orgánulos y destrucción total celular. El bajo punto de congelación de los crioprotectores internos permite mantener un ambiente acuoso intracelular, impidiendo la formación de estructuras sólidas cristalizadas que ocasionan daños en la membranas y disminución de la viabilidad celular por súper enfriamiento (*Martínez, 2010*).

La yema de huevo ha sido usada con éxito en diluyentes en combinación con crioprotectores extracelulares para la criopreservación de espermatozoides (peces y mamíferos) contra el choque térmico durante el enfriamiento, congelación y descongelación (*Martínez, 2010; Pérez, 2010*). Siendo un crioprotector no permeable (extracelular) que tiene una acción termoprotectora, ejercida por la fracción lipídica compuesta por lecitina y cefalina y una acción conservadora dada por la fracción lipoproteica de la yema de huevo (*María y col 2006*); lo cual la ha convertido en uno de los crioprotectores no permeables más utilizados en semen de mamíferos y peces de agua dulce por su capacidad de prevenir daños a la membrana. Aun así debido a su composición indefinida y origen animal, se han realizado muchos esfuerzos para encontrar alternativas para la yema de huevo. Para reemplazar a la yema de huevo se utilizan liposomas, particularmente compuestos de lípidos insaturados (*Röpke et al., 2011, Pillet et al., 2012*), y leche en polvo descremada con buenos resultados (*Sieme, 2011, Varisli et al., 2013; Pardo-Carrasco et al., 2015*).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS AGRO CLIMATOLÓGICAS

El estudio se desarrolló durante los meses de mayo a julio de 2019, en el Instituto de investigaciones piscícolas de la universidad de córdoba (CINPIC). Ubicado en el municipio de montería, departamento de córdoba, cuyas coordenadas geográficas son $8^{\circ}48'$ de latitud norte y $75^{\circ} 22'$ de longitud oeste; a una altitud de 15 metros sobre el nivel del mar y valores anuales promedio de temperatura, humedad relativa y precipitación, respectivamente de $27,5^{\circ}$, 68%, 1225mm



Figura 1: Ubicación satelital del instituto de investigación piscícola de la universidad de cordoba (CINPIC)

5. MATERIAL BIOLÓGICO

5.1 SELECCIÓN DE MACHOS

Se utilizaron 10 machos de Dorada *Brycon sinuens*, con edad entre dos y tres años obtenidos y mantenidos bajo condiciones de cautiverio en el CINPIC. Los ejemplares seleccionados fueron trasladados a piletas circulares de manejo (4 m³) con flujo constante de agua, donde permanecieron durante 48 horas, con el propósito de habituarlos a las condiciones experimentales, reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente. La selección de los reproductores se realizó con base en su estado de madurez sexual. Los machos fueron seleccionados en fase de espermiación cuya característica principal es la liberación de líquido seminal fluidamente cuando se aplica una leve presión abdominal, en sentido cráneo-caudal (Atencio *et al.*, 2015). La inducción se realizó con extracto de pituitaria de carpa (EPC), utilizando 5 mg/Kg de peso vivo en una dosis única (Atencio *et al.*, 2015).

5.2 OBTENCIÓN DEL SEMEN

El semen se obtuvo seis horas pos-inducción. Antes de su recolección los machos se colocaron en una solución de Eugenol 0.5ml/10 L de agua hasta evidenciar la pérdida de eje de nado. Esto nos permitió tener peces más tranquilos para una mejor manipulación, a la hora de coleccionar el semen. Se realizó suave presión sobre la papila urogenital, con el objetivo de eliminar restos de agua, orina o heces; luego se secó con papel absorbente el área abdominal. Para la extracción del semen se realizó un masaje abdominal en sentido cráneo-caudal, el semen se colectó directamente en tubos Falcon de 15 ml estéril y seco.

Posteriormente las muestras fueron llevadas al laboratorio (26±1°C) con el fin de conocer la calidad del semen fresco, observando el comportamiento de variables a nivel macroscópico y microscópico.

5.2.1 Evaluación macroscópica. Fue evaluado el volumen y color, el volumen se evaluó directamente en los tubos Falcón de 15 mL con la finalidad de estimar la cantidad de diluyente necesario que debe ser adicionado. El color se evaluó con la finalidad de evidenciar la posible presencia de sustancias contaminantes como heces, orina o sangre.

5.2.2 Evaluación microscópica Microscópicamente se evaluó movilidad total, velocidad espermática, tiempo de activación, concentración espermática del espermatozoide de Dorada.

5.2.2.1 Movilidad total. En una cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments Ltd, Israel) se agregó una muestra de 0.25 μ l de semen y 75 μ l de agua destilada (dilución 1:300); luego se homogenizó y con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa asistido por computadora para análisis de semen Sperm Class Analyzer (SCA Versión 6.4.0.65-2018 Microptic SL, España) se midió la movilidad total. Se evaluó en semen fresco, precongelado y descongelado.

5.2.2.2 Velocidad y progresividad espermática. Se analizó en un periodo de cuatro segundos por el programa SCA, obteniéndose los porcentajes de espermatozoides con velocidad rápida (tipo a, mayor de 100 μ m/seg), media (tipo b, entre 50 y 99 μ m/seg), lenta (tipo c, menor de 50 μ m/seg), así como el porcentaje de estáticos (tipo d). También el SCA estimó las velocidades curvilínea (VCL) y lineal (VSL). Todas las velocidades se expresaron en μ m/s. Se evaluó en semen fresco, pre congelación y descongelación.

5.2.2.3 Tiempo de activación. Se determinó desde el instante en que se adicionó la solución activadora (agua esterilizada) a la muestra de semen hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides dejaron de moverse. Se evaluó en semen fresco.

5.2.2.4 Concentración espermática. Se utilizó 1 μ l de semen mezclado con 699 μ l de glucosa al 6% en un Eppendorf de 2 ml (dilución 1:700), la mezcla fue homogenizada durante cinco segundos en un vortex a 1200 rpm (Velp Scientifica,

Zxclasic, China). Luego se tomaron 10 μ l y se colocaron en la cámara Makler para la determinación de la concentración mediante el Sperm Class Analyzer SCA. Este procedimiento se realizó tres veces para obtener un valor promedio de la concentración espermática del semen analizado. Esta característica se midió en semen fresco.

5.3 PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS PARA LA CRIO CONSERVACIÓN DEL SEMEN.

Se utilizó como diluyente: glucosa 6% (p:v), adicionando como crioprotector externo yema de huevo al 12%; como crioprotector interno DMA o ETG (Sigma Chemical Co, USA) a dos porcentajes de inclusión (5 y 10%). Para la preparación se mezcló la glucosa con agua destilada calentada previamente a temperatura de 60°C, posteriormente se adiciono el volumen correspondiente del crio protector interno y pasada la reacción exotérmica, ocasionada por la inclusión del crio protector; se adiciono la yema de huevo y se completó el volumen deseado con agua destilada.

Tratamiento 1: glucosa 6%, yema de huevo 12%, **DMA 5%**, agua destilada+ semen.

Tratamiento 2: glucosa 6%, yema de huevo 12%, **DMA 10%**, agua destilada+ semen.

Tratamiento 3: glucosa 6% , yema de huevo 12%, **ETG 5%**, agua destilada+ semen.

Tratamiento 4: glucosa 6% , yema de huevo 12%, **ETG 10%**, agua destilada+ semen.

5.4 EMPACADO

Para el empaque, el semen se diluyó en proporción 1:3, se mezcló a temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$; posteriormente se empaco en pajillas de 0.5 mL (Minitub, Abfül-und Labortechnik GmbH & Co, Inglaterra) previamente selladas con polivinilo y marcadas de acuerdo a cada tratamiento.

5.5 CONGELACIÓN

Las pajillas fueron Introducidas en un soporte vertical dentro de un termo seco de vapores de nitrógeno de 4 L (MVE, SC 4/2v, USA) durante 30 minutos, tasa de enfriamiento rápido ($27.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 28 a -20°C , $29.9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -20 a -100°C , $5.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -100 a -196°C) según lo establecido por Cruz-Casallas *et al.*, (2006). Al alcanzar la temperatura de crioconservación de -196°C , las pajillas se trasladaron a un termo de almacenamiento 34 L (MVE, XC 34/18, USA) y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido.

5.6 DESCONGELACIÓN

Para la Descongelación del semen, las pajillas congeladas y conservadas en nitrógeno líquido, se descongelaron pasado 30 días, por inmersión directa en un baño serológico a 35°C durante 60 segundos (Mermert, WNB 7, Alemania). Pruebas post-descongelación. Se realizaron pruebas de movilidad, velocidad y progresividad total (igual que en fresco).

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, Todos los datos fueron sometidos a estadística descriptiva y los resultados expresados como $\text{media}\pm\text{desviación}$

estándar. En todos los casos se utilizó un nivel de confianza de 5 % como criterio estadístico para revelar diferencia significativa.

Donde se evaluó el factor crioprotector con (DMA y ETG) y el factor porcentaje de inclusión con dos niveles (5 y 10%); DMA 5%, DMA 10%, ETG 5% Y ETG 10% para un total de cuatro tratamientos; además se evaluó semen fresco como tratamiento control. Todas las variables analizadas como movilidad total (%), tipos de movilidad (%), velocidades espermáticas ($\mu\text{m}/\text{seg}$) y progresividad total (%) fueron sometidos a pruebas de normalidad (Shapiro y Wilks) y de homogeneidad de varianza (Barlett), cumplidos estos supuestos se realizó un análisis de varianza en una sola vía (ANOVA) y finalmente para identificar diferencias entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey, en todos los casos $p < 0.05$ fue considerado como nivel de significancia. Los análisis se realizaron con ayuda del Statgraphic centurión XVI.I.

7 RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS SEXUALES DE DORADA *Brycon Sinuensis*.

En la Tabla 1 Se muestran las características del semen de Dorada *Brycon sinuensis* obtenidos por inducción hormonal con extracto pituitario de carpa (EPC).

Tabla 1 Características del semen de Dorada *Brycon sinuensis* obtenidos por inducción hormonal EPC.

Características	Semen fresco
Número de individuos	10
Color producto sexual	Amarillo pardo
Volumen seminal (mL)	3.0
Concentración espermática ($\times 10^6/\text{mL}$)	17524.0 \pm 3542.4
Movilidad total (%)	97.0 \pm 7.0
Tiempo de activación (seg)	30.7 \pm 3.2

7.2 VARIABLES DE CALIDAD DEL SEMEN DE LA DORADA *Brycon Sinuensis* DURANTE LA FASES DE PRECONGELACION Y DESCONGELACIÓN CON DMA Y ETG COMO CRIOPROTECTORES.

7.2.1 movilidad total del semen precongelado y descongelado. La Figura 1 muestra los valores en el semen fresco, precongelado y descongelado. El semen fresco registró una movilidad de (97.0±7.0%) presentando esta diferencia estadística ($p<0.05$), con respecto los tratamientos DMA 5 y 10%, ETG 5 y 10 %. Durante la fase de precongelacion, la mayor movilidad total (59.9±11.8%) se obtuvo con ETG 5% presentando diferencia estadística ($p<0.05$), con los tratamientos DMA 5% (32.0±5.0%), DMA10% (33.1±1.4%) y ETG 10% (43.5±6.8%) Para la fase de descongelación no se observó diferencia estadística entre los tratamientos ($p>0.05$) (DMA 5%) 35.5±4.6%; (DMA10%) 32.2±6.2%; (ETG 5%) 36.6±8.4%; (ETG10%), 32.4±5%.

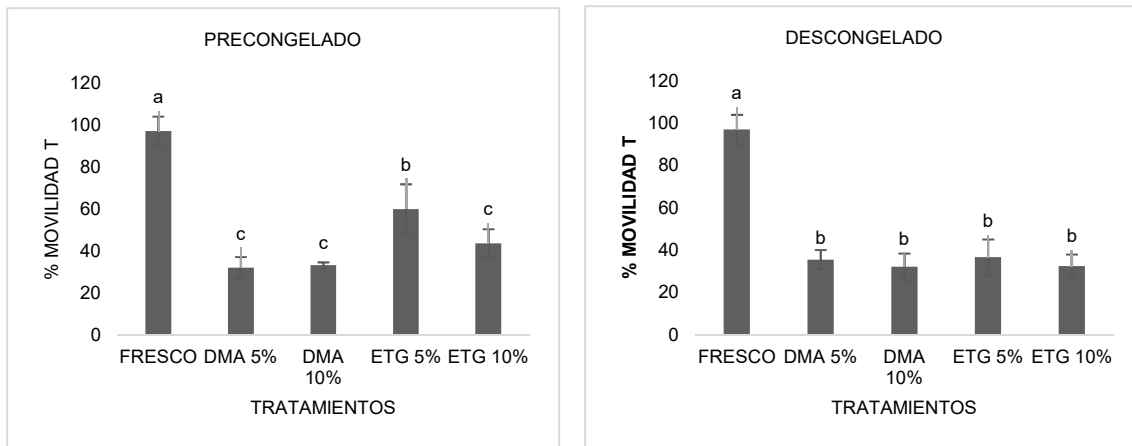


Figura 2. Movilidad total de semen de *B. sinuensis* fresco, pre congelado y descongelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$)

7.2.2 movilidad rápida. Los valores de movilidad rápida en semen fresco, pre congelado y descongelado se muestran en la Figura 3. El mayor porcentaje de espermatozoides rápidos se presentó en semen fresco ($70.1\pm 25.6\%$), siendo estadísticamente diferente a los tratamientos ($p < 0.05$), DMA y ETG al 5 y 10%.

Mientras los tratamientos en semen precongelado el porcentaje de movilidad rápida osciló entre DMA 5% $0.3\pm 0.1\%$, DMA 10% $0.1\pm 0.2\%$, ETG 5% $1.2\pm 1.1\%$, ETG 10% $0.9\pm 0.5\%$ valores que estadísticamente no presenta diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$).

Para el descongelado el semen que mostro espermatozoides más rápidos fue el (ETG 5% $5.9\pm 3.4\%$) valor que estadísticamente no presenta diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos ($p > 0.05$). (4.9 ± 2.9 DMA 5%), (4.4 ± 1.5 DMA 10%), (4.3 ± 1.0 ETG 10%).

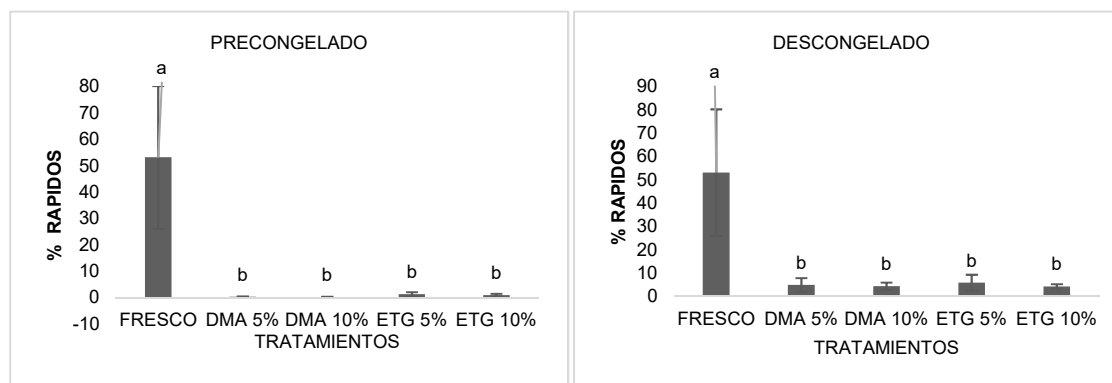


Figura 3. Movilidad rápida de semen de *B. sinuensis* fresco, pre congelado y descongelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

7.2.3 movilidad media. Los valores de movilidad media de semen fresco, pre congelado y descongelado se muestran en Figura 4.

El semen fresco registró los espermatozoides con mayor movilidad media ($32.3\pm 19.1\%$). Mientras entre tratamientos el ETG5% ($11.2\pm 5.7\%$) y ETG10% ($5.2\pm 2.8\%$)

registraron los mayores porcentajes de velocidad media mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación a los tratamientos con DMA 5 y 10%.

Para los tratamientos con semen des congelado, el ETG 5% ($8.8 \pm 3.4\%$) mostró el porcentaje más alto de espermatozoides con movilidad media sin presentar diferencia significativa entre estos valores ($p > 0.05$).

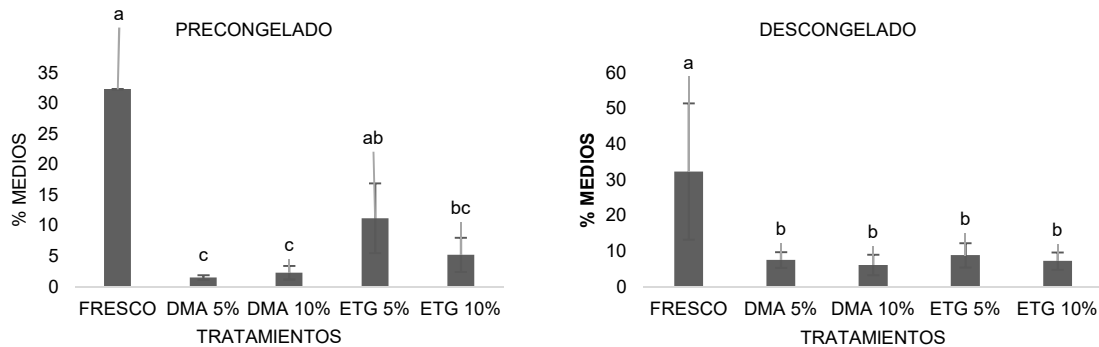


Figura 4. Movilidad media de semen de *B. sinuensis* fresco Y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

7.2.4 Los valores de movilidad lenta en semen fresco y pre congelado se muestran en la Figura 5. Los tratamientos ETG5% ($47.3 \pm 5.3\%$) y ETG% ($37.4 \pm 3.9\%$) registraron los porcentajes más altos de espermatozoides lentos presentando diferencias significativas ($p < 0.05$), con respecto a los valores obtenidos con los tratamientos DMA 5 y 10% y el semen fresco.

Mientras en semen descongelado todos los tratamientos presentaron tasas altas de espermatozoides lentos, respecto al semen fresco ($11.6 \pm 11.8\%$), registrando mayor porcentaje de espermatozoides lentos el DMA 5 % ($23.2 \pm 2.5\%$), seguido

de ETG 5% ($22.0 \pm 2.0\%$), DMA 10% ($21.7 \pm 3.9\%$), ETG 10% ($20.8 \pm 2.4\%$) no mostrando diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$).

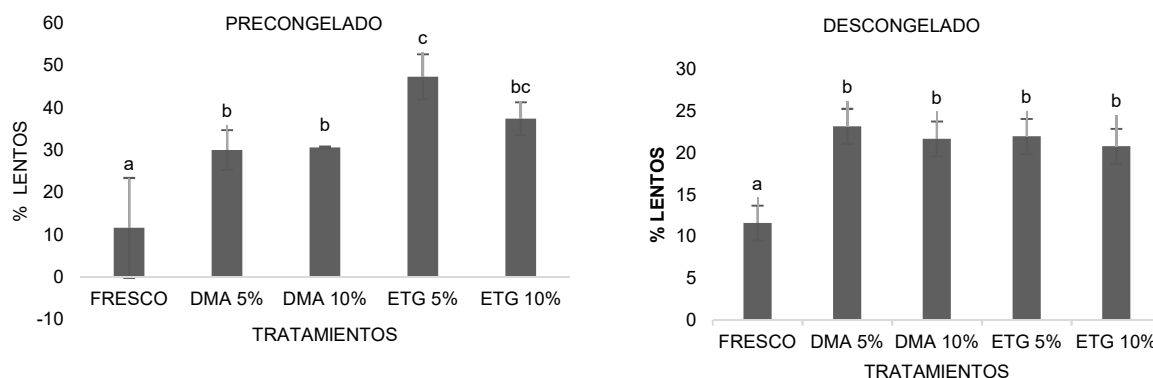


Figura 5. Movilidad lenta de semen de *B. sinuensis* fresco y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

7.2.5 Espermatozoides estáticos. El porcentaje de espermatozoides estáticos en semen fresco, pre congelado y descongelado se muestran en la Figura 6. Los tratamientos DMA5% ($68.3 \pm 5.0\%$), DMA 10% ($66.9 \pm 1.4\%$), ETG 10% ($56.5 \pm 6.8\%$) registran el mayor porcentaje de espermatozoides inmóviles, presentando diferencia significativa ($p < 0.05$), con relación al ETG10% ($40.1 \pm 11.8\%$). Mientras en semen descongelado los tratamientos DMA 10% ($68.0 \pm 6.2\%$) y ETG (67.6 ± 5.52) 10% presentan el mayor porcentaje de espermatozoides inmóviles, frente al DMA 5% 64.5 ± 4.6 y ETG 5% (63.4 ± 8.4) sin presentar diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos.

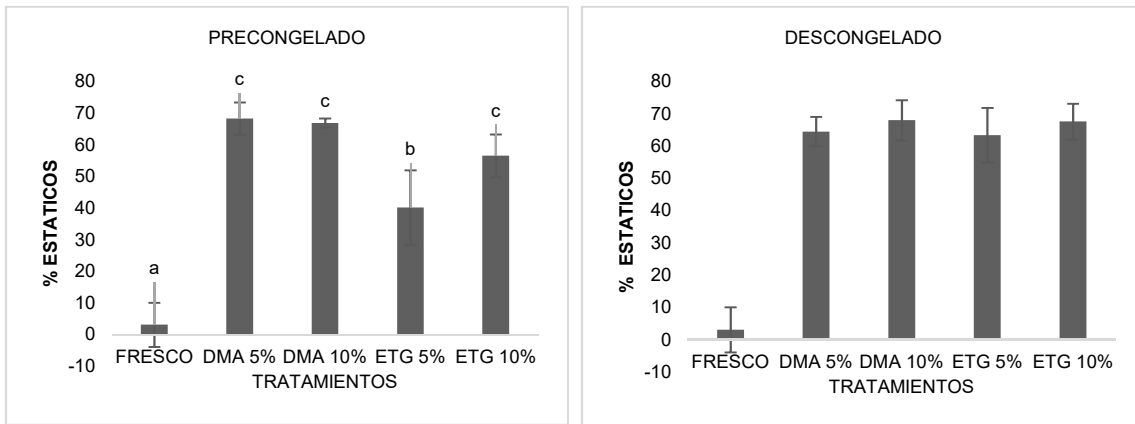


Figura 6. Espermatozoides estáticos de semen de *B. sinuensis* fresco y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

7.2.6 Velocidad curvilínea (VCL). Los valores de Velocidad Curvilínea (VCL) del semen fresco, pre congelado y descongelado se muestran en la Figura 7. La mayor VCL se registró en semen fresco ($92.0 \pm 23 \mu\text{m}/\text{seg}$), presentando diferencia significativa ($p < 0.05$). Frente al semen pre congelado y descongelado de DMA y ETG (5 y 10%). Mientras que entre tratamientos el ETG 5% ($32.3 \pm 4.1 \mu\text{m}/\text{seg}$) y ETG 10% ($27.2 \pm 4.3 \mu\text{m}/\text{seg}$) presentan la mayor Velocidad Curvilínea entre tratamientos frente al DMA 5% y 10%, sin observarse diferencia significativa entre ellos.

En semen descongelado el ETG 5% presentó la mayor velocidad curvilínea de ($30.5 \pm 5.0 \mu\text{m}/\text{seg}$) y la menor DMA 10% ($28.8 \pm 3.2 \mu\text{m}/\text{seg}$), sin mostrar diferencia significativa entre tratamientos.

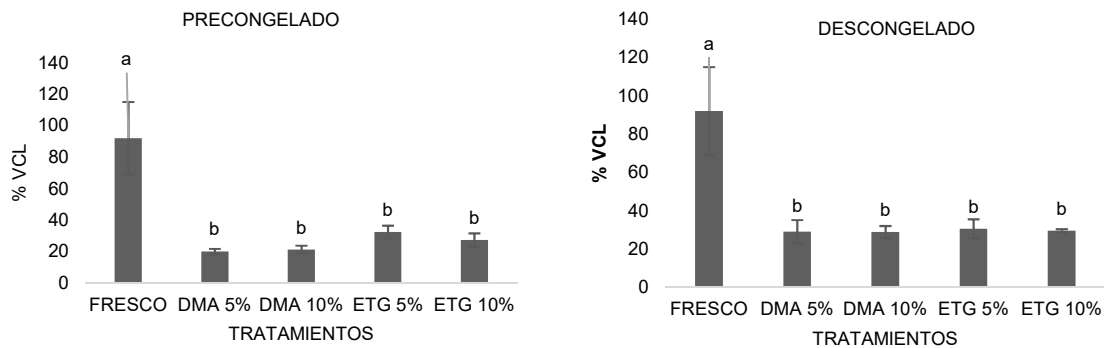


Figura 7. Velocidad Curvilínea (VCL) de semen de *B. sinuensis* fresco, pre congelado y descongelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

7.2.7 La Velocidad en Línea recta (VSL). Los valores de Velocidad Lineal del semen fresco, pre congelado y descongelado se muestran en la Figura 8. La mayor VSL se registró en semen fresco ($42.0 \pm 11.2 \mu\text{m}/\text{seg}$), estadísticamente diferente ($p < 0.05$) con semen pre congelado y descongelado. En tanto en semen pre congelado, la VSL osciló entre (ETG 5%) $9.4 \pm 1.8 \mu\text{m}/\text{seg}$ y $4.3 \pm 1.2 \mu\text{m}/\text{seg}$ DMA 5%) sin observarse diferencia significativa entre estos valores ($p > 0.05$).

Para el semen descongelado la VSL osciló entre $11.0 \pm 2.7 \mu\text{m}/\text{seg}$ (ETG 5%) y $8.4 \pm 2.9 \mu\text{m}/\text{seg}$ (DMA 10%) sin observarse diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$).

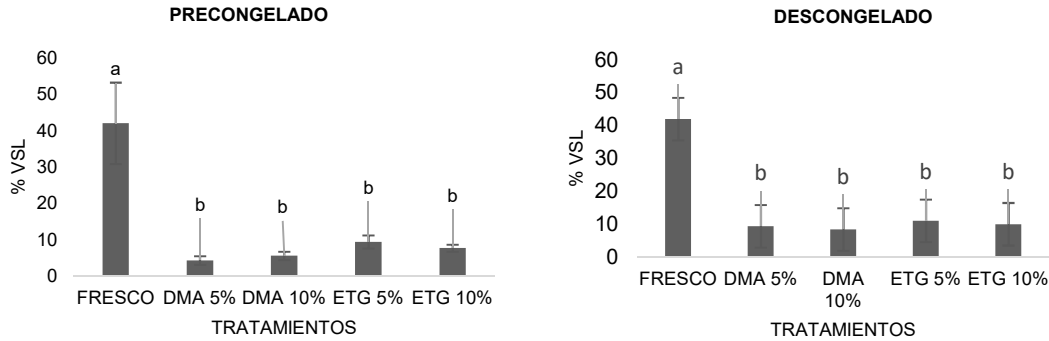


Figura 8. Velocidad Lineal (VSL) de semen de *B. sinuensis* fresco y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

7.2.8 Progresividad Total. Los porcentajes de progresividad total en semen fresco, pre congelado y descongelado se muestran en la Figura 9. Se registró el mayor valor de pt en semen fresco ($61.0 \pm 24.0\%$), mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$) con semen pre congelado y descongelado. Mientras en semen pre congelado la PT osciló entre $4.3 \pm 2.1\%$ (ETG) 5% y $0.5 \pm 0.4\%$ (DMA) 5% sin observarse diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

Para el semen descongelado la PT entre los tratamientos osciló entre 10.3 ± 5.7 (ETG) 5% y 7.9 ± 3.2 (DMA) 5% sin observarse diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

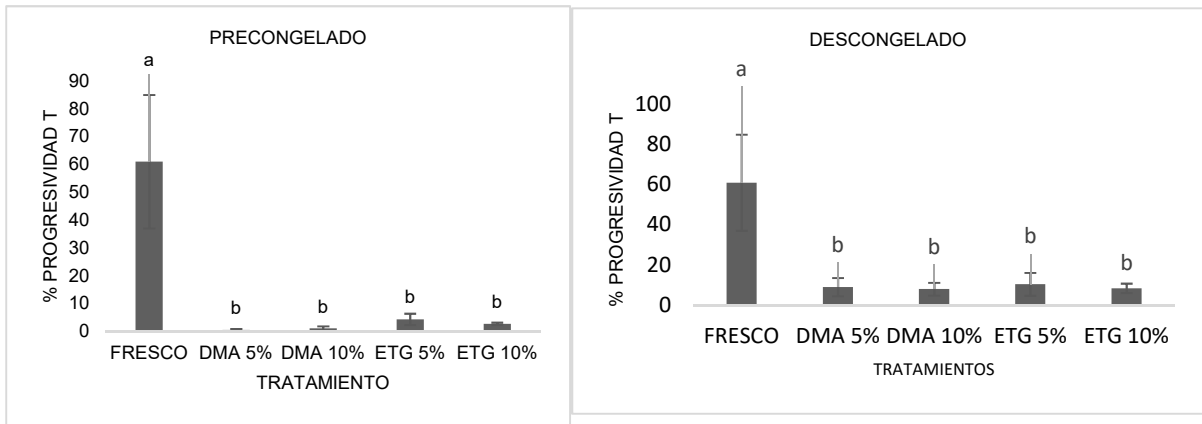


Figura 9. Progresividad total de semen de *B. sinuensis* fresco y pre congelado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Semen fresco y crio conservado

El semen fresco utilizado en este estudio registró un tiempo de activación de 30.7 seg, valor similar al obtenido por Montes y Salgado (2014) para la misma especie (31.4 seg.) Para otras especies del mismo género como *Brycon moorei* se reportó un tiempo de activación de (33.7 seg) (Garcia, Lonjas, Petro, Guevara, & Araujo, 2017); Lo que permite sugerir que el tiempo de activación obtenido es similar en las especies del género y está dentro del promedio de los peces de agua dulce. (Marián *et al*, 1997). La mayoría de peces de agua dulce tiene un rango de duración entre 30-40 segundos. La concentración espermática en este estudio fue de 17524.0 ± 3542.4 millones/ML. Montes y Salgado (2014) en la misma especie reportaron una concentración espermática de 10058 ± 5493 millones/mL, valor inferior al registrado en la presente investigación. Sin embargo, en estudios realizados con individuos del mismo género por Pineda *et al.* (2015) reportaron en

B. henni una concentración espermática de 14554 ± 5138 millones/mL así mismo Cruz- Casallas *et al.* (2005) en *B. amazonicus* registraron una concentración de 13900 ± 4000 millones/mL, mientras que para *B. moorei* fue $12393,1 \pm 1486,8$ (Atencio G, *et al* 2017) Siendo todos estos valores cercanos o similares con los obtenidos en el presente estudio; permitiendo sugerir que estos datos pueden considerarse normales para el género y para peces reofílicos.

El valor de movilidad total para *Brycon sinuensis* en este estudio fue 97% para el semen fresco. Similar al reportado por Espinosa *et al*, 2014 para la misma especie 96,2%. Pineda *et al*, 2015 reporta para *Brycon henni* 96%, y para *B orbygnianus* (98%) (Murgas *et al.*, 2001), *B insignis* (92%) (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001) y *B amazonicus* (96%) (Cruz-Casallas *et al.*, 2004).

Para La movilidad total del semen descongelado esta redujo entre 33-38 % con relación a la del semen fresco (97.0 ± 7.0 %) y descendió al incrementar el porcentaje de inclusión en los crio protectores. Por tanto, se encontró que con ETG 5% tuvo un porcentaje de 36.6 ± 8.4 % menor al reportado por Cruz- Casallas *et al.*, (2006), en *B amazonicus* de 60 ± 04 % con ETG 5% y (Pineda *et al*, 2015) en *Brycon henni* 62.1 ± 11.2 % con ETG al 5%. Mientras que en este estudio con ETG al 10% fue superior 32.4 ± 5.5 % con relación a lo reportado por Cruz- Casallas *et al.*, (2006), en *B amazonicus* con ETG 10% (12 ± 2 %) respectivamente.

Mientras Richardson *et al* (2000) reportaron movilidad total 31,7% con semen post-descongelado de *Salvelinus alpinus* crioconservado con DMA 10%, similar al resultado obtenido en el presente estudio con DMA 10% (32.2 ± 6.2 %) y V. Garcia *et al*, 2017 , en *B. moorei* obtuvo una movilidad total promedio con DMSO 5% ($40,1 \pm 5,0$ %) cercana a la obtenida con ETG (36.6 ± 8.4 %) y DMA (35.5 ± 4.6 %) al 5%.

Pre congelado

Los resultados obtenidos en semen precongelado con los crioprotectores ETG Y DMA (5% y 10%) afectaron la calidad seminal en cuanto a los parámetros de movilidad total, tipos de movilidad, velocidad espermática y progresividad total con relación a semen fresco mostrando diferencia significativa ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en semen precongelado con ETG y DMA (5% y 10%) permiten sugerir que estos crioprotectores internos afectaron la movilidad total, tipos de movilidad y velocidad espermática y progresividad total con relación a semen fresco siendo estadísticamente diferente ($p < 0,05$). Entre los tratamientos el ETG 5% presentó el mayor porcentaje de movilidad total $59.9 \pm 11.8\%$ siendo estadísticamente diferente con el resto de los tratamientos ($p < 0,05$). Se evalúa una reducción casi a cero de los espermatozoides rápidos, disminuyó los espermatozoides con movilidad media con un rango entre $1.5 \pm 0.41\%$ - $11.2 \pm 5.7\%$, aumentando los lentos mostrando el mayor valor el ETG 5% ($47.3 \pm 5.3\%$), incrementándose los estáticos en DMA al 5 - 10% y ETG 10%; también se observó una disminución de la VCL y la VSL. A pesar que los datos obtenidos con semen de *Dorada Brycon sinuensis* precongelado son similares en todos los casos, se observó que el ETG presentó mejores resultados que DMA; de acuerdo a que todo crioprotector ejerce efecto tóxico sobre el espermatozoide, logrando desnaturalizar las proteínas celulares reduciendo la viabilidad durante la precongelación (Medina, 2007), por otro lado, Martínez & Pardo (2010) sugirieron que el descenso de movilidad total y velocidad espermática en la precongelación se da a la alteración de la síntesis de las proteínas implicadas en la producción energética celular y las reservas de ATP. Por otro lado Horváth & Urbányi (2000) determinaron que ETG en concentración de 5% redujo la movilidad post-equilibrio con solo dos minutos de exposición al crioprotector, resultando dañino para el semen de catfish Africano. Además Padilla (2014) encontró que desde el mismo momento en que el semen entra en contacto con la solución crioprotectora se producen daños en las

mitocondrias, membrana espermática y fragmentación del DNA como consecuencia del choque hiperosmótico y la toxicidad del crioprotector.

Descongelado

En este estudio el mayor valor de Velocidad Lineal fue $42.0 \pm 11.2 \mu\text{m/s}$ y curvilínea $92.0 \pm 23 \mu\text{m/s}$ fue obtenido con semen fresco; mientras que con semen crioconservado, los mayores valores de VSL ($11.0 \pm 2.7 \mu\text{m/s}$) y VCL ($30.5 \pm 5.0 \mu\text{m/s}$) se obtuvieron con ETG 5%; presentando una reducción de aproximadamente de 74% de la VSL y una caída cercana a 67% para el caso de la VCL con relación al semen fresco. Mientras Garcia *et al.* 2017 en *B. moreei* reporto con DMSO al 5% una VSL $25,7 \pm 9,3$ y VCL $48,3 \pm 17,8$; Pineda et al, 2015 en parte en *Brycon henni* con ETG al 5% obtuvieron una VSL 25.6 ± 5.4 y VCL 53.3 ± 8.7 superiores a los resultados obtenidos en el presente estudio. Li *et al.* 2008 Afirmaron que las pérdidas de velocidad Velocidad curvilínea y Velocidad lineal ocurridas luego de los procesos de congelación y descongelación son causadas por daños en la integridad del ADN, debido a que la concentración de los crioprotectores no son apropiadas. Para Cabrita *et al.*, 2010; Padilla (2014). Los daños que sufren las mitocondrias y la membrana citoplasmática en el proceso de crioconservación se consideran las principales causas de la pérdida de movilidad, tipos de movilidad y velocidades espermáticas.

El papel de las mitocondrias se considera el factor clave de la funcionalidad del espermatozoide, en peces particularmente, se necesita preservar la actividad mitocondrial, ya que esta se aprovecha para mantener alta la movilidad (Figueroa et al., 2013). Por tanto La magnitud de los daños criogénicos puede resultar en disminución de la movilidad y velocidad espermáticas; lo cual termina afectando la capacidad fertilizante del semen descongelado (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010). Ogier de Baulny *et al.* (1999) reportaron pérdidas en las propiedades seminales durante los procesos de crioconservación, siendo solo una pequeña fracción de las células espermáticas viables; lo cual reduce la capacidad fertilizante

de semen crioconservado-descongelado. Lahnsteiner *et al.* (2000), debido a la reducción de la velocidad espermática limitando la probabilidad que el espermatozoide alcance el micrópilo del ovocito.

La mayor progresividad total se presentó para el semen fresco ($61.0 \pm 24.0\%$) mientras que para los el semen crio conservado descongelado con DMA y ETG al 5% Y 10% tuvo un rango de $7.9 \pm 3.2\%$ y $10.3 \pm 5.7\%$. siendo el ETG al 5 % el valor más alto entre los tratamientos. V. Garcia *et al*, 2017 en *brycon moorei* reporta valor similares con DMSO 5% (9.9 ± 5.9) Y 10 % (7.1 ± 4.6) mientras Atencio *et al* 2013 en *Prochilodus magdalenae* con DMA al 8 (11.0 ± 2.6) y 10% (10.7 ± 0.8) obtiene resultando parecidos a los del presente estudio.

En general los mejores resultados para la crioconservación de semen de *B. sinuensis* fueron alcanzados al emplear ETG al 5 %, yema de huevo de gallina 12% y glucosa 6%. Sin embargo, es conveniente anotar que, con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, la crio conservación de semen en los peces presenta resultados altamente variables y que el proceso es muy sensible a diferentes factores, siendo necesario realizar ajustes específicos a los protocolos (especie-específico) para cada especie (Medina *et al.*, 2005; Martínez, 2008).

CONCLUSIONES

Los valores de movilidad total para este estudio con crio protectores DMA y ETG tuvieron una reducción significativa con relación al semen fresco en la especie *Brycon sinuensis*.

Los crio protectores en concentraciones altas presentaron mayor disminución de movilidad y velocidades posiblemente debido al efecto toxico sobre el espermatozoide haciéndolo inviable para la fertilización.

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a la calidad espermática en la crio conservación y descongelación de semen de Dorada *Brycon sinuensis* el ETG en concentraciones bajas, con glucosa y yema de huevo presenta una alternativa que puede ser utilizada en la crio conservación de semen de esta especie. Sin embargo se debe seguir investigando alternativas de crio conservación en *Brycon sinuensis* que permitan mejorar los resultados obtenidos.

Las reducciones de la velocidad curvilínea en semen descongelado crio conservado, Posiblemente fueron afectadas por el crio daño del espermatozoide en las mitocondrias y membrana celular, disminuyendo su capacidad de movilidad y fertilización.

Bibliografía

1. Andrade-Talmelli E, Kayamoto E, Fenerich-Verani N. Características seminais da piabanha *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) após estimulação hormonal. *Biol Inst Pesca*, São Paulo. 2001;27(2):149-154.
2. Atencio-García VJ, Mercado-Fernández T, Kerguelén E. Evaluación del desempeño reproductivo de las principales especies reofilicas del río Sinú. CINPIC, Universidad de Córdoba. Informe final presentado Urrá S.A. E.S.P Montería, Colombia. 2003; 73.
3. Atencio V. 2005. Descripción del desarrollo ontogénico y aspectos de alevinaje de la dorada (*Brycon sinuensis* Dahl, 1955). Informe final. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 55 pp.
4. Atencio García VJ, Pertuz Buevas V, Pérez Espitía F, Ortiz Mestra R, Pardo Carrasco S. Manejo de la primera alimentación de dorada *Brycon sinuensis* ofreciendo larvas de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2010; 23(3):317-324.
5. Aristizabal Regino Jorge, Arabia Ricardo Farid. Descripción del desarrollo embrionario y larvario de la dorada (*Brycon moorei sinuensis* Dahl, 1955). Universidad de Córdoba, Departamento de Acuicultura. Trabajo de grado (Acuicultura). Montería, 2004. 69p.
6. Asturiano J, Cabrita E, Horvath A. 2016. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 245, 69–76.
7. Atencio V. 2000. Impactos de la Hidroeléctrica Urrá en los peces migratorios del río Sinú. *Revista Temas Agrarios* 5 (9): 29-40.
8. Atencio-García VJ, Pardo-Carrasco SC, Barrera Cruz U, Martínez E. Efecto de la densidad de siembra en el alevinaje de la dorada (*Brycon sinuensis* Dahl, 1955). *Rev Col Cienc Pec* 2006; 19:197-203.
9. Atencio-García V, Olaya-Nieto C. *Brycon sinuensis* Dahl 1955, p205-208. En: Mojica JI, Usma JS, Álvarez-León R, Lasso CA (Eds). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia (2012). Bogotá: Instituto de Investigación de

Recursos Biológicos Alexander von Humboldt/Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia/ WWF Colombia/Universidad de Manizales. 2012, 319p.

10. Atencio V, Pardo S, Espinosa J, Pérez E. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Med Vet 2013; 45, 151-158.
11. Betancur J, Ospina J, Botero J, Uribe J, Botero M, Montoya A. Efecto de diferentes activadores espermáticos sobre el porcentaje de movilidad y tiempo de activación en semen de dorada *Brycon moorei* (Dahl, 1955) fresco y criopreservado. Rev Colomb Cienc Pecu. 2009;22:385.
12. Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. Gen. Comp. Endocrinolgy. 2009; 165 (3): 535-548.
13. Brown, G. y Brown, L. 2011. Cryopreservation of sperm of striped bass and white bass. In: Cryopreservation in aquatic species, 2da Edition TR. Tiersch and C.C. Green, editors. Word Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.; 430-438.
14. Cabrita E, Sarasquete C, Martínez S, Robles V, Beirao J, Pérez S, Herráez M. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives, Journal of Applied Ichthyology, 26, 623-635.
15. Carrillo M.; Muñoz J.; Zanuy S.; Rocha A. y Molés, E. 2009. La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español De Acuicultura. Madrid, p 475-530.
16. Cosson, J. (2012). Fish spermatozoa motility: physical, and bio-energetic interactions with their surrounding media. In: Morisawa M. (ed.) Sperm Cell Research in the 21st Century: Historical Discoveries to New Horizons, pp. 152–156. Adthree Publisher Co. ISBN 978-4-9044419-37-3.
17. Coward K, Bromage N, Hibbitt O, Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Reviews in Fish Biology and

- Fisheries 12, 33–58. Cruz-Casallas P, Pardo-Carrasco S, Arias-Castellanos J, Lombo-Castellanos
18. P, Lombo-Rodríguez D. Cryopreservation of yamu *Brycon siebenthalae* milt. *J World Aquacult Soc.* 2004;35:529-535.
 19. Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú *Brycon amazonicus*. *Rev Colom Cien Pec.* 2006;19(2):153-159.
 20. Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú. *Rev Col Cienc Pecu* 2006; 19(2): 146-51.
 21. Espinosa J. Crioconservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*). Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Básicas. Maestría en Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 2013.
 22. Figueroa E, Risopatrón J, Sánchez R, Isachenko, E., Merino, O. & Valdebenito, I. (2013). Sperm vitrification of sex reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 372–375, 119–126.
 23. Figueroa E, Valdebenito I, Farias J. 2014. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*, DOI:10.1111/are.12630.
 24. Figueroa E, Valdebenito I, Zepeda A, Figueroa C, Dumorné K, Castillo R, Farías J. (2015). Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Reviews in Aquaculture* doi: 10.1111/raq.12105.
 25. García et al. Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 81 – 88.
 26. Gillies E, Bondarenko V, Cosson J, Pacey A. (2013). Fins improve the swimming performance of fish sperm: a hydrodynamic analysis of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Cytoskeleton* 70, 85-100.
 27. Gonzalez J, Losada E, Cruz N, Cruz-Casallas P, Medina-Robles V. Efecto de la sustancia crioprotectora y nivel de glucosa sobre la viabilidad de embriones de cachama blanca *Piaractus brachypomus* conservados a -14 °C. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2011;24:384.

28. Kerguelén E, Brú S, Mercado T, Atencio V. 2011. Variables ambientales asociadas a la reproducción de los peces reofílicos en el río Sinú. *En: Memorias de Resúmenes XI Congreso Colombiano de Ictiología y II Encuentro Sudamericano de Ictiólogos*. Ibagué (Tolima), Colombia. Mayo 8 a 13 de mayo de 2011.
29. Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the starlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Res* 2004;35:519-528.
30. Lahnsteiner F, Patzner R. (2008). Sperm Morphology and Ultrastructure in Fish. In *Fish spermatology* (Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward., K. & Rafiee, G., eds.) pp. 215-239. Oxford: Alpha Science Ltd.
31. Laboratorio de Investigación Biológico Pesquera. Base de datos biológicos pesqueros en la cuenca del Río Sinú. LIBP. Departamento de Acuicultura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba. Lórica, Colombia. 2004.
32. Lind C, Ponzoni R, Nguyen N, Khaw H. Selective breeding in fish and conservation of genetic resources for aquaculture. (2012). *Reprod. Domest. Anim.* 47, 255-263.
33. Linhartova Z, Rodina J, Nebesarova J, Cosson, Psenicka M. Morphology and ultrastructure of beluga (*Huso huso*) spermatozoa and a comparison with related sturgeons, *Animal Reproduction Science* 137 (2013) 220– 229.
34. Maria AN, ATM Viveiros, RTF Freitas, AV Oliveira. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260, 298-306.
35. Márián T, Krasznai Z, Balkay L, Emri M, Trón L. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺ / H⁺ exchanger. *Cytometry* 1997; 27: 374-382.
36. Martínez S. 2008. Bases para la elaboración de bancos de germoplasma en peces: aplicación a la trucha leonesa. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León. 174p

37. Martínez S, Horváth Á, Labbé C, Zhang T, Robles V, Herráez P, Suquet M, Adams S, Viveiros A, Tiersch T, Cabrita E. 2016. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*. 2016.05.042.
38. Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y, Cruz-Casallas P. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev Col Cienc Pec* 2005; 18:34-48.
39. Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y, Cruz-Casallas P. Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (*Brycon amazonicus*). *Arch. Med. Vet.* 2007; 39: 229-237.
40. Mojica J, Álvarez R, Usma J, Lasso C. (Eds.). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La Serie Libros Rojo de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, U. Nacional de Colombia, Bogotá 2012; 205-208.
41. Morales M, Lasso C. 2011. *Brycon sinuensis* (Characiformes, Characidae), Capítulo 7. Pp. 211-213. *En*: Lasso, C. A., E. Agudelo Córdoba, L. F. Jiménez-Segura, H. Ramírez-Gil, M. Morales-Betancourt, R. E. Ajiaco, F. de P. Gutiérrez, J. S. Usma Oviedo, S. E. Muñoz Torres, A. I. Sanabria Ochoa (Eds.) I. Catálogo de los Recursos Pesqueros Continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia.
42. Murgas L, Gualhanone A, Silva M, Mello C, Freitas R, Zangeronimo M. Calidad seminal del pez pirancanjuba *Brycon orbignyanus* post descongelación. *An Vet. (Murcia)*. 2001;17:3-10.
43. Otero R, González A, Solano J, Zappa F. Migración de peces del Río Sinú. CINPIC/Universidad de Córdoba. Informe presentado a Corelca. Montería, Colombia. 1986; 106.
44. Padilla D. (2014). Evaluación de daños en el espermatozoide de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* durante la crioconservación con etilenglicol (Tesis de

maestría). Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba, Montería.

45. Pardo-Carrasco S, Zaniboni E, Arias J, Suarez H, Atencio V, Cruz P. Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. Rev Colomb Cienc Pec. 2006;19:134-139.
46. Pardo-Carrasco S, Salas Villalva J, Reza Gaviria L, Espinosa Araujo J, Atencio-García V. Crioconservación de semen de blanquillo *Sorubim cuspicaudus* con dimetilacetamida como crioprotector. Rev CES Medicina Veterinaria 2015; 10(2):122-131.
47. Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. Theriogenology 77, 268–279.
48. Pinzón-Arciniegas S, Mojica J, Cruz-Casallas P. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*pseudoplatistomas fasciatum linnaeus 1766*). Revista colombiana Orinoquia 2005. vol 9:versión 002: 28-37..
49. Pineda-Santis H; Gómez-Oquendo J; Montoya-Páez J; Toro-Rendón V; Acevedo-Villa O, Restrepo-Betancur G. Crioconservación de semen y calidad espermática en sabaleta. *Brycon henni* (Pisces: Characidae) Orinoquia, vol. 19, núm. 2, 2015, pp. 166-173.
50. Ramírez-Merlano J, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Crioconservación de semen de bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) empleando un congelador programable: evaluación de la movilidad y fertilidad post descongelación. Rev Colomb Cienc Pecu. 2008;21:473.
51. Ramírez- Merlano, J., Medina-Robles, V., y Cruz-Casallas, P. (2010). Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. Orinoquia, 14(1), 59-71.
52. Reza L, Salas J. 2010. Crioconservación de semen de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* (Littmann, Burr & Nass 2000) con dimetilacetamida DMA y

- dimetilsulfóxido DMSO. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Programa de Acuicultura. Universidad de Córdoba. 60p.
53. Richardson G, T Miller, M McNiven. 2000. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, semen in various extenders and in three sizes of Straw. *Aquaculture* 31, 307-15.
 54. Sambu S. Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. *PeerJ*. 2015;3:e1039.
 55. Shishanova E, Trenkler A, Mamonova S. Influence of milt cryoconservation on survival and genetic polymorphism of larvae of Russian sturgeon, *Vestnik of Astrakhan State Technical University*. Series: Fishing Industry 2 (2012) 105-111.
 56. Sieme H. 2011. Semen extenders for frozen semen. in: McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D. (Eds.), *Equine Reproduction*, second edition, Blackwell Publishing Ltd., Chichester, UK, pp. 2964–2971.
 57. Swain J, Smith G. Cryoprotectants, in: R.C. Chian, P. Quinn (Eds.), *Fertility Cryopreservation*, Cambridge University Press, New York, 2010, pp. 24–38.
 58. Tabares C, Tarazona A, Olivera M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 18:2, 2005.
 59. Tiersch T. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *R Bras Zootec*. 2008;37:15-19.
 60. Usma J, Valderrama M, Escobar R, Ajiaco F, Villa F, Castro H, Ramírez A, Sanabria A, Ortega J, Maldonado J, Cipamocha C. 2009. Peces dulceacuícolas migratorios en Colombia. Pp. 103 – 131. En: Amaya, J. D. y L. G. Naranjo (Eds.). *Plan Nacional de las Especies Migratorias: Diagnóstico e identificación de acciones para la conservación y el manejo sostenible de las especies migratorias de la biodiversidad en Colombia*. MAVDT–WWF. Bogotá D. C. Colombia, 214 pp.
 61. Varela A, Corcini C, Gheller S, Jardim S, Lucia C, Streit D, Figueiredo M. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm for tambaqui *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*. 2012;78:244-251.

62. Varisli O, Scott H, Agca C, Agca Y. 2013. The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology* 67, 109–116.
63. Watson PF Holt WV. *Cryobanking the Genetic Resourc Wildlife Conservation for the Future*. London, UK: Taylor and Francis; 2001.
64. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*. 2007;67:81-89.
65. Yu S, Kojima N, Hakomori S, Kudo S, Inoue S, Inoue Y. (2002). Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-tocarbohydrate interaction between (KDN) GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3 like epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2854–2859.