

Revisión bibliográfica, sobre la influencia de la curva de descongelación y volúmenes de empaque, en protocolos de crioconservación de semen de especies ícticas nativas de Colombia.

Johan Stive Espejo Varela

✉ jstivespejo@ucundinamarca.edu.co

Monografía presentada, para optar al título de Zootecnista

Director:

José Alonso Espinosa Araujo

Ingeniero Acuicultor

Magíster (MSc) En Biotecnología



Universidad de Cundinamarca
Facultad Ciencias Agropecuarias
Zootecnia
Fusagasugá, Colombia
2020

Citar/How to cite	(Espejo, 2020)... (Espejo, 2020)
Referencia/Reference	<i>Espejo, J. S., (2020). Revisión bibliográfica, sobre la influencia de la curva de descongelación y volúmenes de empaque, en protocolos de criopreservación de semen de especies ícticas nativas de Colombia. (Trabajo de grado Zootecnia). Universidad de Cundinamarca, Facultad Ciencias agropecuarias</i>
Estilo/Style: APA 6th ed. (2010)	



En convenio con la Universidad de Córdoba 

Aplicación de Normas APA: Plantilla Bibliotecas Universidad de San Buenaventura

Coordinador de prácticas: John Alexander Moreno Sandoval

Jurados: Karen Patricia Montoya Andrade – Sara Cristina Chaverra Garcés

Bibliotecas Universidad de Cundinamarca



Biblioteca Digital (Repositorio)
<http://repositorio.ucundinamarca.edu.co/>

Universidad de Cundinamarca

Universidad de Cundinamarca sede principal Fusagasugá: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Seccional Girardot: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Seccional Ubaté: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Extensión Chía: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Extensión Chocontá: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Extensión Facatativá: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Extensión Soacha: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Extensión Zipaquirá: <https://www.ucundinamarca.edu.co/>

Dedicatoria

Dedico mi trabajo de grado A. DIOS, quien me sostuvo y me dio sabiduría para culminar mi pregrado. A mi madre quien me dio educación, apoyo y consejos. A mi padre, hermano, compañera de vida, abuelos, familia, amigos y maestros, que ayudaron a mi formación y a la construcción de conocimientos. Para todos ellos hago esta dedicatoria.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones piscícolas CINPIC, que por medio del Doctor Víctor Atencio García me dio la oportunidad de conocer y aprender todo lo relacionado a mi investigación, a mi director José Alonso Espinosa Araujo quien me guio y estuvo siempre pendiente en la construcción de mi trabajo de grado, a la docente Nury Sánchez quien me guio en el tema de la biotecnología en la producción piscícola, a mis dos jurados quienes fueron las que me ayudaron a obtener mejoras en la estructura de mi investigación a todos ellos muchas gracias...

Tabla de contenido

Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
1 Planteamiento del problema	11
2 Justificación.....	13
3 Objetivos	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4 Marco teórico	15
4.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del pez macho.....	15
4.1.1 Testículo.....	15
4.1.2 Células germinativas o reproductivas	16
4.2 Espermatogénesis y Regulación Endocrina	17
4.3 Criopreservación de semen en peces.....	18
4.3.1 Generalidades de la crioconservación.....	18
4.3.2 Aspectos a considerar en protocolos de crioconservación.....	19
4.3.2.1 Crioprotectores y diluyentes.....	20
4.3.2.2 Los crioprotectores no permeables.....	20
4.3.2.3 Los diluyentes	21
4.3.2.4 Las curvas de congelación y descongelación	21
4.3.2.5 Volumen de empaquetado de pajillas.....	22
4.4 Daños celulares en el proceso de crioconservación de semen de peces.....	24
4.4.1 Daño Morfológico.....	24
4.4.2 Daño en la Mitocondria	25

4.4.3 Daño del DNA	25
4.4.4 Deterioro Fisiológico	26
4.5 Criopreservación de semen de peces en Colombia	26
4.5.1 Protocolos empleados en algunas especies ícticas nativas de interés comercial en curva de descongelación y volumen de empaque	27
4.5.1.1 Bocachico (<i>Prochilodus magdalenae</i>)	28
4.5.1.2 Bagre rayado (<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>)	30
4.5.1.3 Cachama Blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>)	31
4.5.1.4 Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	32
5 Diseño Metodológico	34
6 Impactos Esperados	35
7 Conclusiones	36
Referencias	39

Lista de figuras

Figura 1. Estructura Aparato Reproductor. (1995) Jobling.....	15
Figura 2. Bocachico Macho. (2015) Atencio-García Víctor	28
Figura 3. Bagre Rayado Macho. (2015) Atencio-García Víctor	30
Figura 4. Cachama Blanca. (2015) Departamento de Ciencias para la Producción Animal.....	31
Figura 5. Yamú Macho (2015) Landines Miguel Ángel.....	32
Figura 6. Metodología.	34

Resumen

El objetivo principal fue describir con base a la literatura, la influencia que tiene la curva de descongelación y volúmenes de empaque, en los protocolos de crioconservación de semen de especies ícticas de importancia comercial. El proceso de descongelación debe tener una curva osmótica equilibrada, esto con el fin de suministrar a la célula hidratación y no haya destrucción de la misma. La descongelación es un punto importante en el proceso de crioconservación y también tiene efectos adversos. La recristalización del hielo al momento de la descongelación provoca efectos similares a los de la congelación. Por ello es importante establecer las tasas de descongelación más adecuadas para reducir los daños celulares. La tasa de descongelación influye sobre el material biológico formando cristales de hielo intracelular, la rehidratación y el mantenimiento de la integridad celular. La temperatura de descongelación depende de la tasa de congelación y de la temperatura previa de la muestra antes de haber sido introducida en el nitrógeno líquido. El volumen de empaque varía dependiendo la cantidad de gametos almacenados en una concentración de partículas osmóticamente activas, contenidas en un diluyente depositado en pajillas. La reproducción inducida se encarga de administrar a los reproductores, hormonas de origen natural o sintético para provocar la maduración final de sus gónadas y la ovulación o espermiaciones para luego generar protocolos de crioconservación de semen en peces, pues juega un papel importante en la producción de interés zootécnico, favoreciendo el mejoramiento genético animal y conservación de gametos en todas las épocas del año. Las especies ícticas nativas de interés comercial que se plasmaron en la revisión, fueron: *Prochilodus magdalenae* (Bocachico) *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Bagre rayado), *Piaractus brachypomus* (Cachama blanca) *Brycon amazonicus* (Yamú), esto con el fin de identificar el efecto que tiene el desempeño reproductivo en términos de fertilidad y eclosión, así como la valoración de la calidad espermática para estimar la viabilidad del semen post descongelación con dichas curvas. En Colombia la información acerca del efecto de variables tales como volumen de la pajilla y la temperatura de descongelación, sobre los porcentajes de fertilidad y eclosión, son escasos.

Palabras clave: Curva de Descongelación, Crioconservación, Fertilidad, Peces, Volumen de Empaque.

Abstract

The main objective is to analyze, based on the literature, the effect that the defrost curve and package volumes have on cryopreservation protocols for semen of fish species of commercial importance. The thawing process must have a balanced osmotic curve, this in order to supply the cell with hydration and there is no destruction of it. Thawing is an important point in the cryopreservation process and also has adverse effects. Recrystallization of ice upon thawing causes effects similar to those of freezing. Therefore, it is important to establish the most suitable defrost rates to reduce cell damage. The thawing rate influences the biological material by forming intracellular ice crystals, rehydration, and maintaining cellular integrity. The thawing temperature depends on the freezing rate and the previous temperature of the sample before it has been introduced into the liquid nitrogen. Packaging volume varies the number of sets stored in a concentration of osmotically active particles, contained in a diluent deposited on straws. Induced reproduction is based on cryopreservation protocols for semen in fish, since it plays an important role in the production of zootechnical interest, favoring animal genetic improvement and game conservation at all times of the year. The native fish species of commercial interest that were reflected in the review were: *Prochilodus magdalenae* (Bocachico) *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Striped catfish), *Piaractus brachypomus* (White Cachama) *Brycon amazonicus* (Yamú), this in order to control the effect that the effect has reproductive in terms of fertility and hatching, as well as the evaluation of sperm quality to estimate the viability of the post-thaw semen with curved dimensions. In Colombia, the information about the effect of variables such as straw volume and thawing temperature, on fertility and hatching percentages, is small.

Keywords: Thawing Curve, Cryopreservation, Fertility, Fish, Pack Volume.

Introducción

La presente monografía está enfocada en la crioconservación de semen en peces, siendo útil en procesos de mejoramiento. La conservación *ex situ*, es el mantenimiento genético de animales fuera de su hábitat natural. Permitiendo preservar especies amenazadas o en peligro de extinción y tener disponibilidad de gametos en todas las épocas del año (Cabrita et al., 2014). La reproducción de peces mediante la inseminación artificial, permite obtener resultados significativos para las producciones piscícolas del país. Manteniendo su diversidad genética y aumentando el tamaño de la población en un periodo corto de tiempo (Medina, Velasco, & Cruz, 2015). Así mismo facilita el movimiento e intercambio de material genético entre productores, mejorando la eficiencia en los parentales y contribuyendo a la reducción de la presión sobre la población silvestre impactada en cada sector del país (Viveiro et al., 2010).

La temperatura, el equilibrio osmótico y la formación de cristales de hielo en el medio intra y extracelular, permiten un aspecto óptimo para el desarrollo celular. El proceso de enfriamiento y congelación del espermatozoide presenta cambios físicos y químicos. Uno de los cambios intracelularmente es cuando el agua en fase líquida pasa a sólida en forma de cristales, esto es generado a partir de que las soluciones llegan a temperaturas de -5 y -15°C (Medina, Velasco, & Cruz, 2015). Si la deshidratación celular es excesiva, la concentración de las partículas activas puede intoxicar la célula y la membrana plasmática no puede recuperar su forma en el proceso de descongelación y por lo tanto afectara la célula (Martínez, 2010). La velocidad en el proceso de enfriamiento es importante, debido a que, si la congelación es lenta, el equilibrio osmótico es alcanzado a través del flujo de agua, pero si la congelación es muy rápida, la célula no puede perder agua para alcanzar el nivel de equilibrio de congelamiento intracelularmente (Fernández et al., 2009). La congelación intracelular es letal para la célula, dependiendo del tamaño y de la cantidad de cristales de hielo que se formaron en el citoplasma. El inconveniente que se presenta es por las altas velocidades de enfriamiento, generando producción de cristales pequeños siendo inofensivos, pero cuando presenta aumento de estos cristales, se unen y crecen durante la descongelación generando recristalización (Cruz, Medina & Velasco, 2006).

En algunos protocolos de crioconservación, se ha evaluado el volumen de empaque, temperatura y tiempo de descongelación, siendo usual pajillas de 0.5ml y descongelaciones a 30°C y 60°C durante 8 y 16 segundos. Siendo estas las más útiles como herramienta para la reproducción de peces (Atencio et al, 2015). Así mismo se han hecho estudios, donde se usaron pajillas de 2.5ml y 5ml con un volumen alto, generando mayor concentración de gametos, con curvas de descongelación de 60°C por 45 segundos (Martinez & Pardo, 2013). Sin embargo, para llevar a cabo procesos de crioconservación de semen de peces es necesario ajustar cada uno de los factores fundamentales para la realización de este proceso (Cabrita et al, 2010). La crioconservación de semen en las distintas especies varía de acuerdo a diferentes factores que influyen en el éxito del protocolo utilizado, incluido el origen de los reproductores, la calidad del esperma, la composición del diluyente, la relación de la dilución, la concentración de crioprotectores, curvas de congelación/descongelación, volumen de empaque y el porcentaje necesario de movilidad espermática (Balamurugan & Munuswamy, 2017). La presente monografía se planteó con el objetivo de analizar con base a la literatura, el efecto que tiene la curva de descongelación y volúmenes de empaque en los protocolos de crioconservación de semen de especies ícticas de importancia comercial. Con el fin de contribuir al futuro establecimiento de protocolos exitosos mediante esta importante herramienta biotecnológica.

1 Planteamiento del problema

En Colombia, aspectos como las curvas de descongelación y el volumen de empaque dentro del proceso de crioconservación de semen de peces, son poco conocidos, debido principalmente a la falta de información y capacitación sobre nuevas alternativas biotecnológicas para el mejoramiento de los procesos de producción del entorno piscícola, por ende es necesario la contextualización y la divulgación a la comunidad académica y científica sobre la información concerniente a procesos de criopreservación aplicados a las especies como *Prochilodus magdalenae* (Bocachico), *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Bagre rayado), *Piaractus brachypomus* (Cachama blanca) y *Brycon amazonicus* (Yamú) con potencial piscícola del país.

Con respecto a la crioconservación de semen de peces se puede mencionar que, “presenta efectos que disminuyen la calidad espermática y comprometen directamente la capacidad de la célula para participar exitosamente en los procesos de fertilización. Las características como movilidad y capacidad de fertilización del espermatozoide, son considerados criterios de calidad, que permiten medir el éxito o el fracaso” (Martinez & Pardo, 2010). Por estas características, se sugiere seguir investigando sobre estos procesos para comprender la metodología, procurando que sean menos nocivos y más eficientes con miras a estandarizar los protocolos en la crioconservación de semen de especies íctica. (Especialmente aquella que está en peligro de extinción). Adicionalmente cabe destacar, que los protocolos de crioconservación, reproducción y volúmenes de semen están sometidos a legislaciones cada vez más exigentes.

El proceso de crioconservación, enmarcado en el mejoramiento de los parámetros productivos de la piscicultura en el país son relativamente nuevos y la información existente referente al manejo de curvas de descongelación y volúmenes de empaque es escasa. Las investigaciones realizadas en este campo generalmente buscan brindar información acerca de la efectividad de crioprotectores internos y externos así como su porcentaje de inclusión dentro de la solución crioprotectora. Debido a lo anterior el presente manuscrito busca dar a conocer algunos registros y resultados de curvas de descongelación y volumen de empaque, utilizado en especies nativas con importancia comercial,

con el fin de dilucidar la importancia de estos puntos claves en el desarrollo de protocolos de crioconservación.

2 Justificación

Los protocolos de crioconservación de semen empleados con especies ícticas nativas de Colombia, son realizados con la finalidad de generar un mayor rendimiento en la producción. Un aumento en las poblaciones vulnerables a la extinción, reducción del número de reproductores, mejoramiento en la rentabilidad en relación costo/beneficio y garantizar semen durante cualquier época del año. Es por esto, que brindar la información existente sobre el impacto generado por variables zootécnicas como volumen de empaque y curva de descongelación, podrían impulsar el mejoramiento de los procesos reproductivos para especie de importancia comercial.

En términos generales la actualización y divulgación constante de información en el marco de la criobiología enfocada en peces, permitirá generar conocimientos a las nuevas generaciones de profesionales Zootecnistas de la Universidad de Cundinamarca. Enfocados en el área de la piscicultura, ayudando al desarrollo de la producción del país. Por lo tanto la inseminación artificial en peces juega un papel importante en las producciones, generando innovación para el mejoramiento y la eficiencia productiva, pretendiendo dar una visión clara a métodos reproductivos artificiales, como la crioconservación de semen de peces. Lo que hace pertinente la ejecución de la presente propuesta de trabajo de grado.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Describir con base a la literatura, la influencia que tiene la curva de descongelación y el volúmenes de empaque, en los protocolos de crioconservación de semen de especies ícticas nativas de Colombia, con fin comercial.

3.2 Objetivos específicos

Compilar investigaciones de los diferentes protocolos existentes de crioconservación en los volúmenes de empaque y curvas de descongelación.

Definir los daños que ocasionan las curvas de descongelación en la crioconservación de semen de peces.

Identificar variables de fertilidad y movilidad espermática, como desempeño reproductivo para estimar la viabilidad del semen post descongelación con dichas curvas.

4 Marco teórico

4.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del pez macho.

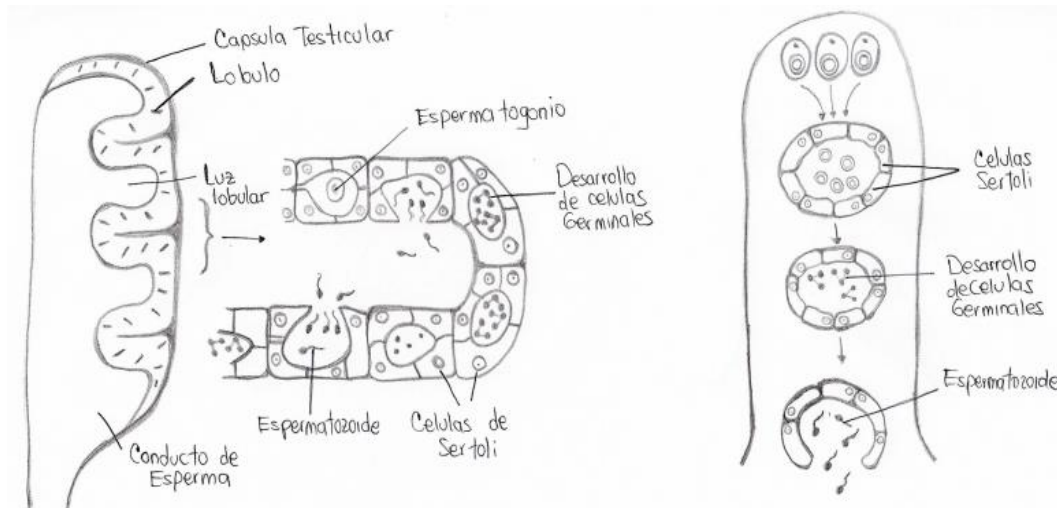


Figura 1. Estructura Aparato Reprodutor. (1995) Jobling¹

4.1.1 Testículo

En peces teleósteos la gónada deriva de un solo primordio germinal donde por medio de un conjunto de células embrionarias sufre un proceso de meiosis formándose sin que en ello aporte significativamente el mesonefro (Carrillo, 2009). Son órganos pares de color blanco, están unidos entre sí por un tejido pigmentado adherido a la vejiga natatoria localizados ventralmente, los testículos se unen hacia la región caudal, dando origen a un conducto deferente corto (Soria, 2003). Son órganos pares situados en posición dorso lateral, una a cada lado del mesenterio dorsal, en la cavidad peritoneal. “Los testículos de los teleósteos son dos órganos alargados y unidos por la pared dorsal de la cavidad corporal. El spermiducto sale de la superficie medio dorsal posterior

¹ Esquema utilizado para referenciar la estructura generalizada de los testículos lobulares observada en la mayoría de las especies de teleósteos.

de cada testículo y desemboca en la papila urogenital, situada entre el recto y los ductos urinarios” (Carrillo , 2009).

Son productores de esteroides sexuales, con capacidad de almacenamiento de espermatozoides, la cantidad depende de su estado de maduración, permanecen estáticos conservando su trifosfato de adenosina (ATP) para cuando se transporten hasta el poro urogenital (Montoya et al, 2006). La estructura testicular varía entre las especies, distinguiéndose en dos tipos básicos, lobulares y tubulares, según la diferenciación de tejido conjuntivo (Castro, 2011). El lóbulo seminífero, está relacionada con la ausencia del epitelio germinativo verdadero y permanente en el lóbulo, por esta característica el término lóbulo es usado para teleósteos y el término túbulo (que si tiene epitelio permanente) es usado para mamíferos. La estructura testicular se puede clasificar teniendo como criterio la distribución de las células germinales (Huayta & Marie, 2014).

La célula espermatogonial irrestricta, se ubica en todo el lóbulo seminífero y la espermatogonial restricta, se localizan sólo en el extremo ciego de los lóbulos o en la periferia. En ambos tipos el desarrollo de las células germinativas se produce de manera sincrónica dentro de los cistos germinativos delimitados por las células de Sertoli (Montoya et al., 2006).

4.1.2 Células germinativas o reproductivas

Las espermatogonias son células madre especializadas en diferenciarse para dar lugar a los espermatozoides, se dividen en: Espermatogonias primarias, son las que presentan mayor tamaño de la célula de forma esférica, presentan un citoplasma abundante y tienen nucléolo. Espermatogonias secundarias, son de menor tamaño y se agrupan en cistos. Las espermátidas se generan a partir de la segunda división meiótica. Los espermatozoides son las de menor tamaño de la línea germinativa y no son semejantes a los otros tipos de células (Atencio et al, 2013). Las células de Sertoli o llamadas císticas son células somáticas intralobulares no germinales, son grandes con forma ovoide o triangular tienen un núcleo claro se encargan de regular a las células de Leydig siendo estas las que segregan testosterona. Cada uno de los testículos presenta un conducto deferente el cual se fusionan y posteriormente desemboca en el poro genital (Cardenas & Barrera, 1998)

4.2 Espermatogénesis y Regulación Endocrina

La espermatogénesis es la multiplicación de las espermatogonias, formación de espermatocistos, división celular y espermatidas. La espermatogénesis es el paso de espermatida a espermatozoide. Representa la fase post meiótica de la espermatogénesis. Los quistes de espermatidas, en diferentes estados de maduración, se encuentran a lo largo de los tubos seminíferos (Anzola et al, 2001). Durante la espermatogénesis se puede observar la compactación del contenido nuclear, la formación de la pieza media y el desarrollo del flagelo. Así mismo, en la espermiación las células de Sertoli se separan y los espermatozoides son liberados a la luz de los lóbulos, se mantienen hidratados por los fluidos seminales y para finalizar presentan la liberación del semen (Anzola et al, 2001).

La reproducción es un proceso que involucra diferentes interacciones como el ambiente, causas neuronales, hormonales y nutricionales, sincronizando acciones desde el eje Hipotálamo-Pituitaria-Gónadas (Agostinho et al, 2016). La Hormona Gonadotropina Folículoestimulante (GTH-I) contribuye a la espermatogénesis, mientras que la Hormona Gonadotropina Luteinizante (GTH-II) está relacionada con el crecimiento gonadal, en la producción de esteroides sexuales y de esperma (Fex et al, 2019). En los peces, el sexo cromosómico no siempre corresponde con el sexo fenotípico (Alegria & Chaube, 2015). En peces participa muy poco el mesonefro, sin desarrollar conductos de Müller ni de Wolff, en su lugar los primordios gonadales, presentan crecimiento somático que formará una cavidad sin diferenciación sexual (Saidou et al, 2016). Las células germinales primordiales son los precursores de los ovocitos y espermatocitos, se caracterizan por ser la única capaz de retener verdaderamente la capacidad de desarrollo pluripotencial luego de la gastrulación (Stevenson et al, 2016). Si un mayor número de células germinales llegan a la cresta genital, son las que determinarán si se consolida como un ovario o si por la actividad de la hormona antimulleriana (AMH), la inhibición de la aromatasa y la producción de andrógenos, la cresta se transformará en un testículo (Saidou et al, 2016). Morfológicamente el sistema reproductor está relacionado con el riñón, donde el conducto de Wolff conduce orina y la gónada se abre hacia el celoma, permitiendo la salida de gametos por el poro urogenital conectado

al conducto de Wolff en los machos, el conducto de Müller desaparece y los espermatozoides usarán el conducto de Wolff y la orina usará un conducto accesorio (Rodríguez et al, 2018).

4.3 Criopreservación de semen en peces

4.3.1 Generalidades de la crioconservación

La criopreservación o crioconservación es la rama de la criobiología (estudio de la vida a bajas temperaturas) por medio de la cual se espera prolongar indefinidamente el potencial total de vitalidad y las funciones metabólicas normales de las células. Por medio de este proceso se busca la estabilización de las células a temperaturas criogénicas generalmente de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la que se detiene la actividad metabólica, permitiendo su preservación por periodos de tiempo indefinidos (Novoa, 2014). La crioconservación seminal, ha evolucionado considerablemente desde el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol en diversas investigaciones (Polge et al, 2009). Permitiendo que el semen crio conservado sea utilizado y reconocido como método para la reproducción asistida en varias especies de animales (Ramírez, Medina, & Cruz, 2011).

A través de los años los trabajos de crioconservación de semen en peces han establecido protocolos conducidos al mejoramiento del proceso de crioconservación seminal (Song et al, 2004). Sin embargo, los procesos de crioconservación de semen muestran aún una viabilidad espermática post descongelación por debajo del 50% con relación a semen fresco, lo cual ha sido relacionado con una serie de factores y cambios biofísicos durante el proceso de congelación y descongelación (Linhart et al, 2005). Esta técnica puede ser utilizada como herramienta para la conservación de los recursos genéticos en especies de peces comercialmente importantes y en peligro de extinción (Martínez & Pardo, 2010). Permitiendo optimizar los procesos reproductivos en cautiverio, manejo simplificado de los reproductores, aumentando frecuencia de reproducción, reducción de extracción de reproductores del medio natural y finalmente facilita la disponibilidad de semen, lo que contribuye a la sincronización de los procesos reproductivos de machos y hembras de una especie determinada (Ramírez, Medina & Cruz, 2011). Lo anterior supone que gametos y por tanto alevinos de buena calidad estén disponibles dentro y fuera del periodo de la época de desove. (Ramírez, Medina & Cruz, 2011).

4.3.2 Aspectos a considerar en protocolos de crioconservación

Al evaluar la efectividad de un protocolo de criopreservación normalmente se tienen en cuenta factores atenuantes como: volúmenes de empaque, curvas de congelación y descongelación, factores de dilución, entre otros; los cuales inciden sobre viabilidad celular, contenido de ATP, Movilidad total, Integridad del ADN y variables de desempeño reproductivo (Cabrita et al, 2010). A pesar de que la crioconservación garantiza la supervivencia del espermatozoide, ocasiona daño irreversible a la membrana plasmática debido principalmente a la formación de cristales de hielo en la célula espermática o la despolarización de la membrana como consecuencia del intercambio iónico, conllevando a la activación y capacitación espermática espontánea (Bobe & Labbe, 2009). La congelación intracelular es letal para la célula dependiendo particularmente del tamaño y de la cantidad de cristales de hielo formados en el citoplasma. Normalmente, altas velocidades de enfriamiento producen cristales intracelulares pequeños que pueden llegar a ser inocuos; pero estos pueden unirse y crecer durante la descongelación por medio de un proceso denominado recristalización. La integridad de la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática y la mitocondria, así como la movilidad son factores críticos en la fertilización de peces teleósteos, de tal forma que pueden ser afectados por estos procesos de congelación y descongelación (Asturiano et al, 2016).

4.3.2.1 Crioprotectores y diluyentes

Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de crioconservación, teniendo como fin mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado; cumpliendo 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. Así entonces encontramos diversas sustancias distribuidas en dos grupos de acuerdo con su permeabilidad en la membrana, que pueden ser permeables o internos como Dimetilsulfóxido (DMSO), Dimetilacetamida (DMA), Etilenglicol (EG) glicerol y 1,2-Propanodiol. Y no permeables a las membranas celulares, yema de huevo, leche en polvo, 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 además, se pueden aplicar antioxidantes y otros compuestos buscando intentar reducir la muerte celular en el ciclo de congelación y descongelación (Krauskova et al, 2016).

4.3.2.2 Los crioprotectores no permeables

Son usados para remover osmóticamente el agua intracelular, remplazándola por los crioprotectores permeables durante el enfriamiento y adicionalmente para prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación. Una vez los crioprotectores ingresan al citoplasma en favor del gradiente de concentración, el fluido intracelular puede ser enfriado a temperaturas entre -5 y -15°C , sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a que estas sustancias disminuyen el punto de congelación por medio de la reducción en la interacción entre las moléculas de agua; a estos rangos de temperaturas los cristales de hielo comienzan a formarse en el medio externo. Cuando las temperaturas descienden por debajo de estos rangos, se inicia la formación de cristales de hielo intracelular (Nomura et al, 2018).

4.3.2.3 Los diluyentes

Son soluciones que tienen como función proteger la integridad del espermatozoide ante la acción tóxica de los productos generados por su propio metabolismo, así como los cambios bruscos de temperatura y el aumento en el volumen seminal. 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 espermatozoide de la acción tóxica de agentes extraños y de los cambios bruscos de temperatura (Cuenca & Avellaneda, 2017).

4.3.2.4 Las curvas de congelación y descongelación

Teóricamente, la tasa de descongelación debe ser similar a la de enfriamiento o congelación, sin embargo, hay una cantidad pequeña de hielo presente, cuando se utiliza una tasa de enfriamiento óptimo, se produce una recristalización durante la descongelación, formándose cristales de hielo intracelularmente que son letales. Una alta tasa de calentamiento es empleada para disminuir el grado de recristalización. Cuando la descongelación es rápida, no existe el tiempo suficiente para que la célula deshidratada absorba el agua que se perdió durante la congelación (Nomura et al, 2018). Para las especies icticas nativas objeto de estudio, se reportan curvas de congelación en vapores secos de nitrógeno líquido usando pajillas de 0.5, 2.5 y 5.0 ml durante un periodo de 30 minutos, previo al proceso de criopreservación (Atencio et al, 2015). Las temperaturas de descongelación utilizadas en la crioconservación del semen en diferentes especies de peces son muy amplias, desde temperaturas cercanas a las de refrigeración de 4°C hasta temperaturas por encima de los 80°C (Ramirez, Medina & Cruz, 2011). La técnica de descongelación es esencial para no destruir la célula debe ser tan lenta como para permitir la rehidratación; pero tan rápida como para que los cristales no se expandan demasiado durante la descongelación, procesos fisicoquímicos toman lugar en orden inverso.

Lo anteriormente expuesto en el proceso del semen post-descongelación, evidencia los posibles daños sufridos por los espermatozoides durante el proceso de congelación y

descongelación, considerado como uno de los parámetros más sensibles durante la crioconservación. La descongelación se efectúa por inmersión en baños de agua, durante este proceso son importantes el control de los tiempos y la temperatura, con el fin de disminuir el efecto de recristalización y el efecto por el cambio térmico (Ramirez, Medina & Cruz, 2010).

Concretamente, se evalúa características seminales como movilidad espermática, viabilidad y fertilidad; valores que se contrastan con los datos del semen fresco o *in situ*; en especies como *Xyrauchen texanus* (Tiersch et al, 1998), muestran valores muy bajos, en contraste con lo observado en Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y Yamú (*Brycon amazonicus*), las cuales mostraron en general valores mayores a 40% (Velasco, Medina & Cruz, 2006). Otros autores como Atencio-García, Reportaron buenos resultados de fertilidad (60.4%) y eclosión (50.1%) para semen crioconservado de Bocachico con DMA 8%, descongelado bajo una curva de descongelación de 60°C por 45 segundos (Atencio et al, 2013), este mismo autor reporta curva de descongelación de 35°C por 90 segundos, al evaluar el semen crioconservado de *Sorubime cuspicaudus* con ETG 5%, con buenos índices de desempeño reproductivo (Atencio et al, 2015). En *Pseudoplatystoma metaense* registraron tasas de fertilidad hasta un 79% con semen criopreservado (Ramirez, Medina & Cruz, 2011).

4.3.2.5 Volumen de empaqueo de pajillas

Tradicionalmente se ha utilizado pajillas de empaqueo de 0.25ml y 0.5ml en los procesos de crioconservación de semen de varias especies (peces), para fertilizar pequeñas cantidades de ovocitos (Lahnsteiner et al, 1996). Sin embargo, el congelamiento de semen en grandes volúmenes fue reportado por primera vez en mamíferos, mostrando resultados satisfactorios en toros y cerdos (Torreta et al, 1996). La posibilidad de criopreservar espermatozoides en grandes volúmenes, sin pérdidas en la calidad y la fertilidad, podría facilitar la aplicación de la crioconservación a gran escala en la industria de la acuicultura como una ayuda para la gestión de reproductores o para la creación de bancos de semen (Nomura et al, 2018). Implicando varias dificultades técnicas, el uso de pajillas de gran tamaño causa una meseta de punto de congelación más prolongada y puede causar tasas de enfriamiento retrasadas y desiguales dentro de una pajilla, lo que resulta en un

mayor porcentaje de daño celular y una menor motilidad del espermatozoide después de la descongelación (Martínez & Pardo, 2013).

Por tanto, para mantener la viabilidad espermática post descongelación al pasar desde un recipiente de congelación tradicional de volumen pequeño (pajilla de 0.25 ml) a un recipiente de congelación de gran volumen (pajilla de 2.5 y 5 ml), es necesario ajustar las condiciones de congelación y descongelación en pajillas de mayor volumen, para obtener las condiciones adecuadas para las especies de estudio (Nomura et al, 2018).

La crioconservación de espermatozoides en gran volumen se ha utilizado con éxito para varias especies de peces como: "*Pseudocaranx dentex*" (Richardson et al, 1999), "*Oncorhynchus mykiss*" (Cabrita et al, 2001), "*Scophthalmus maximus*," (Song et al, 2004) "*Beryx decadactylus*" (Qinghua et al, 2006). "*Cyprinus carpio*," (Horvath et al, 2007) "*Gadus morhua*," (Butts et al, 2011) "*Hippoglossus hippoglossus*," (Ding et al, 2011) "*Oncorhynchus mykiss*," (Lahnsteiner et al, 2011) "*Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus*," (Richardson et al, 2001) "*Polyodon spathula*" (Brown & Mims, 2007) y "*Silurus glanis*" (Bart, Wolfe, & Dunham, 2011), entre otras.

Dichas técnicas utilizaron recipientes de congelación de 2 o 5.0 ml para aumentar el número de espermatozoides almacenables, que ha demostrado ser aceptable y rentable en la fertilización a escala comercial. Alternativamente, el volumen de espermatozoide preservado podría mejorarse adoptando estándares de relación de dilución más bajos (Ding et al, 2011). En un estudio más reciente se evaluó el semen crioconservado de *Cyprinus carpio* utilizando pajillas de 10ml y descongelaciones a 40°C durante 4 minutos, reportan datos prometedores de calidad seminal referente a velocidad línea recta (VSL) con dos métodos, uno de Grayling 45±3 micrómetros (µm/s) y el método Pike con 38±4 (µm/s) generando diferencia significativa en la investigación para la producción a gran escala en dicha especie (Varkonyi et al, 2018).

4.4 Daños celulares en el proceso de crioconservación de semen de peces

La dilución del espermatozoide en las soluciones crioprotectoras, así como las curvas de congelación y descongelación, producen cambios en la célula, deteriorando la calidad espermática, los cambios en la osmolaridad externa provocan daños en la estructura y funcionalidad celular, generalmente la hiperosmolaridad induce alteraciones en el tamaño de las células (Atencio, 2015). El daño celular es observado, cuando se utilizan tasas lentas de congelación, relacionándose con la exposición y la eliminación de las condiciones hipertónicas, causadas por los crioprotectores, considerando que un aumento en la tasa de congelación reduce al mínimo el tiempo de exposición del semen a las soluciones y por tanto se esperaría una disminución del daño ocasionado por el desequilibrio osmótico (Atencio, 2015).

La magnitud de daños criogénicos puede resultar en la disminución de la movilidad, la velocidad y la fertilidad, en el proceso de crioconservación se ocasionan daños morfológicos, daño en la mitocondria, daño en el DNA y deterioro fisiológico. En general todos los daños son causados por desbalance osmótico interno y formación de cristales de hielo. (Atencio, 2014).

4.4.1 Daño Morfológico

Los procesos de crioconservación tienen una influencia significativa sobre: morfología, integridad y función del espermatozoide. Entre estos, la integridad de la membrana plasmática y la función de la mitocondria son los dos factores más importantes para mantener la viabilidad del espermatozoide (Ramirez, Medina, & Cruz, 2010). Se han observado daños morfológicos por procesos criogénicos en la ruptura de la membrana plasmática, en la cabeza, en la pieza media y cola, en la mitocondria ocasionado por la pérdida de la envoltura densa y la formación de protuberancias en el flagelo y la cabeza en la pérdida de cromatina nuclear (Espinoza, 2003). Ocasionando baja viabilidad y bajas tasas de fertilidad por daños morfológicos (Ramirez, Medina, & Cruz, 2010).

4.4.2 Daño en la Mitocondria

“Las alteraciones de la membrana plasmática implican pérdidas en la posibilidad de fusión entre el espermatozoide con la membrana del oocito siendo afectada la mitocondria para transmitir la energía, afectando la funcionalidad de la movilidad espermática” (Ramirez, Medina, & Cruz, 2010). Es claro que el inicio de la activación espermática en peces implica una constante fosforilacion oxidativa de ATP, incluso durante el mantenimiento de todo el proceso de movilidad. Los daños en mitocondria causarían una disminución considerable de la movilidad espermática debido a que podrían afectar la síntesis de proteínas involucradas en la producción energética celular, ocasionando perdida de ATP del espermatozoide tanto en el proceso de congelación y post descongelación siendo crucial en el momento de movilidad post descongelación (Martinez & Pardo, 2010). No obstante los daños en la mitocondria, presenta oxidación lipídica y reducción del potencial en la membrana.

4.4.3 Daño del DNA

Los daños en ADN causados se han reportado en diferentes procesos de crioconservación, así mismo se ah reportado en varias especies de animales como peces (Zilli et al., 2003), primates (Li et al., 2007), caprinos (Peris et al., 2004) e incluso en humanos (Sharma, Said & Agarwai, 2004). Los procesos de congelación y descongelación del DNA genera un daño en la integridad o fragmentación del DNA se entiende como las anormalidades que sufre la estructura de la cromatina espermática, debido a las diversas condiciones ambientales a las cuales una célula está sometida (Atencio, 2015). La integridad del DNA espermático está asociado al éxito de la fertilización, el desarrollo normal de los embriones resultantes o su descendencia (Portella & Gonzales, 2016). Los daños en el DNA son respuesta a la oxidación y a procesos mecánicos, es decir, la fragmentación del DNA por la generación de ROS (estrés oxidativo), pueden ser generados por la modificación de las histonas que actúan en el DNA. (Atencio, 2015). El daño en el genoma, impide los procesos de replicación y la transcripción de genes mitocondriales, así mismo, impide la síntesis de proteínas claves para el desarrollo de la producción energética acarreado como consecuencia la disminución de la movilidad o la inmovilidad espermática. Los daños en el proteoma se traducen en la

interrupción de la cascada de fosforilación y activación enzimática afectando la movilidad del espermatozoide, así como la capacidad de fertilizar (Pardo & Martínez, 2010).

4.4.4 Deterioro Fisiológico

Se verán reflejados en los movimientos circulares en el tiempo de activación, reduce la velocidad del nado y disminuye la probabilidad de que el espermatozoide alcance el micrópilo (Tabares, Tarazona, & Olivera, 2005). El criodañó morfológico del espermatozoide podría explicar la baja viabilidad y las bajas tasas de fertilidad en contraste con lo reportado para semen fresco (Ramírez, Medina, & Cruz, 2010).

4.5 Criopreservación de semen de peces en Colombia

Los intereses de investigación de crioconservación en peces han sido dirigidos principalmente a tres tópicos: la estandarización de los protocolos de congelación que permitan alcanzar tasas de fertilización cercanas a las obtenidas con semen fresco; la evaluación de sustancias crio protectoras que disminuyan los efectos tóxicos y de crio daños sobre las células espermáticas y la extrapolación de resultados entre las diferentes especies ícticas para encontrar puntos de similitud. El efecto de variables tales como volumen de la pajilla y la temperatura de descongelación, sobre los porcentajes de fertilidad alcanzados, no ha sido evaluado metodológicamente, no existiendo suficiente información sobre lo que sucede a nivel celular (Medina, Velasco, & Cruz, 2015).

4.5.1 Protocolos empleados en algunas especies ícticas nativas de interés comercial en curva de descongelación y volumen de empaque.

Las ventajas de desarrollar la piscicultura con especies nativas, están enfocados por la adaptación de estos peces al clima, a la calidad del agua de la región y por la fácil comercialización que se genera en la población. Entre estas especies se destaca por su potencial en la piscicultura continental las especies reófilas.

La reproducción en cautiverio evita la presión pesquera sobre alevines o larvas, la producción de grandes lotes de alevines o larvas de tamaño homogéneo facilita su manejo posterior en las instalaciones, y la producción de estos lotes en diferentes momentos del año, sin la restricción del periodo reproductivo natural de las especies. Las reproducciones pueden realizarse con tratamientos hormonales y con un control en los parámetros ambientales, fundamentalmente de la temperatura del agua y del fotoperiodo (Rodríguez & Moreno, 2013). Estos resultados son generados a partir de las últimas investigaciones en cada una de las especies ícticas mencionadas, buscando optimizar los existentes protocolos para la calidad seminal.

El desempeño del semen crioconservado será abordado en especies ícticas como: *Prochilodus magdalenae* (Bocachico) *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Bagre rayado), *Piaractus brachipomus* (Cachama blanca) *Brycon amazonicus* (Yamú), al ser sometidas a curvas de descongelación planteadas por distintos autores.

4.5.1.1 Bocachico (*Prochilodus magdalenae*)



Figura 2. Bocachico Macho. (2015) Atencio-García Víctor

Es una especie endémica que aparece reportada en el libro rojo de las especies dulceacuícolas de Colombia, en categoría de peligro crítico, su tamaño es mediano, su boca es pequeña carnosa y prominente, lo cual hace referencia a su nombre común (Mojica et al, 2012). Se generan acciones de repoblamiento con prácticas biotecnológicas reproductivas (Hernandez, Navarro & Muñoz, 2017). Obteniendo períodos de reproducción con mayor actividad, entre octubre y marzo épocas de lluvia (Roa & Villa, 2019). Durante la época de reproducción, hace migraciones conocidas como subienda, desplazándose desde las ciénagas, donde se cría y se desarrolla en la parte alta de los ríos donde se reproduce. Durante este proceso sus gónadas terminan de madurar. Así mismo, realiza un proceso de migración de retorno a las ciénagas llamadas “bajanza”; Estas migraciones durante el año están sujetas a cambios en las condiciones físicas y químicas del agua, los cuales están influidos por el periodo de lluvias (Zapata & Usma, 2013).

Existen algunos reportes para curvas de congelación, para la especie de Bocachico, como el registrado por Pérez-Almanza 2010, utilizando una curva de descongelación de 60 grados centígrados por 45 segundos, empacadas en pajillas de 5ml. Este autor reporta, porcentajes de desempeño reproductivo para la especie, obteniendo fertilidad de 60.4% y de eclosión de 50.1%. En general, se encontró que a medida que se aumentó la concentración de Dimetilacetamida, aumentó la toxicidad lo cual implica una disminución en la tasa de fertilización y eclosión; por lo que los resultado del presente estudio señalan que Dimetilacetamida 8%, glucosa 6% y yema de

huevo de gallina 12%, es una alternativa viable para la crioconservación de semen de bocachico con buenos resultados de fertilización y eclosión (Perez, Atencio, Espinosa, & Pardo, 2013). Así mismo, Atencio 2015 utilizó una curva de descongelación a 60 grados centígrados por 45 segundos, empacadas en pajillas de 5ml. Este autor reporta porcentajes de sobrevivencia larval de 19,5% así mismo el desempeño reproductivo para la especie en términos de fertilidad fue de 70.0%, y de eclosión de 48.6% (Atencio et al, 2015). Cano 2019, para (*Prochilodus magdalenae*) Bocachico de la cuenca de magdalena, utilizó curvas de descongelación a 35 grados centígrados por 60 segundos, empacadas en pajillas de 0.5ml. Este autor reporta porcentajes de desempeño reproductivo, fertilidad de $31.6 \pm 8.5\%$ y de eclosión $22.2 \pm 8.1\%$, este autor propone que ese dato es obtenido por el tratamiento con glucosa 6%, la cual se le agregó 10% Dimetilsulfoxido y 12% yema de huevo (Cano, 2017).

4.5.1.2 Bagre rayado (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*)



Figura 3. Bagre Rayado Macho. (2015) Atencio-García Víctor.

Es representativo de la cuenca del río Magdalena en Colombia, es endémico, las características de su cuerpo son: Alargado, muy comprimida de forma aerodinámica y sin escamas, cabeza grande y achatada valioso tanto económico y ambiental, actualmente está bajo amenaza debido a la pesca indiscriminada y la degradación de su nicho ecológico (Lozano et al, 2017).

A partir de las últimas investigaciones de crioconservación, se registró para Bagre rayado, curva de descongelación a 35 grados centígrados por 90 segundos, empacadas en pajillas de 2.5 ml. Herrera (2019). Este autor reporta porcentajes de desempeño reproductivo en movilidad total de $72,6 \pm 17,1\%$, en tiempo de activación $31,2 \pm 2,1$ segundos, en términos de fertilidad fue de $40,2 \pm 3,4\%$, y de eclosión $22,6 \pm 0,7\%$ (Herrera et al, 2019). En el 2016, Atencio, Espinosa y Prieto registraron los siguientes datos, utilizando pajillas de 2.5ml para una curva de descongelación de 35 grados centígrados por 90 segundos, obteniendo porcentajes de movilidad espermática con semen descongelado de $43,1 \pm 2,6\%$ por las siguientes características del diluyente, conformado por Dimetilsulfoxido al 6% y lecitina de soya al 6%, logrando un tiempo de activación de 40 segundos promedio. Alternativa viable para la crioconservación de semen de (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*) (Atencio et al, 2016). Ramírez 2011, utilizó curvas de descongelación de 35 grados centígrados por 60 segundos, empacadas en pajillas de 0.5 ml. Este autor reporta porcentajes de desempeño reproductivo en términos de movilidad espermática de 90% con tiempo de activación de $48,9 \pm 1,4$ segundos y de fertilidad de $79,6 \pm 2,1\%$ este semen fue sometido al tratamiento de 10%

Dimetilsulfoxido, 5,5% de glucosa y 5% de leche entera en polvo. Estos resultados permiten obtener una idea para establecer un protocolo de descongelación con resultados aceptables para la reproducción artificial de bagre rayado (Ramirez, Medina & Cruz, 2011).

4.5.1.3 Cachama Blanca (Piaractus brachypomus)



Figura 4. Cachama Blanca. (2015) Departamento de Ciencias para la Producción Animal.

Es propio de la Amazonia, destacado por ser la especie nativa de mayor producción en Colombia, su coloración es grisácea con reflejos azulosos, abdomen blanquecino con ligeras manchas anaranjadas. Inicia su reproducción al inicio de marzo hasta mediados de junio (Suarez, Medina, & Cruz, 2019).

Los resultados encontrados, son a partir de procesos de crioconservación, los reportes para curva de congelación para la Cachama blanca, registrado por Navarro en 2004, donde utilizo una curva de descongelación a 35 grados centígrados por 80 segundos, en pajillas de 0.5ml. Este autor reporta porcentajes de desempeño reproductivo con leche entera en polvo 15g, agua destilada 100 ml y Etilenglicol 5% como diluyente, dando resultados de 70.0% de fertilidad (Navarro, Velasco, & Cruz, 2003). Así mismo Fresneda, Lenis, Olivera y Agudelo el mismo año reportaron, un método de descongelamiento a temperatura ambiente de 28 grados centígrados, empacadas en pajillas de 5ml, obteniendo desempeño reproductivo con movilidad espermática total de $78.2 \pm 6.4\%$, un tiempo de activación de 151.9 ± 26.4 segundos, en fertilidad fue de 70.7% y eclosión 70.7%. Estos resultados son dados a partir del manejo del crioprotector con metanol, sin embargo, Dimetilsulfoxido presenta buenos resultados y no tienen diferencia significativa (Fresneda et al, 2003). Ramírez–Merlano 2011 utilizo curvas de descongelación a 35°C grados centígrados en 80

segundos, empacadas en pajillas de 2.5 ml o 5ml. Este autor reporta porcentajes de desempeño reproductivo en términos de fertilidad de 71.0%, los porcentajes más altos de motilidad post-descongelación fueron observado en esperma crio preservado con Dimetilsulfoxido al 10% (Ramirez, Cruz & Robles, 2011).

4.5.1.4 Yamú (*Brycon amazonicus*)



Figura 5. Yamú Macho (2020) Landinez.

Es un pez endémico de Colombia, es una especie reófila nativa de la cuenca del Amazonas (Maldonado, Vari, & Usma, 2008). Es considerada una especie con potencial de interés comercial, debido a su tamaño, rápido crecimiento, alimentación omnívora y aceptación de alimentos artificiales (Atencio et al, 2017). Es un pez de excelente carne. Se maneja su reproducción artificial, los estanques deben ser en lugares de clima tropical puede alcanzar los 8.4 cm de longitud en cautiverio (Mercado, Garcia, & Rosado, 2003).

Existen algunos reportes para curvas de congelación de (*Brycon amazonicus*) Yamú, como el registrado por Velasco, Medina y Cruz 2006, utilizando una curva de descongelación de 35 grados centígrados, durante 90 segundos, empacadas en pajillas de 0.5, 1.8, 2.5 y 4.0ml. Este autor reporta porcentajes de fertilidad $48\pm 2\%$, $51\pm 2\%$, $52\pm 2\%$ y $54\pm 3\%$ y no tienen diferencia significativa, su diluyente, es en una proporción (1:4) de solución de glucosa, yema de huevo y Dimetilsulfóxido, obteniendo porcentajes de fertilidad similares (Cruz, Medina & Velasco, 2006). Así mismo, utilizaron curvas de descongelación de 35 grados centígrados en 60 segundos, empacadas en pajillas de 0.5ml dando resultados de movilidad total $76\pm 2.4\%$ y tiempo de activación de 88.2 ± 6.1 segundos, obteniendo fertilidad de $50\pm 1.4\%$. Determinando que el semen de la Yamú crioconservado se obtuvo con los siguientes diluyentes, Dimetilsulfoxido 5% y

Propilenglicol al 3.75% (Cruz, Medina & Velasco, 2006). Existen reportes donde el semen obtenido fue evaluado y diluido en una proporción de (1:4) en una solución de 5,5% en glucosa, 12% en yema de huevo y 10% de Dimetilsulfóxido, empacado en pajillas de 0.5ml, el desempeño en porcentajes de fertilidad con mejor resultado fue de $52\pm 3\%$ con una curva de descongelación de 35 grados centígrados en 60 segundos, cabe mencionar que la fertilidad no fue afectada por el volumen de empaque cuando se utilizaron 35°C como temperatura de descongelación (Medina, Velasco & Cruz, 2007).

En Colombia, los estudios de crioconservación de semen de peces nativos son recientes y se han orientado principalmente a la estandarización de protocolos de congelación, evaluación de crio protectores y diluyentes para disminuir los efectos tóxicos y el crio daño sobre la célula espermática (Martinez, Atencio & Pardo, 2011).

5 Diseño Metodológico

Para la compilación de la información de la monografía se tuvo en cuenta el método deductivo por medio de una investigación descriptiva, por revisiones bibliográficas en artículos de revistas indexadas, plataformas: Universidad de Cundinamarca base de datos: Science Direct, Scopus y Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Córdoba base de datos: AQUASTAT. Otras plataformas como Scielo, Google académico, Redalyc, dial net, donde se encontraran información sobre la estandarización en especies ícticas nativas como *Prochilodus magdalenae* (Bocachico) *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Bagre rayado), *Piaractus brachypomus* (Cachama blanca) *Brycon amazonicus* Yamú) así mismo protocolos de crioconservación, donde se evidencia proceso de mejoramiento animal y obtención de gametos en todas las épocas del año entre esas esta la curvas de descongelación, enfocada en los grados centígrados y el tiempo óptimo para generar un descongelamiento adecuado para la estructura de la célula y el volumen de empaque, está relacionado en proporciones de semen/diluyente asimismo peces y fertilidad.

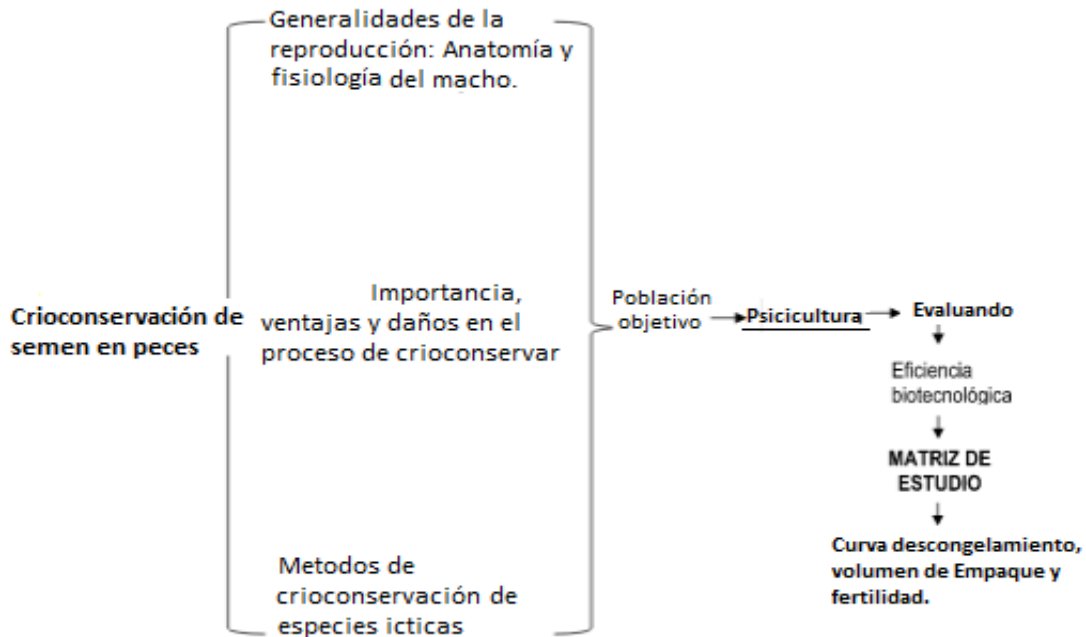


Figura 6. Metodología (Espejo, 2020).

6 Impactos Esperados

El impacto social de esta monografía está enfocado en la comunidad académica, científica y productores piscícolas relacionado en temas de reproducción de peces; esto con el fin de compartir la información suministrada, y estén contextualizados para generar nuevas investigaciones, que puedan transformar e innovar procesos en la producción piscícola.

El impacto económico está enfocado en los parámetros zootécnicos en protocolos de crío conservación que permiten resultados de calidad, generando el interés de patrocinadores y otras fuentes de financiación de proyectos.

Los impactos que se busca tener en el tema del medio ambiente, está enfocado en disponibilizar información como un aporte a la problemática relacionada con protocolos de críoconservación de semen de algunas especies ícticas nativas que están en riesgo de extinción, o en alguna condición crítica.

El impacto esperado en la formación de recursos humanos es generado a partir de aumentar nuevos conceptos, con el fin de crecer como persona y como profesional. Ganando habilidades y ampliando los conocimientos en el área de la Biotecnología en la reproducción animal.

7 Conclusiones

Tal como esta investigación lo ha demostrado, la técnica de descongelación es esencial para no destruir la célula, debe de ser tan lenta para permitir la rehidratación, pero tan rápida para que los cristales de hielo no se expandan demasiado durante la descongelación.

Los volúmenes de empaque más empleados, en tema de crioconservación, están entre 2ml a 5ml. Pues presenta mayor concentración de espermatozoides almacenados y un aumento en la fertilización a gran escala.

Los daños comúnmente observados, son ocasionados a partir de desbalances osmóticos internos y por la formación de cristales de hielo. Generando daños morfológicos, daños en la mitocondria, daños en el DNA y en el deterioro fisiológico.

Para *Prochilodus magdalenae* el protocolo con mejores resultados encontrados en esta investigación fue con Dimetilacetamida 8%, glucosa 6% y yema de huevo de gallina 12% con una curva de descongelación de 60 grados centígrados por 45 segundos, empacadas en pajillas de 5ml. obteniendo fertilidad de 60.4% y de eclosión de 50.1%.

Para *Pseudoplatystoma magdaleniatum* con mejor resultado fue desarrollado a partir del 10% Dimetilsulfoxido, 5,5% de glucosa y 5% de leche entera en polvo. Con una curva de descongelación de 35 grados centígrados por 60 segundos, empacadas en pajillas de 0.5 ml. Movilidad espermática de 90% con tiempo de activación de $48,9 \pm 1,4$ segundos y de fertilidad de $79,6 \pm 2,1$ %.

Para *Piaractus brachypomus* el protocolo con mejores resultados encontrados en esta revisión fue por descongelamiento a temperatura ambiente de 28 grados centígrados, empacadas en pajillas de 5ml, obteniendo desempeño reproductivo con movilidad espermática total de

78.2±6.4%, un tiempo de activación de 151.9±26.4 segundos, en fertilidad fue de 70.7% y eclosión 70.7%. Estos resultados son dados a partir del manejo del crioprotector con metanol y Dimetilsulfoxido.

Para *Brycon amazonicus* más representativo en la compilación de esta investigación, se encontró una curva de descongelación de 35 grados centígrados, durante 90 segundos, empacadas en pajilla de 4.0ml. Reportando porcentajes de fertilidad de 54±3%. Manejaron una proporción (1:4) de solución de glucosa, yema de huevo y Dimetilsulfóxido.

Recomendación

Se sugiere seguir investigando la reproducción en especies ícticas de interés comercial, en temas de crioconservación. Esto con el fin de mejorar el desempeño reproductivo, en tema de fertilidad y eclosión.

Referencias

- Agostinho, A., Gomes, L., Santos, N., Ortega, J., & Pelicice, F. (01 de 2016). *Fish assemblages in Neotropical reservoirs: Colonization patterns, impacts and management*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.04.006>
- Alegria, K. P., & Chaube, R. (2015). Vasotocina: un nuevo jugador en el control de la maduración de los ovocitos y la ovulación en los peces. 38-49.
- Anzola, E., Aviles, M., Beltran, C., Burbano, C., Carrillo, M., Diaz, J., . . . Villanueva, M. (2001). Fundamentos de acuicultura continental. Obtenido de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/34424>
- Asturiano, J., Sorensen, S., Perez, L., Lauesen, P., & Tomkiewicz, J. (2016). *First production of larvae using cryopreserved sperm: Effects of preservation temperature and cryopreservation on European eel sperm fertilization capacity*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27189043/>
- Atencio Garcia, V., Dorado, L., Montes, C., Prieto, M., & Espinosa, J. (2017). *Criopreservación de esperma dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-34752017000200087
- Atencio Garcia, V., Espinosa, J. A., Martinez, J., & Pardo Carrasco, S. (2015). *Inseminación del pez bocachico (*Prochilodus magdalenae*) con semen fresco o criopreservado : efecto de la relación espermatozoides / ovocitos*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902015000400008
- Atencio Garcia, V., Perez, E., Espinosa, J., & Pardo, S. (2013). *Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae**. Obtenido de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2013000200006
- Atencio, V. (2014). *Evaluación de etilenglicol como crioprotector en la crioconservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*, *Pimelodidae*)*. Obtenido de

- 262300367_Evaluacion_de_etilenglicol_como_crioprotector_en_la_crioconservacion_de_semen_de_bagre_blanco_Sorubim_cuspicaudus_Pimelodidae
- Atencio, V. (2015). *Daños en el espermatozoide durante el proceso de crioconservacion*. Obtenido de [file:///C:/Users/Equpo1TDC/Downloads/2983-Texto%20del%20art%C3%ADculo-10061-1-10-20161111%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Equpo1TDC/Downloads/2983-Texto%20del%20art%C3%ADculo-10061-1-10-20161111%20(3).pdf)
- Atencio, V., Espinosa, J., Salas, J., & Prieto, M. (2016). *Evaluación del semen crioconservado de bagre rayado Pseudoplatystoma magdaleniatum con Dimetilsulfoxido*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/312500157_EVALUACION_DEL_SEMEN_CRIOCONSERVADO_DE_BAGRE_RAYADO_Pseudoplatystoma_magdaleniatum_CON_DIMETILSULFOXIDO
- Atencio-Garcia, V., Espinosa, J., Martinez, J., & Pardo, S. (2015). *Insemination of bocachico fish (Prochilodus magdalenae) with fresh or cryopreserved semen: effect of spermatozoa/oocyte ratio*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902015000400008
- Balamurugan, R., & Munuswamy, N. (2017). Crioconservación de esperma en salmonete gris *Mugil cephalus* (Linnaeus,1758). *Anim Reprod Sci*, 205-213.
- Bart, A., Wolfe, D., & Dunham, R. (2011). *Cryopreservation of Blue Catfish Spermatozoa and Subsequent Fertilization of Channel Catfish Eggs*. Obtenido de [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8659\(1998\)127%3C0819%3ACOBBCSA%3E2.0.CO%3B2](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8659(1998)127%3C0819%3ACOBBCSA%3E2.0.CO%3B2)
- Bobé, J., & Labbe, C. (2009). *Egg and sperm quality in fish*. *Gen Comp Endocrinol*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/24187726_Egg_and_sperm_quality_in_fish_Gen_Comp_Endocrinol
- Brown, G., & Mims, S. (2007). *Cryopreservation of Paddlefish Polyodon spathula Milt*. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00871.x>
- Butts, I., Feindel, N., Neil, S., & Trippel, E. (2011). *Cryopreservation of Atlantic cod (Gadus morhua) sperm in large-volume straws: Applications for commercial production and gene banking*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/264666048_Cryopreservation_of_Atlantic_cod_

- Gadus_morhua_sperm_in_large-volume_straws_Applications_for_commercial_production_and_gene_banking
- Cabrita, E., Martinez, S., Gavaia, P., Rierco, M., Valcarce, D., Sarasquete, C., . . . Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging foals for sperm analysis. *Aquaculture*, 389-401.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., & Herráez, M. (2001). *Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848601006366>
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez, S., Robles, V., Beirao, J., Perez, S., & Herraez, M. (2010). Criopreservación de esperma de pescado: aplicaciones y perspectivas. *Revista de ictiología aplicada*, 623-635.
- Cano, R. (2017). Efecto del volumen de empaque, el tiempo y temperatura de descongelación en la calidad del semen criopreservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*.
- Cardenas, R., & Barrera, H. (1998). *Histología y ultraestructura del testículo del charal *Chirostoma jordani* (Osteichthyes:Atherinidae)*. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441998000400007
- Carrillo , M. A. (2009). *La reproducción de los peces: Aspectos basicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Obtenido de file:///C:/Users/EquipolTDC/Downloads/reproduccion_en_peces.pdf
- Castro, L. (2011). *Descripción histológica gonadal de cinco especies de peces demersales *Lutjanus synagris*, *Lutjanus analis*, *Lujanus mahogoni*, *Trichiurus lepturus* y *Sphyraena guachancho* de la costa del departamento del Magdalena- Caribe Colombiano*. Obtenido de [file:///C:/Users/EquipolTDC/Downloads/T969%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/EquipolTDC/Downloads/T969%20(1).pdf)
- Cruz, P., Medina , V., & Velasco, Y. (31 de 01 de 2006). *Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*)*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000200006
- Cruz, P., Medina, V., & Velasco, Y. (2006). Criopreservación de esperma de yamú (*Brycon amazonicus*) para fertilización a gran escala.
- Cruz, P., Medina, V., & Velasco, Y. (2006). *Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de Yamú (*Brycon amazonicus*)*. Obtenido de

- https://www.researchgate.net/publication/44967907_Evaluacion_de_diferentes_crioprotectores_para_la_crioconservacion_de_espermatozoides_de_Yamu_Brycon_amazonicus
Cuenca, M., & Avellaneda, J. (2017). *Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina*.
Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653009012.pdf>
- Ding, F., Lall, S., Li, J., Lei, J., Rommens, M., & Milley, J. (2011). *Cryopreservation of Sperm From Atlantic Halibut (Hippoglossus Hippoglossus, L.) for Commercial Application*.
- Espinoza, C. (2003). *Alteraciones Morfológicas y Fisiológicas en Espermatozoides Criopreservados de Argopecten Purpuratus. (Lamarck, 1819) "Concha de Abanico"*.
Obtenido de <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/810>
- Fernandez, A., Gonsalvo, M., Clavero, A., Ruiz, R., Zamora, S., Roldan, M., . . . Ramirez, J. P. (14 de 06 de 2009). *Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen*. Obtenido de <https://revista.asebir.com/fundamentos-de-criobiologia-espermatologica-para-bancos-de-semen/>
- Fex-Wolf, D., López-Casas, S., & Jiménez-Segura, L. (07 de 04 de 2019). *Efectos de la generación de energía hidroeléctrica en la reproducción de Prochilodus magdalenae (Prochilodontidae): evidencia de la respuesta endocrina*. Obtenido de <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/1606>
- Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E., & Olivera, M. (2003). *Espermiación inducida y Crioconservación de Cachama blanca (Piaractus brachypomus)*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/45108233_Espermiacion_inducida_y_Crioconservacion_de_Cachama_blanca_Piaractus_brachypomus
- Hernandez, H., Navarro, M., & Muñoz, F. (2017). *Diversidad genética del bocachico Prochilodus magdalenae en el departamento de Sucre*. Obtenido de <https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/527>
- Herrera, E., Aristizabal, J., Yepes, J., Estrada, A., Espinosa, J., Atencio, V., & +. (2019). *Criopreservación de semen de bagre rayado Pseudoplatystoma magdaleniatum con tres diferentes crioprotectores*.
- Horvath, A., Miskolczi, E., Szilvia, M., Osz, K., Szabó, K., & Urbanyi, B. (2007). *Cryopreservation of common carp (Cyprinus carpio) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm ml straws and*

- occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224007000314>
- Huayta, P., & Marie, S. (2014). *Estudio microbiológico e histopatológico en neón tetra (Paracheirodon innesi) procedente de la Amazonía peruana*. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3701>
- Kazuhara, N., Chu, I., Lio, R., Okuda, D., Kazeto, Y., Tanaka, H., & Ohta, H. (2018). *Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848617325814>
- Kobelkowsky, A. (06 de 2007). *Diversidad morfológica del sistema de conductos excretores de los peces teleósteos*. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532007000100011
- Krauskova, L., Prochazkova, J., Klaskova, M., Filipova, L., Chaloupkova, R., Stanislav, M., . . . Heger, D. (2016). *Suppression of Protein Inactivation During Freezing by Minimizing pH Changes Using Ionic Cryoprotectants*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27224008/>
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., & Patzner, R. (1996). *Physiological and Biochemical Determination of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Semen Quality for Cryopreservation*. Obtenido de https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J028v06n04_05
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., & Patzner, R. (2011). *Aging Processes of Rainbow Trout Semen during Storage*. Obtenido de [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640\(1997\)059%3C0272%3AAPORTS%3E2.3.CO%3B2](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640(1997)059%3C0272%3AAPORTS%3E2.3.CO%3B2)
- Li, M., Meyers, S., Toliner, T., & Overstreet, J. (02 de 01 de 2013). *Daño a los cromosomas y al ADN de los espermatozoides de los monos Rhesus después de la criopreservación*. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2164/jandrol.106.000869>
- Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D., & Kocour, M. (2005). *Cryopreservation of European Catfish *Silurus Glanis* Sperm: Sperm Motility, Viability, and Hatching Success of Embryos*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16122724/>
- Lozano, G., Hernandez, D., Chaves, N., Valderrama, M., Mojica, J., & Gomez, F. (2017). *Caracterización de patrones de piel en Pseudoplatystoma Magdaleniatum*.

- Maldonado, J., Vari, R., & Usma, J. (2008). *Checklist of the Freshwater Fishes of Colombia*.
Obtenido de file:///C:/Users/Equop1TDC/Downloads/201-200-1-PB.pdf
- Martinez, G., Atencio, V., & Pardo, S. (2011). *Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico Prochilodus magdalenae*. Obtenido de <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/revistamvz/article/view/1020>
- Martinez, J. G. (2010). *Efecto de la concentración de dmsó y glucosa sobre la calidad espermática y el material genético en semen crioconservado de bocachico Prochilodus magdalenae*. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3368>
- Martinez, J. G., & Pardo, S. (2013). *Efecto de la congelación y descongelación sobre movilidad espermática en Bocachico Prochilodus magdalenae (Pisces, Characiformes)*. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682013000100007&script=sci_abstract&tlng=es
- Martinez, J., & Pardo, S. (2010). *Crioconservación de semen en peces: Efecto sobre la movilidad espermática y la fertilidad*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/261834820_Crioconservacion_de_semen_en_peces_efectos_sobre_la_movilidad_espermatologica_y_la_fertilidad
- Medina, V., Velasco, Y., & Cruz, P. (2007). *Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (Brycon amazonicus)*. Obtenido de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2007000300006
- Medina, V., Velasco, Y., & Cruz, P. (2015). *Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/45108212_Aspectos_generales_de_la_crioconservacion_espermatologica_en_peces_teleosteos
- Mercado, I., García, J., & Rosado, R. (2003). *Evaluación del cultivo de la dorada (Brycon moorei sinuensis) en jaulas flotantes utilizando cuatro alimentos concentrados*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/26490119_Evaluacion_del_cultivo_de_la_dorada_Brycon_moorei_sinuensis_en_jaulas_flotantes_utilizando_cuatro_alimentos_concentrados
- Mojica, J., Usma, J., Leon, R., & Lasso, C. (2012). *Libro Rojo de peces dulce acuicolas de Colombia*. Arte y Fotolito.

- Montoya, A., Tabares, C., Echeverri, A., Arboleda, L., & Olivera, M. (2006). Descripción anatómica e histológica de las gónadas en Sabaleta (*Brycon henni*, Eigenmann 1913). *Dialnet*, 187-196. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3240096>
- Navarro, O., Velasco, Y., & Cruz, P. (2003). *Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (Piaractus brachypomus)*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/45108235_Evaluacion_de_cinco_protectores_para_la_crioconservacion_de_semen_de_Cachama_Blanca_Piaractus_brachypomus
- Nomura, K., Chu, I., Lio, R., Okuda, D., Kazeto, Y., Tanaka, H., & Ohta, H. (2018). *Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.007>
- Novoa, N. (2014). Conservación de embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*) a -14°C como posible estrategia de producción.
- Pardo, S., & Martínez, J. (2010). *Crioconservación de semen en peces: Efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad*. Obtenido de <http://bdigital.unal.edu.co/16071/1/10868-64275-1-PB.pdf>
- Perez, E., Atencio, V., Espinosa, J., & Pardo, S. (2013). *Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico Prochilodus magdalenae*. Obtenido de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2013000200006
- Peris, S., Morrier, A., Dufour, M., & Bailey, J. (abril de 2004). *La criopreservación del semen de carnero facilita el daño del ADN del esperma: relación entre los parámetros andrológicos del esperma y el ensayo de estructura de la cromatina del esperma*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14760008/>
- Polge, C., Smith, U., & Parkes, A. (2009). *Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures*. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/164666a0>
- Portella, J., & Gonzales, G. (2016). *Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2016/gom167i.pdf>

- Qinghua, L., Jun, L., Shicui, Z., Fuhong, D., Xizhang, X., Zhizhong, X., & Shihong, X. (2006). *An Efficient Methodology for Cryopreservation of Spermatozoa of Red Seabream, Pagrus major, with 2-mL Cryovials*. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-7345.2006.00039.x>
- Ramirez, J., Cruz, P., & Robles, M. (2011). Efectos de criopreservación sobre la calidad del esperma de Cachama blanca *Piaractus brachyomus* (Cuvier 1818). 256-269.
- Ramirez, J., Medina, V., & Cruz, P. (2010). *Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v14n1/v14n1a07.pdf>
- Ramirez, J., Medina, V., & Cruz, P. (2011). *Crioconservación seminal de bagre rayado Pseudoplatystoma metaense (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación*. Obtenido de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2011000200006
- Ramirez, M., Medina, V., & Cruz, P. (2010). *Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v14n1/v14n1a07.pdf>
- Richardson, G., Miller, T., & McNiven, M. (2001). *Cryopreservation of Arctic charr, Salvelinus alpinus (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw*. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2109.2000.00443.x>
- Richardson, G., Wilson, C., Crim, L., & Yao, Z. (1999). *Cryopreservation of yellowtail flounder (Pleuronectes ferrugineus) semen in large straws*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848698005092>
- Roa, M., & Villa, F. (2019). Aspectos reproductivos y pesquería de *Prochilodus magdalenae* Steindachner, 1879(Characiforme).
- Rodriguez, J., & Moreno, P. (2013). *Sobrevivencia de post larvas de bagre rayado (Pseudoplatystoma sp) en estanques en tierra bajo alimentación de zooplancton nativo*. Obtenido de <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/20957>
- Rodriguez-Pulido, J., Mira-Lopez, T., & Cruz-Casallas, P. (2018). Determinación, diferenciación sexual y pubertad en peces.

- Saidou, S., Gennotte, V., Toguyeni, A., Melard, C., Antoine, N., & Rougeot, C. (2016). Termosensibilidad del proceso de diferenciación sexual en el bagre africano, *Clarias gariepinus*: Determinación del período termosensible.
- Sharma, R., Said, T., & Agarwai, A. (06 de 2004). *Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing*. Obtenido de <https://ccf.org/reproductiveresearchcenter/docs/agradoc145.pdf>
- Song, C., Xiang, J., Guo, Y., Yong, T., & Zhen, S. (2004). *Criopreservación de esperma de rodaballo (Scophthalmus maximus) y aplicación a fertilización a gran escala*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848603007300>
- Soria, A. (05 de 2003). *Descripción anatómica e histológica del sistema reproductor de juveniles de tiburón martillo Sphyrna lewini (Griffith y Smith, 1834)*. Obtenido de <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/Medios/tesis/soriaq1.pdf>
- Stevenson, A., Obaid, M., Romina, R., & Vigneaux, L. (2016). Caracterización y Marcación de Células Germinales Primordiales.
- Suarez, R., Medina, V., & Cruz, P. (2019). *Efecto de dos colectas de semen en una temporada reproductiva sobre la calidad seminal de cachama blanca (Piaractus brachipomus)*. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000300022&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Tabares, C., Tarazona, A., & Olivera, M. (2005). *Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/45108205_Fisiologia_de_la_activacion_del_espermatozoide_en_peces_de_agua_dulce
- Tiersch, T., Figiel, J., & Wayman, W. (1998). *Cryopreservation of Sperm of the Endangered Razorback Sucker*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/238444357_Cryopreservation_of_Sperm_of_the_Endangered_Razorback_Sucker
- Torreta, M., Wevar, C., Forchetti, O., & Moschetti, E. (1996). Effect of freezing at different levels above liquid nitrogen, with or without a thawing diluent, on the post thawing quality of boar semen frozen in large straws. *Av. Prod. Anim*, 179-184.
- Varkonyi, L., Bokor, Z., Molnár, J., Fodor, F., Szari, Z., Ferincz, Á., & Bernath, G. (2018). La comparación de dos extensores diferentes para la mejora de la criopreservación de esperma a gran escala en la carpa común (*Cyprinus carpio*).

- Velasco, Y., Medina, V., & Cruz, P. (2006). *Cryopreservation of yamú (Brycon amazonicus) sperm for large scale fertilization*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848606001402>
- Viveiros, A., Lock, E., Woelders, H., & Komen, J. (2010). Influencia de las tasas de enfriamiento y las temperaturas de inmersión en un procedimiento de congelación lenta interrumpida para el semen del bagre africano, *Clarias gariepinus*. 38-46.
- Zapata, L., & Usma, J. (2013). La migración de peces dulceacuícolas y marinos en Colombia.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storeli, C., & Vilella, S. (2003). *Evaluación del daño del ADN en el esperma de Dicentrarchus labrax después de la criopreservación*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224003001068>