

EVALUACIÓN DE CALIDAD SEMINAL EN YAMÚ (*Brycon amazonicus*):  
RELACIÓN CON LA VIABILIDAD POSDESCONGELACIÓN

WILSON RICARDO JIMÉNEZ MOLINA  
CÓDIGO: 150211221

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
FUSAGASUGÁ  
2016

EVALUACIÓN DE CALIDAD SEMINAL EN YAMÚ (*Brycon amazonicus*):  
RELACIÓN CON LA VIABILIDAD POSDESCONGELACIÓN

WILSON RICARDO JIMÉNEZ MOLINA

CÓDIGO: 150211221

Proyecto de grado opción investigación, como requisito parcial para la obtención  
del título de Zootecnista

Director

Roger Oswaldo Suárez Martínez

Médico Veterinario, Especialista en Acuicultura – Aguas Continentales

Maestrando en Acuicultura

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

FUSAGASUGÁ

2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

---

Jurado

Dr. VICTOR MAURICIO MEDINA ROBLES

Médico Veterinario Zootecnista

Magister en Ciencias Animales

---

Jurado

Dr. JUAN ANTONIO RAMÍREZ MERLANO

Profesional en Acuicultura

Magister en Acuicultura – Aguas Continentales

## DEDICATORIA

Con amor, a mi familia, mis amigos y personas especiales en mi vida, gracias por ser mi guía en el buen camino y brindarme las fuerzas necesarias para seguir luchando y no rendirme ante los problemas presentados, gracias por enseñarme a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. No podría sentirme más honrado con la confianza que han puesto en mi, especialmente cuando he contado con su mejor apoyo desde que tengo memoria.

Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes, he logrado culminar con éxito un proyecto que en un principio podría parecer una tarea titánica. Hoy soy profesional, y quiero dedicar mi trabajo de grado a todos ustedes, personas de bien, seres que ofrecen amor, bienestar y están presentes en los mejores momentos y deleites de la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Hoy, quiero brindar mi reconocimiento e imperecedero agradecimiento a mi mentor, profesor Roger O. Suarez M. a quien con cariño considero un verdadero Maestro, que con su trabajo, en muchas ocasiones subestimado, se empeña en cuidar los saberes del mundo y permitirle a otros, expandir sus conocimientos. Nos ayuda a vivir del sueño de superarnos y cumplir nuestras expectativas, y de siempre ir por la constante mejora con el objetivo de ser mejores profesionales y mejores seres humanos. Esta ocasión no ha sido la excepción, y quiero exaltar su trabajo y agradecerle con creces por ayudarme a lograr esta nueva meta. Mil gracias por poner a mi disposición sus conocimientos, su experiencia, su paciencia, su esfuerzo, su dedicación y motivación las cuales han cosechado en mí la disciplina necesaria terminar mis estudios con éxito.

De igual forma quiero agradecer a todo el capital humano de la Universidad de Cundinamarca y la Universidad de los Llanos, que con su experiencia y conocimiento, aportaron en el desarrollo de mi formación como ser humano y profesional. Quiero exaltar la gran colaboración que recibimos por parte de Mauricio Medina, quien siempre sacaba un momento para nosotros, sin importar lo ocupado que fuera su día. Gracias por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, y por sus consejos, que me ayudaron en la formación como persona e investigador.

A todos ellos, Gracias. Éxitos en sus vidas.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	11
1 OBJETIVOS.....	14
2 REVISION DE LITERATURA .....	15
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5 DISCUSIÓN.....	40
6 CONCLUSIONES .....	45
7 RECOMENDACIONES.....	46
8 BIBLIOGRAFIA.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
9 ANEXOS.....	60

## TABLAS

Tabla 1 Características del semen fresco de Yamú ( <i>Brycon amazonicus</i> ), 18 horas pos-inyección intramuscular de Extracto de Hipófisis de Carpa (4.0 mg.kg <sup>-1</sup> ).....	29
Tabla 2 Porcentaje de Fertilidad con semen fresco vs. semen congelado.....	30
Tabla 3 Variables de calidad seminal del semen fresco de yamú.....	31
Tabla 4 Correlaciones entre fertilidad-tiempo de activación y variables evaluadas .....	32

## RESUMEN

*Introducción.* A pesar de los estudios sobre crioconservación de gametos y de los avances obtenidos mediante experimentos de laboratorio a pequeña escala, la crioconservación de semen de peces en Colombia no ha logrado los progresos prácticos suficientes que permitan su uso a escala comercial. Uno de los limitantes ha sido la alta variación de la fertilidad de los espermatozoides posdescongelación, observada incluso entre individuos de la misma especie, a causa de la diferente capacidad de las células espermáticas de resistir los efectos de la crioconservación, la cual parece estar directamente relacionada con la composición del plasma seminal de cada individuo. *Objetivo.* Evaluar diferentes variables de calidad seminal en yamú y determinar su relación con la congelabilidad. *Materiales y métodos.* La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción de Peces Tropicales del Instituto de Acuicultura de Los Llanos. Nueve (9), machos sexualmente maduros ( $1.18 \pm 0,16$  kg), fueron inducidos con Extracto de Hipófisis de Carpa (4 mg/Kg); a las 18 horas post-inducción el semen con movilidad > 80% fue diluido en proporción 1:4 en una solución de glucosa (5.5 %), yema de huevo (12%) y DMSO (10%), luego conservado en macrotubos de 5 ml en vapores de nitrógeno líquido (30 min.), hasta  $-196^{\circ}\text{C}$ . Se determinó la viabilidad del semen crioconservado y fresco a través de pruebas de fertilidad empleando dosis de 75000 y 50000 espermatozoides/oocito respectivamente. Las variables volumen, espermatozocrito, concentración, tiempo de activación, concentración de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , colesterol, triglicéridos, glucosa y proteínas, fueron evaluados. Se determinó la relación entre las variables del semen fresco y fertilidad posdescongelación. *Resultados.*

Tabla 1. Variables de calidad seminal del semen fresco de yamú (*Brycon amazonicus*).

Vol. (ml)	Tiempo activ. (s)	Spcto (%)	Conc. (mill.)	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)
7,5±1,9	52,3±4,4	13,4±2,3	7,22±4.0	0,6±0,2	75,8±4,4	28,2 ± 4,6

Gluc (mg/dL)	Colest. (mg/dL)	Triglic. (mg/dL)	Prot. (mg/dL)	Fertil. (%)
6,8± 0,4	3,4±1,9	18,6 ± 4,8	375,3±5,3	74,8±7,7

Las correlaciones de Pearson para las variables Mg<sup>2+</sup> (r=-0,41497), K<sup>+</sup> (r= -0,00417), colesterol (r=-0,70947) y proteína (r=-0,08796), relacionadas negativamente con la fertilidad, mientras que las variables concentración de glucosa (r=0,15636), triglicéridos (r=0,03887), y tiempo de activación (r=0,15565), presentaron bajas correlaciones con la fertilidad posdescongelación. *Conclusión.* A través de las variables evaluadas no fue posible explicar la variación individual de la fertilidad posdescongelación en la especie estudiada.

*Palabras clave:* Semen, bioquímica, iones, congelación, correlación

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la piscicultura implica la producción continua de semilla a través de la reproducción. En especies nativas como el yamú, depende de un proceso continuo de maduración sexual por parte de los reproductores que ocurre naturalmente cuando inician su recorrido migratorio con el inicio de la época de lluvias. El aumento de la pluviosidad tiene un efecto directo sobre el nivel del agua de los ríos, facilitando el desplazamiento migratorio y contracorriente de los reproductores con el fin de ofrecer áreas y condiciones favorables para el crecimiento de los huevos y el desarrollo de su descendencia. Durante dicho recorrido, el fotoperiodo y algunos factores del agua como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la conductividad entre otros, varían estimulando la cascada hormonal de la reproducción y por lo tanto la preparación de las gónadas para el inicio de la época de apareamiento. De este modo, en regiones tropicales, la temporada de lluvias desempeña un papel determinante en la reproducción de los peces, estimulando la maduración gonadal y el inicio de la migración con fines reproductivos. A los peces con este tipo de comportamiento se les denomina reofílicos (Landines y Mojica, 2005). En cautiverio, el yamú logra su desarrollo gonadal, sin embargo, este no es continuo y solo se da cuando aumenta la pluviosidad. En consecuencia, la disponibilidad de gametos se ha convertido en un cuello de botella para la industria piscícola, justificando el desarrollo de técnicas que permitan su conservación y disponibilidad para las épocas de escasez.

Una de las técnicas empleadas para la conservación de gametos durante largos periodos es la crioconservación seminal (Polge, et al. 1949). La implementación de técnicas de crioconservación en piscicultura, ha permitido el uso de espermatozoides en momentos en que no hay desarrollo reproductivo de los peces, facilitando el movimiento de material genético entre productores, así como, la

utilización eficiente de parentales a través de la dilución seminal (Medina Robles, et al. 2005). A la fecha, se han realizado importantes avances referentes a la crioconservación de peces nativos definiendo protocolos que han permitido el almacenamiento del semen en grandes pajillas con resultados satisfactorios (Velasco-Santamaría, Medina-Robles, & Cruz-Casallas, 2006; Ramírez-Merlano, Velasco-Santamaría, Medina-Robles, & Cruz-Casallas, 2011). Sin embargo, en Colombia el uso semen crioconservado para la fertilización aún tiene que ganar popularidad ya que no es una práctica común en las producciones comerciales. Algunos de los factores que limitan el uso de semen crioconservado son: la ausencia de protocolos de crioconservación estandarizados para aplicaciones a escala comercial (Cabrita, Robles, Álvarez, & Herráez, 2001), las lesiones celulares derivadas del proceso (Muller, Muller, Pincemy, Kurz, & Labbe, 2008; Peñaranda, Pérez, Gallego, Jover, & Asturiano, 2009), la baja movilidad espermática y baja capacidad de fecundación una vez el semen es descongelado (Lahnsteiner, Berger, Horvath, Urbanyi, & Weismann, 2000).

La variación en la capacidad de los espermatozoides para sostener el efecto criogénico de la congelación y descongelación se ha reportado entre individuos de la misma especie (Babiak, Glogowski, Luczynski, & Luczynski, 1997). La variación entre machos plantea un problema donde individuos con esperma de características no óptimas para la crioconservación, pueden tener, no obstante, un alto valor genético. Los factores que originan estas variaciones no han sido claramente dilucidados, sin embargo, algunos autores han intentado establecer modelos que correlacionan algunas características del semen con su potencial para la crioconservación, por ejemplo, la concentración espermática, pH, osmolaridad, capacidad antioxidante, proteína y actividad antitripsina (Butts, *et al.*, 2011). Los machos con bajo potencial para la crioconservación también requieren razones más grandes esperma/huevo para compensar la menor calidad. Por lo tanto, adquiere

importancia el establecer las posibles correlaciones entre las características seminales y la aptitud del semen de los peces para soportar el proceso de congelación y descongelación. Diferentes estudios han demostrado que componentes del plasma seminal (osmolaridad, pH, iones, glucosa, colesterol, triglicéridos, proteínas, capacidad antioxidante), guardan estrecha relación con variables de calidad seminal posdescongelación (Borges et al., 2005; Alavi, et al., 2009; Butts, Litvak, & Trippel, 2010; Butts et al., 2011), en especies como trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), (Lahnsteiner, Berger, Weismann, & Patzner, 1996; Alavi & Cosson, 2006), Sabaleta (*Brycon henni*), (Tabares Serna, 2013), Bacalao del atlántico (*Gadus morhua*), (Butts et al., 2010; Butts et al., 2011) entre otras. Para el caso particular del *Brycon amazonicus* aunque existen diferentes reportes sobre trabajos en crioconservación seminal (Cruz-Casallas et al., 2004; Cruz-Casallas, Lombo-Rodríguez, & Velasco-Santamaría, 2005; Cruz-Casallas, Velasco Santamaría, & Medina Robles, 2006; Medina-Robles, Velasco-Santamaría, & Cruz-Casallas, 2007; Cruz Casallas, Medina Robles, & Velasco Santamaría, 2009), ninguno reporta acerca de la relación entre las características del plasma seminal y la calidad del semen descongelado.

El propósito de este trabajo fue evaluar la correlación entre algunas variables de la calidad seminal con la fertilidad posdescongelación.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo General

Establecer la correlación entre variables de calidad del semen fresco y la viabilidad posdescongelación en el yamú (*Brycon amazonicus*)

### 1.2 Objetivos específicos

- 1.2.1 Determinar las variables de calidad seminal (movilidad, tiempo de activación, espermatozoides, concentración espermática, concentración iónica, triglicéridos, colesterol, glucosa).
- 1.2.2 Relacionar las variables de calidad seminal con la movilidad seminal y fertilidad posdescongelación.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 El Yamú

El yamú (*Brycon amazonicus* - Spix y Agassiz, 1829), hace parte de un género de carácidos ampliamente distribuidos en los ríos de América desde México hasta Argentina (Howes, 1982). Es una especie de pez de agua dulce nativa del río Orinoco y su prevalencia en el país, es mayor en afluentes de los ríos Meta, Ariari y Guaviare (Arias, 1995). Se caracteriza por tener hábitos omnívoros y excelentes cualidades como especie comercial gracias a la calidad de su carne (Cifuentes, 1999), y rápido crecimiento (Clavijo & Arias, 2004). El yamú ha sido objeto de numerosos estudios enfocados en determinar varios aspectos de su biología básica (Arias, 2006), anatomía (Eslava, Suárez, Pardo, Arias, & Cruz, 2001), hábitos alimenticios (López, Vásquez, Arias & Wills, 2004) manipulación de sus ciclos reproductivos en cautiverio (Muñoz, Vásquez, & Cruz, 1991; Landines, 1995; Arias, Zaniboni, Pardo, Vásquez, & Atencio, 2004), entre otros. Desde el punto de vista de la reproducción en cautiverio, se han estudiado e implementado protocolos de inducción hormonal con base en extracto de hipófisis de carpa (Landines y Mojica, 2005). Durante el proceso post-inducción con la hormona hipofisiaria, los indicadores reproductivos más importantes son la ovulación que ocurre a las seis o siete horas, después de la última aplicación hormonal, el desove y la fertilización (Arias, 2002). Trabajos en crioconservación seminal han sido reportados (Cruz-Casallas et al., 2004; Cruz-Casallas, Lombo-Rodríguez, & Velasco-Santamaría, 2005; Cruz-Casallas, Velasco Santamaría, & Medina Robles, 2006).

## 2.2 Fundamentos de crioconservación espermática

La crioconservación de células espermáticas, es un proceso que consiste en almacenar células mediante el descenso controlado de temperatura hasta  $-196^{\circ}\text{C}$ . La crioconservación tiene sus orígenes al final de la década del 40 cuando Polge *et al.* (1949), descubrieron de manera accidental las propiedades protectoras del glicerol en los procesos de congelación espermática.

Durante la congelación, el espermatozoide es sometido a cambios químicos y físicos extremos como la formación de cristales de hielo, estrés mecánico, estrés osmótico y la inestabilidad de las membranas celulares. Dentro del conjunto de cambios generados por el proceso de congelación, se pueden citar:

### 2.2.1 El enfriamiento

Da origen a una transición de líquido intracelular y del estado físico de los lípidos (tornándose más sólidos), alterando la fluidez de la membrana, así como la disposición y funcionamiento de las proteínas transmembranales que son responsables del movimiento de sustancias entre el interior y exterior celular.

### 2.2.2 La nucleación / cristalización

Consiste en la formación de núcleos de hielo (cristales). Aquí el agua líquida que se encuentra tanto en el interior como en el exterior de la célula es convertida en hielo cuando la solución alcanza temperaturas comprendidas entre  $-5$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ . Durante este proceso, la formación de hielo extracelular puede provocar lesiones y muerte celular por mecanismos como el incremento de la presión osmótica, el enfriamiento,

y la ruptura mecánica por efecto de los cristales, los cuales afectan a las células en la solución acuosa que tiende a congelarse. Al formarse los núcleos, las membranas lipídicas de las células pierden flexibilidad debido al enfriamiento, se endurecen y se resisten a la deformación, además; se da origen a un proceso de deshidratación celular debido a las fuerzas osmóticas resultantes de un menor contenido de agua líquida. La osmolaridad deforma las membranas celulares durante la congelación, y en conjunto con las fuerzas mecánicas que ejercen los cristales de hielo que están creciendo, se provocan lesiones a causa de un efecto “cuchilla”, principalmente sobre las membranas lipídicas. Por otra parte, la congelación intracelular también ocurre a causa del rápido enfriamiento de la célula y puede tener consecuencias letales debido a la alteración de las estructuras de los organelos.

### 2.2.3 Hiperosmolaridad

La nucleación causa un incremento de la concentración de solutos en las fracciones de agua no congelada, dando origen a la formación de “canales residuales”. Esto obliga al agua intracelular a desplazarse hacia el espacio extracelular donde se congela y, en consecuencia, las células se encogen y deshidratan (Karow, 2001; Medina-Robles et al., 2005).

### 2.2.4 Estrés osmótico e inestabilidad de las membranas

Debido a la constante pérdida de agua del interior de la célula hacia el exterior, generado por el aumento de la osmolaridad extracelular, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo agua, al excederse esta resistencia física propia de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad (Gómez, Delgado, Gómez, Lozano, & Reguero, 2006).

### 2.2.5 Liberación de calor latente

Durante la deshidratación de la célula, sin que haya congelación intracelular, la concentración de electrolitos, sustratos, cofactores y proteínas celulares aumentan, así como lo hace el transporte del agua al medio externo que se encuentra en proceso de congelación; este fenómeno genera la liberación de calor de fusión o calor latente, que puede producir lisis celular (Gómez et al., 2006).

## 2.3 La crioconservación del semen en peces

El proceso de crioconservación seminal se inicia con la evaluación de la calidad seminal que comprende dos etapas importantes: 1) Determinación de las características macroscópicas; 2) Evaluación de las características microscópicas; 3) Dilución seminal; 4) Congelación

### 2.3.1 Determinación de características macroscópicas

#### 2.3.1.1 Volumen

El semen es depositado y evaluado directamente dentro de un tubo de ensayo aforado en mililitros (Cruz-Casallas & Velasco-Santamaría, 2005). El volumen seminal depende de muchos factores entre los cuales se encuentran la especie, el método de inducción hormonal, así como la habilidad del técnico o profesional que realiza el procedimiento (Cruz-Casallas, 2001; Fresneda et al., 2004).

### 2.3.1.2 Color

La evaluación del color permite determinar la presencia de contaminantes en la muestra como agua, materia fecal, orina, bilis, sangre (Cruz-Casallas, 2001). Algunas dietas comerciales contienen carotenoides que pueden dar origen a una coloración similar a la de la contaminación con sangre (Daza, Parra, Ochoa, 2005).

### 2.3.2 Evaluación de las características microscópicas

La evaluación microscópica del semen de los peces por lo menos dentro de los 60 minutos siguientes a la colección del semen dado que a medida que el tiempo transcurre, el semen disminuye su calidad. Entre las características evaluadas se encuentran la movilidad espermática, la concentración espermática, la morfología, la viabilidad espermática y el tiempo de activación (Cruz-Casallas, 2001; Cruz-Casallas & Velasco-Santamaría, 2005).

#### 2.3.2.1 Concentración Espermática

La concentración se define como el número de células espermáticas por mililitro (ml), de semen y es expresado en millones por ml o  $\mu\text{l}$ , utilizando el método del hemocitómetro o cámara de Neubauer. Se ha demostrado una alta correlación del recuento espermático con el espermatocrito (Pablo E Cruz-Casallas, Medina-Robles, & Velasco-Santamaría, 2007), sin embargo, el espermatocrito únicamente expresa una relación porcentual entre el volumen seminal y la fracción celular del mismo. La realización de esta técnica se basa en el mismo principio que el hematocrito en hematología (Hickman, 1958).

### 2.3.2.2 Espermatocrito

El espermatocrito es un modo alternativo para medir la concentración espermática; varios autores han reportado una relación positiva y estadísticamente significativa entre la concentración espermática y el espermatocrito. Se puede entender como la relación entre el volumen de espermatozoides empaquetados, con respecto al volumen seminal expresada en porcentaje (vol. espermatozoides / vol. seminal x 100) (Medina-Robles & Velasco-Santamaría, 2006).

### 2.3.2.3 Movilidad espermática

Los espermatozoides son inmóviles en las gónadas del macho e incluso a la hora de realizar la espermiación. La movilidad del espermatozoide es inducida después de entrar en contacto con un medio acuoso o cuando entra en contacto con el tracto genital de la hembra. En peces de agua dulce, la movilidad espermática es iniciada por soluciones hiposmóticas, así mismo como soluciones con bajos niveles de K<sup>+</sup> (Krasznai, 2000). La movilidad es inducida agregando a una muestra de semen una gota de una solución activadora, la cual debe contener una osmolaridad inferior al plasma seminal como por ejemplo agua o bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub> al 1%).

#### 2.3.2.3.1 Movilidad masal

Es un dato subjetivo que tiene como base las ondas que provienen de las células espermáticas al moverse; para determinarla, la muestra diluida debe observarse con un aumento de 10x inmediatamente después de adicionar la solución activadora (Pablo Emilio Cruz-Casallas & Velasco-Santamaría, 2005).

#### 2.3.2.3.2 Movilidad individual

Para realizar un análisis más detallado, se puede usar un sistema de análisis seminal asistido por computador, como el CASA (siglas del inglés: Computer-Assisted-Sperm-Analysis), (Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004). Es una técnica utilizada para la evaluación de la movilidad espermática individual, que permite la visualización y digitalización de imágenes espermáticas estáticas y dinámicas para su análisis, se caracteriza una alta capacidad de repetición y proporcionar una estimación más rigurosa de la movilidad de los espermatozoides en comparación con el procedimiento subjetivo por microscopía (Billard & Cosson, 1992). Los parámetros más utilizados para la evaluación de la motilidad espermática son: 1) porcentaje con movilidad progresiva rápida, 2) porcentaje con movilidad progresiva lenta no lineal, 3) porcentaje con movimientos no progresivos, 4) porcentaje de inmóviles. La velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad a lo largo de un trayecto (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), linealidad o rectitud ( $LIN = VSL / VCL$  o  $VAP$ ), son evaluados en los espermatozoides móviles (Rurangwa *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.4 Tiempo De Activación

Es el tiempo que dura el movimiento de las células espermáticas desde el momento en que es adicionada la solución activadora hasta que el movimiento cesa, esta característica difiere bastante entre especies, además depende también en gran medida de las propiedades químicas de la solución activadora, por ejemplo, una solución activadora de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 1%, aumenta el tiempo de activación en *Piaractus brachypomus*, la temperatura también afecta la movilidad, se ha comprobado que a temperaturas bajas la movilidad aumenta, pero la

velocidad de las células espermáticas disminuye (Medina-Robles, Velasco-Santamaria, Cruz-Casallas, 2005). Por otra parte, Fresneda et al., (2004), reportan que el tiempo de activación en semen de *Piaractus brachypomus* fue mayor cuando los animales fueron inducidos hormonalmente con Extracto Pituitario de Carpa (EHC).

### 2.3.3 Dilución

Una vez ha culminado el proceso de evaluación de la calidad seminal y determinadas las características en fresco, se inicia uno de los eventos más importantes en el proceso de criopreservación que consiste en la preparación del diluyente del cual depende la viabilidad de células espermáticas posdescongelación. La composición del diluyente no es estándar en todas las especies de peces y varían las cantidades porcentuales de los componentes como también el crioprotector a utilizar.

En el yamú (*Brycon amazonicus*), el diluyente es una solución de agua destilada estéril de 5.5% (peso : volumen) de glucosa monohidratada, 12% de (volumen : volumen) de yema de huevo de gallina (preferiblemente criollo) y 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Medina-Robles & Velasco-Santamaría, 2006). En cachama blanca el diluyente contiene 5.5% de glucosa monohidratada, 15% de yema de huevo y 10% de Metanol (Ramírez-Merlano, Velasco-Santamaría., Medina-Robles & Cruz-Casallas P. (2001). En bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*), el diluyente contiene 5.5% de glucosa, 12% de yema de huevo y 12% de metanol (Ramírez-Merlano & Robles, 2010). El semen y el diluyente se mezclan generalmente a temperatura ambiente, en proporción 1:4 para el caso del yamú es decir una parte de semen por tres partes de diluyente, esta relación cambia de acuerdo con la concentración espermática promedio de la especie, posterior a eso

se empacan en pajillas de volumen variable según la especie (Medina-Robles & Velasco-Santamaría, 2006) y se destina la muestra al enfriamiento, en una primera instancia la muestra es almacenada en el *dry shipper* durante 30 minutos donde llegara a la temperatura de crioconservacion (-196°C), y luego es llevada durante tiempo indefinido al termo de almacenamiento.

#### 2.3.4 Fertilidad

La prueba de fertilidad es el ensayo reina que define a un semen de buena calidad. Para la ejecución de ésta se utilizan hembras sexualmente maduras cuya ovulación puede es inducida hormonalmente con 5.75 mg.kg-1 de EHC. Fresneda et al. (2004), en cachama blanca, reportan una ovulación inducida mediante la aplicación de dos dosis de EHC la primera de 0.5 mg.kg-1, y 4.5 mg.kg-1 con un intervalo de 12 horas, donde la ovulación ocurrió de 8 a 10 horas después de la aplicación. Los oocitos son recibidos en un recipiente limpio y se organizan en grupos de 2 a 4 g para luego ser fertilizados con el semen. La activación espermática se realiza con NaHCO<sub>3</sub> al 1% y la proporción a utilizar es de 1200 millones de espermatozoides por cada gramo de oocitos. Para *P. brachypomus* y *B. amazonicus* la evaluación de fertilidad debe realizarse después de las 6 a 9 horas de incubación. El resultado se expresa en porcentaje, y se determina con la relación de oocitos fecundados sobre el número de oocitos observados (Cruz-Casallas, 2001)

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización

El proyecto fue realizado en el Laboratorio de Reproducción de Peces Tropicales de la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Los Llanos (IALL), ubicado a 12 km de la Ciudad de Villavicencio (Meta), a una altura aproximada de 418 msnm, temperatura promedio de 25°C, precipitación pluvial de 4050 mm y una humedad relativa del 75%

#### 3.2 Material Biológico

Para el experimento se escogieron 9 ejemplares de yamú (*Brycon amazonicus*), sexualmente maduros, con un peso aproximado de  $1,19 \pm 0,16$  Kg de peso corporal (PC). Estos peces fueron criados y mantenidos en estanques de tierra a una densidad de 1.5 peces.m<sup>-2</sup>. Todos los animales fueron identificados individualmente, mediante códigos de colores (chaquiras), instalados en la aleta dorsal. La estimación del estado de madurez reproductiva fue realizada en machos por la presencia de semen en la papila urogenital después de una leve presión en la cavidad celómica y en hembras mediante la comprobación del diámetro (>1200 µm) y estado de migración de la vesícula germinal en oocitos obtenidos por medio de biopsia ovárica.

### 3.3 Inducción reproductiva y extracción de gametos

Los peces seleccionados fueron mantenidos en tanques circulares de concreto con aireación permanente y en un sistema de recirculación de agua. Los machos fueron inyectados intramuscularmente con EHC marca Stoller Fisheries®, a razón de 4,0 mg Kg<sup>-1</sup> PC. Las hembras fueron inyectadas con 5,5 mg Kg<sup>-1</sup> PC y distribuidas en dos aplicaciones, a las 0 horas (0.5 mg Kg<sup>-1</sup> PC), y de 6 a 7 horas después (5,0 mg Kg<sup>-1</sup> PC). Para obtener los gametos, los peces fueron anestesiados en una solución 2-fenoxietanol (300 mg L<sup>-1</sup> Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), La colecta de semen fue realizada 18 horas después de la inyección hormonal en tubos de ensayo de vidrio (15 mL). Las muestras de semen contaminadas con agua, orina, heces o sangre fueron descartadas. En el momento de la ovulación los oocitos fueron colectados 18 horas después de la última inyección hormonal. La región abdominal en cada pez fue cuidadosamente secada para evitar el contacto entre el agua y los gametos.

### 3.4 Evaluación de las características seminales

#### 3.4.1 Movilidad masal y tiempo de activación

La colecta espermática fue mantenida a temperatura ambiente (25 ± 2°C), La movilidad masal y tiempo de activación (duración de la movilidad) fueron evaluados usando un microscopio de luz (10X), agregando 20µl de semen en una lámina excavada (1.0-1.2 mm de profundidad, Micro Slides Premiere®, Shangai, China), y activando la movilidad espermática con 180 µL de agua destilada. Las muestras con movilidad masal inferior al 80% de fueron descartadas para el proceso de crioconservación. El tiempo de activación o duración de la movilidad fue evaluada

inmediatamente después de la adición de agua, registrando el tiempo hasta que la movilidad se redujo al 5%.

#### 3.4.2 Concentración espermática

La concentración espermática fue determinada usando dos métodos, el primero corresponde a una técnica indirecta conocida como espermatocrito, donde el semen es tomado en tubos microcapilares (75 mm de longitud y 1,1 mm de diámetro interno) y centrifugado a 14000 g, durante 5 minutos. El método directo se realiza por medio del método de Hematocitómetro, o Cámara de Neubauer, el semen es diluido (1:1200) previamente en una solución salina fisiológica (0,9% NaCl), el montaje es mantenido bajo una atmosfera húmeda por 10 min, y subsecuentemente los espermatozoides son contados individualmente en una cámara de Neubauer (Bright Line, Optik Labor, Friedrichshofen, Germany) con un objetivo de 40X.

#### 3.4.3 Evaluación de la composición del plasma seminal.

El semen fresco fué centrifugado (14000 gravedades X 15 min, EBBA 12, Hettich, Tuttlingen, Germany) y el sobrenadante (plasma), fue evaluado para cada constituyente seminal. El promedio de al menos dos mediciones fue utilizado para el análisis estadístico

##### 3.4.3.1 Concentración de proteína, glucosa, colesterol y triglicéridos

Los niveles de proteína, glucosa, colesterol y triglicéridos fueron determinados de acuerdo con el método de (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). La absorbancia de la muestra será medida espectrofotométricamente a 750 nm. Albumina bovina será utilizada como estándar.

### 3.4.3.2 Concentración Iónica

Las concentraciones de Iones presentes en el plasma seminal fueron determinadas mediante Reflectancia de fibra óptica (VITROSDT60II System Chemistry, USA) en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia con Sede en Bogotá.

### 3.5 Proceso de crioconservación seminal y condiciones de descongelación

El semen seleccionado para el proceso de crioconservación fue mezclado y diluido (1:5), con un diluyente compuesto por glucosa monohidratada como un agente protector del exterior de la célula (5,5%, Merck, Darmstadt, Germany), yema de huevo de gallina (12%), que ejerce una función tanto para la estabilización de la membrana como para la protección del medio intracelular de la célula y un crioprotector, DMSO 10%, (Sigma Chemical Co.), que junto con los anteriormente nombrados, garantizan la supervivencia espermática después del proceso de crioconservación. Una vez el semen ha sido diluido, debe verificarse la inexistencia de espermatozoides móviles en las muestras observadas. Realizada la verificación, el esperma diluido fue empacado en macrotubos de 4 mL (280 x 5mm, Minitub, Abfüll-und Labortechnik GmbH, Tiefenbach, Germany). Los macrotubos fueron congelados por 30 min. mediante vapores de nitrógeno en un termo (CP100 Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA), pasados los 30 min., todos los tubos fueron sumergidos y mantenidos en un termo de nitrógeno líquido a -196°C (35 HC, Taylor-Wharton) hasta su evaluación.

### 3.6 Pruebas de fertilidad

Para realizar las pruebas de fertilidad se descongeló el semen durante 60 segundos, a una temperatura de 35°C. Una vez descongelado el semen fue activado con bicarbonato de sodio (1%), en una relación 1:10 (20 µL de semen con 180 µL de bicarbonato de sodio), se evaluaron movilidad masal y tiempo de activación. Para la evaluación de fertilidad se seminaron los oocitos de una hembra inducida hormonalmente (5.5 mg.kg<sup>-1</sup> EPC), a razón de 75000 espermatozoides/oocito para el semen congelado y 50000 espermatozoides/oocito para el caso del control (semen fresco). De cada uno de los 9 machos congelados, así como del macho control se realizaron 3 réplicas que fueron distribuidas al azar en 30 incubadoras de flujo ascendente con capacidad de 2 litros. El porcentaje de fertilidad se determinó luego de 6 horas de incubación a partir del promedio de 3 muestras tomadas de cada incubadora y se calculó con base en el número de oocitos embrionados (estado de cierre del blastoporo), sobre el total contenido en la muestra.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Características seminales del yamú

La tabla 1 muestra las características del semen fresco obtenido del eyaculado de 9 ejemplares de *Brycon amazonicus*. En todos los casos los machos presentaron un volumen seminal superior a 5mL con una movilidad espermática mayor al 90%. El tiempo de activación espermática varió entre los 47 y 60 segundos, por otra parte, la concentración estuvo entre  $5,22 \times 10^6$  y  $9,8 \times 10^6$  spz. $\mu\text{L}^{-1}$ , mientras que el espermatocrito mostró valores entre el 10% y 15%.

Tabla 1. Características del semen fresco de Yamú (*Brycon amazonicus*), 18 horas después de inyección intramuscular de Extracto de Hipofisis de Carpa ( $4.0 \text{ mg.kg}^{-1}$ )

	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Movilidad masal</b>	<b>Tiempo de activación (s)</b>	<b>Spcto. (%)</b>	<b>Concen. (spz/uL)</b>
	5	> 90%	52	15	$5,82 \times 10^6$
	6	> 90%	55	15	$6,72 \times 10^6$
	8,3	> 90%	47	16	$6,54 \times 10^6$
	7	>90%	51	13	$7,2 \times 10^6$
	11	>90%	52	12	$9,8 \times 10^6$
	9,5	> 90%	60	15	$7,74 \times 10^6$
	7	> 90%	47	15	$5,22 \times 10^6$
	8	> 90%	50	10	$6,54 \times 10^6$
	5,5	> 90%	57	10	$5,46 \times 10^6$
Promedio	7,5		52,3	13,4	6,78
DS	1,9		4,4	2,3	1,38

Abreviaturas: S: Segundos, Spcto: espermatocrito, Conteo Neub: Conteo cámara de Neubauer, Concen.(spz/uL): Concentración espermatozoides/microlitro

#### 4.2 Determinación de fertilidad

La tabla 2 muestra los resultados de las pruebas de fertilidad realizadas a partir del semen de los 9 individuos congelados y el tratamiento control (semen fresco). El porcentaje de fertilización obtenido con el control fue significativamente mayor (74,8%), que los resultados obtenidos con el semen congelado ( $P < 0,05$ )

Tabla 2. Porcentaje de fertilidad *Brycon amazonicus*, semen fresco vs. semen congelado

Individuo	Media %	Desviación	Control	Media %	Desviación
Yamú 1	53,1	21,1	1	74	8,7
Yamú 2	63,3	7,3	2	84,7	4,2
Yamú 3	46,4	21,6	3	76	5,3
Yamú 4	55,3	16,7	4	64	5,3
Yamú 5	47,1	18,1	5	81,3	7
Yamú 6	30,9	9,0	6	68,7	6,1
Yamú 7	64,7	6,2			
Yamú 8	46,4	12,4			
Yamú 9	49,1	6,7			
<b>Promedio:</b>	<b>50,5</b>			<b>74,8</b>	

#### 4.3 Composición del plasma seminal

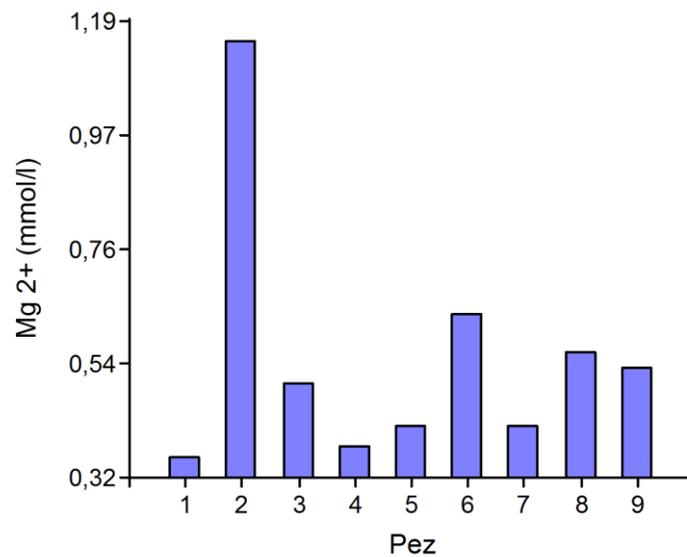
La tabla 3, muestra las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, proteína y electrolitos contenidos en el fluido seminal de los 9 individuos evaluados. Se aclara que no se reportan resultados para sodio ( $\text{Na}^+$ ), dado que el contenido de  $\text{Na}^+$  presente en la muestra no alteró la sensibilidad del equipo de medición.

Tabla 3. Variables de calidad seminal del semen fresco de yamú (*Brycon amazonicus*).

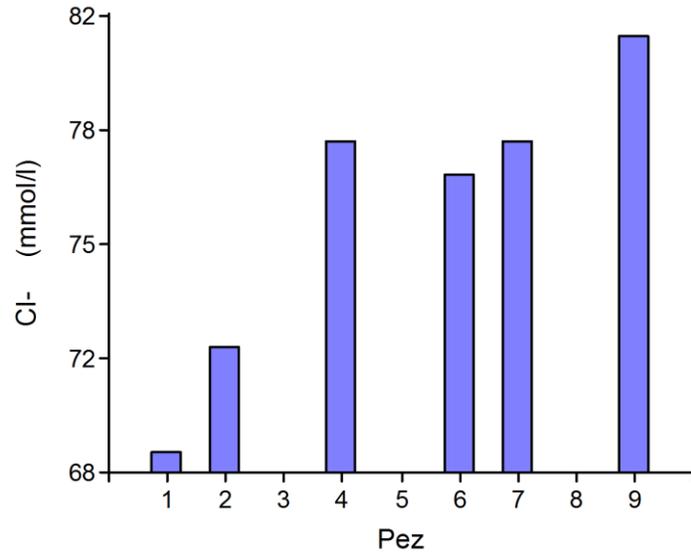
Volume n (ml)	Tiempo activ. (s)	Spcto (%)	Conc. (millones )	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L )	Cl <sup>-</sup> (mmol/L )	K <sup>+</sup> (mmol/L )	Glucos a (mg/dL)	Colest. (mg/dL )	Triglic. (mg/dL )	Prot. (mg/dL)
7,5±1,9	52,3±4,4	13,4±2, 3	7,22±4.0	0,6±0,2	75,8±4,4	28,2 ± 4,6	6,8± 0,4	3,4±1,9	18,6 ± 4,8	375,3±5, 3

\* Los resultados observados en la tabla corresponden al promedio de 9 individuos evaluados

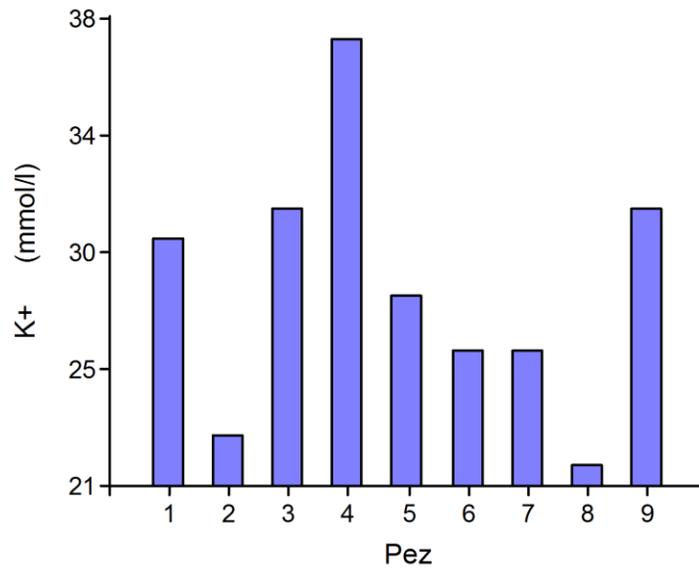
En las gráficas se muestra la concentración iónica del semen en los individuos evaluados. En el eje de las (X) se muestran los peces que fueron objeto de este experimento, en el eje de las (Y) se muestran las cantidades en milmoles por litro (mmol/L) de las variables evaluadas: 1) magnesio ( $Mg^{2+}$ ), 2) cloruro ( $Cl^-$ ), 3), potasio ( $K^+$ ). Para el  $Mg^{2+}$ , los datos fluctuaron entre 0,36 y 1,15 mmol/L, en el caso del  $Cl^-$ , entre 69 y 81 mmol/L y para el  $K^+$  entre 22 y 31 mmol/L. La gráfica 2, no muestra los resultados de los peces 3, 5 y 8, debido a que las concentraciones de  $Cl^-$  contenidas en las muestras seminales de estos animales no afectaron la sensibilidad del equipo de medición.



Gráfica 1. Concentración de  $Mg^{2+}$  en plasma seminal de yamú (*Brycon amazonicus*). Datos en milimoles por litro (mmol/L)

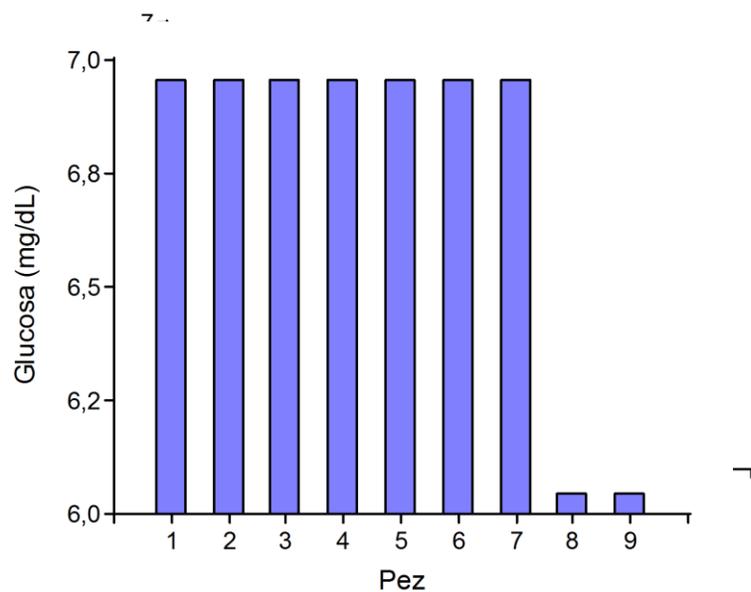


Gráfica 2. Concentración de Cl<sup>-</sup> en plasma seminal de yamú (*Brycon amazonicus*).  
 Datos en milimoles por litro (mmol/L)

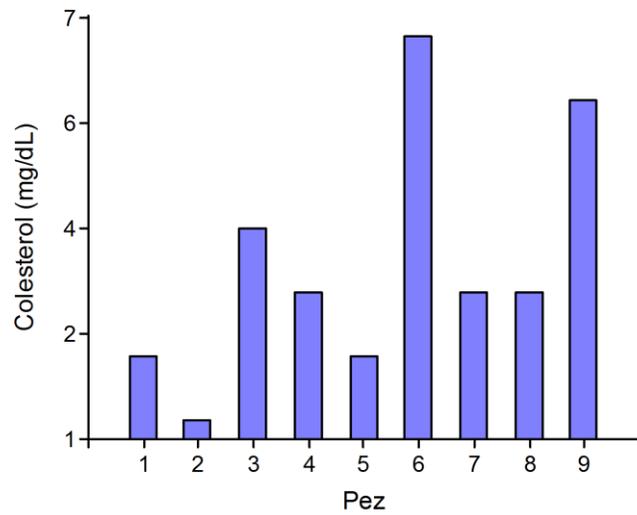


Gráfica 3. Concentración de K<sup>+</sup> en plasma seminal de yamú (*Brycon amazonicus*).  
 Datos en milimoles por litro (mmol/L)

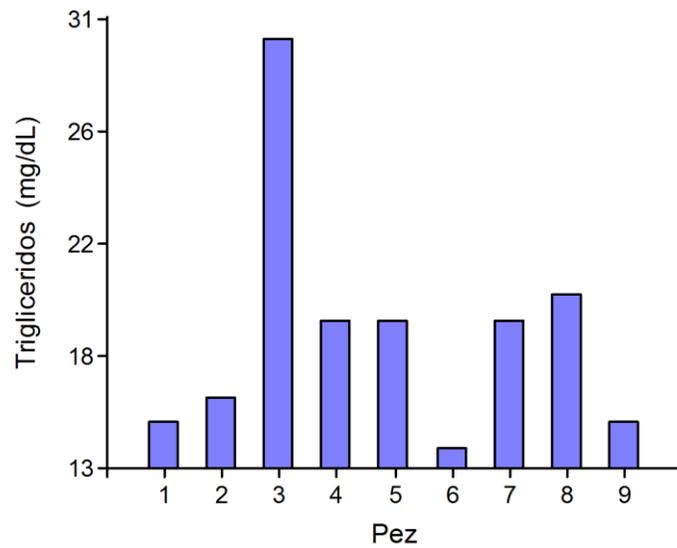
En las siguientes graficas se presentan los resultados de la evaluación de la concentración de algunas variables bioquimicas del semen en los individuos evaluados. En el eje de las (X) se muestran los peces que fueron objeto de este experimento, el eje de las (Y) muestra las cantidades en miligramos por decilitro (mg/dL) de: 4) glucosa, 5) colesterol, 6) trigliceridos y 7) proteína. Las concentraciones para la glucosa fluctuaron entre 6 y 7 mg/dL; Colesterol, entre 1 y 7 mg/dL, Trigliceridos, entre 14 y 30 mg/dL y proteína, entre 365 y 383 mg/dL.



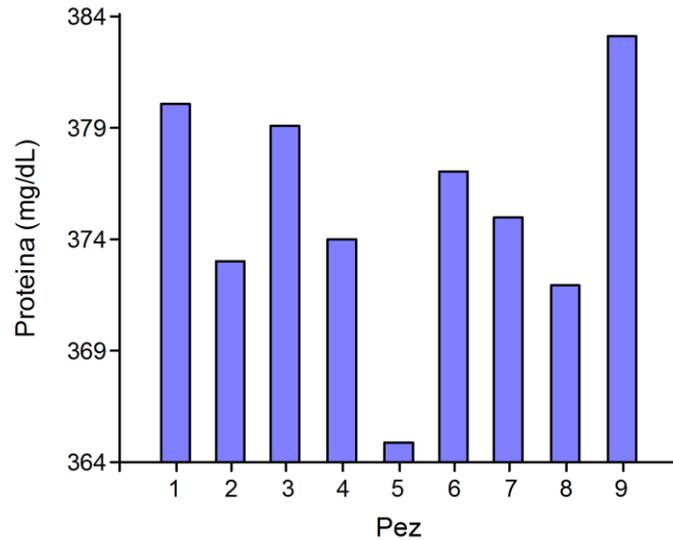
Gráfica 4. Concentración de glucosa en plasma seminal de yamú (*Brycon amazonicus*). Datos en miligramos por decilitro (mg/dL)



Gráfica 5. Concentración de colesterol en plasma seminal de yamú (*Brycon amazonicus*). Datos en miligramos por decilitro (mg/dL)



Gráfica 6. Concentración de triglicéridos en plasma seminal de yamú (*Brycon amazonicus*). Datos en miligramos por decilitro (mg/dL)



Gráfica 7. Concentración de proteína en plasma seminal de yamú (*Brycon amazonicus*). Datos en miligramos por decilitro (mg/dL)

Tabla 4. Valores para osmolaridad y pH de los individuos evaluados

Individuo	Osmolaridad	pH
Yamu 1	249 mOsm/L	8,3
Yamu 2	---	---
Yamu 3	266 mOsm/L	7,8
Yamu 4	279 mOsm/L	7,9
Yamu 5	264 mOsm/L	8,2
Yamu 6	271 mOsm/L	8,3
Yamu 7	279 mOsm/L	7,9
Yamu 8	278 mOsm/L	8,1
Yamu 9	302 mOsm/L	8,4
<b>Promedio y Desviación</b>	<b>273,5 ± 15,33</b>	<b>8,0 ± 0,22</b>

--- Valor no reportado

La tabla 4 muestra los valores de osmoaridad y pH encontrados en el plasma seminal de los individuos evaluados, los datos de la osmolaridad tuvieron rangos entre 249-302 mOsm/L, el dato para el Yamu 2 no se reporta debido al daño de la muestra.

En la tabla 5, se muestran las probabilidades y coeficientes de correlacion de las variables que se evaluaron, los valores resaltados de color azul, indican la significancia o valor de probabilidad ( $p$ ), entre las variables involucradas, los valores resaltados en rojo, indican los coeficientes de correlacion ( $r$ ). No se demostraron correlaciones significativas en las variables y la fertilidad, se encontraron relaciones entre variables, como el ión  $\text{Cl}^-$  y la concentración espermática (-0,98  $P < 0,01$ ), siendo una correlación inversa y altamente significativa, conjunto a ello existe una correlación inversamente proporcional entre la concentración de triglicéridos y el peso del animal (-0,66  $P < 0,05$ ).

Tabla 5. Correlación de las variables evaluadas respecto a la fertilidad

	Peso	Concent.	Esp.	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Gluc.	Coles.	Trigli.	Prot.	Fert.	Osm.
Peso	1	0,96	0,66	0,97	0,08	0,57	0,54	0,98	0,05	0,15	0,62	0,71
Concent.	0,02	1	0,67	0,9	0,04	0,43	0,36	0,4	0,91	0,74	0,54	0,07
Esp.	-0,17	0,18	1	0,13	0,81	0,19	0,55	0,65	0,58	0,72	0,83	0,11
Mg <sup>2+</sup>	-0,02	0,05	-0,55	1	0,63	0,11	0,98	0,65	0,6	0,82	0,74	0,35
Cl <sup>-</sup>	-0,75	-0,98	-0,13	-0,25	1	0,55	0,24	0,15	0,62	0,74	0,68	0,01
K <sup>+</sup>	0,22	-0,32	0,48	-0,57	0,31	1	0,59	0,69	0,64	0,42	0,13	0,88
Gluc.	0,24	-0,37	0,23	0,01	-0,57	0,21	1	0,42	0,75	0,55	0,1	0,07
Coles.	-0,01	-0,35	0,17	-0,18	0,67	0,15	-0,31	1	0,75	0,14	0,29	0,19
Trigli.	-0,66	0,05	0,21	-0,2	0,26	0,18	0,12	-0,12	1	0,86	0,19	0,72
Prot.	0,52	0,14	-0,14	-0,09	0,18	0,31	-0,23	0,53	-0,07	1	0,67	0,56
Fert.	0,19	-0,25	-0,08	-0,13	-0,21	0,55	0,59	-0,39	0,48	0,17	1	0,62
Osm.	-0,16	-0,72	-0,60	0,38	0,95	0,06	-0,66	0,52	-0,15	0,25	-0,21	1

\* Concent= Concentración; Esp= Espermatozoides; Gluc= Glucosa; Coles= Colesterol; Trigli= Triglicérido Prot= Proteína; Fert= Fertilidad; Osm= Osmolaridad

Concent= Concentración; Esp= Espermatozoides; Gluc= Glucosa; Coles= Colesterol; Prot= Proteína; Fert= Fertilidad; Osm= Osmolaridad

## 5. DISCUSIÓN

El volumen seminal encontrado para el presente estudio osciló entre 5 y 9,5 mL. Estos valores fueron mayores que los reportados en la misma especie (1,8 - 4 mL); por Cruz-Casallas *et al.* (2004), y para otros carácidos como el *Brycon henni* ( $0.8 \pm 2.2$  mL) (Tabares *et al.*, 2006); por otra parte, fueron menores a los  $13 \pm 1$  mL reportados en la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), (Ramírez-Merlano *et al.*, 2011). La concentración espermática del yamú en este estudio ( $6,8 \pm 1.4 \times 10^6$  esp/mL), resultó ser inferior a la reportada para ella misma  $12,8 \times 10^6$  esp./uL (Cruz-Casallas *et al.*, 2004), y en otros carácidos como el *Brycon cephalus* ( $9,23 \pm 1,5 \times 10^6$  esp./uL); por Silveira *et al.*, (2006) y *Piaractus brachypomus* ( $30 \times 10^6$  esp./uL); por Fresneda *et al.* (2004).

El tiempo de activación ( $52,3 \pm 4,4$  seg.), fue similar a otros reportes generados para la especie ( $58 \pm 3.1$ ), por Cruz-Casallas *et al.*, (2004); de igual manera Mira *et al.* (2003), reportaron valores similares de  $58 \pm 15,7$  segundos, en el *Brycon henni*. Es importante mencionar depende en gran medida de las propiedades químicas de la solución activadora; por ejemplo, una solución activadora de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 1%, aumentó el tiempo de activación en semen fresco de *Piaractus brachypomus* (Fresneda *et al.*, 2004) y en el semen fresco de *Pseudoplatystoma fasciatum* se triplicó (Pinzón *et al.*, 2005). La inducción hormonal puede afectar el tiempo de activación en *P. brachypomus*, siendo este mayor cuando los individuos fueron inyectados con EHC (Fresneda *et al.*, 2004). La temperatura también puede afectar la movilidad, se ha comprobado que a temperaturas bajas el tiempo de

movilidad aumenta, pero la velocidad de las células espermáticas disminuye (Medina -Robles, Velasco-Santamaría, Cruz- Casallas, 2005).

Los resultados de este trabajo demuestran que la crioconservación afecta los porcentajes de fertilización cuando se compara a la fertilización obtenida con semen fresco. Según Karow (2001), las células espermáticas experimentan una serie de fenómenos propios de la crioconservación que afectan la viabilidad celular y debido a ello, la capacidad de fertilización del semen después del descongelamiento se ve reducida (Tiersch *et al.*, 1998). En Yamú (*B. amazonicus*), se reportan porcentajes de fertilidad con semen congelado por debajo del 45% (Velasco-Santamaría *et al.*, 2006), esta observación concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio 50.5%. En otras especies, los resultados de las pruebas de fertilidad con semen crioconservado fueron del 71%, como lo reportan Ramírez-Merlano *et al.* (2011), en cachama blanca, y de 75% y 81% como lo reportaron Steinberg *et al.*, (1995) y Cabrita *et al.* (2001), respectivamente, para la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Estudios realizados por Bart *et al.*, (1998), en *Ictalurus punctatus*, demuestran la importancia de estandarizar y optimizar los protocolos de crioconservación para cada especie, ya que en dicho experimento se reportan porcentajes de fertilidad con semen crioconservado del 0%.

Las concentraciones de  $Mg^{2+}$  reportadas para este estudio fueron inferiores a las obtenidas por Cruz-Casallas *et al.*, (2004), en *B. amazonicus* (3,48 mmol/L), y por Suarez-Martínez *et al.*, (2013), para *P. brachypomus* ( $10 \pm 0,2$  mmol/L). No obstante, fueron similares a las determinadas para *P. fasciatum* ( $0,3 \pm 0,1$  mmol/L), y *O. mykiss* ( $0,85 \pm 0,13$  mmol/L), (Glogowski, *et al.*,2000; Ramírez-Merlano, *et al.*, 2011).

Por su parte, los valores de  $\text{Cl}^-$  ( $75,8 \pm 4,4$  mmol/L), se presentaron mayores que los reportados por Cruz-Casallas *et al.*, (2004), en *B. amazonicus* (26,4 mmol/L). En relación con *P. brachypomus* ( $122,2 \pm 6,8$  mmol/L); *P. fasciatum* ( $118,2 \pm 5,3$  mmol/L) y *Rhamdia quelen* ( $139,4 \pm 2,1$  mmol/L), los valores de  $\text{Cl}^-$  se mostraron inferiores (Borges *et al.*, 2004; Ramírez-Merlano, *et al.*, 2011 y Suarez-Martínez *et al.*, 2013).

Las concentraciones de  $\text{K}^+$  determinadas se encuentran entre los rangos reportados en *B. amazonicus* y *P. brachypomus* (21,2 mmol/L y  $37,7 \pm 4,9$  mmol/L, respectivamente), (Cruz-Casallas *et al.*, 2004, Suarez-Martínez *et al.*, 2013); por su parte en *P. fasciatum* se reportaron valores de  $4,5 \pm 1$  mmol/L, es decir, por debajo de lo presentado en este estudio.

El semen se compone del paquete celular (espermatozoides) y el plasma seminal (Ciereszko *et al.*, 2000), este último tiene su importancia debido a su función principal que es la de mantener la inmovilidad de los espermatozoides dentro de los ductos espermáticos y además de ello ejercer una función protectora sobre los espermatozoides (Cosson *et al.*, 1997). El plasma o fluido seminal tiene una composición única, y la concentración de sus componentes es específica para cada especie, por lo cual los estudios de las características seminales son necesarios para entender los procesos bioquímicos básicos que ocurren en los mecanismos de activación de la movilidad espermática y durante el proceso de fertilización (Linhart *et al.*, 1991; Coward *et al.*, 2002; Ingermann *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2003; Kowalski *et al.*, 2003; Wojtczak *et al.*, 2003).

Algunos reportes indican que existe una gran variabilidad inter e intraespecie en la composición del plasma seminal y espermatozoides de los peces, concordando así con los resultados aquí observados y sugiriendo diferencias significativas en la

secreción testicular entre individuos de la misma especie, así como en individuos de especies diferentes (Billard *et al.*, 1995). A diferencia de otros vertebrados, el fluido seminal de los peces es caracterizado por una baja concentración de proteína, conteniendo principalmente iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$   $\text{Mg}^{2+}$ ) y una baja concentración de otras sustancias orgánicas como el colesterol, glucosa y lípidos.

Las concentraciones de las variables bioquímicas del plasma seminal evaluadas en este estudio fueron; glucosa ( $6,8 \pm 0,4$  mg/dL), colesterol ( $3,4 \pm 1,9$  mg/dL), triglicéridos ( $18,6 \pm 4,8$  mg/dL) y proteína ( $375 \pm 5,3$  mg/dL). La concentración de glucosa es cercana a los rangos reportados para *B. amazonicus* (5,4 mg/dL), (Cruz-Casallas *et al.*, 2004), mientras que en *P. brachypomus* ( $19,3 \pm 3,3$  mg/dL), Suarez-Martínez *et al.*, (2013), reportó valores son superiores a los presentados en este estudio.

Las concentraciones de colesterol fueron menores a lo mostrado en *B. amazonicus* (15,4 mg/dL), (Cruz-Casallas *et al.*, 2004), mientras que las concentraciones de triglicéridos fueron superiores para *R. quelen* ( $10,9 \pm 0,8$  mg/dL), (Borges *et al.*, 2004).

En la revisión realizada para este trabajo no se encontraron reportes relacionados con valores de proteína seminal en *B. amazonicus*, sin embargo, en especies como *P. brachypomus* los valores para proteína ( $36,1 \pm 18,2$  mg/dL), se mostraron superiores, contrastando con los de *R. quelen* ( $0,6 \pm 0,05$  mg/dL); donde se reportaron valores inferiores a los observados en este estudio.

La osmolaridad del plasma seminal de los animales evaluados (n=8) en este estudio ( $273,5 \pm 15,33$  mOsm/L) se presentó inferior a lo reportado para *Brycon amazonicus* (314,1 mOsm/L) (Cruz-Casallas, Medina-Robles, Velasco-Santamaría, 2007) y

*Oncorhynchus mykiss* ( $322 \pm 21,76$  mOsm/L) (Glogowski et al., 2000). Los resultados de osmolaridad se presentaron similares en *Rhamdia quelen* ( $274,8 \pm 11,12$  mOsm/L) (Borges et al., 2004) y *Esox lucios* ( $283 \pm 33$  mOsm/L) (Alavi et al., 2009), mientras que en *Pseudoplatystoma metaense* ( $259,1$  mOsm/L) (Ramirez-Merlano, Medina-Robles y Cruz-Casallas. 2011) y *Tinca tinca* ( $230 \pm 82$  mOsm/L) (Linhart et al., 2003) los valores fueron inferiores en relación con lo aquí reportado.

Así como ocurre con la composición iónica del plasma seminal, la presión osmótica también puede variar entre individuos. Las variaciones en la presión osmótica observada en la literatura se atribuyen a la inducción hormonal con el propósito de una espermiación fuera de la estación reproductiva (Redondo-Muller et al., 1991).

En el presente experimento se buscaron las posibles relaciones existentes entre las distintas variables evaluadas y la viabilidad espermática posdescongelación a través de las pruebas de fertilidad. No se encontraron, relaciones que demuestren la influencia de alguna de las variables respecto a la fertilidad, sin embargo, se encontraron relaciones entre el ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y concentración espermática (correlación negativa y altamente ( $-0,98$ ;  $P < 0,01$ )), así como entre el  $\text{Cl}^-$  y la osmolaridad ( $0,95$ ;  $P < 0,01$ ).

Aunque los resultados obtenidos no demuestran una relación positiva significativa entre las variables evaluadas y la fertilidad, algunos trabajos reportan correlaciones significativas entre la concentración espermática y calidad seminal (Babiak et al., 2006), así mismo, entre la composición de ácidos grasos y la funcionalidad de las células espermáticas (Asturiano et al., 2001; Lahnsteiner et al., 2009)

Por su parte Tabares et al., (2005), demostraron que variables como el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , junto con la osmolaridad son los principales activadores de la movilidad

espermática en *Brycon henni*, de la misma manera que en *Oncorhynchus mykiss* se encontró que el Na<sup>+</sup>, el Ca<sup>2+</sup> y el ion hidrogenión (H<sup>+</sup>), son los responsables de la activación de la movilidad, siendo el K<sup>+</sup> su principal inhibidor (Krasznai *et al.*, 2000).

En otros estudios Alavi y Cosson (2006), también demostraron que iones como K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> juegan un papel importante en la movilidad espermática de salmónidos y esturiones.

## 6. CONCLUSIONES

Aunque se logró determinar la variación de la calidad y composición seminal en términos de movilidad, tiempo de activación, concentración espermática, espermatozoides, concentración iónica, triglicéridos, colesterol y glucosa no fue posible explicar aún los resultados de la variación de la fertilidad posdescongelación en la especie estudiada.

No fue posible establecer algún efecto de las variables estudiadas sobre parámetros de calidad seminal como movilidad y fertilidad posdescongelación

## 7. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios posteriores en el tema, con el fin de encontrar relaciones existentes entre las variables estudiadas y la capacidad de fertilización por parte de las células espermáticas. En ese caso sería óptimo realizar mediciones consecutivas de las variables utilizando un mayor número de animales.

Próximas investigaciones deberían orientarse a estudiar la viabilidad en ambientes comerciales a través del seguimiento y evaluación de la calidad de la semilla obtenida a partir del semen crioconservado.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Aas, G.H., Refstie, T. and Gjerde, B. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture* 95: 125-132.

Ali Canyurt, Süleyman Akhan. (2008). Effect of Ascorbic Acid Supplementation on Sperm Quality of Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8: 171-175.

Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets, S, et al. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology* 2009; 72: 32-43.

Alavi, S., Rodina, M., Policar, T., & Linhart, O. (2009). Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(4), 430-437.

Alavi, S. M. H., & Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell biology international*, 30(1), 1-14.

Arias, JA. (1990). Apuntes sobre la biosistemática de la Cachama Blanca *Piaractus brachypomus*. *Memorias XXI Congreso Latinoamericano de Zoología*.

Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J.C., Bromage, N., 2001. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* 194, 173–190.

Arias CJA. Contribución al conocimiento biológico de los peces de los Llanos, yamu (*Brycon siebenthalae*) y sapuara (*Semaprochilodus laticeps* cf.), con fines de cultivo. Informe final de investigación. UniLlanos-Colciencias; Villavicencio; 1995. 63P.

Arias CJA. Biología reproductiva del yamœ *Brycon siebenthalae* (Teleostei, Characidae) en cautiverio. Tesis de doctorado, Universidad del Valle, Cali, 2002. 112p.

Arias, J., Zaniboni, E., Pardo, S., Vásquez, W., & Atencio, V. (2004). Breeding and domesticating *Brycon siebenthalae* females for reproduction. *Acta Scientiarum Animal Science*, 262, 159-163.

Arias, JA. (2006). Estado actual del conocimiento sobre el yamú. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 125-133.

Babiak, I., Glogowski, J., Luczynski, M., & Luczynski, M. (1997). Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. 1997; 28:191–7. *Aquaculture Research*, 28, 191-197.

Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Johnsen, S., 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* 65, 1587–1604.

Bell, M.V., Dick, J.R., Thrush, M., Navarro, J.C., 1996. Decreased 20:4n–6/20:5n–3 ratio in sperm from cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared with wild fish. *Aquaculture* 144, 189–199.

Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Develop.* 26: 877-920.

Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S., & Pourkazemi, M. (2004). Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 236, 1-9.

Billard R, Cosson J, Perchec G, Linhart O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 1995; 124:95e112.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (Rhamdia quelen). *Fish Physiol. Biochem.* 30: 21–25.

Borges, A., Siqueira, D. R., Jurinitz, D. F., Zanini, R., do Amaral, F., Grillo, M. L., . . . Wassermann, G. F. (2005). Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 31(1), 45-53.

Butts, I., Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M., Słowińska, M., Soler, C., & Trippel, E. (2011). Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, (*Gadus morhua*) *Theriogenology*, 75(7), 1290-1300.

Butts, I., Litvak, M., & Trippel, E. (2010). Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic *Gadus morhua*. *Theriogenology*, 73(7), 873-885

Butts, I., Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M., Słowinskad, M., Soler, C., & Tripel, E. (2011). Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod (*Gadus morhua* L). *Theriogenology*, 75, 1290–1300.

Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., & Herraiez, M. (2001). Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, 201, 301-304.

Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M., & Bonet, S. (2009). Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, 72, 930-948.

Ciereszco and Konrad Dabrowski (1993). Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. School of

Natural Resources, The Ohio State University, 2021 Coffey Road, Columbus, Ohio 43210, U.S.A. Fish Physiology and Biochemistry vol. 12 no. 5 pp 357-367

Ciereszko A, Glogowski J, Dabrowski K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of fresh water fishes. In: Tiersch TR, Mazik PM, editors. Cryopreservation in aquatic species. Louisiana: WAS, Baton Rouge; 2000. p. 20e48.  
Cifuentes, R. (1999). *Composición nutricional de la carcaza de yamú en cinco etapas de cultivo*. Tesis, Universidad de La Salle, Bogotá.

Clavijo, A., & Arias, C. (2004). Avances en el estudio de la embriología del yamú, *Brycon siebenthalae* (Pisces:Characidae). *Dahlia Revista Asociación Colombiana de Ictiología*, 7, 37-48.

Coser A, Godinho H. Capacidade de fertilizacao de ovocitos e semen de curimata pacu (*Prochylodus marggravii*) em condicoes experimentais. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia, 9ª Brasilia, DF, 1987: 884p.

Cosson J, Billard R, Cibert C, Dreanno C, Linhart O, Suquet M. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. *Pol Arch Hydrobiol* 1997;44(1e2): 103e13

Coward K, Bromage NR, Hibbitt O, Parrington J. Gametogenesis, fertilization and egg activation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fish* 2002; 12:33e58.

Cruz-Casallas, P. E. (2001). Técnicas de laboratorio para la evaluación de la calidad. *Orinoquía*, 5((1)), 155 - 163.

Cruz-Casallas, P., Pardo-Carrasco, S., Arias Castellanos, J., Lombo-Castellanos, P., DA, L.-R., & Pardo-Mariño, J. (2004). Cryopreservation of Yamu Brycon siebenthalae Milt. *Journal Of World Aquaculture Society*, 35(4), 529-535.

Cruz-Casallas, P. E., Y. M. Velasco-Santamaría, M. P. Ramírez-Ordoñez, V. M. Medina-Robles and M. Olivera-Ángel (2004). Determinación de algunas características bioquímicas del plasma seminal del yamú (Brycon siebenthalae). Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura, X Jornada de Acuicultura IALL. 114-115.

Cruz-Casallas, P. E., Lombo-Rodríguez, D. A., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2005). Milt quality and spermatozoa morphology of captive Brycon siebenthalae (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research*, 36(7), 682-686.

Cruz Casallas, P., Medina Robles, V., & Velasco Santamaría, Y. (2009). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (Brycon amazonicus). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 152-159.

Cruz Casallas, P. E., Velasco Santamaría, Y. M., & Medina Robles, V. M. (2006). Determinación del espermatozocito y efecto del volumen de la dosis semillante sobre la fertilidad en yamú (Brycon amazonicus). *Rev. colomb. cienc. pecu*, 19(2), 140-145.

Díaz & López. (1995). *Fundamentos de Acuicultura Continental* (1ra. Edición ed.). Bogotá: INPA.

Eslava, P., Suárez, H., Pardo, S., Arias, J., & Cruz, P. (2001). Morfología macro y microscópica del esófago, estómago y ciegos pilóricos del yamú *Brycon siebenthalae*. *Orinoquía*, 5, 111-128.

Flogli Da Silveira W, Kavamoto ET, Cestarolli MA. Quali-quantitativa e preservacao criogenica do semen do pacú *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), provenientes de reproducao induzida. Anais do XV Congresso Brasileiro de Zoologia 1988; Curitiba, Paraná, Brasil: 283.

Flogli Da Silveira W, Kavamoto ET, Cestarolli MA, Godinho H, Ramos S, Salveira . Avaliacao spermatica, preservacao criogenica e fertilidade do semen do Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), proveniente de reproducao induzida. B. Inst. Pesca 1990; 17: 1-13.

Glogowski J, Kwasnik M, Iros B, Dabrowski K, Goryczko K, Dobosz S, et al. (2000) Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation successes. *Aquat Res*;31:289e96.

Herrera, D., Eslava, P., & Iregui, C. (1996). Aspectos de anatomía macro y microscópica del bazo de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *ACOVEZ*, 21(1), 16 - 21.

Howes, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei:Characoidei). *Bull Br Mus Nat Hist (Zool.)*, 43, 1 - 47.

Ingermann R, Holcomb M, Robinson ML, Cloud JG. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *J Exp Biol* 2002; 205:2885-90.

Itoh A, Inaba K, Ohtake H, Fujinoki M, Morisawa M. Characterization of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:855-61.

Kowalski R, Wojtczak M, Glogowski J, Cierieszko A. Gelatinolytic and antitrypsin activities in seminal plasma of common carp: relationship to blood, skin mucus and spermatozoa. *Aquat Living Resour* 2003; 16:438-44.

Labbe, C., & Maisse, G. (1996). Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*, 145, 281-294.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., & Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54, 1477–1498.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., & Patzner, R. (1996). Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation. *Journal of Applied Aquaculture*, 6(4), 47-73.

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *J Fish Physiol Biochem* 1996; 15:167-79.

Lahnsteiner, F., Mansour, N., McNiven, M.A., Richardson, G.F., 2009. Fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: composition and effects on sperm functionality. *Aquaculture* 298, 118–124.

Linhart O, Slechta V, Slavik T. Fish sperm composition and biochemistry. Bull Inst Zool Acad Sin Monogr 1991; 16:285-311.

Landines, M. (1995). Inducción de la reproducción del yamú *Brycon siebenthalae* a partir de extracto de hipófisis de carpa (EPC). *Boletín Científico INPA*, 3, 5-17.

Linhart O, Rodina M, Bastl J, Cosson J. (2003) Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). *J Appl Ichthyol*;19:177e81.

López, Y., Vásquez, W., Arias, J., & Wills, A. (2004). Evaluación de diferentes proporciones de energía/proteína en dietas para juveniles de yamú, *Brycon siebenthalae* (Eigenmann, 1912). *Rev Orinoquia* 2004; 8:64-76. *Orinoquia*, 8, 64-76.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.

MADR, FAO, & INCODER. (2011). *Diagnóstico del Estado de la Acuicultura en Colombia (Documento para página Web)*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - Instituto Colombiano de Desarrollo Rural, Bogotá.

MADR-IICA. (2012). *Agenda Nacional de Investigación en Pesca y Acuicultura*.

Medina Robles, V. M., Velasco Santamaria, Y. M., & Cruz Casallas, P. E. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34 - 48.

Medina-Robles, V., Velasco-Santamaría, Y. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2007). Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (*Brycon amazonicus*). *Archivos de medicina veterinaria*, 39(3), 229-237.

Mira, t.; f. Montoya; c. Tabares; a. Tarazona; s. Jara y m. Olivera. 2003. Parámetros fisicoquímicos y descripción morfológica en semen de sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16 (Suplemento): 80.

Muller, K., Muller, P., Pincemy, G., Kurz, A., & Labbe, C. (2008). Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: Consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biol Reprod*, 78, 390-399.

Muñoz, D., Vásquez, W., & Cruz, P. (1991). Reproducción inducida de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) con mGnRHA. *Boletín Red de Acuicultura*, 5(3), 3-6.

Navarro, O., Velasco Santamaría, Y., & Cruz Casallas, P. (2004). Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(Suplemento), 53-59.

Pardo, S., & Suárez, M. (1991). *Evaluación de tres niveles de administración de alimento en el periodo de ceba de la Cachama Blanca (Piaractus brachypomus)*. Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Los Llanos, Villavicencio

Pena, F., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodriguez-Martinez, H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78, 85-98.

Penaranda, D., Perez, L., Gallego, V., Jover, M., & Asturiano, J. (2009). Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. *Cryobiology*, 59, 119-126.

Phronen, J. (1994). Composition and cryopreservation of sperm of some Finnish teleost fish. *Finnish Fish Res.*, 15, 27 - 48.

Pinzón-Arciniegas, S. M.; Mojica-Rodríguez, J.E. y Cruz-Casallas, P.E. (2005). Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum Linnaeus, 1766*) Revista Orinoquia vol.9 N°2

Pustowka, C., McNiven, M., Richardson, G., & Lall, S. (2000). Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquaculture Research*, 31, 297-305.

Ramirez-Merlano, J., Velasco-Santamaría, Y., Medina-Robles, V., & Cruz-Casallas, P. (2011). Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). *Aquaculture Research*, 42, 738-745.

Ramirez-Merlano, Medina-Robles, Cruz-Casallas. (Enero - Abril de 2011). Variación estacional de las características seminales del bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Telostei, Pimelodidae). *Revista MVZ Córdoba*, 16((1)), 2336-2348.

Ramírez-Merlano, Velasco-Santamaría, Medina-Robles & Cruz-Casallas. (2011). Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). *Aquaculture Research*, 42, 738 - 745.

Redondo-Muller C, Cosson MP, Cosson J, Billard R. (1991) In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. *Mol Reprod Dev*;29: 259e70.

Scott, A.1'. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17: 707--739.

Steinberg H.A., Hedder R., BaulainY. & HoltzW. (1995) Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws. In: Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish (ed. By F.W. Goetz & P. Thomas), pp. 146. Austin, TX, USA: University of Texas at Austin.

Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: *Fish Physiology*. Vol. IX B, pp. 305-350. Edited by W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson. Academic Press, New York.

Suarez-Martínez, R.O.; Jimenez-Molina, W.R.; Sandoval-Vargas, L.Y-; Bernal-Buitrago, G.F.; Valderrama-Diaz, J.A. Ramírez-Merlano, J.A.; Medina-Robles V.M.; Cruz-Casallas P.E. (2013). Determinación de algunas variables bioquímicas del plasma seminal de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), obtenido por inducción hormonal.

Tabares Serna, C. J. (2013). Evaluación del efecto de algunos iones sobre la activación de la movilidad espermática y el potencial de membrana en *Brycon henni*.

Tabares, C. J., A. Tarazona and M. Olivera-Angel (2005). "Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce " Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 18(2): 149-161.

Tabares CJ, Montoya AF, Arboleda L, Echeverri A, Restrepo LF, Olivera-Ángel M. Efecto de la pluviosidad y el brillo solar sobre la producción y características del semen en el pez *Brycon henni* (Pisces: Characidae). Rev Biol Trop 2006; 54 (1): 179-187.

Tiersch TR, Williamson JH, Carmichael GJ, Gorman OT. Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. Transactions of the American Fisheries Society 1998; 127: 95-104.

Vassallo-Agius, R., Watanabe, T., Yoshizaki, G., Satoh, S., Takeuchi, Y., 2001. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n-3 essential fatty acid-deficient and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. Fish. Sci. 67, 818-827.

Velasco-Santamaría, Y., Medina-Robles, V., & Cruz-Casallas, P. (2006). Cryopreservation of yamu (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture, 256, 264-271.

Wojtczak M, Glogowski J, Koldras M, Kucharczyk D, Ciereszko A. Characterization of protease inhibitors of seminal plasma of cyprinids. Aquat. Living. Resour. 2003;16:461e5.

## 9. ANEXOS

Fotografía 1. Tanque circular; lugar de mantenimiento de los peces una vez son pescados



Fotografía 2. Yamú inmovilizado, proceso pre-eyaculación



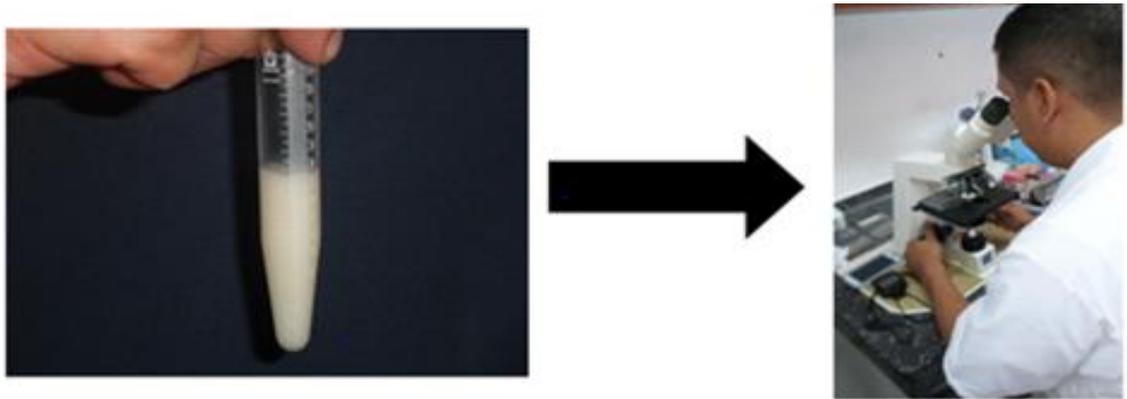
Fotografía 3 Desove de una hembra Yamú



Fotografía 4. Eyaculado de un macho, tras inducción



Fotografía 5. Evaluación seminal



Fotografía 6. Centrífuga y rotor, usados para determinación de espermatozoides



Fotografía 7. Distribución de las incubadoras experimentales en los tratamientos de evaluación



Fotografía 8. Oocitos fecundados contenidos en una incubadora experimental



Fotografía 9. Tanques de Nitrógeno líquido (izquierda), Dry Shipper (derecha)

