

**EFFECTO DEL VOLUMEN DE EMPAQUE, EL TIEMPO Y TEMPERATURA DE
DESCONGELACIÓN EN LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE
BOCACHICO *Prochilodus magdalenae***

REINALDO RAFAEL CANO CUELLO

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DIVISIÓN DE POSTGRADOS
SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
MONTERÍA - CÓRDOBA
2020**

**EFFECTO DEL VOLUMEN DE EMPAQUE, EL TIEMPO Y TEMPERATURA DE
DESCONGELACIÓN EN LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE
BOCACHICO *Prochilodus magdalenae***

REINALDO RAFAEL CANO CUELLO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magíster
en Ciencias Ambientales**

**Víctor Julio Atencio García, MSc.
José Alonso Espinosa Araujo, MSc.
Directores**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DIVISIÓN DE POSTGRADOS
SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
MONTERÍA - CÓRDOBA
2020**

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Montería, febrero de 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Sistema de Universidades Estatales del Caribe SUE- Caribe y a la Universidad de Córdoba, la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en Ciencias Ambientales.

Al Instituto de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba CINPIC, por su contribución con la infraestructura, equipos y materiales necesarios para la realización de esta investigación.

A los profesores Víctor Julio Atencio García y José Alonso Espinosa Araujo, por su tiempo e incondicional orientación durante la realización de esta investigación.

A todos los colegas, amigos y trabajadores de campo del CINPIC por el apoyo, motivación y confianza.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza necesaria para salir adelante y guiarme siempre por su camino, a mi abuela, madre y tía que siempre han estado conmigo apoyándome y brindándome su amor incondicional, a cada una de las personas que contribuyeron a este logro. Gracias.

Reinaldo

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GENERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1 BIOECOLOGIA DE LA ESPECIE	14
3.2 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE PECES	16
3.2.1 Generalidades de la criopreservación	16
3.2.2 Aspectos a considerar en protocolos de criopreservación	17
3.3 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE PECES EN COLOMBIA	22
4 MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 ÁREA DE ESTUDIO	25
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO	25
4.2.1 Obtención de productos sexuales	25
4.3 TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	26
4.4 EVALUACIÓN SEMINAL	28
4.4.1 Movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total y velocidades espermáticas	28
4.4.2 Duración de la movilidad	28
4.4.3 Concentración espermática	29
4.5 TASA DE FERTILIZACIÓN Y ECLOSIÓN	29

4.5.1 Calidad de agua en la incubación	30
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
5. RESULTADOS	31
5.1 CARACTERÍSTICAS SEMEN FRESCO	31
5.2 CARACTERÍSTICAS SEMEN DESCONGELADO	32
5.2.1 Movilidad total y tipos de movilidad	32
5.2.2 Progresividad total y velocidad espermática	33
5.3 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE SEMEN CRIOPRESERVADO	34
5.3.1 Fertilización	34
5.3.2 Eclosión	35
5.4 EFECTO DE FACTORES EVALUADOS Y SU INTERACCIÓN	36
6. DISCUSIÓN	37
6.1 SEMEN FRESCO	37
6.2 MOVILIDAD TOTAL Y TIPOS DE MOVILIDAD	38
6.3 PROGRESIVIDAD TOTAL Y VELOCIDAD ESPERMÁTICA	41
6.4 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO SEMEN CRIOPRESERVADO	44
6.4.1 Fertilización	44
6.4.2 Eclosión	47
6.5 INTERACCIÓN DE FACTORES EVALUADOS	47
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA	41
9. ANEXOS	60

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reporte de estudios realizados en Colombia relacionados con protocolos de crioconservación de semen de peces.	23
Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación de dos volúmenes de empaque (ml), dos temperaturas (°C) y dos tiempos de descongelación (s) de semen crioconservado de Bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> .	27
Tabla 3. Características de semen fresco de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> obtenido mediante inducción hormonal. Valores mostrados como media \pm ds.	29
Tabla 4. Características del semen criopreservado de <i>Prochilodus magdalenae</i> empacado en pajillas de 0.5 y 2.5 ml y descongeladas a dos temperaturas y cuatro tiempos de descongelación. Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm ds.	33
Tabla 5. Efectos de la interacción de los factores evaluados, sobre variables de calidad seminal en <i>Prochilodus magdalenae</i> . Ns, no significativo ($p > 0.05$),* significativo,** muy significativo,*** altamente significativo.	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Ejemplar adulto de bocachico. Fotografía Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba (CINPIC).	14
Figura 2. Porcentajes de fertilización en semen crioconservado de bocachico <i>Prochilodus magdalenae</i> . Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm ds.	35
Figura 3. Porcentajes de eclosión en semen crioconservado de <i>Prochilodus magdalenae</i> . Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm ds.	36

RESUMEN

Bocachico *Prochilodus magdalenae* es la principal especie de la pesca continental colombiana; sin embargo, en los últimos 40 años sus capturas han sufrido un fuerte descenso. Entre las causas de este declive se señalan la degradación ambiental, pérdida de planos inundables y la fuerte presión pesquera. Esta situación ha conducido a declararla en categoría vulnerable según los criterios de la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza. La crioconservación de semen es una herramienta para la conservación *ex situ* de especies amenazadas o en peligro de extinción; así como favorecer la disponibilidad de gametos por fuera de la época reproductiva. A pesar que existen protocolos de criopreservación de bocachico, aún son necesarios ajustes para lograr su estandarización, por tanto el objetivo del estudio fue evaluar el efecto del volumen de empaque, temperatura, y tiempo de descongelación sobre la calidad del semen criopreservado de bocachico; para lo cual se obtuvo semen mediante inducción hormonal con EPC® a razón de 5 mg/kg de peso vivo, se evaluó y se diluyó (1:4) en una solución compuesta por DMSO 10%, glucosa 6% y yema de huevo 12%; se empacaron en dos volúmenes de pajillas (0.5 y 2.5 ml). Se congeló en vapores de nitrógeno en un termo dry shipper y después de 6 meses se descongelaron a dos temperaturas (35 y 60°C) y cuatro tiempos de descongelación (30, 60, 90 y 120 s). En total se evaluaron 16 tratamientos en un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2x2x4 (dos volúmenes de empaque, dos temperaturas de descongelación y cuatro tiempos de descongelación). La calidad del semen fresco y post-descongelación se realizó con el software Sperm Class Analyzer (Microptic, SCA®, España), analizando la movilidad total, tipos de movilidad, progresividad y velocidades espermáticas. Además, se evaluó la capacidad fecundante del semen criopreservado en una muestra de ovocitos de 1 g (1288±182) mediante las tasas de fertilización y eclosión. Se encontró que el factor temperatura afectó de manera independiente todas las variables de calidad seminal y desempeño reproductivo ($p < 0.05$). No hubo efecto del resto de factores de manera independiente a excepción del volumen de empaque el cual afectó la eclosión. La interacción de la temperatura y volumen de empaque afectaron significativamente el desempeño reproductivo, mientras que la interacción entre los tres factores evaluados afectó el porcentaje de espermatozoides lentos y estáticos, así como las variables de desempeño reproductivo. Los resultados del estudio sugieren, que bajo la solución crioprotectora utilizada se puede lograr una mayor capacidad fecundante en bocachico, se deben utilizar pajillas de 2.5ml descongeladas a 60°C durante 60s, puesto que, aunque no se obtuvo los mejores porcentajes de fertilidad, el volumen seminal almacenado en estas pajillas es cinco veces más que las de 0.5ml, por lo compensaría y sobrepasaría la cantidad final de ovocitos que potencialmente podría fertilizar el uso de una sola pajilla de 2.5ml.

Palabras claves: Conservación, espermatozoides, fecundación, movilidad, peces, reproducción.

1. INTRODUCCIÓN

El Bocachico *Prochilodus magdalenae* es la principal especie de la pesca continental colombiana, aunque su captura ha disminuido bruscamente (66.5%) en los últimos 40 años; pasando de 38.000 ton en 1978 a 12.728 ton 2017 (SEPEC, 2017).; lo cual ha llevado a categorizarla como una especie vulnerable de acuerdo a los criterios de la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza (UICN); entre las causa de esta drástica disminución se destacan la degradación de su ambiente, pérdida de planos inundables, construcción de hidroeléctricas y la fuerte presión pesquera, entre otros (Mojica et al., 2012). Además, es una especie con importancia piscícola por lo que la demanda de alevinos de esta especie, se ha incrementado en virtud de la expansión de su cultivo y la ejecución de programas de repoblamiento en las principales cuencas hidrográficas del país (Atencio, 2010).

La criopreservación de semen es una herramienta que permite el mejoramiento genético de las especies de interés comercial, la conservación *ex situ* de especies amenazadas o en peligro de extinción; así como favorecer la disponibilidad de gametos por fuera de la época reproductiva (Bobe & Labbé, 2010, Yildiz et al., 2013; Cabrita et al., 2014). En bocachico se han evaluado diferentes protocolos de criopreservación, teniendo como principales factores; el volumen de empaque, temperatura y tiempos de descongelación; siendo las pajillas de 0.5ml y la descongelación a 60°C y 30°C durante 8 y 16 segundo las más evaluadas (Martínez et al., 2012; Martínez & Pardo 2013). Así mismo se han hecho estudios en donde se usaron pajillas de 2.5ml y 5ml, con curva de descongelación de 60°C por 45 segundos (Atencio et al., 2013 & 2015).

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). Debido a que la criopreservación del semen en las distintas especies, varían de acuerdo a diferentes factores que influyen en el éxito de las metodologías utilizadas, incluido el origen de los reproductores, la calidad inicial del esperma, la composición del diluyente, la relación de dilución, la concentración de crioprotectores, curvas de congelación/descongelación, volumen de empaque de semen (Butts et al., 2013; Balamurugan & Munuswamy 2017) y la proporción semen: ovocito (Atencio et al., 2013).

Debido principalmente a la variación de respuestas que se obtiene cuando se aplican protocolos de criopreservación ya establecidos sobre diferentes especies, el presente estudio se planteó como objetivo evaluar el efecto que tiene el volumen de empaque, la temperatura y el tiempo de descongelación sobre la calidad espermática del semen criopreservado de bocachico, con el fin de contribuir a la conservación del material genético (espermatozoides) para esta especie amenazada por diferentes actividades antrópicas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del volumen de empaque y la curva de descongelación sobre la calidad espermática del semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la calidad del semen descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes volúmenes de empaque y curvas de descongelación.
- Determinar la capacidad fecundante del semen descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* mediante la tasa de fertilización y eclosión.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 BIOECOLOGÍA DEL BOCACHICO

El bocachico *Prochilodus magdalenae* (Steindachner, 1878) pertenece al Orden Characiformes, suborden Characoidei y a la familia *Prochilodontidae* (Taphorn, 1992).



Figura 1. Ejemplar adulto de bocachico. Fotografía Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba (CINPIC).

Según DoNascimento et al. (2017) el bocachico se cataloga como una especie endémica la cual se distribuye principalmente en las cuencas del río Magdalena, Cauca y ríos de la región del Caribe Colombiano Hasta aproximadamente 1000 msnm pudiendo llegar a los 1500 msnm (Dahl, 1971). Este pez de comportamiento migratorio, es la principal especie de la pesquería continental colombiana, sin embargo, su captura pasó de 38.000 ton en 1978 a 12.728 ton 2017 (SEPEC, 2017). Entre las causas de esta drástica disminución se señalan el deterioro ambiental de su hábitat ocasionado por la contaminación orgánica e inorgánica, desecación de las ciénagas, construcción de hidroeléctricas, así como la sobrepesca (García et al., 2011).

El bocachico es un pez reofílico que realiza dos migraciones, una llamada reproductiva o de subienda; la cual por lo general se inicia una vez ha disminuido el volumen de agua en las ciénagas. La segunda migración denominada trófica o bajanza, se presenta una vez ha desovado en las partes altas de los ríos retornando a las ciénagas de origen (Atencio-García et al., 2013). Los huevos son semi-pelágicos, sufren una fuerte hidratación y son incubados en los cauces principales de los ríos; después de la eclosión, las larvas son transportadas por los ríos y caños para finalmente llegar a las ciénagas o planos inundables donde inician su alimentación exógena (Atencio-García et al., 2013).

El inicio de su alimentación exógena se presenta entre las 44 y 48 horas post-eclosión a temperaturas entre 27.5 y 29°C (Atencio-García et al., 2003); en ese momento aún mantiene reservas vitelínicas equivalentes al 34% de las mostradas en el momento de la eclosión y presenta una abertura bucal máxima de 671 ± 12.8 μm equivalente al 12% de su longitud total; sin observarse conducta caníbal (Atencio-García et al., 2013) definieron que el periodo mínimo necesario de manejo de la primera alimentación, con nauplios de *Artemia* sp., es de por lo menos tres días antes de ser llevados a los estanques de alevinaje. Las ciénagas son sus lugares de alimentación, permaneciendo allí durante el periodo lluvioso donde encuentran su alimento y acumulan energía en forma de grasa cavitaria, la cual es utilizada para la maduración de los ovocitos Atencio-García et al. (2015). En el río la reproducción ocurre en periodo lluvioso, abarcando los meses de mayo a agosto (Atencio-García, 2015).

Esta especie ha sido considerada como alternativa para la piscicultura extensiva y semi-intensiva por las ventajas que representa su régimen alimentario detritívoro. Su cultivo se realiza a densidades menores de 1 pez/m², siendo común en policultivos con especies omnívoras como la cachama negra (*Colossoma macropomum*), cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y las del género

Oreochromis. Por lo que se ha convertido en la cuarta especie más cultivada en Colombia; por lo que la demanda de alevinos del bocachico se ha incrementado en virtud de la expansión de su cultivo y por la ejecución de programas de repoblamiento en las principales cuencas hidrográficas del país (Atencio et al, 2013).

3.2 CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN PECES

3.2.1 Generalidades de la criopreservación. 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 °C en la que se detiene la actividad metabólica, permitiendo su preservación por periodos de tiempo indefinidos (Novoa-Rodríguez, 2014). La crioconservación seminal, ha evolucionado considerablemente desde el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol (Polge et al., 1949), permitiendo que el semen crioconservado sea utilizado y reconocido como un método para la reproducción asistida en varias especies de animales (Ramírez-Merlano, 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 (Cruz-Casallas et al., 2006; Ramírez-Merlano et al., 2010). Sin embargo, en algunos teleósteos los procesos de crioconservación han generado motilidad espermática postdescongelación por encima del 50% utilizando como crioprotector DMSO 5% en *Colossoma macropomum* (Varela et al., 2015), lo cual ha sido relacionado con una serie de factores y cambios biofísicos durante el proceso de congelación y descongelación. Este proceso ha

sido estudiado con una amplia trayectoria en salmónidos y ciprínidos (Figuroa et al., 2016).

La crioconservación de semen de peces puede ser utilizada como herramienta para la conservación de los recursos genéticos en especies de peces comercialmente importantes y en peligro de extinción (Martínez & Pardo, 2010), permitiendo optimizar los procesos reproductivos en cautiverio, manejo simplificado de los reproductores, aumentar frecuencias 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 (Cabrita et al., 2010). 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-Merlano, 2011).

3.2.2 Aspectos a considerar en protocolos de criopreservación. 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 & Labbé, 2010; Cabrita et al., 2010; Asturiano et al., 2016). 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 (Asturiano et al., 2016). 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.

Crioprotectores y diluyentes. Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de crioconservación, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado; 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 (Chanatasig-Chicaiza, 2015).

Así entonces encontramos diversas sustancias distribuidas en dos grupos de acuerdo a 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 (Sambu, 2015); además, se pueden aplicar antioxidantes y otros compuestos buscando intentar reducir la muerte celular en el ciclo de congelación y descongelación (Safa et al., 2016; Krauskova et al., 2016; Amidi et al., 2016).

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).

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-Condoy, 2017).

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 y 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 la especie 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 (Martínez et al., 2012; Atencio et al., 2013; 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 (Cruz-Casallas et al., 2006; Ramírez-Merlano et al., 2011; Atencio-García et al., 2017). 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 expuesto arriba crea la necesidad de evaluar el semen post-descongelación, ya que se pueden evidenciar 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 (Ramírez-Merlano et al., 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% (Navarro et al., 2004; Velasco-Santamaría et al., 2006). Otros autores como Atencio-García et al. (2013) 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, este mismo autor reporta curva de descongelación de 35°C por 90 segundos, al evaluar el semen crioconservado de *Sorubim cuspicaudus* con ETG 5%, con buenos índices de desempeño reproductivo (Atencio-García et al., 2015).

Ramírez-Merlano (2011) en *Pseudoplatystoma metaense* registraron tasas de fertilidad hasta un 79% con semen criopreservado.

Volumen de empaqueo de pajillas. Tradicionalmente se ha utilizado pajillas de empaque 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 (Brown et al., 1991; 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 esperma 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* (Chen et al., 2004), *Beryx decadactylus* (Liu et al., 2006), *Cyprinus carpio*

(Miskolczi y Miha, 2007), *Gadus morhua* (Butts et al., 2011), *Hippoglossus hippoglossus* (Ding et al., 2011), *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner et al., 1997). *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* (Richardson et al., 2000), *Polyodon spathula* (Brown & Mims, 1999) y *Silurus glanis* (Bart et al., 1998), 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 esperma preservado podría mejorarse adoptando estándares de relación de dilución más bajos (Ding et al., 2011). Estudios más recientes como el de Varkonyi et al. (2018) donde evaluó el semen crioconservado de *Cyprinus carpio* utilizando pajillas de hasta 10ml y descongelaciones a 40°C durante 4 minutos, reportan datos prometedores de calidad seminal para la producción a gran escala de dicha especie.

3.3 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 crioprotectoras que disminuyan los efectos tóxicos y de criodaños 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 et al., 2005).

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 crioprotectores y diluyentes para disminuir los efectos tóxicos y el criodaño sobre la célula espermática (Medina-Robles 2005, Martínez 2010, Martínez 2011). En la tabla 2, se presentan algunos de los trabajos investigativos de crioconservación de semen, en diferentes especies de peces de gran importancia acuícola nacional.

Tabla 1. Reporte de estudios realizados en Colombia relacionados con protocolos de crioconservación de semen de peces.

Especie	Objetivos	Referencia
<i>Colossoma macropomum</i>	Evaluar tres diferentes agentes crioprotectores, dos sistemas de empaque y su efecto sobre la calidad postdescongelación del semen de cachama negra (<i>Colossoma macropomum</i>) sometido a procesos de crioconservación.	Medina-Robles et al. (2019)
<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>	Evaluación del efecto de tres crioprotectores DMSO ¹ , DMA ² y ETG ³ en diferentes volúmenes de empaque.	Herrera-Cruz et al. (2018)
<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>	Evaluación de la calidad del semen en la fase de precongelación, diluido en las soluciones crioprotectoras (1:3) durante cinco minutos.	Herrera-Cruz et al. (2018)
<i>Brycon moorei</i>	Evaluar calidad seminal postdescongelación, crioconservado con diferentes concentraciones de DMSO ¹ .	Atencio-García et al. (2017)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	Evaluar seis proporciones diferentes entre espermatozoides/ovocito utilizando semen crioconservado y fresco.	Atencio-García et al. (2015)
<i>Brycon henni</i>	Evaluar efecto de tres crioprotectores (DMF ⁴ , DMSO ¹ y ETG ³ sobre parámetros de movilidad y vitalidad en el semen pos descongelado.	Pineda-Santis et al. (2015)
<i>Sorubim cuspicaudus</i>	Evaluación de la calidad del semen crioconservado utilizando como crioprotector, tres niveles de inclusión (5,10, 15%) de ETG ³ .	Atencio-García et al. (2014)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	Se evaluó el efecto de DMA ² como crioprotector a tres concentraciones 8% (0.85M), 10%(1.07M) y 12% (1.29M).	Atencio-García et al. (2013)
<i>Prochilodus magdalenae</i>	Determinar tasas de congelación y descongelación para mantener la viabilidad	Martínez & Pardo (2013)

	espermática postdescongelación.	
<i>Prochilodus magdalenae</i>	Estudio de la fragmentación del ADN ⁵ y daño en la membrana espermática después de la crioconservación con DMSO ¹ y glucosa.	Martínez et al. (2012)
<i>Pseudoplatystoma metaense</i>	Evaluaron diferentes protocolos de crioconservación de semen (efectos de diluyentes, tasa de congelación, movilidad y criodaños).	Ramírez-Merlano et al. (2011)
<i>Brycon amazonicus</i>	Se determinó efecto del tamaño de la pajilla y temperatura de descongelación sobre la calidad espermática.	Velasco-Santamaría et al. (2006)
<i>Brycon amazonicus</i>	Evaluación de diferentes sustancias crioprotectoras, curvas de congelación y volúmenes de empaque sobre calidad seminal post descongelado.	Cruz-Casallas et al. (2006)
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Caracterizar el semen de la especie, evaluar la toxicidad del DMSO ¹ sobre la movilidad espermática.	Pinzón-Arciniegas. (2004)
<i>Piaractus brachypomus</i>	Efectos de DMSO ¹ , MET ⁶ y ETG ³ sobre la calidad del semen post descongelado	Ramírez et al. (2005)
<i>Piaractus brachypomus</i>	Evaluar la calidad y fertilidad del semen crioconservado con cinco sustancias crioprotectoras: GLY ⁷ , DMSO ¹ , MET ⁶ , PPG ⁸ y ETG ³ .	Navarro et al. (2004)

Fuente: Recopilación del autor con referentes bibliográficos.

¹Dimetilsufoxido, ²Dimetilacetamida, ³Etilenglicol, ⁴Dimetilformamida, ⁵Acido desoxirribonucleico, ⁶Metanol, ⁷Glicerol y ⁸Propilen glicol.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones Piscícola de la Universidad de Córdoba (CINPIC), ubicado en el municipio de Montería, departamento de Córdoba, cuyas coordenadas geográficas son 8° 47.5' Latitud Norte y 75° 51.8' Longitud Oeste, con una altitud de 15 metros sobre el nivel del mar, humedad relativa del 80%, precipitación promedio anual de 1100 mm y una temperatura promedio anual de 28.5°C.

4.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron machos y hembras de bocachico, entre tres y cuatro años de edad, mantenidos bajo condiciones de cautiverio en estanques en tierra del CINPIC, a densidad de 0.5 Kg/m². La selección de los ejemplares se realizó en base a su estado de madurez sexual. Solo se seleccionaron machos en fase de espermiación; lo cuales liberaron líquido seminal a leve presión abdominal, en sentido cráneo-caudal. En el caso de las hembras la madurez sexual se valoró mediante biopsia ovárica para verificar que estuvieran en fase de maduración final. Los ejemplares seleccionados fueron trasladados a tanques circulares de 6 m³ con recambio continuo de agua de 6 L/min durante 48 horas, con el propósito de habituarlos a las condiciones experimentales, reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente.

4.2.1 Obtención de productos sexuales

Espermatozoides y ovocitos fueron obtenidos mediante inducción hormonal con extracto hipofisario de carpa (EPC). Las hembras fueron tratadas con 7 mg EPC /Kg, aplicado en dos dosificaciones (10 y 90%, con 12 horas entre aplicaciones)

(Atencio et al., 2010). La extracción de los ovocitos se realizó mediante masaje cráneo-caudal del abdomen, a las seis horas después de la segunda dosis con EPC. Los ovocitos se recibieron en un recipiente plástico limpio y seco. Los machos fueron tratados con 4 mg EPC/Kg de peso vivo en dosificación pasadas 6 horas post-inducción, se extrajo el semen mediante masaje abdominal en sentido cráneo-caudal, colectándolo directamente en un vial con capacidad de 1.5 ml, estéril y seco. Antes de coleccionar el semen se realizó una limpieza con toalla absorbente sobre la papila urogenital y región abdominal en general, con el objetivo de eliminar restos de agua, orina o heces.

4.3 TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Inmediatamente después de colectado el semen fue evaluado y solo se consideró semen con movilidad total mayor a 80%. Como diluyentes glucosa 6% (p/v), a la cual se le agregó 10% DMSO (v/v) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y 12% yema de huevo (v/v) y. Para la preparación de la solución crioprotectora inicialmente la glucosa se mezcló con agua destilada calentada previamente a temperatura de 60°C, posteriormente se adicionó el volumen correspondiente de DMSO y pasada la reacción exotérmica; se adicionó la yema de huevo; finalmente se completó el volumen deseado con agua destilada. El semen se diluyó en proporción 1:4 (Cruz-Casallas et al., 2004), mezclado a temperatura de 28±1°C.

Posteriormente el semen se empacó en dos volúmenes de pajillas (0.5 y 2.5 ml) (Minitub, Abfüll-und Labortechnik GmbH & Co, Inglaterra) previamente selladas con polivinilo o con esferas de acero inoxidable. Para el empaque se utilizó un pool (mezcla) de semen de varios machos ($n=12$) previamente valorados presentando similitud en sus movilidades y tiempo de activación.

Seguidamente fueron introducidas en un termo (dry shipper) de vapores de nitrógeno de 4 L (MVE, SC 4/2v, USA) durante 30 minutos, el cual permitió una

tasa de enfriamiento (27.3°C/min desde 28 a -20°C, 29.9°C/min desde -20 a -100°C, 5.5°C/min desde -100 a -196°C) según lo establecido por Cruz-Casallas et al. (2006). Al alcanzar la temperatura de crioconservación de -196°C, las pajillas finalmente fueron trasladadas a un termo de almacenamiento 34 L (MVE, XC 34/18, USA) y sumergidas directamente en nitrógeno líquido durante seis meses; luego las pajillas fueron descongeladas en baño serológico (Mammert, WNB 7-45, Alemania) evaluando dos temperaturas (35 y 60°C) y cuatro tiempos de descongelación (30, 60, 90 y 120 s).

Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación de dos volúmenes de empaques (ml), dos temperaturas (°C) y cuatro tiempos de descongelación (s) de semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*.

Factores			Tratamientos
Vol. empaque (A)	Temperatura (B)	Tiempo (C)	
0.5 ml (A1)	35°C (B1)	30 s (C1)	A1xB1C1
		60 s (C2)	A1xB1xC2
		90 s (C3)	A1xB1xC3
		120 s (C4)	A1xB1xC4
	60°C (B2)	30 s (C1)	A1xB2XC1
		60 s (C2)	A1xB2xC2
		90 s (C3)	A1xB2xC3
		120 s (C4)	A1xB2xC4
2.5 ml (A2)	35°C (B1)	30 s (C1)	A2xB1XC1
		60 s (C2)	A2xB1xC2
		90 s (C3)	A2xB1xC3
		120 s (C4)	A2xB1xC4
	60°C (B2)	30 s (C1)	A2xB2XC1
		60 s (C2)	A2xB2xC2
		90 s (C3)	A2xB2xC3
		120 s (C4)	A2xB2xC4

En total se evaluaron 16 tratamientos correspondientes en diseño 2x2x4 correspondientes a dos volúmenes de empaque (0.5 y 2.5 ml), dos temperaturas de descongelación (30 y 60°C) y cuatro tiempos de descongelación (30, 60, 90 y

120 segundos) (Tabla 3); adicionalmente se evaluó un tratamiento control (semen fresco). Cada tratamiento fue evaluado por sextuplicado (Tabla 2).

4.4 EVALUACIÓN SEMINAL

Tanto en semen fresco como en semen descongelado se evaluó la movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total y velocidades espermáticas mediante el método CASA (Computer-Assited Sperm Analysis) con el programa Sperm Class Analyzer SCA (Microptic, SCA VET 1, España). Adicionalmente en semen fresco se estimó la duración de la movilidad y la concentración espermática.

4.4.1 Movilidad total, tipos de movilidad, progresividad total y velocidades espermáticas. En una cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments Ltd., Israel) se colocó una alícuota de 0.25 μ l de semen y 75 μ l de agua destilada (dilución 1:300); luego se homogenizó y con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa SCA® (Microptic, SCA VET 1, España) se estimaron estas variables.

La velocidad de los espermatozoides fue estimada en un periodo de cuatro segundos con el programa SCA® y fueron clasificada como movilidad rápida cuando era mayor de 100 μ m/s, media cuando se encontró en el rango entre 99 y 50 μ m/s y lenta cuando era menor de 50 μ m/s. Al porcentaje de espermatozoides rápidos se denominó movilidad rápida (tipo a), al porcentaje de espermatozoides medios como movilidad media (tipo b) y al porcentaje de espermatozoides lentos como movilidad lenta (tipo c), mientras que porcentajes de espermatozoides sin movimiento se conoce como estáticos (tipo d). También el SCA® calculó las velocidades curvilíneas (VCL) y rectilínea (VSL).

4.4.2 Duración de la movilidad. En una cámara Makler (Sefi Medical Instruments Ltd., Israel) se colocó una alícuota de 0.25 μ l de semen y se activó con agua

destilada, este tiempo se estimó a partir del instante en que se adicionó la solución activadora (agua destilada) a la muestra de semen hasta que alrededor del 90% de los espermatozoides dejaron de moverse.

4.4.3 Concentración espermática. Una alícuota de 1 μ l de semen se mezcló con 699 μ l de glucosa 6% en un vial de 1.5 ml (dilución 1:700) y se homogenizó durante cinco segundos en un vortex a 1200 rpm (Velp Scientifica, Zxclasic, China); luego se colocaron 10 μ l esta dilución en una cámara Makler y se estimó la concentración mediante el SCA®. Este procedimiento fue repetido tres veces para obtener un valor promedio de la concentración espermática del semen analizado.

4.5 TASA DE FERTILIZACIÓN Y ECLOSIÓN

La capacidad fertilizante de semen fresco y semen descongelado se evaluó en una muestra de un gramo de ovocitos (1288 ± 182) en una proporción 320.000 espermatozoides/ovocitos para semen crioconservado y para semen fresco 160.000 espermatozoides/ovocitos (Atencio et al., 2015). El volumen para fertilizar cada gramo fue adicionado con una micropipeta (Transferpette®, CE704174, Alemania). Una vez adicionado el volumen seminal (fresco y descongelado) se agregaron 20 ml de agua destilada a temperatura ambiente (28°C) para la activación del semen durante un minuto; transcurrido este tiempo se aumentó el volumen del agua a 50 ml para la hidratación de los ovocitos, inmediatamente después se depositaron los ovocitos en incubadoras experimentales de flujo ascendente de 2 L de capacidad.

La tasa de fertilidad fue calculada a las seis horas post-fertilización (HPF). Con la ayuda de una pipeta de vidrio de 0.5 cm de diámetro se tomó una muestra al azar de mínimo 50 embriones; luego con la ayuda de un estereoscopio de luz (Leica, EZ4, China), se contabilizó el número de embriones viables los cuales se observaron traslucidos; y número de embriones inviables, presentando estos un

color blanquecino opaco. Este conteo se realizó tres veces en cada unidad experimental (6) y luego se calculó un valor promedio para cada unidad experimental. La fórmula que se usó fue:

$$\text{Tasa de fertilización (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de embriones en gastrulación}}{\text{N}^\circ \text{ de embriones analizados}} \times 100$$

El porcentaje de eclosión fue calculado a las 10 horas post-fertilización (HPF); utilizando el mismo procedimiento descrito para la tasa de fertilización, con la diferencia que los embriones viables son aquellos de cola libre (faringulación) y los inviables eran los de color blanquecinos y sin movimientos espasmódicos.

$$\text{Tasa de eclosión(\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de embriones en faringulación}}{\text{N}^\circ \text{ de embriones analizados}} \times 100$$

4.5.1 Calidad de agua en la incubación. Durante el periodo de incubación de los ovocitos, los parámetros de calidad de aguas se mantuvieron dentro de los rangos óptimos para el mantenimiento de la especie; temperatura de 26.6-27.3°C, pH 7.5±0.8, OD>4mg/L, Amonio total<1ppm, Dureza total de 160.4±17.7mg/LCaCO₃ y Alcalinidad Total de 161.6±29.7mg/L CaCO₃.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores son presentados como media ± ds. Este experimento se llevó a cabo utilizando un diseño completamente aleatorizado (DCA) con arreglo factorial dos por dos por cuatro (2x2x4). El primer factor fue el volumen de empaque el cual constó de dos niveles (0.5 y 2.5 ml), el segundo factor fue la temperatura la cual tuvo dos niveles (35 y 60°C) y un tercer factor que correspondió al tiempo de descongelación compuesto por cuatro niveles (30, 60, 90 y 120 segundos), para un total de 16 tratamientos, cada uno con tres réplicas. Todos los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y de homogeneidad de

varianza (test de Bartlett), una vez cumplidos estos supuestos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y cuando hubo diferencias se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey; en todos los casos $p < 0.05$ se consideró como nivel de significancia. Los análisis se realizaron con ayuda del Software estadístico R, versión 3.0.1.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN FRESCO

La tabla 3 registra las características del semen fresco de bocachico utilizado en el presente estudio. Las características seminales registradas en este estudio, muestran una buena calidad en el semen que se utilizó en el proceso de crioconservación; y coinciden con lo reportado por otros autores. La calidad seminal, se define como la habilidad que tiene el espermatozoide para fertilizar exitosamente y subsecuentemente desarrollar un embrión normal, dicha habilidad está regida por parámetros que permiten predecir y determinar el grado de calidad del gameto (Martínez & Pardo, 2010).

Tabla 3. Características de semen fresco de bocachico *Prochilodus magdalenae* obtenido mediante inducción hormonal. Valores mostrados como media \pm ds

Característica	Valor
Volumen seminal (ml)	2.3 \pm 0.4
Concentración espermática (10 ⁶ spz/ml)	19700.1 \pm 10310.1
Movilidad total (%)	95.8 \pm 0.5
Duración movilidad (s)	28.47 \pm 1.5

5.2 CARACTERÍSTICAS SEMEN DESCONGELADO

5.2.1 Movilidad total (MT) y tipos de movilidad. En el presente estudio, se encontró que los mayores valores de MT ($p < 0.05$) se obtuvieron cuando se descongeló pajillas de 0.5 ml a 35°C durante 30 s ($51 \pm 23.0\%$) y 60 s ($53.6 \pm 24.3\%$), cuando se descongeló pajillas de 2.5 ml a 35°C durante 90 s ($50.1 \pm 26.2\%$) y cuando se descongeló pajillas de 2.5 ml a 60°C durante 30 s ($58 \pm 31.1\%$) sin encontrarse diferencia significativa en estos valores ($p > 0.05$); pero tampoco fueron diferentes a los valores de MT registrados ($p > 0.05$) cuando se descongeló pajillas de 0.5 ml a 35°C durante 90 s ($40.5 \pm 13.1\%$) y 120 s ($38.6 \pm 17.3\%$), cuando se descongeló pajillas de 2.5 ml a 35°C durante 30 s ($44.1 \pm 25\%$), 60 s ($44.8 \pm 18.9\%$) y 120 s ($47.8 \pm 21.2\%$) (Tabla 4, Anexo 1). Los menores valores de MT ($p < 0.05$) se registraron cuando se descongeló pajillas de 0.5 ml a 60°C durante 30 s ($21.9 \pm 7.8\%$) y 90 s ($23.8 \pm 4.8\%$) y pajillas 2.5 ml a 60°C durante 90 s ($21.2 \pm 3.4\%$) y 120 s ($21.8 \pm 8.6\%$) sin observarse diferencia entre estos valores ($p > 0.05$) (Tabla 4).

Los mayores porcentajes de espermatozoides con movilidad rápida (tipo a) se encontraron en los tratamientos en donde se usó pajillas de 2.5ml a 60 °C durante 30s ($13.8 \pm 19.3\%$) y pajillas de 0.5ml a 35°C durante 60 s ($12.6 \pm 14.7\%$); en contraste los valores más bajos se hallaron en pajillas de 2.5ml a 60°C durante 90s ($0.1 \pm 0.2\%$) y pajillas de 0.5ml a 60°C durante 90s y 120s ($0.2 \pm 0.3\%$), encontrándose diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). (Tabla 4, Anexo 3a). En contraste los porcentajes de espermatozoides estáticos arrojaron valores superiores a los espermatozoides rápidos; encontrándose los mayores en pajillas de 2.5ml a 60°C durante 90s ($78.8 \pm 3.4\%$) y 120 s ($78.2 \pm 8.6\%$), los menores porcentajes para este tipo de espermatozoides (estáticos) se hallaron en pajillas de 2.5ml a 60°C a 30s con $42.0 \pm 31.1\%$ en conjunto con las pajillas de 0.5ml a 35°C durante 60s con $46.4 \pm 24.3\%$ ($p < 0.05$) (Anexo 3d).

Tabla 4. Características del semen criopreservado de *Prochilodus magdalenae* empacado en pajillas de 0.5 y 2.5 ml y descongeladas a dos temperaturas y cuatro tiempos de descongelación. Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.5$). Valores mostrados como media \pm ds.

Vol.	Tem.	Tiempo	MT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	Rápidos (%)	Medios (%)	Lentos (%)	Estáticos (%)	PT (%)
0.5 ml	35°C	30 s	51.4 \pm 23.0 ^a	49.0 \pm 26.1 ^{abcd}	24.6 \pm 17.4 ^{ab}	8.5 \pm 8.6 ^{abc}	10.0 \pm 6.6 ^a	33 \pm 11.2 ^{ab}	48.6 \pm 18.9 ^e	13.2 \pm 11.5 ^{ab}
		60 s	53.6 \pm 24.3 ^a	55.4 \pm 36.0 ^a	29.9 \pm 23.1 ^a	12.6 \pm 14.7 ^{ab}	11.1 \pm 8.2 ^a	29.8 \pm 8.8 ^{abc}	46.4 \pm 24.3 ^e	19.4 \pm 19.7 ^a
		90 s	40.5 \pm 13.1 ^{abdce}	46.1 \pm 39.0 ^{abcde}	23.5 \pm 19.9 ^{abc}	6.4 \pm 11.9 ^{abc}	6.1 \pm 6.5 ^{abcdef}	28 \pm 7.8 ^{abcd}	59.5 \pm 13.1 ^{abcde}	9.7 \pm 12.4 ^{ab}
		120 s	38.6 \pm 17.3 ^{abcde}	43.4 \pm 29.0 ^{abcde}	24.8 \pm 25.7 ^{ab}	7.7 \pm 10.8 ^{abc}	6.4 \pm 5.6 ^{abcde}	24.5 \pm 6.6 ^{bcd}	61.4 \pm 17.3 ^{abcde}	12.2 \pm 15.5 ^{ab}
	60°C	30 s	21.9 \pm 7.8 ^e	21.4 \pm 4.5 ^{cde}	4.8 \pm 2.7 ^{cd}	0.6 \pm 0.8 ^c	1.1 \pm 1.5 ^{ef}	20.2 \pm 5.7 ^d	78.1 \pm 7.8 ^a	1.2 \pm 1.5 ^a
		60 s	26.0 \pm 8.8 ^{cde}	27.4 \pm 18.2 ^{abcde}	4.1 \pm 2.0 ^{cd}	2.1 \pm 4.7 ^{bc}	2.0 \pm 1.9 ^{def}	21.9 \pm 4.8 ^{cd}	74.0 \pm 8.8 ^{abc}	2.7 \pm 4.6 ^b
		90 s	23.8 \pm 4.8 ^e	22.4 \pm 5.7 ^{cde}	4.4 \pm 2.4 ^{cd}	0.2 \pm 0.3 ^c	1.9 \pm 2.4 ^{def}	21.8 \pm 5.8 ^{cd}	76.2 \pm 4.8 ^a	1.1 \pm 1.6 ^b
		120 s	24.4 \pm 4.5 ^{de}	24.4 \pm 7.2 ^{bcdde}	4.3 \pm 1.1 ^{cd}	0.2 \pm 0.2 ^c	2.5 \pm 1.4 ^{bcddef}	21.8 \pm 4.7 ^{cd}	75.6 \pm 4.5 ^{ab}	0.4 \pm 0.5 ^b
2.5 ml	35°C	30 s	44.1 \pm 25.0 ^{abcd}	52.8 \pm 41.3 ^{ab}	30.3 \pm 28.5 ^a	11.7 \pm 17.1 ^{abc}	7.7 \pm 7.6 ^{abcd}	24.8 \pm 7.1 ^{bcd}	55.9 \pm 25.0 ^{bcdde}	17.3 \pm 21.7 ^a
		60 s	44.8 \pm 18.9 ^{abc}	50.5 \pm 30.2 ^{abc}	28.2 \pm 21.6 ^a	10.1 \pm 12.7 ^{abc}	7.2 \pm 3.8 ^{abcd}	27.6 \pm 4.3 ^{abcd}	55.2 \pm 18.9 ^{cde}	14.6 \pm 15.1 ^{ab}
		90 s	50.1 \pm 26.2 ^a	44.4 \pm 28.9 ^{abcde}	24.7 \pm 20.1 ^{ab}	9.2 \pm 12.3 ^{abc}	8.3 \pm 7.3 ^{ab}	32.6 \pm 9.5 ^{ab}	49.9 \pm 26.2 ^e	13.7 \pm 15.2 ^{ab}
		120 s	47.8 \pm 21.1 ^{ab}	43.8 \pm 26.1 ^{abcde}	25.3 \pm 17.5 ^{abc}	7.7 \pm 9.8 ^{abc}	8.6 \pm 6.8 ^a	31.6 \pm 7.9 ^{ab}	52.2 \pm 21.2 ^{de}	12.7 \pm 12.4 ^{ab}
	60°C	30 s	58.0 \pm 31.1 ^a	50.0 \pm 40.2 ^{abc}	26.6 \pm 28.0 ^{ab}	13.8 \pm 19.3 ^a	8.2 \pm 6.8 ^{abc}	36.0 \pm 14.0 ^a	42.0 \pm 31.1 ^e	17.7 \pm 21.1 ^a
		60 s	28.3 \pm 7.3 ^{bcdde}	24.3 \pm 6.6 ^{bcdde}	7.6 \pm 5.3 ^{bcd}	0.8 \pm 1.0 ^c	2.3 \pm 1.3 ^{cdef}	25.2 \pm 6.4 ^{bcd}	71.7 \pm 7.3 ^{abcd}	1.4 \pm 1.7 ^b
		90 s	21.2 \pm 3.4 ^e	18.3 \pm 3.2 ^e	3.4 \pm 1.7 ^d	0.1 \pm 0.2 ^c	0.5 \pm 0.6 ^f	20.6 \pm 3.2 ^d	78.8 \pm 3.4 ^a	0.3 \pm 0.6 ^b
		120 s	21.8 \pm 8.6 ^e	19.5 \pm 3.7 ^{de}	3.3 \pm 2.0 ^d	0.4 \pm 0.4 ^c	0.9 \pm 1.6 ^{ef}	20.5 \pm 6.8 ^d	78.2 \pm 8.6 ^a	0.6 \pm 0.8 ^b
Control			95.8 \pm 5.0	136.0 \pm 40.6	65.0 \pm 18.6	55.8 \pm 18.8	29.7 \pm 18.6	10.2 \pm 9.3	4.2 \pm 5.0	70.5 \pm 10.0

MT: movilidad total; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad lineal; PT: progresividad total.

5.2.2 Progresividad total y velocidades espermáticas. Los valores de progresividad total (PT) encontrados en el estudio se presentan en la tabla 4 y anexo 2. Se halló que los mejores porcentajes para este parámetro ocurrió en pajillas de 0.5ml descongeladas a 35°C durante 60 segundos (19.4 \pm 19.7%) en conjunto con pajillas de 2.5 ml a 60°C durante 30 s (17.7 \pm 21.1%), con diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar con los valores más bajos, el cual se dio en pajillas de 2.5ml descongeladas a 60°C durante 90 segundos (0.3 \pm 0.6%) y 120 segundos (0.4 \pm 0.8%). Por su parte, la velocidad espermática curvilínea (VCL) mostró los mejores resultados en el tratamiento con pajillas de 0.5ml

descongeladas a 35°C durante 60 segundos ($55.4 \pm 36.0 \mu\text{m/s}$) y su valor más bajo en pajillas de 2.5ml descongeladas a 90 segundos ($18.3 \pm 3.2.0 \mu\text{m/s}$) y 12 segundos ($19.5 \pm 3.7 \mu\text{m/s}$), sin haber diferencias significativas entre dichos tratamientos ($p > 0.05$). En la tabla 4 y anexo 5 se presentan los valores de velocidad lineal (VSL) encontrados en el estudio; las mayores velocidades de este tipo se dieron cuando se empaco semen en pajillas de 2.5 ml y luego descongeladas a 35°C durante 30 segundos ($30.3 \pm 28.5 \mu\text{m/s}$) y los valores bajos se dieron en estas mismas pajillas, pero cuando la descongelación se realizó a 60°C durante 120 segundos ($3.3 \pm 2.0 \mu\text{m/s}$); mostrando diferencia significativa para esta variable ($p < 0.05$).

5.3 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DEL SEMEN CRIOPRESERVADO

5.3.1 Fertilización. Los porcentajes de fertilización encontrados en el presente estudio se muestran la figura 2. De forma general, se halló mejores tasas de fertilización cuando se realizó la descongelación a 35°C; específicamente se encontró que los mejores valores se dieron cuando se empacó semen en pajillas de 0.5ml y posteriormente descongeladas a 35°C durante 60 segundos ($31.6 \pm 8.5\%$); contrario a lo ocurrido con las pajillas de 0.5ml y descongeladas a 60°C durante 30°C en donde no hubo fertilización ($p < 0.05$).

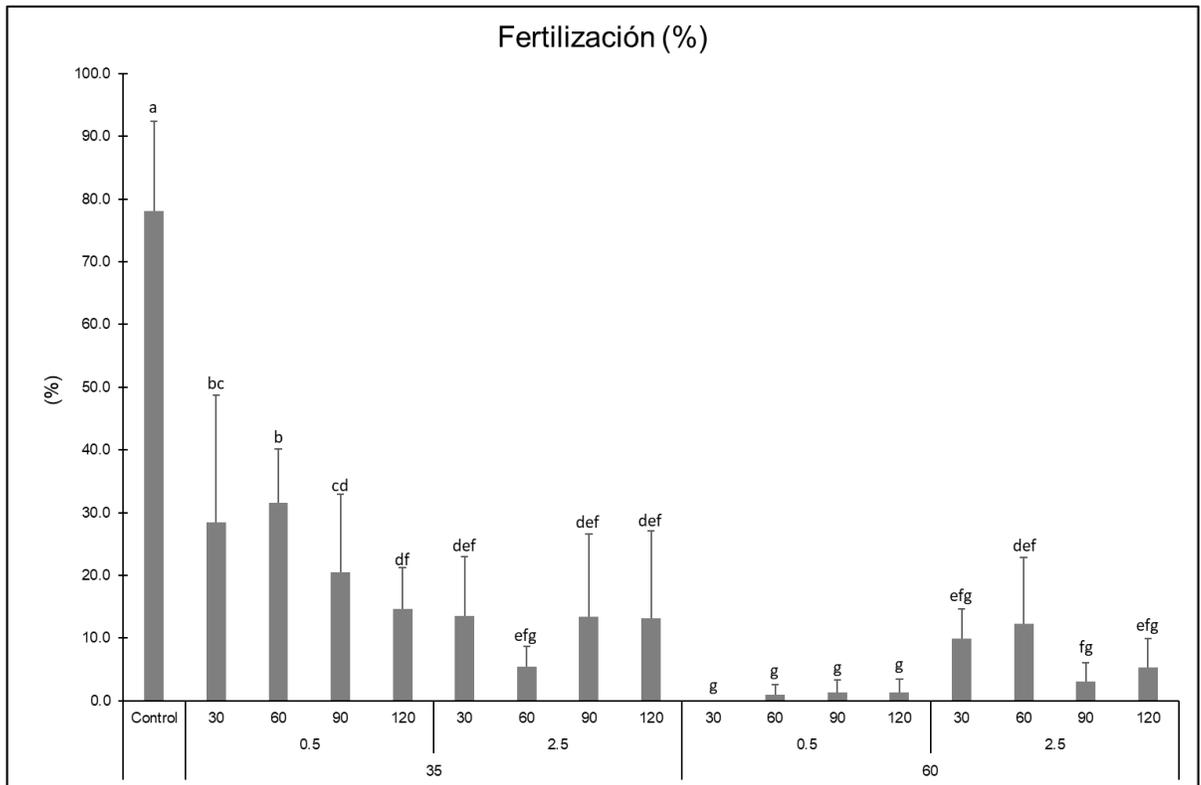


Figura 2. Porcentajes de fertilización en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm ds.

5.3.2 Eclosión. La figura 3 muestra los porcentajes de eclosión encontrados en el estudio, se observa que de forma general se tuvieron mejores tasas de eclosión cuando la descongelación de las pajillas se realizó a 35°C, independiente del volumen de empaque y tiempo de exposición. La mejor tasa de eclosión fue de $22.2 \pm 8.1\%$ cuando se usó pajillas de 0.5ml descongeladas a 35°C durante 60 segundos.

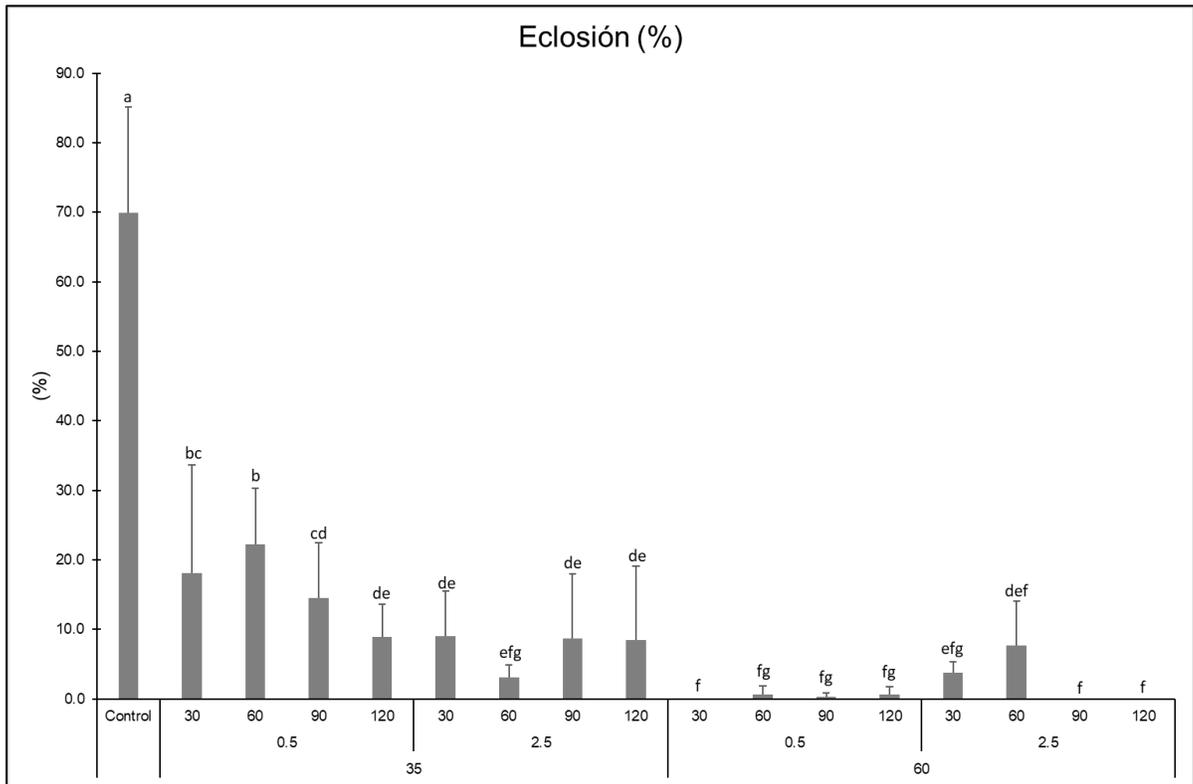


Figura 3. Porcentajes de eclosión en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Valores mostrados como media \pm ds.

5.4 EFECTO DE FACTORES EVALUADOS Y SU INTERACCIÓN

El efecto general de los factores evaluados durante el proceso de crioconservación de semen de bocachico y la interacción entre ellos sobre las variables de calidad seminal se presentan en la tabla 5. Se observó que la temperatura fue el factor que más afectó significativamente las variables de calidad seminal evaluadas; el volumen de empaque afectó moderadamente solo los porcentajes de eclosión. Caso contrario pasó con el factor tiempo de descongelación, el cual no tuvo ningún efecto significativo sobre las variables.

Tabla 5. Efectos de la interacción de los factores evaluados, sobre variables de calidad seminal en *Prochilodus magdalenae*. NS, no significativo ($p>0.05$), * significativo, ** muy significativo, *** altamente significativo

VARIABLES	Factor A/ Tiempo	Factor B/ Temperatura	Factor C/ Vol. Emp	Inter. AB	Inter. AC	Inter. BC	Inter. ABC
Movilidad Total (%)	NS	***	NS	NS	NS	NS	*
Velocidad Curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
Velocidad Lineal ($\mu\text{m/s}$)	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
Rápidos (%)	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
Medios (%)	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
Lentos (%)	NS	***	NS	NS	NS	NS	**
Estáticos (%)	NS	***	NS	NS	NS	NS	*
Progresividad Total (%)	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
Fertilización (%)	NS	***	NS	NS	NS	***	*
Eclosión (%)	NS	***	*	NS	NS	***	**

6. DISCUSIÓN

6.1 SEMEN FRESCO

Atencio-García et al. (2013) reportó volumen seminal de $1.3\pm 0.4\text{ml}$ en bocachico inducidos con EPC; con buena movilidad total ($>90\%$) y concentración ($18524.0\times 10^6\pm 3452.4\times 10^6$ spz/ml). Montes (2018) evaluó la calidad del semen de bocachico al inicio, media, final y fuera de la temporada reproductiva y encontró valores de volumen seminal menores (0.4 ± 0.2 y $0.9\pm 0.1\text{ml}$) a las halladas en el presente estudio, por el contrario los valores de concentración ($19831.4\times 10^6\pm 6429.8\times 10^6$ y $52623.4\times 10^6\pm 4495.7\times 10^6$ spz/ml) y tiempos de activación (37.4 ± 5.5 s) reportados por este autor, superan los valores en esta investigación; sin embargo, se encontró similitud en valores de MT (mayor al 90%), representativo de un semen de buena calidad.

6.2 MOVILIDAD TOTAL Y TIPOS DE MOVILIDAD

La movilidad total (MT) del semen crioconservado es considerada un criterio de calidad espermática, que permite medir el éxito o fracaso del proceso de crioconservación (Atencio et al., 2017). Padilla (2014) señala que desde el mismo momento en que el semen entra en contacto con la solución crioprotectora se producen daños en las mitocondrias, membrana espermática y fragmentación del ADN como consecuencia del choque hiperosmótico y la toxicidad de los crioprotectores; estos daños se incrementan durante los procesos de congelación y descongelación. Los criodaños ocasionan disminución de la movilidad y velocidad espermática, lo cual termina afectando la capacidad fecundante del semen descongelado (Ramírez-Merlano et al., 2010; Cabrita et al., 2014).

En esta investigación, la temperatura de descongelación fue un factor determinante, por lo que de forma general el semen descongelado a 35°C presentó mejores porcentajes de MT (Anexo 1 y Tabla 4); sin embargo, el mayor valor de movilidad total, fue encontrado cuando se realizó la descongelación a 60°C durante 30s en pajillas de 2.5 ml; esto nos señala que curvas de descongelaciones rápidas podrían reducir los daños en la mitocondrias y flagelos, siendo estas estructuras las que permiten la motilidad a los espermatozoides. Parece ser que estas velocidades rápidas de descongelación funcionan bien para la especie, cuya hipótesis es respaldada por estudios como el de Martínez y Pardo (2013) los cuales reportan movilidad total de 54.13 ± 5.67 % luego de realizar una descongelación rápida a 60°C durante 8s en la misma especie de estudio. El uso de pajillas de grandes volúmenes (mayor de 2.5 ml) ha sido evaluado en bocachico por otros autores como Atencio-García et al. (2013), que estudiaron la criopreservación de semen en pajillas de 5 ml con diferentes concentraciones de DMA (8, 10 y 12%) y descongelaron a temperatura de 60°C durante 45s obteniendo valores de MT menores de 32%.

En otros *Characiformes* se ha criopreservado semen de *Brycon moorei* con DMSO (5,10 y 15%) empaquetado en pajillas de 2.5 ml y descongelado a 35°C durante 90 con registros de MT entre 30.6% y 40.1%, valores similares a los encontrados en el presente estudio (Atencio-García et al., 2017). En especies tropicales estudiadas por Ramírez-Merlano et al. (2011), evaluaron diferentes protocolos de crioconservación para en *Pseudoplatystoma metaense*, usando pajillas de empaque de 0.5ml y descongeladas a 35°C durante 60 s; reportan valores de MT completamente nulas (0%) para algunos tratamientos. De igual manera, Herrera-Cruz et al. (2018) al evaluar semen criopreservado de *Pseudoplatystoma magdaleniatum* en pajillas de 2.5ml y descongeladas a 35°C durante 90 segundos registraron MT entre 22.2±7.1% y 10.3±6.8%, valores que resultan ser bajos a los hallados en esta investigación. Estudios muchos más recientes como Judycka et al. (2019) quienes evaluaron diferentes protocolos de crioconservación en semen de la perca europea *Perca fluviatilis* utilizando pajillas de empaque de 0.5ml y curvas de descongelación de 40°C durante 10s; reportaron muy buenos resultados, llegando a alcanzar valores de MT entre 58% y 83%, muy similares a los del semen fresco utilizado en el presente estudio; esta investigación demostró que es posible estandarizar protocolos de crioconservación de semen de peces, conservando características similares al semen fresco si se aumentan los factores de dilución.

Se observó una predominancia de los espermatozoides estáticos y lentos, con oscilaciones de 78.8±3.4% y 42.0±31.1% para el primero y 36.0±14 % y 20.2±5.7% para el segundo; mientras que los porcentajes de espermatozoides con movi­lidades rápidas y media estuvieron por debajo del 14% del total (Anexo 3). Existen pocos trabajos que detallan el tipo de movilidad que presentan los espermatozoides, esto se debe en gran medida al alto nivel tecnológico que demanda realizar dichas lecturas, puesto que se requiere de programas informáticos especializados de alta calidad.

Los espermatozoides estáticos mostraron los mayores porcentajes luego de la descongelación, situación que es bastante usual después de someter el semen a procesos de crioconservación; los resultados registrados para esta variable durante los experimentos son muy similares a los reportado para la especie. Atencio et al. (2017) reportó espermatozoides estáticos con porcentajes de 69.4 ± 7.9 %; este mismo autor en (2013) reportó espermatozoides estáticos con porcentaje de 81.1 ± 0.8 %. En general estos resultados evidencian los profundos daños celulares que sufren los espermatozoides durante todo el proceso de crioconservación sobre sus estructuras móviles como flagelos y fuentes de energía como las mitocondrias. Si bien, no siempre se puede asociar menores tasas de fertilización a menores porcentajes de espermatozoides móviles ya sean rápidos, medios o lentos; si está ampliamente documentado y se conoce a través de la experiencia en campo con reproducciones artificiales utilizando semen fresco, que se reduce la probabilidad de que el espermatozoide encuentre el micrópilo cuando se ve reducida su capacidad móvil y se observa en muchas de nuestras especies nativas que espermatozoides estáticos o vibratorios son capaces de fertilizar desde que la integridad del ADN se mantenga.

Así mismo, se sugiere que a mayor temperatura de descongelación los tiempos de exposición deben ser mucho menor, principalmente si se trabaja con pajillas de 0.5ml; debido a que pajillas de bajo volumen tendrán mayor afectación con velocidades de descongelación rápida, puesto que el calor ingresa mucho más fácil a las células y esto provocaría mayor daño celular. Es importante aclarar que tener buenos porcentajes de movilidad, no siempre garantiza una viabilidad del espermatozoide durante el proceso de incubación, así lo afirma Morris et al. (2012), quien sugiere que los daños en los espermatozoides se encuentran mucho más ligado a daños en la membrana y DNA por la alteración del material genético de la célula causados por desbalances osmóticos y no por la formación de cristales de hielo; lo que permite la capacidad fecundante del espermatozoide, pero no da viabilidad al embrión.

6.3 PROGRESIVIDAD TOTAL Y VELOCIDAD ESPERMÁTICA

La progresividad total (PT) se define como el porcentaje de espermatozoides móviles que presentan desplazamiento dentro de un área específica; este concepto permite comprender que es posible encontrar espermatozoides que presenten movilidad, mas no progresividad; esto supondría que usualmente los porcentajes de MT serán mayores a la PT. Lo anterior sugiere una relación directamente proporcional entre estas dos variables, situación que se evidenció en este estudio (Anexo 2), en donde los mejores porcentajes de PT se observaron de forma general cuando la descongelación se hizo a 35°C sin importar el volumen de empaque o tiempo de exposición, con excepción del tratamiento donde se usó pajillas de 2.5 ml descongeladas a 60°C durante 30s, comportamiento similar al obtenido para la variable MT.

Los mejores resultados registrados resultan ser semejantes a los reportados por Nizio et al. (2015), quien evaluó pajillas de 1.6 ml y 4.5 ml para la crioconservación de semen de *Colossoma macropomum* y reportó porcentajes de progresividad total de 16.6 ± 6 % después de la descongelación a 60°C durante 90s; por otro lado Pineda-Santis et al. (2015) registró porcentajes de PT de 15.6 ± 7.8 % cuando realizó la evaluación de tres crioprotectores (DMSO 5%, DMF 5% y EG 5%) sobre el semen crioconservado de *Brycon henni* en pajillas de 0.5 ml y luego descongelado a 37°C durante 30s. Lo anterior, permite visualizar que se pueden obtener resultados parecidos, aun cuando se varían los rangos de los factores que inciden sobre el proceso de crioconservación; esto podría sugerir que al momento de analizar datos sobre protocolos de crioconservación, se deben considerar características propias de la especie, condiciones de cautiverio, estado nutricional de los reproductores, aclimatación e incluso protocolos de inducción hormonal.

La velocidad (lineal y curvilínea) y los rangos en los cuales se dan estos movimientos, son importante al momento de evaluar la calidad seminal, debido a que este análisis permite cuantificar de manera objetiva los movimientos del espermatozoide durante el periodo de activación o movilidad, sabiendo que esta variable posee estrecha relación con los porcentajes de fertilidad (Moore & Akhondi, 1996). Se sugiere que cuando un espermatozoide tiene mayor velocidad durante su periodo de movilidad, este tendría potencialmente mayor probabilidad de llegar hasta el micrópilo del ovocito y lograr una fertilización exitosa; siendo el flagelo, mediante la energía liberada por la mitocondria la que brinda al espermatozoide mayor o menor grado de velocidad.

Los diferentes resultados hallados en el presente estudio para VCL esta variable se observan en la tabla 4; donde se evidenció que el factor que más afectó este tipo de velocidad fue el tiempo de descongelación, independiente del volumen de empaque y temperatura (Anexo 4); así entonces, el tiempo utilizado de 60s mostró las mejores VCL y por el contrario el tiempo de descongelación de 90s arrojó los valores más bajos; oscilando estos valores $55.4 \pm 36.0 \mu\text{m/s}$ y $18.3 \pm 3.2 \mu\text{m/s}$, presentando diferencias estadística significativas ($p < 0.05$).

Los registros de velocidades espermáticas luego de la descongelación en semen de peces Characiformes son bastante escasos; específicamente para la especie bocachico, el primer reporte a nivel mundial fue realizado por Martínez & Pardo (2013), quienes al evaluar diferentes tasas de congelación (pajillas de 0.5ml) y descongelación ($60^\circ\text{C} \times 8\text{s}$ y $30^\circ\text{C} \times 16\text{s}$) en semen crioconservado reportaron VCL máximas de $51.4 \pm 4.7 \mu\text{m/s}$, encontrándose este reporte dentro del rango hallado en el presente estudio; valores ligeramente parecidos ($63.2 \pm 11.6 \mu\text{m/s}$) se observaron cuando se evaluó el efecto de DMA (8, 10, 12%) durante la crioconservación de semen en pajillas de 2.5ml y descongeladas a 60°C durante 45 segundos de esta misma especie (Atencio et al., 2013).

En la tabla 4 se muestran los valores de VSL encontrados; se evidenció que de forma general el factor temperatura, fue el que más afectó a este tipo de velocidad, cuya tendencia fue muy similar a los valores de MT; concretamente la descongelación realizada a 35°C de temperatura mostró los mejores resultados para esta variable independiente del tiempo o volúmenes de empaque, en conjunto con la descongelación realizada a 60°C en pajillas de 2.5 ml durante 30s (Anexo 5). Los mayores valores para esta variable se dieron utilizando 2.5ml/35°C/30s con 30.3 ± 28.5 $\mu\text{m/s}$ y los menores valores se encontraron cuando se usó 2.5ml/60°C/ 120s con 3.3 ± 2.0 $\mu\text{m/s}$, existiendo diferencia estadística significativas ($p < 0.05$).

La VSL reportadas después de la descongelación del semen crioconservado de *Prochilodus magdalenae* con diferentes protocolos, van desde 36.4 ± 5.0 $\mu\text{m/s}$ (Atencio et al., 2013) hasta menores del 35 $\mu\text{m/s}$ (Martínez et al., 2013), resultados bastante similares a los mejores valores reportados en esta investigación. Estudios realizados en siluriformes como *Pseudoplatystoma magdaleniatum* por autores como Herrera-Cruz et al. (2018) y Ramírez-Merlano et al. (2011) con *Pseudoplatystoma metaense* reportan valores de VSL de 8.6 ± 7.5 $\mu\text{m/s}$ y menores de 10 $\mu\text{m/s}$, respectivamente. Datos que están muy por debajo a los reportados de para la especie bocachico y a los hallados en el presente estudio; por otra parte, Judycka et al. (2019) halló VSL de hasta 198.8 ± 10.9 $\mu\text{m/s}$ durante la evaluación seminal de *Perca fluviatilis* sometida a diferentes protocolos de crioconservación; velocidades que son casi siete (7) veces mayores a las encontradas en el presente estudio.

6.4 DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DEL SEMEN CRIOCONSERVADO

6.4.1 Fertilización.

En este estudio se encontró de forma general que las mejores tasas de fertilización se dieron cuando se descongeló a 35°C, siendo indiferente el tiempo de descongelación y el volumen de empaque utilizado; coincidiendo con el mismo comportamiento de la movilidad total; no sucedió lo mismo con el tratamiento que obtuvo el mejor porcentaje de movilidad total (2.5ml/60°C/30s), siendo que allí se esperaban mejores porcentajes de fertilización, pero no sucedió. Esto indica que existe la posibilidad de tener espermatozoides con alta movilidad, pero no con capacidad fecundante debido principalmente posiblemente a daños genéticos. Así sucedió también con Navarro et al. (2004) quien al utilizar semen crioconservado de *Piaractus brachypomus* con movilidad total del 64% solo obtuvo fertilizaciones del 2%.

Atencio et al. (2015) quienes al estudiaron la viabilidad del semen criopreservado de esta misma especie; utilizando pajillas de 5ml y realizando la descongelación a 60°C durante 45 segundos, registró fertilizaciones hasta de 70.0±0.4; este mismo autor reportó en otros estudios porcentajes de fertilización con semen criopreservado bajo diferentes protocolos valores de 60.4±8.4% (Atencio et al., 2013) y 48.5±15.5% (Atencio et al., 2014). Así mismo, estudios con más anterioridad en una especie coespecifica como *Prochilodus lineatus* en donde se utilizaron crioprotectores de bajo valor económico durante la crioconservación del semen de esta especie, utilizando pajillas de 0.5ml y posteriormente descongeladas a 60°C durante 8 segundos, hallaron fertilizaciones hasta de 74% (Viveiros et al., 2009).

Los bajos porcentajes de fertilización encontrados en este estudio se podrían explicar trayendo a colación lo expresado por Martínez (2010), quien afirmó que la

fertilidad exige del espermatozoide más que una buena movilidad o una variable en particular, demanda el bienestar integral del espermatozoide o por lo menos en la mayor parte de sus variables; en ese orden de ideas, se conoce que los procesos de crioconservación causan daños de diferentes índoles en el espermatozoide: DNA, mitocondrias, flagelos, entre otros (Martínez & Pardo, 2010). Por lo que se sugiere que porcentajes relativamente altos de movilidad total no necesariamente se ven reflejados en altas tasas de fertilidad.

Paralelo a estas situaciones también existen reportes en donde los porcentajes de movilidad total son nulos, pero lograron tener una fertilización aceptable, tal es el caso de Ramírez-Merlano et al. (2011) donde utilizando semen crioconservado de *Pseudoplatystoma metaense* con movilidad total de 0% logró fertilizaciones del 10%; resulta paradójico hallar estos comportamiento tan variables; sin embargo, no ha sido el único estudio que ha evidenciado esta situación, también lo ha reportado Atencio et al. (2013) cuando halló los mayores porcentajes de fertilización ($60.4 \pm 8.4\%$) en los tratamientos con movilidad total menores al 40%. Estas situaciones presentadas se pueden deber a que parte de esos espermatozoides inmóviles conservan de forma intacta la estructura cromosómica la cual está contenida en el núcleo de la cabeza, lo que permite la fecundación efectiva (Andrade et al., 2001; Grassioto et al., 2001). Además autores como Rana et al. (1990) señalan que esto puede suceder porque algunos factores de los ovocitos pueden activar a los espermatozoides inmóviles, esto es respaldado por Iwamatsu (2000) & Babin et al. (2007) quienes afirman que sumado a factores ambientales, la presencia de esos agentes liberados por los ovocitos como pequeñas moléculas polipéptidos sintetizados en el folículo de la célula y acumuladas en el corion, pueden producir hiperactividad de la movilidad espermática en algunas especies de peces.

Otro aspecto que se debe tener en cuenta al momento de analizar los resultados de fertilización, es lo que se conoce como dosis semillante puesto que esto tiene

estrecha relación con la cantidad de ovocitos a fecundar y los volúmenes de empaque; si bien es cierto que el uso de pajillas de mayor volumen brinda potencialmente mayor capacidad fecundante, implica mayores dificultades técnicas, siendo la principal las mesetas de congelación lo que causa velocidades de enfriamiento retrasadas y desiguales dentro de la pajilla, lo que resulta en mayores criodañños en los espermatozoides luego de la descongelación (Nomura et al., 2018).

Estudios como el realizado por Atencio et al. (2015) buscó establecer la cantidad de espermatozoides necesarios para lograr el mayor porcentaje de fertilización para esta misma especie, utilizando semen fresco y crioconservado; reportó que la relación optima (fertilizaciones mayores a 70%) se dieron cuando usó 166,667 spz./ovocito para semen fresco y 320,000 spz./ovocito en semen crioconservado; según este estudio se debe duplicar la cantidad de espermatozoides por cada ovocito cuando se usa semen crioconservado; algo que resulta bastante comprensible debido a la reducción de vitalidad celular luego de la crioconservación. espermatozoides con movilidad, sin tener en cuenta el resto de espermatozoides.

La intención del presente estudio no fue ahondar en aspectos como dosis seminante, pero si se tuvo como objetivo, evaluar volúmenes de empaque; es por ello que se sugiere que, aunque de forma general los porcentajes de fertilizaciones fueron menores en las pajillas de 2.5ml (bajo descongelaciones a 35°C); estas tienen cinco (5) veces mayor volumen seminal que las de 0.5ml, lo que se podría traducir en mayor capacidad de fertilidad absoluta, por lo que alcanzará para poder fertilizar un mayor número de ovocitos, principalmente si el objetivo es la conservación del material genético de la especie y una posible producción a gran escala.

6.4.2 Eclosión

Como era de esperarse se encontraron tendencias similares a las tasas de fertilización, donde se notó que la descongelación a 35°C brindó mejores resultados. Siendo $22.2 \pm 8.1\%$ el mayor valor, que se dio cuando se usó pajillas de 0.5ml descongeladas a 35°C durante 60 segundos y en algunos casos fueron completamente nulas las eclosiones ($p < 0.05$). Los trabajos relacionados con el desempeño reproductivo de esta especie utilizando semen criopreservado; han reportado eclosiones mayores a las encontradas en este trabajo tal es el caso de Atencio et al. (2015) y Atencio et al. (2013) donde se han reportado eclosiones del $48.6 \pm 4.2\%$ y $< 50\%$, respectivamente. Las posibles causas de los resultados del desempeño reproductivo del semen (eclosión) crioconservado bajo los protocolos aquí evaluados se revisaron en párrafos anteriores (fertilización).

6.5 INTERACCIÓN DE FACTORES EVALUADOS

Al analizar las interacciones de los factores estudiados, se halló que, al correlacionar volumen de empaque y temperatura, esto ocasionó un efecto muy significativo sobre porcentajes de fertilización y eclosión. Así mismo al correlacionar los tres factores evaluados, se evidencia un efecto sobre la movilidad total, porcentajes de fertilización y porcentajes de eclosión. Los procesos de crioconservación, el control de la velocidad del cambio de temperatura (curva de descongelación) en conjunto con la osmolaridad son los aspectos más relevantes para optimizar la viabilidad celular, esto se debe a que el espermatozoide está sujeto a cambios drásticos en su medio físico y químico; así mismo está ampliamente documentado que temperaturas no adecuadas durante los procesos de descongelación terminan provocando una recristalización intracelular y consecuentemente termina afectando la calidad espermática (Medina et al., 2007; Martínez et al., 2010; Atencio et al., 2013).

La influencia que tienen las tasas de descongelación sobre el material biológico son la formación de cristales de hielo intracelular, la rehidratación y el mantenimiento de la integridad celular (Tiersch & Green, 2011). 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 (Denniston et al., 2011). Martínez y Pardo (2013) al determinar las tasas de congelación y descongelación (0.5ml/60°C/8s y 0.5ml/30°C/16s) para mantener la viabilidad espermática en *Prochilodus magdalenae*, encontraron un efecto de la velocidad de descongelación sobre movilidad rápida, media y velocidades curvilíneas y lineales; sin embargo, se reporta que la interacción entre tasas de congelación y descongelación, tienen un efecto nulo sobre la calidad espermática, a excepción de la movilidad lenta. Estos reportes realizados en años anteriores sobre la misma especie, son similares a los encontrados en el presente estudio; se puede observar el efecto de la temperatura como uno de los factores determinantes en el proceso de la descongelación de semen crioconservado.

Medina et al. (2005) sugieren que temperaturas de descongelación más altas son viables, pero por un tiempo corto, lo que coincide con una velocidad de descongelación rápida, que puede evitar procesos dinámicos dentro de la membrana espermática que aumenten la fragilidad celular. Los rangos de temperatura de descongelación óptimo son variables según la especie; algunos estudios (Medina et al. 2005; Ramírez-Merlano et al. 2010; Martínez & Pardo, 2013) sugieren la probabilidad de que las temperaturas óptimas pueden estar relacionadas con las temperaturas del agua en el cual los peces desovan; es decir temperaturas de descongelación más bajas en peces de agua fría y más altas para peces de agua cálida; situación que podría estar influenciada por las características de distribución de fosfolípidos en la membrana espermática.

Labbe & Maisse (1996) al estudiar la Influencia de la aclimatación de la trucha arco iris en la crioconservación de espermatozoides y su relación con el cambio en la composición lipídica de la membrana plasmática, registraron que el semen de los peces transferidos a temperatura de agua más bajas que su temperatura en el medio natural, mostró una composición lipídica diferentes de los peces aclimatados a aguas cálidas, consecuentemente la calidad seminal después de descongelación fue mejor en el grupo de peces aclimatados a temperaturas más bajas en comparación con los aclimatados a temperaturas más altas.

Está ampliamente documentado que la temperatura en los peces modula su metabolismo y además contribuye a las repuestas ante los cambios bruscos de temperatura, así como en los órganos que realizan funciones vitales para la supervivencia de los peces, por lo que trabajos como (Hazel & Williams, 1990) determinaron que esas repuestas se encuentran principalmente en los cambios de composición de lípidos en la membrana celular de los eritrocitos, cerebro, hígado y musculo; por ello se sugiere la posibilidad que estos cambios en la composición lipídica también se produzcan en las células del esperma, dando mayor resistencia a los peces que sufren este tipo de adaptaciones.

7. CONCLUSIONES

Luego de evaluar dos volúmenes de empaque (0.5, 2.5 ml), dos temperaturas (35, 60°C) y cuatro tiempos de descongelación (30, 60, 90, 120 s), de semen criopreservado de *Prochilodus magdalenae*, se puede concluir lo siguiente:

- La temperatura en el rango evaluado es el factor más importante en el proceso de descongelación, independientemente del volumen de empaque evaluados y tiempo de exposición debido que afecta la viabilidad de los espermatozoides post-descongelación.
- La movilidad total, la cual se considera como la principal variable de calidad seminal; no siempre se correlaciona proporcionalmente con las variables como fertilización y eclosión.
- Los mejores porcentajes de movilidad total, fertilización y eclosión se encontraron cuando se usó temperatura de descongelación de 35°C en pajillas de 0.5ml independiente del tiempo de exposición; se sugiere que la mejor combinación de volumen de empaque y curvas de descongelación para lograr una mayor capacidad fecundante en *Prochilodus magdalenae* es utilizar pajillas de 2.5ml descongeladas a 60°C durante 60s, puesto que, aunque no se obtuvo los mejores porcentajes de fertilidad, el volumen seminal almacenado en estas pajillas es cinco (5) veces superior a las de 0.5ml, por lo compensaría y sobrepasaría la cantidad final de ovocitos que potencialmente podría fertilizar el uso de una sola pajilla de 2.5ml.

8. BIBLIOGRAFÍA

Amidi F., Pazhohan A., Shabani Nashtaei M., Khodarahmian M., Nekoonam S. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*; 17:745–756.

Andrade R., Bazzoli N., Rizzo E., Sato Y. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tiss Cell*; 33: 524-532.

Asturiano J., Sørensen S., Pérez 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. *Reprod. Domest. Anim*; 51: 485–491. <https://doi.org/10.1111/rda.12706>.

Atencio-García V., Dorado-Longas M., Montes-Petro C., Prieto-Guevara M., Espinosa-Araujo J. Cryopreservation of dorada (*Brycon moorei*) sperm with dimethyl sulfoxide. *Rev. colomb. Biotecnol.* 2017; 19(2): 87-94. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.59987>.

Atencio-García V., Espinosa-Araujo J., Martínez J., Pardo-Carrasco S. 2015. Insemination of bocachico fish (*Prochilodus magdalenae*) with fresh or cryopreserved semen: effect of spermatozoa/oocyte ratio. *Rev Colombiana de Ciencia Pecuaria*; 28:347-355.

Atencio-García V. 2014. Producción de alevinos de especies nativas: con énfasis en Bryconídeos. Memorias. XIV Congreso colombiano y IV latinoamericano de estudiantes de Ciencias Biológicas. ANEC, Santa Marta.

Atencio-García V., Pérez Almanza E., Espinosa J., Pardo S. 2013. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Rev MVZ Córdoba*; 45: 151-158.

Atencio-García V., Pertúz V., Kerguelén E. 2010. Rescate de larvas de peces reofílicos en la desembocadura del río Sinú como estrategia para diversificar las especies del programa de repoblamiento. Universidad de Córdoba/Empresa Urrá SA-ESP, Montería, Colombia.

Atencio-García V., Kerguelén E., Wadnipar L., Narváez A. 2003. Manejo de la primera alimentación del bocachico *Prochilodus magdalenae*. Rev MVZ Córdoba; 8(1):254-260.

Atencio-García V. 2003. Producción de alevinos de peces migratorios continentales en Colombia. CIVA 2003. <http://www.civa2003.org>.

Babin P., Cerdà J., Lubzens E. 2007. (eds) The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer, Dordrecht.

Balamurugan R., Munuswamy N. 2017. Crioconservación de esperma en salmonete gris *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). Anim Reprod Sci; 185: 205-213. doi: 10.1016 / j.anireprosci.2017.08.022.

Bart A., Wolfe D., Dunham R. 1998. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. Trans Am Fish Soc; 127: 819-824.

Bobé J., Labbé C. 2010. Egg and sperm quality in fish. Gen Comp Endocrinol; 165 (3) :535-48.

Brown G., Mims S. 1999. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt. J. World Aquacult. Soc; 30: 245-249.

Brown J., Senger D., Becker W. 1991. Effect of group thawing on post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 5 ml French straws. J. Anim. Sci; 69 (6): 2303–2309.

Butts I., Galvano P., Johnson K., Wilson C., Pitcher T. 2013. Ovarian fluid influences sperm performance in lake trout, *Salvelinus namaycush*. Rev Reproductive biology; 13: 172–175.

Butts I., Feindel N., Neil S., Kovács É., Urbányi B., Trippel E. 2011. Cryopreservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm in large-volume straws: applications for commercial production and gene banking. Aquac. Res; 42: 1714–1722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02769.x>.

Cabrera E., Martínez-Páramo S., Gavaia P., Riesco M., Valcarce D., Sarasquete C., Herráez M., Robles V. 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. Aquaculture; 432: 389–401.

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., y Herráez, MP (2010). Criopreservación de esperma de pescado: aplicaciones y perspectivas. *Revista de Ictiología Aplicada*, 26 (5), 623-635. doi: 10.1111 / j.1439-0426.2010.01556.x

Cabrita E., Robles V., Álvarez R., Herraez M. 2001. Cryopreservation of Rainbow trout sperm in large volume straws: Application to large scale fertilization. *Aquaculture*; 201: 301–314.

Chanatasig-Chicaiza J. Crioconservación de semen de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en el laboratorio de biotecnología de reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la universidad técnica de Cotopaxi. 2015, Tesis de Pregrado. Universidad Técnica de Chicaiza; Latacunga-Ecuador.

Chen S., Ji X., Yu G., Tian Y., Sha Z. 2004. Cryopreservation of Sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*; 236: 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.027>.

Cruz-Casallas P., Medina-Robles V., Velasco-Santamaría Y. 2006. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú. *Rev. Col Cienc Pecu*; 19(2): 146-51.

Cruz-Casallas P., Pardo-carrasco S., Lombo-castellanos P., Lombo-Rodríguez D., Pardo-Mariño J. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon Siebenthalae* Milt. *World Aquaculture Society*; 35(4): 529-535.

Cruz-Casallas P., Mojica-Rodríguez J., Pinzón-Arciniega S. 2005. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus 1766), Universidad de Los Llanos, Colombia Orinoquia; 9: 28-37.

Cuenca-Condoy Mercy., Avellaneda-Cevallos J. 2017. Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *Revista electrónica de veterinaria REDVET [en línea]*;18 (9):1-11 [fecha de consulta 14 de septiembre de 2019]. ISSN: Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653009012>

DoNascimento, C., Herrera-Collazos, E. E., Herrera-R., G. A., Ortega-Lara, A., Villa-Navarro, F. A., Usma Oviedo, J. S., & Maldonado-Ocampo, J. A.

(2017). Checklist of the freshwater fishes of Colombia: a Darwin Core alternative to the updating problem. *ZooKeys*, 708, 25–138. doi:10.3897/zookeys.708.13897

Denniston R., Michelet S., Bondioli K., Godke R. 2011. Principles of Embryo Cryopreservation. III. Basics of Cryopreservation. En: Tiersch TR, Green CC Editors. Cryopreservation in Aquatic Species. Baton Rouge, Louisiana, U. S. A. World Aquaculture Society; 274-290.

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. *Cryobiology*; 63: 56-60.

Dreanno C., Suquet M., Quemener L., Cosson J., Fierville F. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*; 48: 589-603.

Figueroa E, Valdebenito I, Farias JG. (2016) Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*, 1–15. DOI:10.1111/are.12630.

García J, Celis L, Villalba E, Mendoza L, Brú S, Atencio V, Pardo S. (2011). Evaluación del policultivo de bocachico *Prochilodus magdalenae* y tilapia *Oreochromis niloticus* utilizando superficies fijadoras de perifiton. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 58(2), 71-83. Revisado el 14 de septiembre de 2019. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01209522011000200002&lng=en&tlng=es.

Grassiotto Q, Negräu JN, Carvalho ED, Foresti F. Ultraestructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) *J Fish Biol* 2001;59:1494-1502.

Hazel J., Williams E. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in lipid research*; 29: 167-227.

Herrera-Cruz E., Aristizábal-Regino J., Estrada A., Yepes-Blandón J., Espinosa J., Atencio-García V. 2018. Criopreservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*) con tres diferentes crioprotectores. Meeting Abstract Lacqua.

Iwamatsu T. 2000. Fertilization in fishes. In: Tarin J, Cano A (eds). Fertilization in Protozoa and Metazoa Animals. Springer, Berlin, Germany; 90-145.

Judycka S., Zarski D., Dietrich M., Palinska-Zarska K., Karol H., Ciereszko A. 2019. Protocolo de crioconservación estandarizado del semen de la perca europea (*Perca fluviatilis*) permite obtener altas tasas de fertilización con el uso de semen congelado / descongelado. *Acuicultura*; 498: 208-216.

Krauskova L., Prochazkova J., Klaskova M., Filipová L., Chaloupková R., Malý S. 2016. Suppression of protein inactivation during freezing by minimizing pH changes using ionic cryoprotectants. *Int J Pharm*; 509: 41–49.

Labbé C., Maise G. 1996. Influence of rainbow trout termal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*; 145: 281-294.

Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., Patzner R. 1996. Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for Cryopreservación. *J. Appl. Aquac*; 6: 47–73.

Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R. 1997. Aging processes of rainbow trout semen during storage. *Prog. Fish Cult*; 59: 272-279.

Liu Q., Li J., Zhang S., Ding F., Xu X., Xiao Z., Xu S. 2006. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red Seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. *J. World Aquac. Soc*; 37: 289–297. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00039.x>

Martínez G., Atencio-García V., Pardo-Carrasco S. 2011. Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Rev. MVZ Córdoba*; 16 (2): 2554 – 2563.

Martínez G. 2010. Efecto del crioprotector y osmolaridad del diluyente sobre la calidad espermática y el material genético en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae* [Tesis de maestría]. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia.

Martínez J., Pardo S. 2010. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana* 15 (2), 3-23.

Martínez J., Pardo S. 2013. Efecto de la congelación y descongelación sobre movilidad espermática en bocachico (*Prochilodus magdalenae*). *Rev.MVZ Córdoba* 18 (1), 3295-3303.

Martínez J., Atencio-García V., Pardo-Carrasco S. 2012. DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Ostariophysi, Prochilodontidae) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose. *Neotrop Ichthyol*; 10(3): 577-586.

Martínez J., Tarazona-Morales A., Pardo-Carrasco S. 2012. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico *Prochilodus magdalenae* in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. *Anim Reprod*; 9 (1): 19-26.

Martínez JG., Pardo CS. Crioconservación de semen de peces: efecto sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana* [en línea]. 2010, 15 (2), 3-23 [fecha consulta 14 de septiembre de 2019]. ISSN: 0120-548X. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319027885001>.

Medina-Robles V., Velasco-Santamaría Y., Cruz-Casallas P. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev. Col Cienc Pecu*; 18(1): 34-38.

Medina-Robles V., Guarnizo-Pineda M., Ramírez-Merlano J., Otero-Paternina A., Mira T., Pacheco-Murillo R., Velasco-Santamaría Y., Cruz-Casallas P. 2007. Caracterización y ensayos preliminares de crioconservación seminal de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus, 1766). *Memorias XIII Jornada de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia*, 68-72.

Miskolczi E., Miha S. 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; 54: 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.02.003>.

Mojica J., Usma S., Álvarez R., Lasso C. 2012. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia.

Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, Colombia.

Montes C. 2018. Evaluación del desempeño reproductivo del Bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en cautiverio mediante predictores tempranos de calidad espermática y ovocitaria. [Tesis de Maestría], Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería, Maestría en Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia; 90p.

Moore H., M Akhondi. 1996. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight line speed measured by continuous computer-aided sperm analysis. *J Androl*; 17: 50-60.

Morris G., Acton E., Murray J., Fonseca F. 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*; 64 (2): 71-80. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.12.002.
Muñoz R., Martínez C. 2003. Reproducción inducida del blanquillo *Sorubim cuspicaudus* Littmann, Burr & Nass 2000) con Ovaprim®. [Trabajo de pregrado]. Montería (Col): Universidad de Córdoba.

Navarro O., Velasco-Santamaría Y., Cruz-Casallas P. 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev. Col. Cienc. Pec*; 17: 53–59.

Nizio A., Marques A., Venancio R., Pinheiro J., Falanghe P., Costa H. 2015. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaquí Fish semen (*Colossoma macropomum*). *Cryobiology*; 70: 109-114.

Novoa-Rodríguez N. Conservación de embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*) a -14°C como posible estrategia de producción. 2014, [fecha de consulta 14 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/257>.

Nomura K., Chong I., Iio 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. *Aquaculture*; 496: 203 – 210.

Pineda-Santis H., Gómez-Oquendo J., Montoya-Páez J., Toro-Rendón V., Acevedo-Villa O., Restrepo-Betancur G. 2015. Crioconservación de semen y calidad espermática en sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae) *Orinoquia*; 19 (2): 176-182.

- Pinzón-Arciniegas SM, Mojica-Rodríguez JE, Cruz-Casallas PE. 2005. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766). Orinoquia 9, 28-37.
- Polge C., Smith A., Parkes A. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature (London); 164: 666.
- Ramírez-Merlano J., Velasco-Santamaría Y., Medina-Robles V., Cruz-Casallas P. 2005. Crioconservación de semen de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818): efectos del volumen de empaque y de la sustancia crioprotectora sobre la calidad seminal. Rev Col Cienc Pec; 18: 331.
- Ramírez-Merlano J., Medina-Robles V., Cruz-Casallas P. 2010. Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes, Universidad de Los Llanos Villavicencio, Colombia, Orinoquia; 14: 59-71.
- Ramírez-Merlano J., Medina-Robles V., Cruz-Casallas P. 2011. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. Arch Med Vet; 43: 135-144.
- Rana K., Muiruri R., McAndrew B., Gilmor A. 1990. The influence of diluents, equilibration time and pre-freezing storage time on the viability of cryopreservation *Oreochromis niloticus* (L.) spermatozoa. Aquacult and Fish Manag; 21: 25-30.
- Richardson G., Miller T., McNiven M. 2000. Cryopreservation of Arctic charr *Salvelinus alpinus* semen in various extenders and three sizes of straw. Aquacult. Res; 31: 307-315.
- Richardson G., Wilson C., Crim L., Yao X. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. Aquaculture; 174: 89-94.
- Safa S., Moghaddam G., Jozani R., Daghigh J., Kia H., Janmohammadi H. 2016. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. Anim Reprod Sci; 174: 100–106.
- Sambu S. 2015. A Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. Peer J; 3: 10-39.

SEPEC. Boletín estadístico. 2017. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP). Universidad del Magdalena.

Tiersch T., Figiel C., Wayman W., Williamson H., Carmichael G., Gorman O. 1998. Cryopreservation of sperm of the endangered Razorback sucker. *Trans Am Fish Soc*; 127: 95-104.

Tiersch T. 2011. Introduction to the second edition. In: Tiersch TH, Grenn CC (eds). *Cryopreservation in aquatic species*. 2 ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge; 646 – 671.

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*; 21: 179–184.

Varela Junior A, Goularte K, Alves J, Pereira F, Silva E, Cardoso T, et al. Methods of cryopreservation of tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Animal Reproduction Science*. 2015; 157:71–77.

Várkonyi, L., Bokor, Z., Molnár, J., Fodor, F., Szári, Z., Ferincz, Á., Bernáth, 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*). *Reproducción en animales domésticos*. doi: 10.1111 / rda.13383

Velasco-Santamaría Y., Medina-Robles V., Cruz-Casallas E. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*; 256: 267-271.

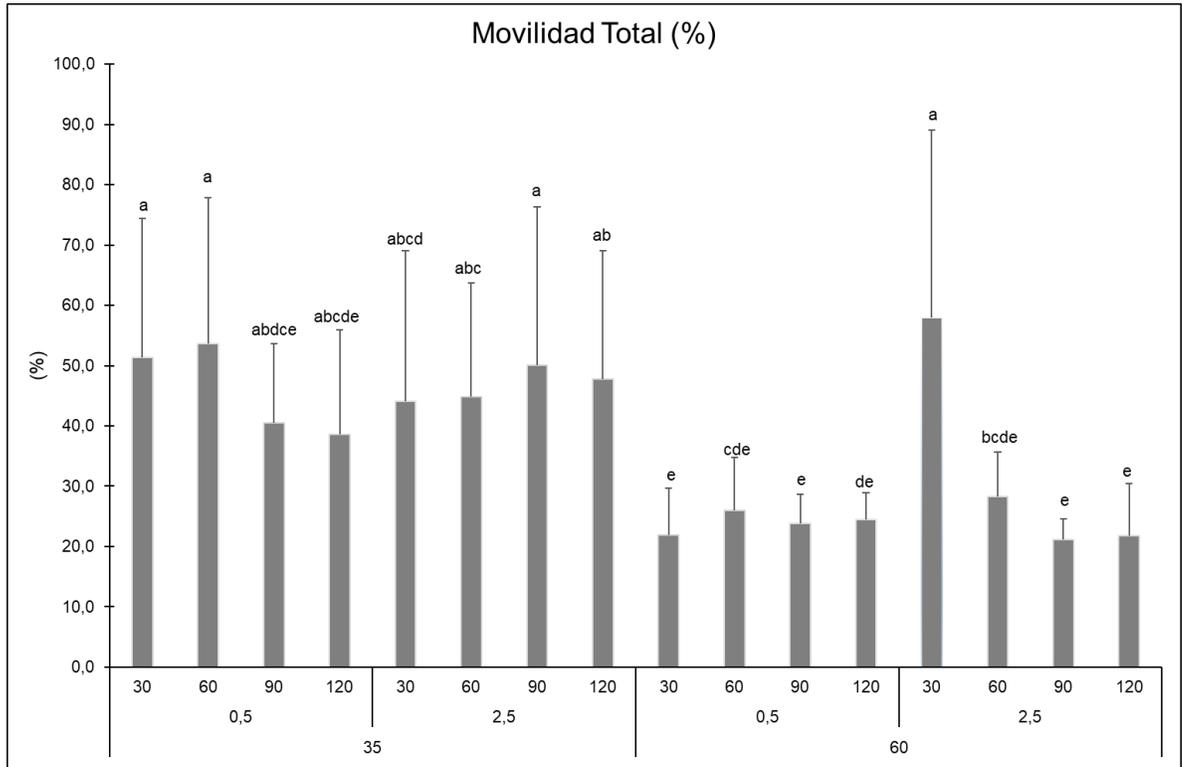
Viveiros A, Godinho HP. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 35: 137- 150. doi: 10.1007/s10695-008-9240-3.

Yildiz C., Bozkurt Y., Yavas I. 2013. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*; 67: 91–94.

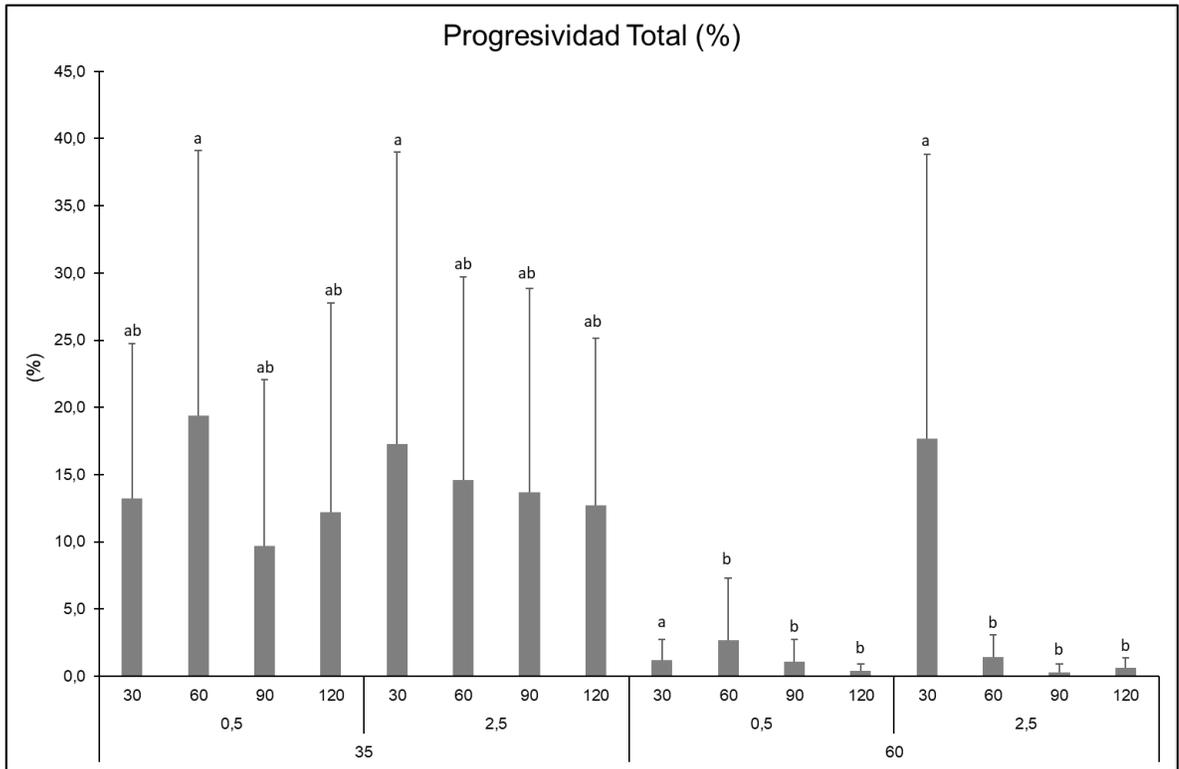
Zhang Y., Zhang S., Liu X., Xu Y., Wang C., Sawant M., Li J., Chen S. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*; 60: 989–996.

9. ANEXOS

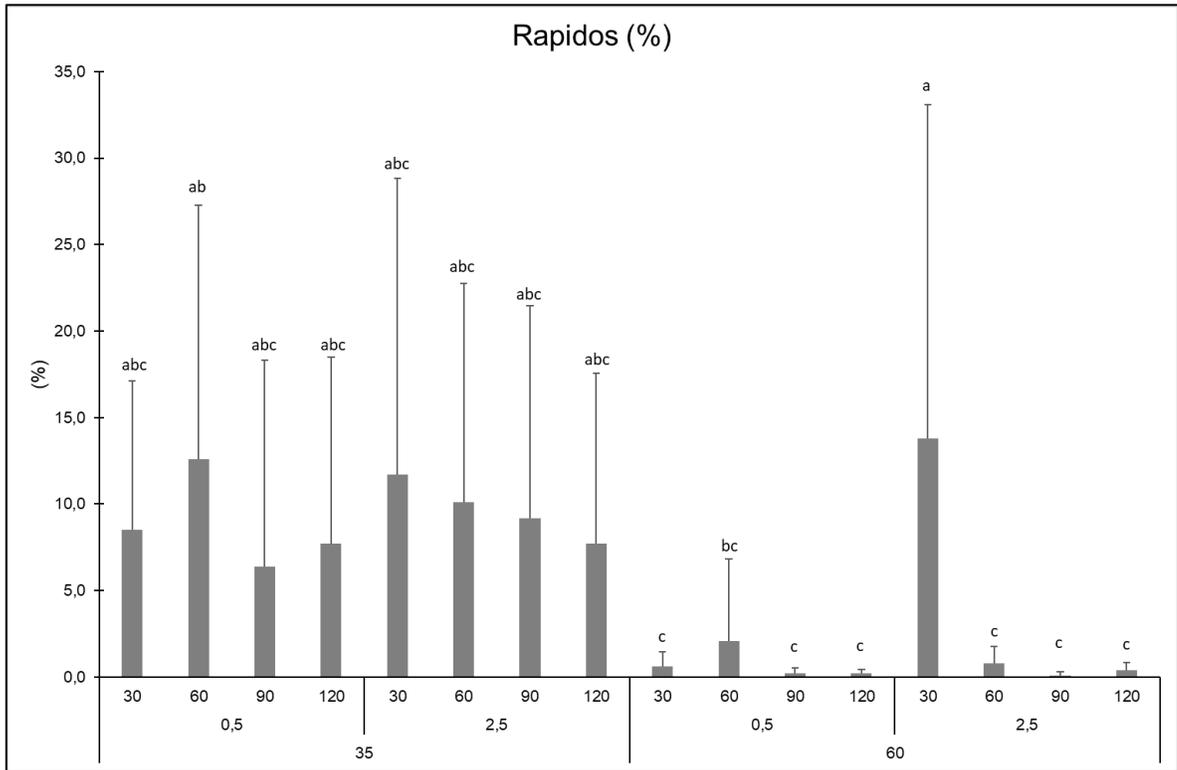
Anexo 1: Movilidad Total (%) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p > 0.05$).



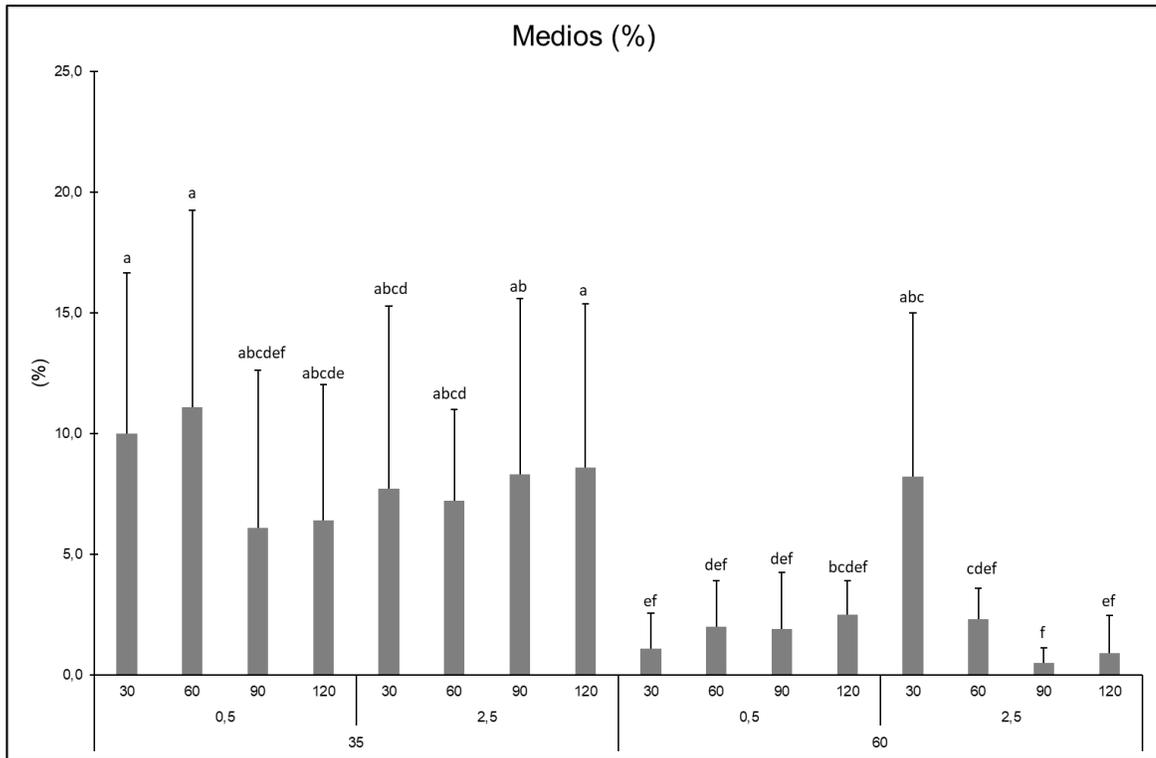
Anexo 2: Progresividad total (%) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p > 0.05$).



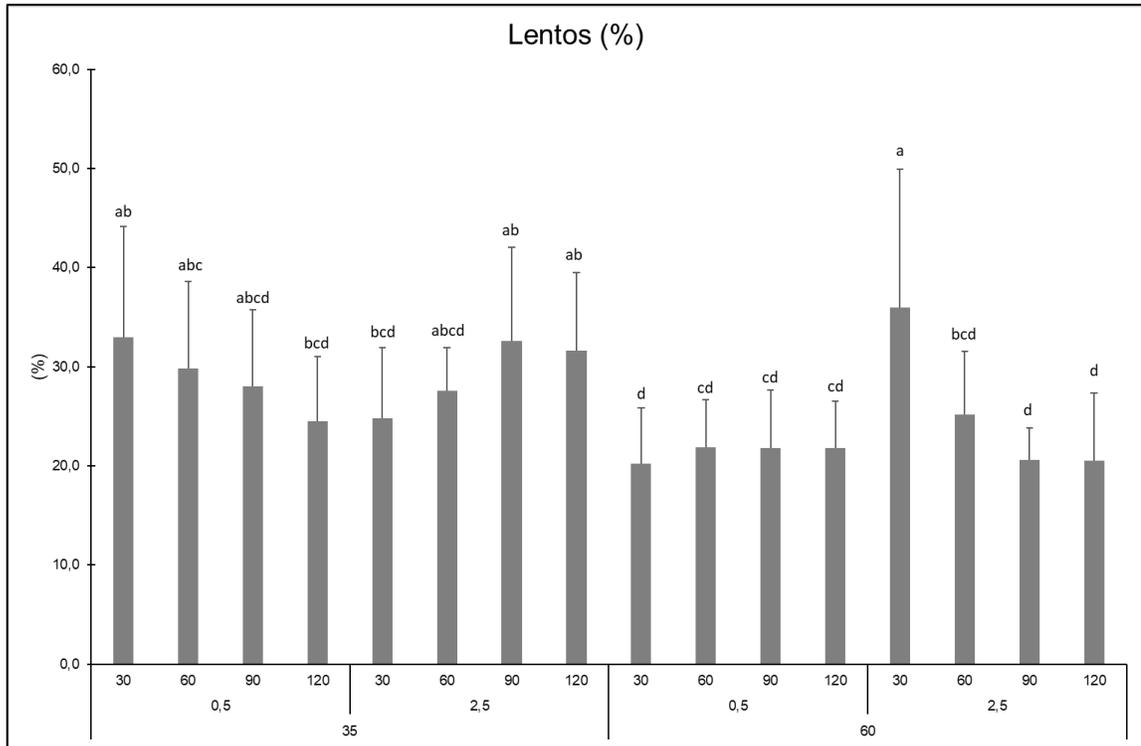
Anexo 3a: Espermatozoides rápidos (%) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p > 0.05$).



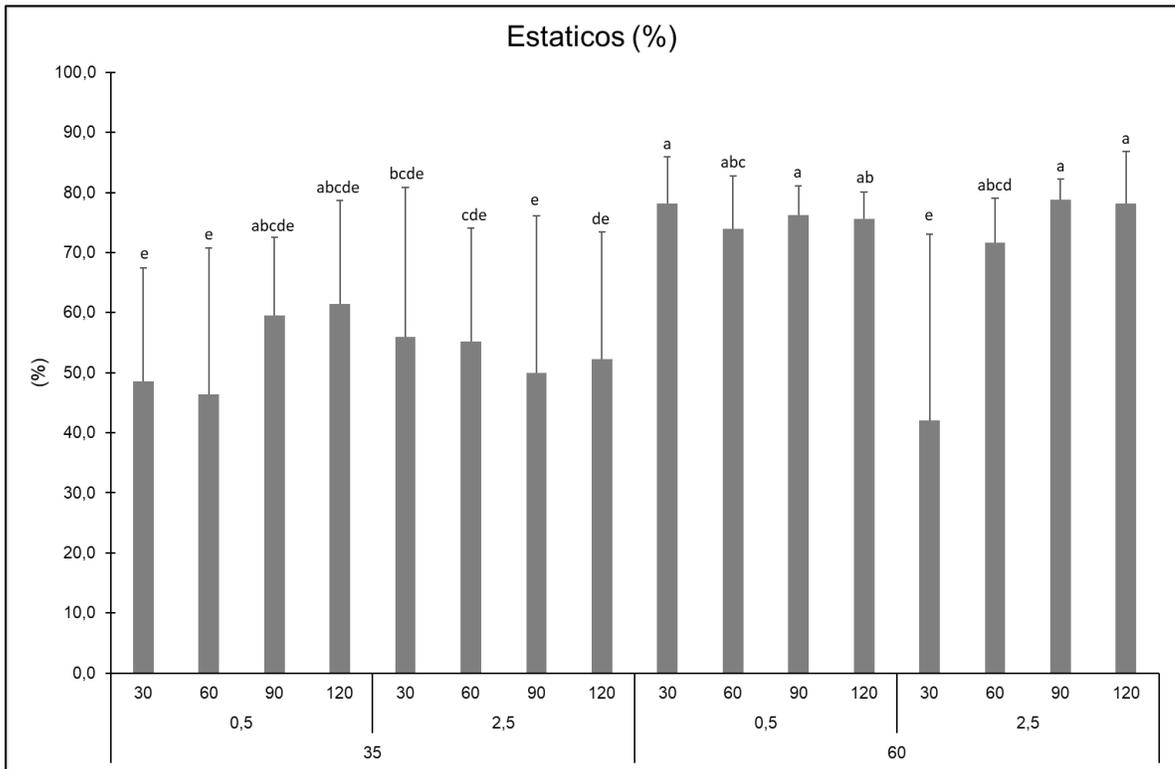
Anexo 3b: Espermatozoides medios (%) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p>0.05$).



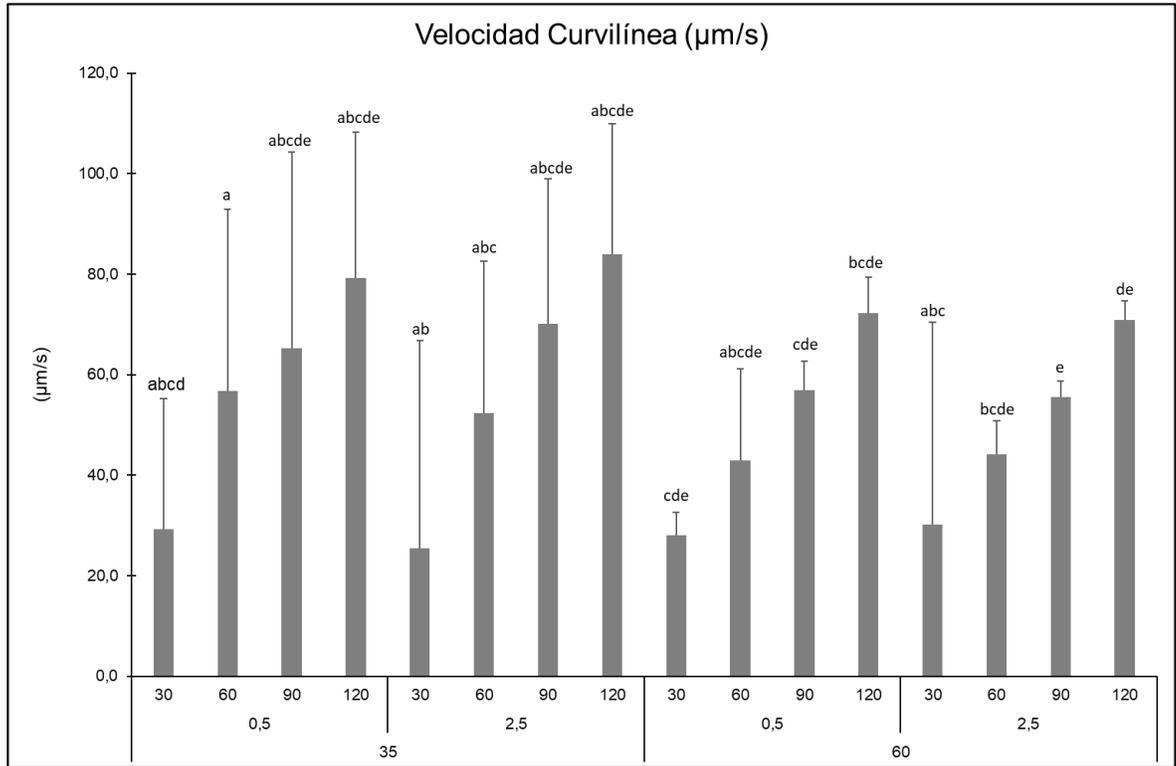
Anexo 3c: Espermatozoides lentos (%) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p > 0.05$).



Anexo 3d: Espermatozoides estáticos (%) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p > 0.05$).



Anexo 4: Velocidad Curvilínea (VCL) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p > 0.05$).



Anexo 5: Velocidad Lineal (VSL) de semen crioconservado-descongelado de bocachico *Prochilodus magdalenae* con diferentes temperaturas, curvas de descongelación y volumen de empaque. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p > 0.05$).

