

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA  
PERUANA**



**ESCUELA DE POSTGRADO  
“JOSÉ TORRES VÁSQUEZ”**



**MAESTRIA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ACUICULTURA**

**TESIS**

**Efecto de diferentes tiempos de criopreservación sobre la  
viabilidad del semen de *Colossoma macropomum*  
“gamitana”.**

**EHRlich YAM LLASACA CALIZAYA**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN ACUICULTURA.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2013**

## **MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR**

---

Dr. Lorgio Absalón Verdi Olivares  
Presidente del jurado

---

Dr. Luis Alfredo Mori Pinedo  
Miembro del jurado

---

M.Sc. Marina Claudiana del Aguila Pizarro  
Miembro del jurado

## **ASESORES**

---

Dr. Jesús Núñez Rodríguez (IRD)  
ASESOR

---

M.Sc. Luis García Ruiz (UNAP)  
ASESOR

## *Dedicatoria*

## AGRADECIMIENTO

En esta etapa de la vida, que me permite poder obtener otro logro académico, debo expresar mis más sinceros agradecimientos a las instituciones y personal, quienes de una u otra manera, participaron directa e indirectamente, en la culminación de éste trabajo de investigación:

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), que a través del Programa Cátedra CONCYTEC – Acuicultura, hizo posible el financiamiento de los estudios de Post Grado.

A la Coordinación general del Proyecto Cátedra CONCYTEC en Acuicultura, al Dr. Lorgio Verdi Olivares y al equipo de profesionales, que participaron en el desarrollo de la Maestría en Ciencias con Mención en Acuicultura.

Al Ing. Salvador Tello Martín, director del Programa AQUAREC, por permitir que esta investigación se desarrollara en las instalaciones del mencionado programa.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), al Instituto de Investigaciones para el Desarrollo, IRD – Francia, quienes financiaron la presente investigación y al Centro de Acuicultura “Nuevo Horizonte” – Iquitos, del Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero – Fondepes, quienes apoyaron desinteresada y oportunamente, en el avance del presente trabajo de investigación

De manera especial y sincera a mi asesor, Dr. Jesús Núñez Rodríguez, por el apoyo y confianza en el tema de investigación de tesis, y porque sus reconocidas capacidades han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de la tesis, sino también en mi formación como investigador, el cual no se hubiese podido concebir sin su oportuna orientación.

Quiero extender un sincero agradecimiento al Dr. Fred William Chu Koo, Blgo. Luciano Alfredo Rodríguez Chu, Mg. Bernardo Olaff Ribeiro Shultz, Mg. Pedro Ramirez, Mg. Luis García, Mg. Cristian Fernández y al Sr. Luís Lamberto Arévalo Llerena, y a todos los técnicos en acuicultura del IIAP – AQUAREC, por su disponibilidad y generosidad en compartir sus experiencias y conocimientos en Acuicultura. No cabe duda que sus participaciones y consejos, han enriquecido el trabajo realizado.

A todas las personas que colaboraron desinteresadamente durante el desarrollo de la presente investigación de tesis: Claudia Biffi García, Miguelina Vicuña Cardenas, Juvenal Napuchi Linares, Hugo Marichin, Cherry Yahuarcani, Italo Orbe, Luis Zafra, y a todas las personas que aportaron sus esfuerzos físicos y sus conocimientos.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló, con el propósito de evaluar el efecto de diferentes tiempos de criopreservación, sobre la viabilidad del semen de *Colossoma macropomum*, “gamitana”. y se desarrolló en las instalaciones del Centro de Investigaciones “Fernando Alcántara Bocanegra”, del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP. Se utilizó un sex ratio de 1:2 (Hembra:Macho), colectando el semen en solución de 0.4 M. de Sacarosa Para el proceso de criopreservación el semen, se sometió a dos tiempos de congelación (Factores: 6 minutos y 9 minutos) y dos niveles de crioprotectores (Nivel 1: 10% de DMSO a 0.1 M. y nivel 2: 43% de dextrosa a 0.3 M.).Se fertilizó con 25  $\mu$ L de semen descongelado, utilizando un diseño factorial de  $2^2$ , los cuales fueron sometidos a un ANOVA

Los resultados demuestran en la evaluación del semen fresco, que el tiempo de motilidad, presentó diferencia significativa  $p=0.021$ . Sin embargo, en la evaluación del semen post descongelación, el tiempo de motilidad y porcentaje de motilidad, no presentaron diferencia significativa ( $p>0.05$ ) para cada reproductor, pero se evidenció una reducción de los tiempos promedios, en comparación al semen fresco. Para el porcentaje de fertilización, sólo el tiempo de congelación presentó diferencia significativa ( $p=0.000001$ ), para el macho 1 y para el macho 2 no se encontró diferencias significativas, entre los tratamientos. Para el porcentaje de eclosión, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1, no se encontró diferencias significativas  $p>0.05$  y para el macho2, se encontró diferencias significativas ( $p=0.043$ ), para el porcentaje de crioprotector. En relación al porcentaje de malformación de las larvas, el tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ), para los reproductores, sin embargo éstos porcentajes, fueron superiores en relación al tratamiento con semen fresco. Por lo cual se evidencia, que habría un factor desconocido del macho, que no permitía replicar los valores obtenidos, lo cual se manifiesta en la cinergia de las variables estudiadas, para esta especie.

**Palabras claves:** *Colossoma macropomum*,, crio preservacion de semen, motilidad, tiempo de activación, dextrosa.

## **ABSTRACT**

This research was developed in order to evaluate the effect of the different freezing times of cryopreservation, and the sperm viability of *Colossoma macropomum*, "gamitana". It was developed in the facilities of the Research Center "Fernando Alcantara Bocanegra". The Research Institute of the Peruvian Amazon - IIAP. A sex ratio of 1:2 (female: male) was used. The semen was collected and a 0.4 M sacarosa solution was used for the cryopreservation process. This process was done in two stages of freezing (factors: 6 minutes and 9 minutes) and two levels of cryoprotectores were used (Level 1: 10% of DMSO to 0.1M and level 2: 43% of dextrose at 0.3 M.) 25  $\mu$ L unfrozen semen was fertilized, using a factorial design of 2<sup>2</sup>, which were put through an ANOVA.

The results of the evaluation of fresh semen show that motility at the time, presented a significant difference of  $p = 0.021$ . In assessing the post thawed sperm, motility time and percentage, showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) for each player. However, a reduction of time averages appeared in comparison to the fresh semen. In reference to fertilization, only freeze time presented a significant difference ( $p = 0.000001$ ). Male 1 and male 2 showed no significant differences between treatments. As for the freezing time and percentage of the cryoprotector form male 1, no significant differences were found  $p > 0.05$ , where as for male 2 a significant different of  $p = 0.043$  was found in the percentage of the cryoprotector. Regarding the percentage of malformed larvae, freeze time and percentage of cryoprotectant showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) for the players. However these percentages were higher in relation to treatment with fresh semen. Hence, it evident that there is an unknown male factor, which did not permit the replication of the values obtained. This is manifested in the cinergy of the variables for this species.

**Keywords:** *Colossoma macropomum*, cryo preservation of semen, motility, activation time, dextrose.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
Página de Jurado y Asesor .....	I
Dedicatoria .....	ii
Agradecimiento .....	iii
Resumen .....	v
Abstract .....	vi
Contenido .....	vii
Lista de Tablas .....	ix
Lista de Figuras .....	x
Lista de Anexos .....	Xii
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO II: ANTECEDENTES .....	3
CAPITULO III: METODOLOGÍA .....	4
3.1. 1. Area de estudio .....	4
3.1.2. Tipo de investigación .....	5
3.1.3. Diseño de la investigación .....	5
3.1.4. Población y Muestra .....	5
3.1.5. Periodo experimental .....	6
3.1.6. Unidades experimentales .....	6
3.2.Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	7
3.2.1. Alimentación de Reproductores .....	7
3.2.2.Frecuencia de Alimentación .....	8
3.2.3. Selección de Reproductores .....	8
3.2.3.1. Machos .....	8
3.2.3.2. Hembras .....	9
3.2.4. Obtención de gametos .....	10
3.2.4.1.Cantidad de óvulos .....	11
3.2.4.2. Evaluación de semen .....	12
3.2.4.3. Concentración de Semen .....	12

3.2.4.4. Volumen de semen	.....	13
3.2.4.5. Relación cantidad de espermatozoide y cantidad de óvulos	.....	13
3.2.5. Técnica de Criopreservación	.....	13
3.2.5.1. Mezcla de Crioprotectores	.....	14
3.2.5.2. Empacado	.....	15
3.2.5.3. Sellado	.....	16
3.2.5.4. Congelado	.....	16
3.2.5.5. Tiempo de Almacenamiento	.....	17
3.2.5.6. Descongelado	.....	18
3.2.6. Fertilización	.....	18
3.2.7. Incubación de óvulos fecundados	.....	19
3.2.8. Eclosión	.....	20
3.2.9. Larvas deformes	.....	20
3.2.10. Procesamiento de la Información	.....	21
CAPITULO IV: RESULTADOS	.....	22
4.1.1. Efecto de las técnicas de criopreservación, sobre el porcentaje de motilidad postdescongelación, del semen de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”.	.....	22
4.1.2. Efecto de las técnicas de criopreservación, en la tasa de fertilización de huevos de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”.	.....	24
4.1.3. Efecto de las técnicas de criopreservación, en la tasa de eclosión de huevos de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”.	.....	27
4.1.4. Efecto de las técnicas de criopreservación, en la tasa de malformación de larvas de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”.	.....	29
CAPITULO V: DISCUSIÓN	.....	33
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	.....	41
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES	.....	42
CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.....	43
CAPITULO IX: ANEXOS	.....	53

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Factores y niveles de estímulo, aplicado a los lotes de semen crio preservado de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”	<b>5</b>
<b>2</b>	Dosificación de EHC y Conceptal©, para <i>Colossoma macropomum</i>	<b>10</b>
<b>3</b>	Participación de crioprotectores, aplicado a los lotes de semen para crio preservación de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”	<b>14</b>
<b>4</b>	Valores promedio $\pm$ DS, de porcentaje de motilidad de espermatozoides post descongelación, según reproductor de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”.	<b>23</b>
<b>5</b>	Valores promedio $\pm$ DS, de porcentaje de fertilización de óvulos de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”	<b>26</b>
<b>6</b>	Valores promedio $\pm$ DS, de porcentaje de eclosión, de óvulos de <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”	<b>28</b>
<b>7</b>	Valores promedio $\pm$ DS, de porcentaje de eclosión, de óvulos de, <i>Colossoma macropomum</i> “gamitana”	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Vista del frontis y mapa de límites del centro de investigaciones de Fernando Alcántara Bocanegra (CIFAB), sede del Programa para el uso y conservación del agua y sus recursos (AQUAREC) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).	<b>4</b>
<b>2</b>	Vista de las unidades experimentales a) Bandejas de plástico para incubación de ovas fertilizadas b) Tanques de inducción hormonal, para reproductores de “gamitana”.	<b>7</b>
<b>3</b>	Alimento extrusado para alimentación de reproductores de “gamitana”, elaborado en el CIFAB – IIAP.	<b>8</b>
<b>4</b>	Selección de reproductores hembra de “gamitana”, en el CIFAB – IIAP.	<b>9</b>
<b>5</b>	Obtención de gametos de reproductores de “gamitana”. a) hembra b)macho, en el CIFAB – IIAP.	<b>11</b>
<b>6</b>	Colecta de óvulos de “gamitana”, en el CIFAB – IIAP.	<b>11</b>
<b>7</b>	Evaluación de semen de “gamitana”, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.	<b>12</b>
<b>8</b>	Conteo de espermatozoides de “gamitana”, utilizando la cámara de Neubauer, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.	<b>13</b>
<b>9</b>	Homogenización de espermatozoides de “gamitana”, con los crioprotectores, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.	<b>15</b>
<b>10</b>	Empacado de semen con crioprotectores. a) Pajillas para criopreservación de semen. b) Empacado de espermatozoides de “gamitana”, con los crioprotectores, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.	<b>15</b>
<b>11</b>	Sellado de espermatozoides de “gamitana”, con los crioprotectores, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.	<b>16</b>
<b>12</b>	Congelado de semen de “gamitana”. a) Pajillas selladas listas para la criogenesis. b) Colocación de las pajillas selladas dentro del tanque de 20 litros de tecnopor. c) Pajillas sobre el vapor de nitrógeno líquido, en el CIFAB – IIAP	<b>17</b>

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>Pág.</b>
<b>13</b>	Tanque contenedor de nitrógeno líquido, almacenando las pajillas con semen y diluyentes crioprotectores, en el CIFAB – IIAP..	<b>18</b>
<b>14</b>	Envases de plástico, utilizados en la incubación artificial. a) Bandejas de plástico, distribuidas al azar. b) Huevo fertilizado de “gamitana”	<b>20</b>
<b>15</b>	Motilidad de semen de “gamitana” post descongelación, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1 (a y b) y tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 2 (c y d)	<b>24</b>
<b>16</b>	Valores de fertilizados con semen descongelado, de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 2 (a y b).	<b>26</b>
<b>17</b>	Valores de fertilizados con semen descongelado, de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 2 (a y b)..	<b>27</b>
<b>18</b>	Valores de eclosión, con semen descongelado de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1 (a y b) y para el macho 2 (c y d).	<b>29</b>
<b>19</b>	Valores de malformación de larvas de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1 (a y b) y macho 2 (c y d).	<b>32</b>

## LISTA DE ANEXOS

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Porcentajes de la evaluación de semen pre congelación	<b>53</b>
<b>2</b>	Porcentajes de la evaluación de semen post descongelación	<b>53</b>
<b>3</b>	Porcentaje de fertilización, eclosión y larvas deformes, para los reproductores	<b>54</b>

## CAPITULO 1:

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

Los beneficios de la criopreservación de gametos (espermatozoides) son ampliamente conocidos e incluyen desde facilitar el mejoramiento genético de las especies de interés comercial hasta permitir la conservación de especies amenazadas o las que se encuentran en peligro de extinción (Cabrita *et al.*, 2010; Liu, 2006; Martino, 2006; Otemé *et al.*, 1996; Munkittrick y Moccia, 1984).

Sin embargo, varios protocolos para la crio preservación de espermatozoides de peces han sido desarrollados durante los últimos 25 años a pesar del gran número de estudios e investigaciones sobre criopreservación de semen, aun no se han logrado los procesos prácticos suficientes que permitan el uso de esta técnica a escala comercial. (Lichtenstein *et al.*, 2010; Vuthiphandchai *et al.*, 2009; Muchlisina, *et al.* 2004; Carolsfeld *et al.*, 2003; Chereguini *et al.*, 1992; Leung y Jamieson, 1991). En general, los resultados son muy variables, indicando una alta sensibilidad de los protocolos propuestos, lo cual hace necesario, en la mayoría de los casos, ajustar el procedimiento para cada especie (Mocé *et al.*, 2010; Rideout *et al.*, 2004; Krone y Wittbrodt, 1997; Ciereszko y Dabrowski, 1993).

Aunque se han realizado varios esfuerzos para lograr la crioconservación eficiente de semen de algunas especies amazónicas, los índices de fertilidad hasta ahora obtenidos aún son inferiores a aquellos observados utilizando semen fresco. Los bajos índices de fertilidad podrían explicarse porque la mayoría de los protocolos estudiados han sido derivados de aquellos utilizados en especies marinas, particularmente salmónidos y ciprínidos. (Murgas *et al.*, 2001; Martino, 2006; Maria *et al.*, 2006.)

Surge entonces la necesidad de realizar trabajos que permitan perfeccionar un protocolo para la crioconservación del semen de esta especie, que garantice adecuados

índices de fertilidad y que permita aprovechar las ventajas que ofrece la inseminación artificial.

Por lo acotado, esta investigación tuvo por finalidad evaluar el efecto de diferentes tiempos de criopreservación, sobre la viabilidad de semen de *C. macropomum*, que garantiza un adecuado índice de fertilidad. Los resultados obtenidos, en esta investigación, brinda información y nuevos aportes científicos, en la optimización de la técnica de criopreservación.

Los hallazgos de este trabajo constituyen un paso muy importante, orientado hacia la conservación de la especie. Como también promover un banco genético con semen viable, que permitirá mantener las opciones de tener semen de buena calidad, disponible en el tiempo, de acuerdo a las demandas de reproducción.

## CAPITULO 2:

### **2.1. ANTECEDENTES**

Las primeras investigaciones sobre criopreservación, se iniciaron en semen de bóvidos y posteriormente han abarcado diversas especies de mamíferos tales como ratones, cerdos, conejos y especialmente en humanos (Chereguini *et al.*, 1992).

En los últimos años, se han trabajado varios protocolos para criopreservar espermatozoides de peces, con resultados muy variables (Carolsfeld *et al.*, 2003; Leung y Jamieson, 1991; Munkittrick y Moccia, 1984; Ciereszko y Dabrowski, 1993; Gwo *et al.*, 1991; Lahnsteiner *et al.*, 1992; Otemé *et al.*, 1996).

Así, la biotecnología de la reproducción, ha sido una área de intensa investigación en especies de vida acuática, siendo los peces ampliamente estudiados, más aún, los primeros éxitos de fecundación de huevos con espermatozoides criopreservados, se realizaron en especies de agua dulce, especialmente en salmónidos (Chereguini *et al.*, 1992). Estos estudios se han extendido a la criopreservación espermática de numerosas especies diferentes de peces (Hoyle y Idler, 1968; Ott y Horton, 1971; Harvey, 1983; Stoss y Holtz, 1983; Baynes y Scott, 1987; Piiromen, 1987; Steyn y Van, 1987; Yoo *et al.*, 1987; Cloud *et al.*, 1990; Chereguini *et al.*, 1992; Thorogood y Blackshaw, 1992; Almendras, 1993; Ciereszko *et al.*, 1993; Hotz, 1993; Pillai *et al.*, 1994; Babiak *et al.*, 1995; Conget *et al.*, 1996; Otemé *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 2000).

Ensayos experimentales en distintas especies amazónicas, de importancia comercial, se han realizado con el fin de evaluar el efecto de crioprotectores en la viabilidad de espermatozoides y su poder fecundante post congelación, como alternativa de reproducción selectiva (Viveiros *et al.*, 2009a; Ramirez *et al.*, 2005). También, se ha investigado el efecto de la criopreservación de semen de *Colossoma macropomum*, sobre la viabilidad y poder fecundante, utilizando la técnica de criopreservación lenta cuyos resultados difieren ampliamente en comparación, con la capacidad fecundante del semen fresco (Martino, 2006).

## **CAPITULO 3:**

### **3.1. METODOLOGÍA**

#### **3.1.1. Área de estudio**

El estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones de “Fernando Alcántara Bocanegra” (CIFAB) del Programa de Investigación para el Uso del Agua y sus Recursos (AQUAREC) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), ubicado geográficamente a 3° 48.9' 9" S y 73° 19'18.2" W, con una altitud de 128 m.s.n.m., situado en el km. 4.5 de la carretera Iquitos- Nauta en el distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, en la Región Loreto (Figura 1).



**Figura 1.** Vista del frontis y mapa de límites del Centro de Investigaciones Fernando Alcántara Bocanegra (CIFAB), sede del Programa para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).

#### **3.1.2. Tipo de investigación.**

El presente trabajo de investigación fue del tipo experimental; y nos permitió conocer el efecto de diferentes tiempos de criopreservación, sobre la viabilidad del semen de *Colossoma macropomum* “gamitana”,

### 3.1.3. Diseño de la investigación

Para poder evaluar las variables de dependientes (Porcentaje de fertilización, porcentaje de eclosión y porcentaje de larvas malformadas), se realizó un diseño de bloques al azar, con un arreglo factorial simétrico de  $2^2$ , teniendo cada factor (Tiempo de congelación), dos niveles de estímulo (porcentaje de crioprotector), con tres repeticiones respectivamente (Tabla 01).

**Tabla 01. Factores y niveles de estímulo, aplicado a dos lotes de semen crio preservado de *Colossoma macropomum* “gamitana”**

Crio protector*\ Factores*	Tiempo de congelación (T)	
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
C <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> C <sub>1</sub> * x 3 Rep.	T <sub>2</sub> C <sub>1</sub> * x 3 Rep.
C <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> C <sub>2</sub> * x 3 Rep.	T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> * x 3 Rep.

\* (C<sub>1</sub>=10% DMSO; C<sub>2</sub>=43% de Dextrosa; T<sub>1</sub>= 6Min.; T<sub>2</sub>=9 Min.)

Rep. = Repeticiones

Variable dependiente (X): % de fertilización, % de eclosión y % de larvas malformadas.

Variable independiente (Y): Tiempo de congelación y Crioprotectores.

### 3.1.4. Población y muestra

Para la selección de los reproductores (Hembras y Machos), que se encontraban en el Centro de Investigaciones “Fernando Alcántara Bocanegra” (CIFAB), del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), se aplicó los criterios de inclusión y exclusión (de acuerdo a su estado de maduración gonadal), obedeciendo dichos criterios a lo recomendado por Woynarovich y Woynarovich (1998), siendo dos reproductores machos y un reproductor hembra, los que se encontraban aptos para el proceso de inducción hormonal.

Se colectaron dos lotes de semen con solución de sacarosa 0.4 M, como diluyente seminal, según lo recomendado por Llasaca y Núñez (2010), para mantener los espermatozoides inmóviles. Así mismo, se colectó 5.0 g., aprox. de óvulos de una misma progenie.

### **3.1.5. Período experimental**

El período experimental fue de 210 días aproximadamente, el cual fue realizado en dos temporadas reproductivas (Octubre 2010 - Marzo del 2011 y Marzo del 2012). Para lo cual se utilizó un total de 20 reproductores machos y 9 reproductoras hembras, en los períodos de experimentación, con el fin de obtener datos, que contribuyan a complementar el desarrollo del experimento de la tesis.

### **3.1.6. Unidades experimentales**

El experimento se llevó a cabo en veintisiete (27) bandejas rectangulares de plástico de medio (1/2) litro de capacidad (Figura 2a), que estuvieron colocadas dentro de un tanque de cemento, revestido con mayólica blanca de 1.5 m. x 1.0 m x 1.0 m., de largo y con una tirante de agua de 0.7 m. (Figura 2b).



**Figura 2.** Vista de las unidades experimentales a) Bandejas de plástico para incubación de ovas fertilizadas b) Tanques de inducción hormonal, para reproductores de “gamitana”.

### **3.2. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.**

#### **3.2.1 Alimentación de reproductores**

Los reproductores, en su etapa de confinamiento y preparación, fueron alimentados de acuerdo a lo recomendado por Woynarovich y Woynarovich (1998), a una ración de 1.5 % de la biomasa. El alimento fue elaborado, en el CIFAB – IIAP y contenía entre 30 a 35% de proteína y energía de 2800 kcal, recomendado por IIAP (2000).



**Figura 3.** Alimento extrusado para alimentación de reproductores de “gamitana”, elaborado en el CIFAB – IIAP.

### **3.2.2 Frecuencia de alimentación**

Los reproductores fueron alimentados siguiendo lo recomendado por IIAP (2000), a una frecuencia diaria de alimentación de 2 a 4 veces al día.

### **3.2.3 Selección de reproductores**

Los reproductores (machos y hembras) aptos que fueron considerados para el tratamiento hormonal, son los que reúnan, las características descritas por Woynarovich y Woynarovich (1998) e IIAP (2000). Teniendo los siguientes criterios de selección e inclusión:

#### **3.2.3.1 Machos**

Se seleccionaron, 5 reproductores que a leve presión abdominal, tuvieron emisión de líquido blanquecino, de aspecto lechoso y de considerable viscosidad.

### 3.2.3.2 Hembras

Se seleccionaron, reproductoras que presentaban como características de madurez: presencia de vientre abultado y blando al tacto, orificio genital rojizo y levemente prominente.

Así también, se realizó la biopsia intraovárica y se introdujo una cánula por el oviducto, extrayendo una muestra de óvulos y realizando el análisis del estadio de maduración de los óvulos, seleccionando a dos hembras que presentaron, óvulos con uniformidad de tamaño y que tenían el núcleo en posición periférica, (Figura 5).



**Figura 4.** Selección de reproductores hembra de “gamitana”, en el CIFAB – IIAP.

Posteriormente se trabajó, con la técnica de inducción hormonal descrita por Arias y Hernández (2009); Alcantara *et al.* (2002), de acuerdo a la Tabla N° 02.

**Tabla N° 02.-** Dosificación de EHC y Conceotal© para *Colossoma macropomum*

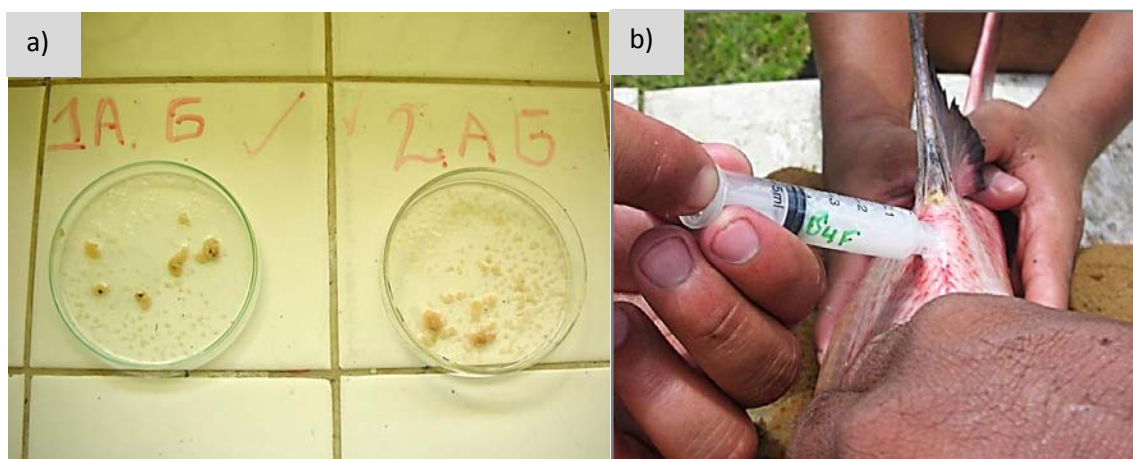
<b>Hormona</b>	<b>Sexo</b>	<b>Dosis total</b>	<b>N° de inyecciones</b>	<b>Intervalo Dosis</b>
EHC	H*	5.0 mg/kg	2	12 hrs
Conceptal©	M**	1.0 ml/kg	1	-

EHC: Extracto hipofisiario de carpa.

\*Arias y Hernández, 2009; \*\*Alcantara *et al.*, 2002.

#### **3.2.4. Obtención de gametos**

Después de la inducción hormonal, se obtuvo una muestra de los gametos de los reproductores, mediante presión o masaje abdominal (machos) y biopsia intra ovárica (hembras), siguiendo los criterios descritos por IIAP (2000), los cuales fueron recolectados, en placas Petri (óvulos) y en jeringas de 10 ml., con solución de Sacarosa 0.4 M. (semen), a una proporción de 1/10, según Llasaca y Núñez (2010) (Figura 5).



**Figura 5.** Obtención de gametos de reproductores de “gamitana”. a) hembra  
b)macho, en el CIFAB – IIAP.

#### 3.2.4.1 Cantidad de óvulos

Para el presente estudio se trabajó con 5.0 g. aproximadamente, de óvulos frescos/reproductor hembra en total, los cuales se mantuvieron en cajas de tecnopor, con hielo en gel, para mantenerlos a temperatura refrigerada, para conservar en óptimas condiciones los óvulos, para la fertilización (Figura 6)



**Figura 6.** Colecta de óvulos de “gamitana”, en el CIFAB – IIAP.

### 3.2.4.2 Evaluación de semen

Inicialmente se evaluó la motilidad del semen de cada reproductor macho, antes de ser sometido a los diferentes tratamientos. Después se evaluó las muestras de semen criopreservado, obteniendo los indicadores de los índices de motilidad (Figura 7).



**Figura 7.** Evaluación de semen de “gamitana”, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.

### 3.2.4.3. Concentración de semen

Se determinó la concentración de espermatozoides/ml, aplicando la metodología de recuento de células utilizando la cámara de Neubauer (Figura 8).



**Figura 8.** Conteo de espermatozoides de “gamitana”, utilizando la cámara de Neubauer, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.

#### **3.2.4.4. Volumen de semen**

El volumen de semen que se utilizó fue de 2.0 ml de semen en solución de sacarosa (1/10), como volumen total, por cada reproductor. Se tuvo en cuenta la relación de cantidad de espermatozoides y cantidad de óvulos, descrita por Arias (2006).

#### **3.2.4.5. Relación cantidad espermatozoides y cantidad de óvulos**

La proporción de la cantidad de espermatozoides por óvulo, que se utilizó, fue la recomendada por Arias (2006), habiendo obtenido un mínimo de 75 000 espermatozoides móviles de semen conservado por óvulo para obtener fertilización del 65%.

#### **3.2.5. Técnica de Criopreservación de semen**

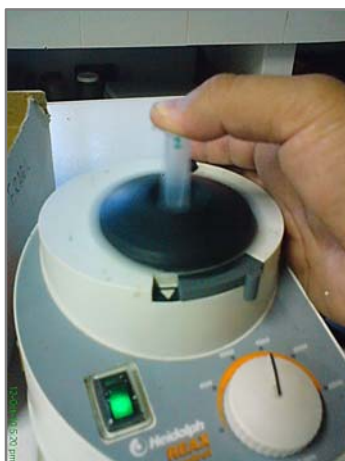
Se descartaron lotes de semen de 3 reproductores de “gamitana”, que no presentaban las mejores características de viabilidad, para proceder a criopreservar los lotes de los otros 2 machos restantes. Para cada lote de semen se realizó el mismo procedimiento de mezclado, con los crioprotectores.

### 3.2.5.1 Mezcla de Crioprotectores

El lote de semen de cada reproductor, se dividió en dos sub lotes, siendo la proporción para cada lote según Tabla 03, para cada tiempo de congelación, posteriormente se procedió a homogenizar la solución crioprotectora (Figura 09)

**Tabla 03.** Participación de crioprotectores, aplicado a los lotes de semen para crio preservación de cada reproductor macho de *Colossoma macropomum* “gamitana”

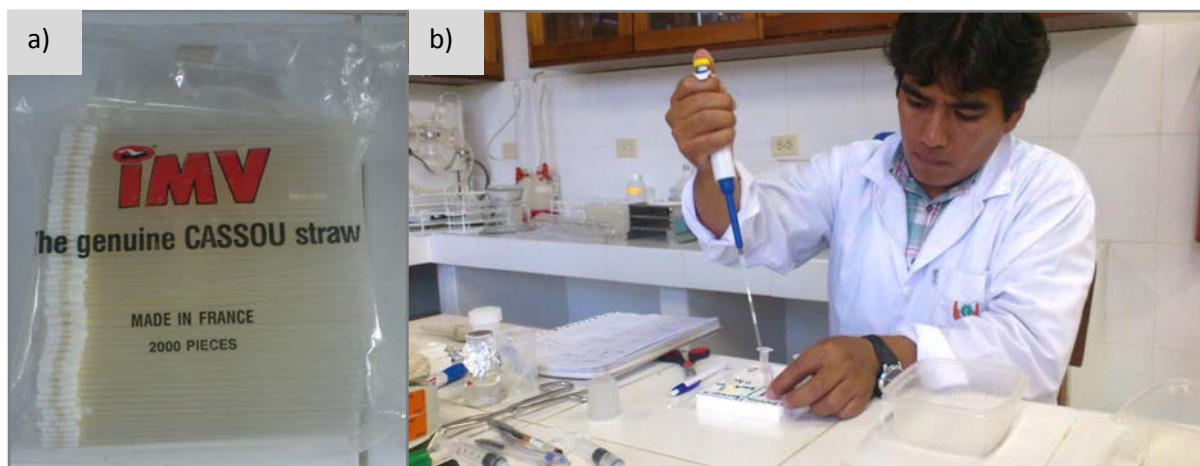
<b>Lote de semen</b>	<b>Crioprotector</b>	<b>Participación (%)</b>
Sub lote 1 (Nivel 1) 10% DMSO	DMSO	10
	Yema de huevo	5
	Semen	10
	Sacarosa	75
Sub lote 2 (Nivel 2) 43% Dextrosa	Yema de huevo	5
	Semen	10
	Sacarosa	42.5
	Dextrosa	42.5



**Figura 9.** Homogenización de espermatozoides de “gamitana”, con los crioprotectores, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.

### 3.2.5.2. Empacado

Posterior al proceso de mezclado, del semen con los crioprotectores, se realizó el empacado respectivo, en pajillas de 500  $\mu\text{L}$ ., de capacidad, siendo el volumen empacado de 200  $\mu\text{L}$ . por pajilla (Figura 10).



**Figura 10.** Empacado de semen con crioprotectores. a) Pajillas para criopreservación de semen. b) Empacado de espermatozoides de “gamitana”, con los crioprotectores, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP

### 3.2.5.3 Sellado

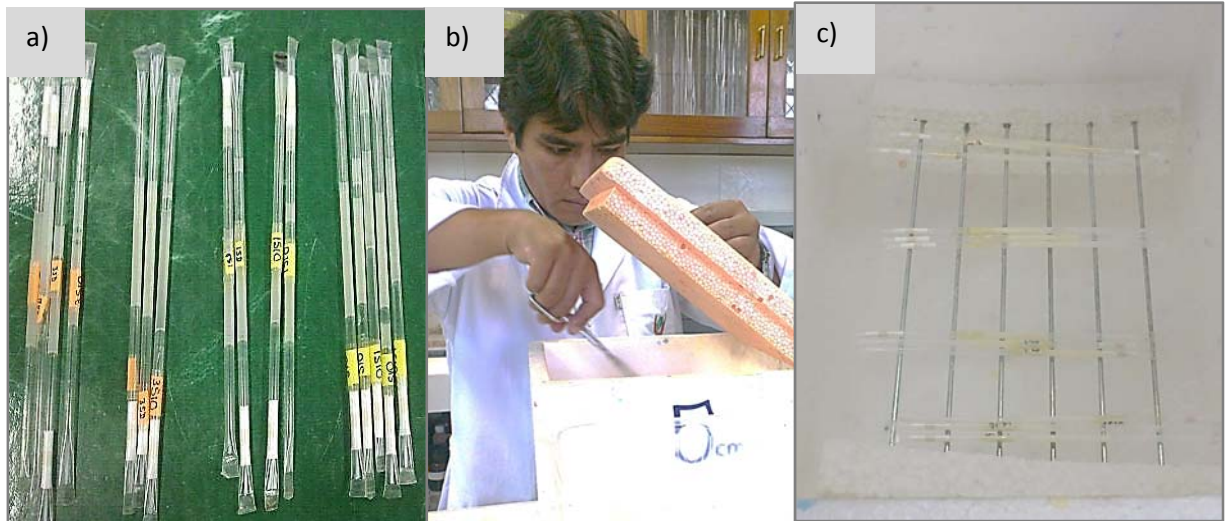
Posteriormente, con la ayuda de un mechero de alcohol y un alicate, se realizó el sellado respectivo, de cada extremo de la pajilla, calentando primeramente el alicate a una temperatura de 80 °C., aproximadamente, la cual permitió el sellado hermético por la presión en calor de las pajillas (Figura 11).



**Figura 11.** Sellado de espermatozoides de “gamitana”, con los crioprotectores, antes del proceso de criopreservación, en el CIFAB – IIAP.

### 3.2.5.4. Congelado

Una vez las pajillas selladas, se procedió a congelarlas en diferentes tiempos de congelación: 6 min. y 9 min., lo que corresponde a 5.0 cm., y 10 cm., de altura a vapor de nitrógeno líquido. Para lo cual se utilizó envases de tecnopor de 20 litros de capacidad, con una rejilla adecuada en su interior, para alcanzar las alturas correspondientes, con la finalidad que puedan llegar a la temperatura de congelación esperada, para luego ser almacenadas en el tanque contenedor de nitrógeno líquido, de 60 litros de capacidad, hasta el momento de la fertilización (Figura 12).



**Figura 12.** Congelado de semen de “gamitana”. a) Pajillas selladas listas para la criogenesis. b) Colocación de las pajillas selladas dentro del tanque de tecnopor, de 20 litros de capacidad aproximadamente. c) Pajillas sobre el vapor de nitrógeno líquido, en el CIFAB – IIAP.

### 3.2.5.5. Tiempo de almacenamiento

Después de haber congelado en diferentes técnicas de criopreservación, las pajillas con las muestras de semen criopreservado, fueron almacenadas por un período de 10 días, en el tanque contenedor de nitrógeno líquido, para posteriormente ser descongeladas y se fertilizadas, al momento de la obtención de los óvulos (Figura 13).



**Figura 13.** Tanque contenedor de nitrógeno líquido, almacenando las pajillas con semen y diluyentes crioprotectores, en el CIFAB – IIAP.

#### **3.2.5.6. Descongelado**

Después del desove del reproductor hembra, se procedió a descongelar las pajuelas, las cuales fueron sumergidas en agua a temperatura ambiente, dentro de una bandeja de plástico, con la finalidad de homogenizar la temperatura en el proceso de descongelación, hasta evidenciar que la pajilla estaba completamente descongelada, lo cual fue de 1 minuto aproximadamente.

#### **3.2.6. Fertilización**

Para la fertilización de los óvulos, se realizó por el método seco, que consistió en echar semen (tanto fresco como descongelado) sobre la bandeja que contenían óvulos, según como lo recomendado por IIAP (2000). Primeramente se descongeló las pajillas que contenían el semen congelado en nitrógeno líquido, luego se agregó una gota de solución de Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), a 0.1 M (para la activación de la motilidad), según lo recomendado por Vicuña (2012), para una mejor recuperación y activación de los espermatozoides congelados. Para lo cual se calculó:

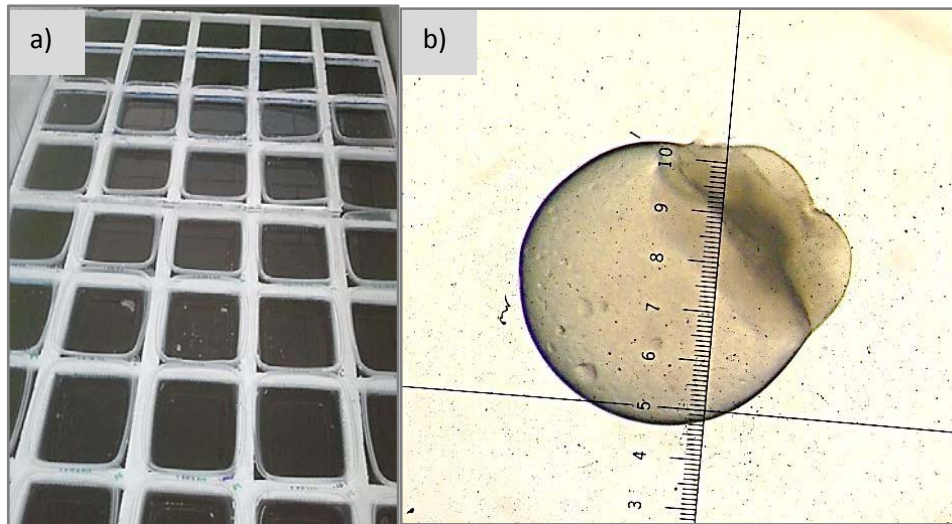
Porcentaje (%) Fertilización =  $(N^{\circ} \text{ óvulos fertilizados} \times 100) / N^{\circ} \text{ óvulos}$

a) **Tratamientos**: Se trabajó con los siguientes tratamientos:

- **Tratamiento 1 (T<sub>1</sub>)**.- Criopreservación semi lenta (congelado en vapor de nitrógeno líquido, a unos 5 cm., de la superficie del nitrógeno, con un tiempo estimado de congelación de 6 min.
- **Tratamiento 2 (T<sub>2</sub>)**.- Criopreservación lenta (congelado en vapor de nitrógeno líquido, a unos 10 cm., de la superficie del nitrógeno, con un tiempo estimado de congelación de 9 min.
- **Tratamiento 3 (T<sub>3</sub>)**.- Semen fresco

### 3.2.7. Incubación de óvulos fertilizados

Para la incubación de los óvulos fertilizados se utilizaron, envases de plástico descartables de 15 cm. x 10 cm. x 4 cm de alto, hasta su eclosión (18 horas post fertilización) Los cuales fueron individuales para cada repetición, el cual albergó un aprox., de hasta 200 óvulos fertilizados por envase, los cuales tenían un marco de tecnopor, para su flotación, dentro de un tanque de cemento de 1,5 m. x 1,5 m. x 0,8 m., los cuales fueron estimados sus porcentajes de fertilización a las 10 horas post fertilización (Figura 14)



**Figura 14.** Envases de plástico, utilizados en la incubación artificial. a) Bandejas de plástico, distribuidas al azar. b) Huevo fertilizado de “gamitana”.

### 3.2.8. Eclosión

Finalizado el período de incubación se procedió a realizar el conteo de las larvas obtenidas y se determinó la tasa de eclosión, para su evaluación estadística. La cual se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje (\%)} \text{ de Eclosión} = \frac{\text{N}^\circ \text{ óvulos eclosionados} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ óvulos fertilizados}}.$$

### 3.2.9. Larvas deformes

Asimismo, se realizó el conteo de las larvas que presentaban algún tipo de malformación, para poder obtener su tasa de larvas deformes, para la evaluación estadística respectiva, según la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje (\%)} \text{ de Larvas deformes} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de larvas deformes} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de larvas}}$$

### **3.2.10. Procesamiento de la información**

Con los datos obtenidos, como resultado del experimento fueron procesados, para porcentajes de fertilización, para cada macho fueron descritos estadísticamente y expresados como media  $\pm$  desviación estándar, valores mínimos y máximos, de acuerdo a los casos. Los factores de tiempo de congelación y los niveles de crioprotector fueron sometidas a un análisis de varianza factorial, previa normalización de los valores o resultados expresados en porcentajes, siendo transformaron por el método del arco seno previo a su análisis en ANOVA siguiendo las recomendaciones de Lochmann *et al.* (2009) y al presentarse diferencias significativas, se realizó la prueba de comparación de medias. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron como diferencia significativa. Para todos los análisis se empleó el programa estadístico SPSS 18.0 para Windows.

## CAPITULO 4:

### **4.1. RESULTADOS**

#### **4.1.1. Efecto de las técnicas de criopreservación, sobre el porcentaje de motilidad post descongelación, del semen de *Colossoma macropomum* ,“gamitana”**

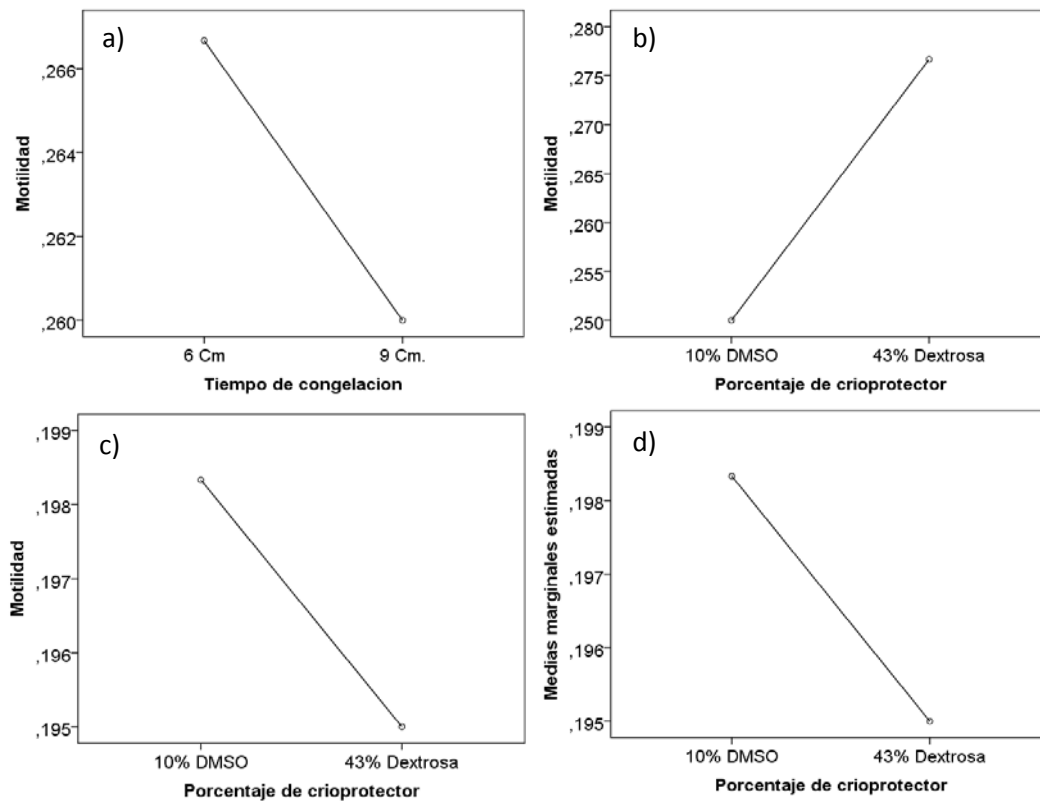
Los porcentajes de motilidad espermática post descongelación, de los tratamientos no presentaron diferencias significativas, tanto para cada variable o la interacción de las mismas, para cualquiera de los machos ( $p > 0.05$ ). Obteniendo  $p = 0.81$  y  $p = 0.35$ , para el tiempo de congelación y para el porcentaje del crioprotector respectivamente y para la interacción de ambas variables se obtuvo un  $p = 0.35$ , para el macho 1 (Figura 15).

El segundo reproductor presento un  $p = 0.51$ ,  $p = 0.87$  y  $p = 0.87$ , para el tiempo de congelación, porcentaje del crioprotector y la interacción de ambas variables, respectivamente (Figura 15). Lo que nos permite deducir, cuando comparamos la tasa de motilidad post descongelación entre los reproductores, que el tiempo de congelación y el porcentaje de crioprotector, no influyen en el porcentaje de motilidad de semen post descongelado, siendo semejantes las tasas de motilidad para ambos machos. Sin embargo, cuando comparamos los valores medios, de la tasa de motilidad entre el semen post descongelado y el semen fresco, se evidencia la reducción del porcentaje de motilidad.

Así también, se observa que el rango del porcentaje de motilidad del espermatozoide post descongelado de los reproductores, varía de  $3.6 \pm 1.15$  seg., hasta  $8.3 \pm 2.89$  seg., lo cual está muy por debajo del porcentaje de motilidad del semen fresco, el cual fue de  $90.00 \pm 0.00$  (Tabla 4).

**Tabla 4. Valores promedio  $\pm$ DS, de porcentaje de motilidad post descongelación, de lotes de semen criopreservado, según reproductor**

<b>Reproductor</b>	<b>Tiempo de congelación</b>	<b>Crioprotector</b>	<b>Motilidad Post descongelación (%)</b>	<b>Motilidad pre congelación (%)</b>
1	6 Min	10% DMSO	7.3 $\pm$ 2.5	90.0 $\pm$ 0.0
		43% Dextrosa	7.3 $\pm$ 2.51	
	9 Min.	10% DMSO	5.6 $\pm$ 1.15	
		43% Dextrosa	8.3 $\pm$ 2.89	
2	6 Min.	10% DMSO	4.0 $\pm$ 1.73	90 $\pm$ 0.00
		43% Dextrosa	3.6 $\pm$ 1.15	
	9 Min.	10% DMSO	4.3 $\pm$ 1.15	
		43% Dextrosa	4.3 $\pm$ 1.15	
3	Testigo			90.00 $\pm$ 0.00



**Figura 15.** Motilidad de semen de “gamitana” post descongelación, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1 (a y b) y tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 2 (c y d)

#### 4.1.2. Efecto de las técnicas de criopreservación, en el porcentaje de fertilización de huevos de *Colossoma macropomum* “gamitana”

Los valores de fertilización con semen descongelado, presentó para el tiempo de congelación diferencias significativas ( $p=0.000001$ ), lo que indica que el tiempo de congelación, si tiene influencia sobre la viabilidad fertilizadora en el espermatozoide. Para el porcentaje de crioprotector, no se encontró diferencia significativa ( $p=0.087$ ), lo cual indica que, no hay influencia del porcentaje de crioprotector sobre el espermatozoide descongelado. Sin embargo, cuando interactúan ambos factores, si existe diferencia

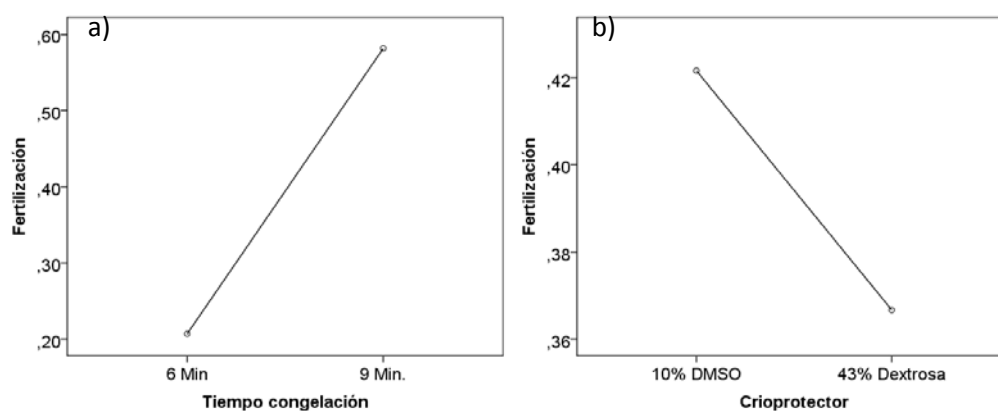
significativa ( $p=0.042$ ), por lo cual el tiempo de congelación, va a influenciar sobre el porcentaje de crioprotector utilizado. Obteniendo los mejores resultados cuando se criopreservó a 9 minutos y con 10% de DMSO, para el macho 1 (Tabla 5, Figura 16).

Para el macho 2, no existe diferencia significativa, para las variables de tiempo de congelación, porcentaje de crioprotector y la interacción de ambos ( $p=0.10$ ,  $p= 0.64$  y  $p= 0.54$  respectivamente). Sin embargo, es de señalar que el tiempo de congelación de 9 minutos con 43% de Dextrosa, presentó el valor más alto en porcentaje de fertilización ( $47.97 \pm 11.99$ ). Siendo todos éstos resultados, mucho menores que los logrados, cuando se fertilizó con semen fresco ( $65.69 \pm 7.85$ ) (Tabla 5, Figura 17).

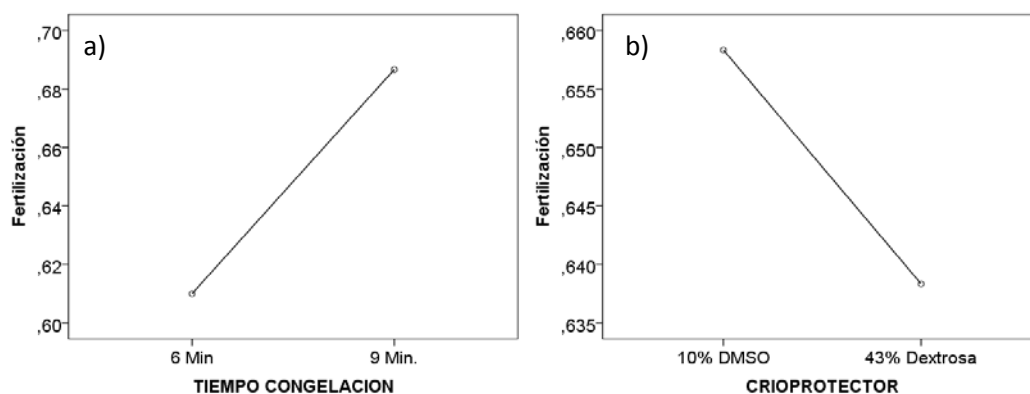
Así también, se observa que el rango del porcentaje de fertilización de huevos, varía de  $4.3\% \pm 2.27.$ , hasta  $47.97\% \pm 11.99$  (Tabla 5).

**Tabla 5.** Valores promedio  $\pm$ DS, de porcentaje de fertilización, de óvulos de *Colossoma macropomum* “gamitana”

Reproductor	Tiempo de congelación	Crioprotector	Fertilización (%)
1	6 Min	10% DMSO	4.3 $\pm$ 2.27
		43% Dextrosa	4.57 $\pm$ 1.29
	9 Min.	10% DMSO	33.26 $\pm$ 2.20
		43% Dextrosa	27.4 $\pm$ 7.77
2	6 Min.	10% DMSO	40.32 $\pm$ 9.22
		43% Dextrosa	34.61 $\pm$ 8.93
	9 Min.	10% DMSO	38.73 $\pm$ 5.38
		43% Dextrosa	47.97 $\pm$ 11.99
3	Testigo		65.69 $\pm$ 7.85



**Figura 16.** Valores de fertilizados con semen descongelado, de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1 (a y b).



**Figura 17.** Valores de fertilizados con semen descongelado, de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 2 (a y b).

#### 4.1.3. Efecto de las técnicas de criopreservación, en el porcentaje de eclosión de huevos de *Colossoma macropomum* “gamitana”

El porcentaje de eclosión, para el primer macho, no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), para el tiempo de congelación, porcentaje de crioprotector y la interacción entre ambos factores, para todos los tratamientos, siendo  $p = 0.32$ ,  $p = 0.45$  y  $p = 0.73$  respectivamente. Lo cual evidenciaría, que para el macho 1, el tiempo de congelación y el porcentaje de crioprotector, no influyen sobre la tasa de eclosión (Tabla 6, Figura 18).

Para el segundo reproductor, se observó  $p = 0.12$ ,  $p = 0.04$  y  $p = 0.512$ , para el tiempo de congelación, porcentaje de crioprotector y la interacción de ambas variables, evidenciando la diferencia significativa en el porcentaje de crioprotector. Lo que indica que el porcentaje de eclosión es influenciado por el porcentaje de crioprotector. Así mismo, el porcentaje de crioprotector va a influenciar de manera independiente, no teniendo influencia sobre el tiempo de congelación. Por lo cual, la interacción entre ambos factores no influye sobre la tasa de eclosión. Evidenciando los mejores resultados, cuando

se congeló a 9 minutos y con 10% de DMSO ( $94.25 \pm 3.28$ ), comparándolo aún con el testigo (semén fresco) (Tabla 6, Figura 18).

Así también, se observa que el rango del porcentaje de eclosión, varió de  $79.05\% \pm 21.45$  hasta  $94.25\% \pm 3.28$  (Tabla, 6). Lo cual está muy por debajo del porcentaje de fertilización del semén fresco el cual fue de  $65.69\% \pm 7.85$  (Tabla 5).

**Tabla 6. Valores promedio  $\pm$ DS, de porcentaje de eclosión, de óvulos de, *Colossoma macropomum* “gamitana”**

Reproductor	Tiempo de congelación	Crioprotector	Eclosión (%)
1	6 Min	10% DMSO	$79.05 \pm 21.45$
		43% Dextrosa	$80.75 \pm 8.34$
	9 Min.	10% DMSO	$83.36 \pm 2.91$
		43% Dextrosa	$91.10 \pm 2.70$
2	6 Min.	10% DMSO	$89.80 \pm 4.54$
		43% Dextrosa	$86.63 \pm 1.44$
	9 Min.	10% DMSO	$94.25 \pm 3.28$
		43% Dextrosa	$88.80 \pm 2.03$
3	Testigo		$78.42 \pm 1.32$



**Figura 18.** Valores de eclosión, con semen descongelado de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1 (a y b) y para el macho 2 (c y d).

#### 4.1.4. Efecto de las técnicas de criopreservación, en el porcentaje de malformación de larvas, de *Colossoma macropomum* “gamitana”

Los porcentajes de malformaciones de larvas para el macho 1, no presentaron diferencias significativas para el tiempo de congelación, porcentaje de crioprotector y la interacción entre ambos factores, para todos los tratamientos, siendo  $p=0.77$ ,  $p=0.87$  y  $p=0.70$  respectivamente. (Tabla 7, Figura 19). Así también, para el segundo reproductor se evidenció  $p=0.27$ ,  $p=0.92$  y  $p=0.23$ , para el tiempo de congelación, porcentaje de crioprotector y la interacción de ambos factores, respectivamente. Lo cual indica, que para ambos machos, el tiempo de congelación no influye, sobre el porcentaje de criopreservación (Tabla 7, Figura 19).

Lo cual nos permite inferir, que los valores de larvas deformes obtenidas en las diferentes técnicas de criopreservación, es estadísticamente similar, para todos los tratamientos.

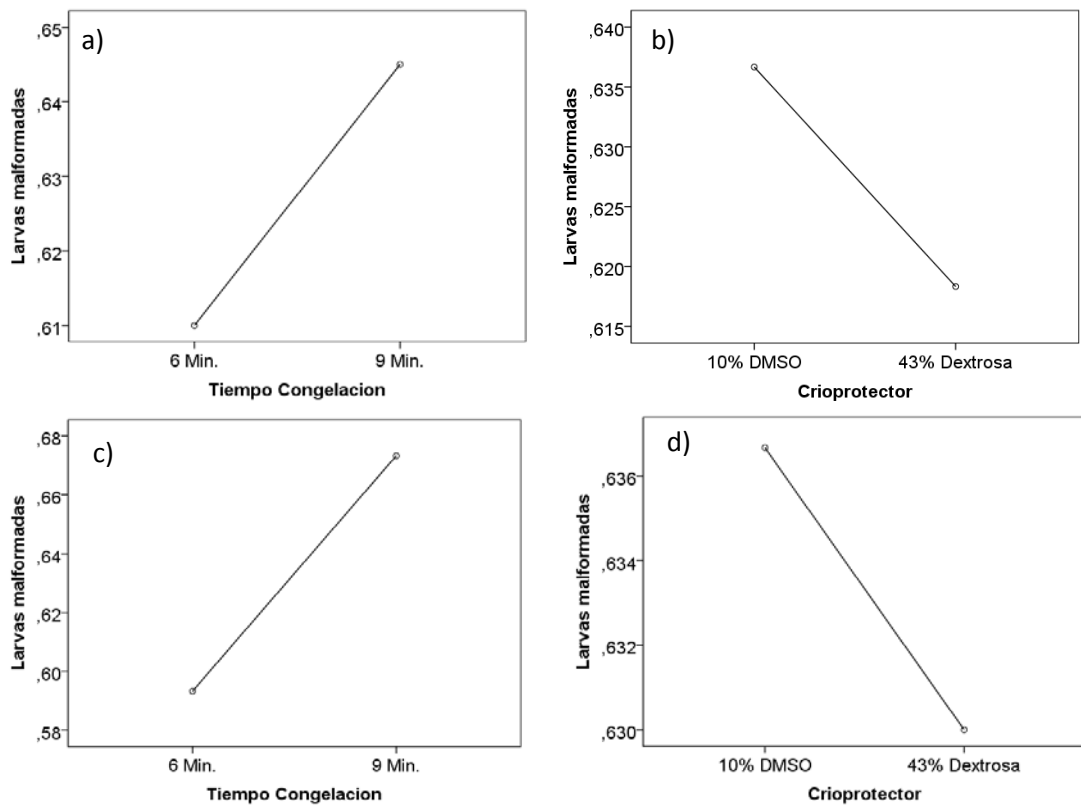
Así mismo, se observa los mayores valores de larvas malformadas, cuando se congeló en 9 minutos y 10% de DMSO, para el macho 1 y 2 ( $53.40 \pm 40.48$  y  $52.39 \pm 14.71$ , respectivamente). Así también, los menores valores de larvas deformes, se observó cuando se congeló en 6 minutos y con 10% de DMSO, para el macho 1 y 2 ( $36.11 \pm 12.73$  y  $31.33 \pm 13.05$ , respectivamente). Por lo cual, se podría pensar según las medias observadas, que el tiempo de congelación podría estar influyendo sobre el porcentaje del crioprotector en la malformación de larvas, observando que en 6 minutos de congelación y con 10% de DMSO, se obtendrían los valores más bajos de malformación de larvas y congelando en 9 minutos, aún en presencia de DMSO, se observa los valores medios más altos de larvas malformadas. Por lo cual, congelando a 6 minutos y con 10% de DMSO, se protege mejor la célula al daño del ADN, por el proceso de criogénesis (Tabla 7, Figura 19).

Estos valores obtenidos, nos permite inferir que el efecto tóxico del DMSO, aumentó cuando se congeló en 6 minutos, en presencia de sacarosa.

Así también, se observa que el rango del porcentaje de larvas deformes, varió de  $31.33\% \pm 13.05$  a  $53.40 \pm 40.48$ , lo cual está por encima del porcentaje de deformes del Testigo, el cual fue de  $18.39\% \pm 10.11$  (Tabla 7).

**Tabla 7. Valores promedio  $\pm$ DS, de porcentaje de malformación de larvas, *Colossoma macropomum* “gamitana”.**

<b>Reproductor</b>	<b>Tiempo de congelación</b>	<b>Crioprotector</b>	<b>Deformes (%)</b>
1	6 Min	10% DMSO	36.11 $\pm$ 12.73
		43% Dextrosa	40.95 $\pm$ 20.07
	9 Min.	10% DMSO	53.40 $\pm$ 40.48
		43% Dextrosa	38.39 $\pm$ 11.67
2	6 Min.	10% DMSO	31.33 $\pm$ 13.05
		43% Dextrosa	41.14 $\pm$ 16.51
	9 Min.	10% DMSO	52.39 $\pm$ 14.71
		43% Dextrosa	40.06 $\pm$ 14.81
3	Testigo		18.39 $\pm$ 10.11



**Figura 19.** Valores de malformación de larvas de “gamitana”, según tiempo de congelación y porcentaje de crioprotector, para el macho 1 (a y b) y macho 2 (c y d).

## **CAPITULO 5:**

### **5.1. DISCUSIÓN**

#### **5.1.1. Efecto de las técnicas de criopreservación, sobre el porcentaje de motilidad post descongelación, del semen de *Colossoma macropomum* “gamitana”.**

La activación de los espermatozoides, para muchas especies es muy corto (Billard y Cosson, 1992; Llasaca y Nuñez, 2010) y el daño que produce la criopreservación, en la activación del semen post descongelado, reduce más el tiempo disponible para la fertilización (Harvey y Carolsfeld, 1993), debido a la deshidratación, cristalización/recristalización, toxicidad y cambios en los fosfolípidos en la membrana plasmática (Mazur, 1984; Watson, 2000; Martínez, 2010), trayendo como consecuencia la desnaturalización de las macro moléculas de la célula, produciendo el encogimiento de la célula (membrana plasmática) de forma irreversible (Medeiros *et al.*, 2002), así mismo una tasa de congelación entre  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$  es la más crítica, pudiendo ocurrir la formación de cristales de hielo extracelular e intracelular (Marques de Carvalho, 2013). Así mismo, cuando la velocidad de congelación se da lentamente, el medio se vuelve ligeramente hiperosmótico, lo cual provoca que la tensión en la membrana plasmática aumente, ocurra deshidratación celular y la afluencia de iones (Mazur, 1984; Yang y Tiersch, 2009). Así también, una descongelación rápida disminuye la recristalización del agua y el hinchamiento de la célula, causando reducción en el daño a nivel de la membrana plasmática (Mazur, 1984), por lo tanto el tipo de congelamiento es importante en el proceso de criopreservación, en semen de peces, porque puede influenciar en la velocidad de congelamiento y descongelamiento (Rodina *et al.*, 2007).

La motilidad de los espermatozoides, está influenciado por la integridad de la célula, los cuales al someterlos al proceso de criopreservación, la célula debe de mantener su integridad y funcionalidad (Watson, 1995; Holt, 2000; Medina *et al.*, 2005; Maria *et al.*, 2011), por lo cual los estudios realizados en ésta especie reportan drásticas reducciones de motilidad de espermatozoide expuesto a nitrógeno líquido. Martino, (2006) reporta motilidades entre 5% a 20%, utilizando solución salina 0.9%, 10% DMSO y 10% de Yema

de huevo. Lo que coincide con Varela *et al.*, (2012) y Maria *et al.*, (2011), en relación al porcentaje de crioprotector. Así mismo. Menezes *et al.*, (2008) reporta motilidades de 5% a 10%, utilizando DMSO.

Varela *et al.* (2012), reporta motilidades hasta 20% (incluyendo motilidad nula), utilizando 10% de DMSO como crioprotector, cuando aumenta la concentración de DMSO a 20%. Esto también coincide con Carolsfeld *et al.* (2003), que reporta motilidades de 0% a 5% activado con 25 mMol de NaCl y hasta el del 20% de motilidad con 1% de Bicarbonato de sodio, como medio de activación de la motilidad, para algunas especies de peces migradores brasileños. Así también, se han reportado, similares valores para otras especies de peces. Por todo esto, nuestros valores obtenidos guardan relación con el protocolo de criopreservación ejecutado, estando nuestros valores dentro de los reportados.

Una explicación, a la reducción del porcentaje de motilidad está referido, que dentro del testículo, los fluidos seminales, contienen iones y azúcares, que le permite mantener la estabilidad a los espermatozoide, algo que se busca lograr cuando le adicionamos sustancias crioprotectoras, que tienen como principal función deshidratar en parte a la célula, para que ingrese el crioprotector intracelular y que no permita la formación de cristales al interior de la célula. Sin embargo, el incremento del DMSO, mezclado con glucosa en combinación con 10% de DMSO, también causan daño en el espermatozoide (Martinez, 2010).

Así también, Ogier De Baulny *et al.* (1997), estableció que el DMSO puede aumentar el osmolaridad de los demás diluyentes, trayendo como consecuencia una mayor deshidratación y daño celular. Diferentes autores indican la toxicidad del DMSO frente a los espermatozoides, lo cual influye negativamente en la estabilidad del mismo, existiendo reportes que indican la toxicidad a partir del 5%, para *Lates calcarifer* (Leung, 1998,; Gwo y Arnold, 1991) y en algunos caracidos: *Prochilodus lineatus* (Viveiros *et al.*, 2009b) y en *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas *et al.*, 2004) cuando la concentración DMSO también

llegó a 15%. Para nuestra especie, Varela *et al.*, (2012), reporta 24% de daños producido a nivel de la integridad de la membrana, trayendo como consecuencia valores del 20% de tasa de motilidad, cuando se utilizó 10% de DMSO, llegando a motilidad nula a 20% de presencia del DMSO.

Por lo cual, los daños tanto en a nivel de células espermáticas (toxicidad), se puede dar por la sola presencia del crioprotector o la ausencia en el interior celular, lo que altera los procesos de nucleación (Zachariassen y Kristiansen, 2000) y también, se podría mencionar en combinación con la glucosa (Martinez, 2010).

### **5.1.2. Efecto de las técnicas de criopreservación, en la tasa de fertilización de huevos de *Colossoma macropomum* “gamitana”**

El proceso de fertilización, se da cuando el espermatozoide logra fecundar al óvulo, ocurriendo cuando el espermatozoide, se activa. Pérdidas en cuanto a la fertilización es posible cuando el espermatozoide no ha sido activado homogéneamente. Siendo el plasma seminal el que se encarga de la su inactivación (Tiersch T. y C. Green, 2011).

El proceso de criopreservación, influye sobre el funcionamiento biológico de la célula, como la alteración de la estructura física, comprometiendo la carga genética (Labbe *et al.*, 2001; Cabrita *et al.*, 2005), pudiendo presentar mayores pérdidas de la calidad del semen criopreservado (Freitas, 2013), lo cual repercutirá en la tasa de fertilización. El proceso de descongelación rápida del semen y su aplicación inmediata a los huevos para la fertilización, puede mitigar los efectos de este daño (Horton y Ott, 1976; Harvey, 1993).

En la fertilización con semen criopreservado Freitas, (2013)., reporta la utilización de 250  $\mu\text{L/g}$ . de óvulo de “gamitana”, obteniendo valores entre 15% a 20% de tasa de fertilización, teniendo una densidad de  $9,73 \times 10^5$  espermatozoides/óvulo, utilizando 250  $\mu\text{L}$  de semen descongelado/g. de óvulo, activando los espermatozoides con agua destilada, lo cual es inferior a lo observado en éste experimento, en relación a la tasa de fertilización. Valores similares, al reportado en éste trabajo, coincide con lo reportados por Martino, (2006), quien obtiene de 10% a 34 % de la tasa fertilización, para ésta especie, aproximándose nuestros valores a los obtenidos por Marques de Carvalho, (2013)., quien reporta tasas de fertilización de 41% a 45%, lo cual difiere con Varela *et al.*, (2012)., quien reporta valores de fertilización de 22% hasta 74%. Por lo mencionado anteriormente, para otras especies de la misma familia (*Brycon siebenthalae*), se obtiene tasas de fertilización de 51% hasta 75%, lo cual es inferior a los valores obtenidos (77% a 85%) con semen fresco, según lo reportado por Cruz-Casallas y Velasco (2002).

Leite *et al.* (2013), reporta que es necesario 100 000 espermatozoides/ovocito, en procesos de fertilización artificial. Nuestros valores de relación espermatozoides/ovocito están cercanos, habiendo utilizado 75 000 espermatozoides/óvulo. Por lo cual, nuestros tasas de fertilización en general están dentro de lo reportado, considerando que fueron activados con solución de Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 0.1 M., como medio activador, lo que coincide con Carolsfeld *et al.* (2003), para *P. corruscans*; Cruz-Casallas *et al.* (2004), para *B. amazonicus*; Andrade-Talmelli *et al.* (2001), para *B. insignis*; Kamavoto *et al.* (1996), para *P. lineatus*; Luz *et al.* (2001), para *S. scriptum*; Vicuña (2012) para *Colossoma macropomum* y Marques de Carvalho (2013), para *P. magdalenae*; en relación a la capacidad como medio promotor de la activación espermática, ayudando a aumentar la fertilización.

Nuestros resultados obtenidos, sobre el efecto del tiempo de congelación en la tasa de fertilización, corroborarían con lo descrito anteriormente, en relación de la capacidad fecundante de los espermatozoides (motilidad), que son afectados por el proceso de congelación y descongelación, en relación al estado de integridad de la célula, tanto

externamente como internamente. Sin embargo, podría pensarse que el volumen de semen empacado podría influenciar en la capacidad fertilizadora. Según lo reportado por Marques de Carvalho (2013), la capacidad de fertilización de los espermatozoides, no fue afectada por el volumen del semen congelado en criotubos.

Así también, el tiempo de descongelamiento del semen, es otro factor que podría estar influenciando negativamente en relación a la calidad y capacidad fertilizadora de los espermatozoides de ésta especie, cuando fue descongelada a 60°C (Marquez de Carvalho, 2013), considerando que temperaturas superiores a 40°C causan la desnaturalización de las enzimas y proteínas, especialmente en los extremos del volumen congelado, que descongela más rápidamente que la parte central (Lahnsteiner *et al.*, 1997).

Sin embargo en otras especies como el *Brycon amazonicus*, la mayor tasa de fertilización se logró descongelando semen criopreservado a 35°C. y en *Prochilodus lineatus*, no se observó diferencia en la calidad y fertilización del semen criopreservado, que fue descongelado a 30 °C y a 60 °C (Martinez, 2010).

### **5.1.3. Efecto de las técnicas de criopreservación, en la tasa de eclosión de huevos de *Colossoma macropomum* “gamitana”.**

Nuestros resultados permiten inferir, que el crioprotector tiene influencia independientemente sobre el porcentaje de eclosión y sobre el reproductor. Esto podría deberse, en las cualidades propias de cada reproductor y el rol del crioprotector. Siendo el DMSO, el mejor crioprotector a nivel intracelular, para peces de agua dulce (Leung y Jamieson, 1991), lo cual se ve reflejado en lo reportado por Varela et al., 2012., quien reporta una tasa de eclosión del 47,3%  $\pm$  2,5, cuando utilizó 10% de DMSO, en comparación con 37.4%  $\pm$  4,5 de eclosión cuando fue con 5% de DMSO, sin embargo la tasa de eclosión fue inversamente proporcional, a medida que aumentaba la concentración

de DMSO, lo cual evidencia el nivel tóxico de este crioprotector intracelular, en mayores proporciones.

Sin embargo Freitas (2013), reporta tasas de eclosión de 65% a 85% aproximadamente, utilizando 10% de DMSO y glucosa como medio de dilución. Nuestros resultados obtenidos están dentro de lo reportado anteriormente, para ambos reproductores. Sin embargo, en este experimento, nuestros resultados, pondrían en evidencia, que los parámetros zootécnicos pueden variar entre reproductores. Si consideramos lo manifestado por Varela *et al.* (2012), que indica que la integridad del espermatozoide probablemente produzca un impacto negativo sobre la tasa de eclosión. Lo cual se evidenciaría, por lo descrito en las discusiones anteriores, cuando comparamos con otros autores, que si bien, es posible replicar el proceso, los valores a obtener no podrían ser los mismos, considerando las cinergias entre las variables estudiadas, para lo cual habría que agregársele las condiciones del reproductor, como un factor a estudiar. Lo cual pondría en manifiesto, que habría que desarrollar una metodología más eficaz de evaluación de la integridad del espermatozoide, como medio de evaluación de calidad espermática para los procesos de criopreservación.

Al comparar nuestros resultados, con las tasas de eclosión del tratamiento testigo, evidenciamos que los mejores resultados fueron obtenidos, cuando fue incubado en envases de medio litro, sin flujo de agua. Lo cual, evidenciaría que el tipo de incubadora y/o el sistema de incubación, podría también afectar la tasa de eclosión.

#### **5.1.4. Efecto de las técnicas de criopreservación, en la calidad de larvas deformes obtenidas, de *Colossoma macropomum* “gamitana”.**

La presencia de larvas deformes, en trabajos de investigación, no es considerada, puesto que es algo común en sistemas de producción de peces, considerando que la

presencia no sólo se puede dar cuando se usa semen criopreservado, si no también con semen fresco, según lo reportado por Miskolczi *et al.* (2005), para el *Clarias gariepinus*. Lo que coincide con lo manifestado por Martínez (2010), quien reporta la presencia de larvas malformadas para *P. magdalenae*, usando semen fresco y criopreservado, así también indica que es posible encontrar grandes cantidades de larvas malformadas, inclusive superiores al tratamiento control de manera significativa. Por lo cual, es posible inferir que el daño del crioprotector hacia la integridad celular, también esta mediado por la presencia de glucosa, la cual aumentaría el daño a nivel del ADN. Por lo cual, a medida que aumenta el crioprotector aumentaba el daño o la malformación larval. Lo cual coincide con lo reportado por (Horváth y Urbanyi, 2000).

En estudios realizados por Miskolczi *et al.* (2005), para *P. magdalenae*, reporta tasas de malformación larval, sin embargo no encontró diferencia significativa con el grupo control. Para nuestro estudio, coincide con lo reportado, en relación los valores encontrados, de malformación de larvas entre los tratamientos, no siendo así cuando comparamos con el grupo control, que si bien, hay presencia de larvas deformes, éstas son en tasas inferiores, lo cual coincide con Horváth y Urbanyi (2000) y Varela *et al.* (2012), manifiesta que la integridad del espermatozoide probablemente produzca un impacto negativo sobre en la alteración del desarrollo embrionario. Así entonces, la temperatura de congelamiento y la presencia de azúcares, aumenta la capacidad tóxica del DMSO, por lo cual se evidencia, el efecto del proceso de congelación y crioprotector, sobre la calidad de larvas a obtener.

Kopeika *et al.* (2004), reporta la existencia de sistemas de reparación de ADN en ovocitos en peces, los cuales pueden reparar el daño de la fragmentación de los ácidos nucleicos en el espermatozoide, que hayan sido afectados por algún agente tóxico, siendo esta capacidad de forma limitada, según el tipo de daño. Así también, lo confirma Martínez (2010), para el *P. magdalenae*, en la cual no encontró la existencia de una correlación entre la fragmentación del ADN y la malformación de larvas, demostrando la existencia de ese mecanismo de reparación celular. Así mismo, May *et al.* (1988), indica que las larvas con

un solo “n” cromosomal (haploides), sea del padre (androgenéticas) o la madre (ginogenéticas), exhiben tipos de malformación. En nuestro trabajo, la mayoría de las larvas malformadas, presentaban curvatura de la espina o columna vertebral, lo que coincide con Martínez, (2010), quien reporta los mismos daños y ausencia de saco vitelino, cabeza y cola, presentes en el tratamiento de 10% de DMSO y 6,5% de Glucosa.

De modo que para nuestro caso, habría la posibilidad de dicho efecto reparador, que podrían dislumbrarse, con estudios más específicos de la existencia de este mecanismo, que podría ser una Adaptación evolutiva de reparación intracelular.

## **CAPITULO 6:**

### **6.1. CONCLUSIONES**

Las técnicas de criopreservación, reducen drásticamente, el porcentaje de motilidad de los espermatozoides de *Colossoma macropomum*.

Es posible obtener mayores tasas de fertilización, congelando espermatozoides a una velocidad de enfriamiento relativamente lenta, independientemente del tipo de crioprotector.

Podemos obtener tasas de eclosión semejantes, independientemente del tiempo de congelación o tipo de crioprotector

El proceso de criogénesis, afecta la tasa de malformación de larvas

Sin embargo, el factor “macho” puede diferir los parámetros zootécnicos reproductivos.

## **CAPITULO 7:**

### **7.1. RECOMENCIONES**

Hacer una evaluación de los reproductores, en relación a su performance reproductiva, para la mejora y optimización de los parámetros reproductivos. Los cuales podrían ayudarnos, en cuanto a planes de mejora y repoblamiento de la especie, para la seguridad alimentaria.

Realizar estudios que permitan la evaluación a nivel molecular, para dilucidar cual es el factor del “macho”, que está influenciando sobre la técnica de criogénesis, que no permite la homogeneidad de los protocolos reportados. Así también, que pueda ayudar a confirmar el efecto reparador al interior del espermatozoide.

Evaluar diferentes técnicas, que permitan conocer los indicadores de performance reproductiva, de las reproductoras hembras de “gamitana”

Revisar el protocolo de incubación, que permita hacer más eficaz la técnica de incubación.

## CAPITULO 8:

### **8.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

- Alcántara, F.; M. Rodríguez; C. Kholer; S. Kholer y W. Camargo. 2002. Reproducción Inducida de Paco y Gamitana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Southern Illinois University at Carbondale, USA. 1-7.
- Andrade-Talmelli, E.; E. Kavamoto y N. Fenerich-Verani. 2001. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. B. Inst Pesca 27:149–154
- Almendras, F. 1993. Ensayo de un sistema de críopreservación de semen de salmonidos aplicado a la trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de grado para obtener el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. 47p.
- Arias, J. 2006. Estado actual del conocimiento sobre el yamú, *Brycon amazonicus*. Instituto de Acuicultura (IALL) de la Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia. J. Cienc Pec 19 (2) 125 – 133
- Arias, J. y J. Hernández. 2009. Efectos del extracto hipofisiario de carpa común y el análogo de GnRH sobre la maduración final del oocito y el desove de la cachama negra (*Colossoma macropomun*). J. FCV-LUZ / Vol. XIX, N° 5: 486 – 494
- Billard, R. y M. Cosson. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in Freshwater fish. J. Exp. Zool. 261: 22-31.
- Babiak, I., J. Glogowski, M. Luczynski, D. Kucharczyk y M. Luczynski. 1995. Cryopreservation of the milt of northern pike. J. Fish Biol. (46) 819-828.
- Baynes, S. y A. Scott. 1987. Cryopreservation of Rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. Aquaculture, (66) 53-67.

- Cabrita, E., C. Sarasquete, S. Martínez-Páramo, V. Robles, J. Beirao, S. Pérez-Cerezales y M. Herraéz. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.* (26) 623–635.
- Cabrita, E.; V. Robles; L. Rebordinos; C. Sarasquete y M. Herráez. 2005. Evaluation o DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* (50) 144-153.
- Carolsfeld, J.; H. Godinho; E. Zaniboni y B. Harvey. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.*; (63) 472-89.
- Ciereszko, A.; L. Ramseyer y K. Dabrowski. 1993. Cryopreservation of perch semen. *The Prog. Fish. Cult.* (55) 261-264.
- Ciereszko, A. y K. Dabrowski. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* (109) 367-73.
- Chereguini, O.; P. Fernández y I. Rasines. 1992. Adaptación de la técnica de criopreservación de esperma para el Rodaballo (*Scoththalmus maximus*) y Besugo (*Pagellus bogaraveo*). Instituto español de Oceanografía. (117) 1-11.
- Cloud, J.; W. Miller y M. Levanduski. 1990. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *The Prog. Fish. Cult.* (52) 51-53.
- Conget, P.; M. Fernández; G. Herrera y J. Minguell. 1996. Cryopreservation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture.* (143)319-329.
- Cruz-Casallas, P.; S. Pardo-Carrasco; J. Arias-Castellanos; D. Lombo-Rodríguez; J. Pardo-Mariño. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *J. World Aquac. Soc.*; 35: 529-535.
- Cruz-Casallas, P. y Y. Velasco. 2002. Criopreservación de semen de yamú (*Brycon siebenthalae*): Calidad seminal; dosis inseminante y sistemas de empaque. Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos. Villavicencio. Universidad de los Llanos – Colciencias.1 – 20.

- Freitas, R. 2013. Criopreservação seminal do tambaqui *Colossoma macropomum*. Tesis do Mestre em Zootecnia. Universidad Federal do Rio Grande do Sul. 1 – 47.
- Gwo, J. y C. Arnold. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. *Journal Experiment Zoology.*; 264: 444–453.
- Gwo, J.; K. Strawn y M. Longnecker. 1991. Arnold CR. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* (94) 335-75.
- Harvey, B. 1993. Cryopreservation of fish spermatozoa. In *Genetic Conservation of Salmonid Fishes* (Cloud, J. & Thorgaard, G., eds). 175–181.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*. (32) 313-320.
- Harvey, B. y J. Carolsfeld. 1993. *Induced Breeding in tropical Fish Culture*, Ottawa: International Development Research Centre.
- Holt, T. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* (62) 3-22
- Hotz, A. 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture*. 110: 97-100.
- Horton, H. y A. Ott. 1976. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* (33) 995 p.
- Hoyle, R. y D. Idler. 1968. Preliminary results in the fertilization of eggs with frozen sperm of atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. BD. Canada*. (25) 1295-1297.
- Horváth, A. y B. Urbányi. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Research*. ( 31):317-324.
- Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). 2000. Cultivo y procesamiento de peces nativos: una propuesta productiva para la Amazonía peruana. 14 – 22.
- Kavamoto, E.; M. Narahara; C. Mainardes-Pinto; E. Andrade-Talmelli; E. Romagosa y

- E. Ferraz. 1996. Efeito do hCG na produção de sêmen do curimbata ´ (*Prochilodus scrofa Steindachner*, 1881). *Rev Ceres* 43:76–85.
- Kopeika, J.; E. Kopeika; T. Zhang; D. Rawson y W. Holt. 2004. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*, 61(9), 1661-1673.
- Krone, A. y J. Wittbrodt. 1997. A simple and reliable protocol for cryopreservation of Medaka (*Oryzias latipes*) spermatozoa. *J. The Fish Biology Medaka*. (9) 47 – 48pp.
- Labbe, C.; A. Martoriati; A. Devaux y G. Maisse. 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Dev*. 60(3):397-404.
- Lahnsteiner, F.; R. Patzner y T. Welsmann. 1992. Energy metabolism in spermatozoa of the grayling (*Thymallus thymallus*). En: Scott AP, Sumpter JPK, Kime DE, Rolfe MS, editors. *Proceedings of the fourth international symposium of the reproductive physiology of fish*. Norwich. 279 p.
- Llasaca, E. y J. Núñez. 2010. Evaluación de una solución inmovilizadora para criopreservación de semen de *Colossoma macropomum* “gamitana”. *Memorias del Workshop Amazonía Occidental*. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 101 p.
- Leite, L.; M. Melo; J. Oliveira; J. Pinheiro; C. Campello; J. Nunes y C. Salmito-Vanderley. 2013. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 65 (2) 421 – 429.
- Leung, K. y B. Jamieson. 1991. Live preservation of fish gametes. En: Jamiesson BGM, editor. *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge: University Press: 245-69.
- Lichtenstein, G.; E. Mariano y L. Miranda. 2010. Development of sperm cryopreservation techniques in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* (306) 357–361 pp.
- Liu, Q.; J. Li; S. Zhang; F. Ding; X. Xu; Z. Xiao y S. Xu. 2006. An Efficient Methodology

for Cryopreservation of Spermatozoa of Red *Seabream*, *Pagrus major*, with 2-mL Cryovials. JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY. 37 (3) 289 – 297.

Lahnsteiner, F.; T. Weismann y T. Patzner. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research (28) 471 – 479.

Leung, L. 1987. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). Aquaculture.; 64: 243-247.

Lochmann, R.; R Chen; F. Chu; W Camargo; C. Kohler y C. Kasper. 2009. Effects of carbohydrate-rich alternative feedstuffs on grow survival, body composition, hematology, and nonspecific immune response of Black pacu, *Colossoma macropomum*, and Red pacu, *Piaractus brachypomus*. Journal of the World Aquaculture Society. 40 (1): 33- 44.

Luz, R.; Ferreira A.; Reynalte-Tataje D. y E. Zaniboni Filho. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do semen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). B Inst Pesca 27(1):39–42

Maria, A.; A. Viveiros; R. Freitas y A. Oliveira. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture (260) 298–306.

Martino, G. 2006. Primeros ensayos sobre críopreservación de semen de Cachama *Colossoma macropomun* y Morocoto *Piaractus brachypomus*. IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 152 – 158.

Maria, A.; H. Azevedo y P. Carneiro. 2011. Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Comunicado técnico. EMBRAPA. 1678 – 1937.

Martinez, J. 2010. Efecto de la concentración de DMSO y Glucosa sobre la calidad

espermática y el material genético en semen crioconservado de bocachico *Prochilodus magdalenae*. Tesis de maestría en Ciencias – Biotecnología. Universidad nacional de Colombia. 1 - 136

Marques de Carvalho, A. 2013. Dissertação Mestre em Zootecnia. Universidade Federal de Sergipe. 1 – 27.

May, B.; K. Henley; C. Krueger y S. Gloss. 1988. Androgenesis as a mechanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*; (75) 57-70.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications- *American Journal of Physiology*. (247) 125 – 142.

Medina, V.; Y. Velasco y P. Cruz. 2005. Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleósteos. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18(1) 34 – 48.

Medeiros, C.; F. Forell; T. Oliveira y J. Rodriguez. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*. 57: 327 – 344.

Meneses, J.; L. Queiroz; C. Da Costa y J. Menezes Jr. 2008. Avaliação pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amazónica*. 38(2) 2008: 365 – 368.

Miskolczi, E.; S. Mihálffy; V. Pata; B. Urbanyi y A. Horváth. 2005. Examination of larval malformation in african catfish (*Clarias gariepinus*) following fertilization with cryoconserved sperm. *Aquaculture*. (247) 119-125.

Mocé, E.; E. Blanch; C. Tomás y J. Graham. 2010. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *J. Reprod. Dom. Anim.* 45 (2) 57 – 66.

Muchlisina, Z; R. Hashimb y A. Chong. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology* (62) 25–34.

- Munkittrick, K. y R. Moccia. 1984. Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production - scale artificial fertilization program. *Theriogenol.* (21) 645-59.
- Murgas, L.; A. Gualhanone; M. Silva; C. Mello; R. Freitas y M. Zangeronimo. 2001. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. *An. Vet. Murcia* (17) 3 – 10.
- Otemé, J.; J. Nuñez; C. Kouassi; J. Agnese y S. Hem. 1996. Testicular structure and sperm cryopreservation of the african catfish *Heterobranchus longifilis* (Clariidae) (27) 805-813.
- Ogier de Baulny, B., Y. Le Vern; D. Kerboeuf y G. Maisse. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology.* 34:141-149
- Ott, A. y H. Horton. 1971. Fertilization of chinook salmon eggs with cryo-preserved sperm. *J. Fish. Res. Bd Canadá.* (28) 745-748.
- Pillai, M. ; R. Yanagimachi y G. Cherr. 1994. In vivo and in vitro initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from the pacific herring, *Clupea pallasi*. *The J. Zoology.* (269) 62-68.
- Piromen, J. 1987. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of withefish (*Coregonus muksun Pallas*). *Elsevier Scien. Publ. B.* 66: 347-357.
- Ramirez, J.; Y. Velasco-Santamaría; V. Medina-Robles y P. Cruz-Casallas. 2005. Crioconservación de semen de cachama blanca (*PiaractusBrachypomus*, Cuvier,1818). Efectos del volumen de empaque y de la sustancia crioprotectora sobre la calidad seminal. *J. Col. Cienc. Pec. Colombia.* 18 (4) 331 – 332.
- Rodina, M.; D. Gela y M. Kocour. 2007. Cryopreservation of tench, tinca tinca, sperm – Sperm motility and hatching success of embryos. *Terriogenology.* (67) 931 – 940.
- Rideout, R.; E. Trippel y M. Litvak. 2004. The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *J. of Fish Biology* (65) 299–311.

- Steyn, G. y J. Van Vuren. 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture*. (63) 187-193.
- Stoss, J. y W. Holtz. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. *Aquaculture*. (32) 321-330.
- Thorogood, J. y A. Blackshaw. 1992. Factors affecting the activation, motility and cryopreservation of the spermatozoa of the yellowfin bream, *Acanthopagrus australis*. *Aquaculture and Fish. Manag.* 23 337-344.
- Tiersch, T. y C. Green. 2011. Cryopreservation in aquatic species. *World Aquaculture Society*. Cap. 1: 46-79.
- Varela Jr., A.; C. Corcini; D. Streit Jr.; G. Rizzoto; R. Dessesards; T. Lucia Jr. y M. Chim. 2012. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do Dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. *Atlântica*. 34 (2) 129 – 137. En : <http://www.seer.furg.br/atlantica/article/view/3175>
- Vicuña, M. 2012. Informe de prácticas pre profesionales. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Facultad de Zootecnia. 1 – 36.
- Viveiros, T.; V. Oliveira; L. Orfao y J. Souza. 2009a. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes solucoes crioprotetoras. *Univ. Fed. Lavras – Departamento de Zootecnia. J. Med. Vet. Zootec.* 61 (4): 883 – 889.
- Viveiros, T.; L. Orfão; A. Maria y I. Allamam. 2009b. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*. (112) 293 – 300.
- Vuthiphandchai, V.; S. Chomphuthawach y S. Nimrat. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology* (72) 129 – 138.
- Watson, P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* (7) 871 – 891.

- Watson, P. 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction Science*. (60) 481-492.
- Woynarovich, A. y E. Woynarovich. 1998. Reproducción artificial de las especies *Colossoma* y *Piaractus*. Guía detallada para la producción de alevinos de gamitana, paco y caraña. Fondo nacional de desarrollo pesquero – FONDEPES. 17 – 21.
- Yao, Z.; L. Crim; G. Richardson y C. Emerson. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus*) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, (181) 361-375
- Yang, H. y T. Tiersch. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. *Comparative biochemistry and Physiology*. (149) 224 – 232.
- Yoo, B.; M. Ryan y J. Wiggs. 1987. Loss of protein from spermatozoa of atlantic salmon (*Salmo salar*) because of cryopreservation. *Can. J. Zool.* (65) 9-13.
- Zachariassen, K. y E. Kristiansen. 2000. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*.; 41:257-279.

## CAPITULO 8: ANEXOS

<b>Evaluación de semen Pre congelación</b>					
	Macho 1	Macho 2	Macho 3	Macho 4	Macho 5
Repeticiones	Porcentaje de motilidad(%)	Porcentaje de motilidad(%)	Porcentaje de motilidad(%)	Porcentaje de motilidad(%)	Porcentaje de motilidad(%)
R <sub>1</sub>	90	90	70	70	90
R <sub>2</sub>	90	90	80	80	90
R <sub>3</sub>	90	80	60	70	90
<b>PROMEDIO</b>	<b>90</b>	<b>86.66</b>	<b>70</b>	<b>73.33</b>	<b>90</b>
<b>DESV.STAND</b>	<b>0</b>	<b>5.77</b>	<b>5.77</b>	<b>5.77</b>	<b>0</b>

### Anexo 1. Porcentajes de la evaluación de semen Post descongelación

<b>Evaluación de semen Post descongelación</b>		
<b>CODIGO</b>	<b>Macho 1</b>	<b>Macho 2</b>
	<b>Porcentaje de motilidad(%)</b>	<b>Porcentaje de motilidad(%)</b>
6M-10	10	2
6M-10	5	5
6M-10	7	5
PROMEDIO	7.33	4
DESV.STAND	2.51	1.73
6M-DEXT.	5	3
6M-DEXT.	5	5
6M-DEXT.	7	5
PROMEDIO	5.66	4.33
DESV.STAND	1.15	1.154
9M-10	7	3
9M-10	5	3
9M-10	10	5
PROMEDIO	7.33	3.66
DESV.STAND	2.51	1.15
9M-DEXT.	10	3
9M-DEXT.	5	5
9M-DEXT.	10	5
PROMEDIO	8.33	4.33
DESV.STAND	2.88	1.15
Testigo	90.00 ± 0.00	

### Anexo 2. Porcentajes de la evaluación de semen Post descongelación

Macho 1				Macho 2		
CODIGO	% FERTIL	% Eclosión	% L. Deform.	% FERTIL	% Eclosión	% L. Deform.
6M-10	6.86	57.14	25	31.63	93.54	45
6M-10	2.6	100	33.33	39.33	84.74	19
6M-10	3.37	80	50	50	91.11	30
PROMEDIO	4.3	79.05	36.11	40.32	89.80	31.33
DESV.STAND	2.27	21.45	12.73	9.22	4.54	13.05
6M-DEXT.	5.47	87.5	42.85	24.81	88.23	25
6M-DEXT.	3.09	83.33	20	42.3	85.45	40.42
6M-DEXT.	5.14	71.42	60	36.7	86.2	58
PROMEDIO	4.57	80.75	40.95	34.61	86.63	41.14
DESV.STAND	1.29	8.34	20.07	8.93	1.44	16.51
9M-10	41.08	84.9	86.66	40.77	96	45.83
9M-10	39.15	80	8.33	51.21	90.47	42.1
9M-10	43.54	85.18	65.21	48.21	96.29	69.23
PROMEDIO	33.26	83.36	53.40	38.73	94.25	52.39
DESV.STAND	2.20	2.91	40.48	5.38	3.28	14.71
9M-DEXT.	35.91	94.11	43.75	34.54	86.84	43
9M-DEXT.	20.68	88.88	25	51.76	90.9	24
9M-DEXT.	25.61	90.32	46.42	57.6	88.67	53.19
PROMEDIO	27.4	91.10	38.39	47.97	88.80	40.06
DESV.STAND	7.77	2.70	11.67	11.989	2.033	14.815
Testigo	Porcentaje Fertilización: 65.69		Porcentaje Eclosión: 78.42		Porcentaje larvas malformadas: 18.39	

**Anexo 3. Porcentajes de fertilización, Eclosión y larvas deformes, para los reproductores.**