

## Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*)

Oscar J Navarro, MVZ; Yohana M Velasco Santamaría<sup>1</sup>, MV; Pablo E Cruz Casallas, MVZ, MS, PhD  
 Instituto de Acuicultura, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales,  
 Universidad de los Llanos, A. A. 2621, Villavicencio, Colombia.  
 pecruz@telecom.com.co

(Recibido: 10 marzo, 2004; aceptado: 28 mayo, 2004)

### Resumen

La Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) es un pez de escama de los Llanos Orientales colombianos, considerada la especie íctica nativa más importante de la acuicultura colombiana. La utilización de semen criopreservado para la reproducción de esta especie puede traer grandes posibilidades de mejoramiento genético; sin embargo, a pesar que han sido realizados esfuerzos para lograr la crioconservación de semen, los índices de fertilidad aún son inferiores a los observados utilizando semen fresco. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad y fertilidad de semen de cachama blanca, crioconservado con cinco diferentes sustancias crioprotectoras: glicerol (GLY), dimetil sulfóxido (DMSO), metanol (MET), propilen glicol (PPG) y etilen glicol (ETG). Se utilizó semen de 15 reproductores adultos,  $4.8 \pm 1.1$  kg de peso corporal, tratados con 4.0 mg/kg de extracto de hipófisis de carpa (EPC) vía IM. El semen fue recolectado mediante estrujamiento, recibido en tubos graduados y mantenido a temperatura ambiente (26°C) hasta su evaluación. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  error estándar. Antes de la dilución la movilidad masal fue de  $92 \pm 1\%$  y la concentración de  $17.7 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^9$  espermatozoides por mL. Se utilizaron dos diluyentes: D1 (glucosa [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>] 5,5 g; yema de huevo 7.0 mL y agua destilada c.s.p. 100 mL) y D2 (leche entera en polvo 15 g, agua destilada c.s.p. 100 mL). Para D1 se utilizó como crioprotector 5% (D1-DMSO 5 o D1-GLY 5), 10% (D1-DMSO 10 o D1-GLY 10) o 15% (D1-DMSO 15 o D1-GLY 15) de dimetil sulfóxido o de glicerol, respectivamente. Para el D2, 5% (D2-MET 5, D2-PPG 5 o D2-ETG 5), 10% (D2-MET 10, D2-PPG 10 o D2-ETG 10) o 15% (D2-MET 15, D2-PPG 15 o D2-ETG 15) de metanol, propilen glicol o etilen glicol, respectivamente. Los mayores porcentajes de movilidad masal posdescongelación fueron observados cuando se utilizó D2-PPG 5 ( $64 \pm 2.4\%$ ) y D2-MET 10 ( $57 \pm 4.9\%$ ) ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, los mayores porcentajes de fertilidad fueron obtenidos con semen crioconservado utilizando D2-ETG 5 ( $38 \pm 5.3\%$ ) y D1-DMSO 10 ( $36 \pm 6\%$ ). Sin embargo, estos porcentajes fueron inferiores ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon con los observados con semen fresco.

**Palabras clave:** crioprotectores, crioconservación, peces, semen

### Introducción

La Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) es un pez de escama, nativo de los Llanos Orientales, que por sus hábitos alimenticios omnívoros, rápido crecimiento, alta calidad y adecuada aceptación comercial de su carne, es una especie ampliamente cultivada en la región (1, 16). Los esfuerzos

investigativos sobre esta especie han sido direccionados principalmente al conocimiento de su biología (3), anatomía (17, 25), hematología básica (12), sanidad (4, 5, 9), hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales (26) y manipulación de sus ciclos reproductivos (2, 22, 23). Sin embargo, aún falta

profundizar en el conocimiento de sus características seminales, en la crioconservación de sus gametos y en los factores que afectan su eficiencia reproductiva.

Varios protocolos para la crioconservación de espermatozoides de peces han sido desarrollados durante los últimos 25 años (6, 20, 21). En general, los resultados son muy variables, indicando una alta sensibilidad de los protocolos propuestos (28), lo cual hace necesario, en la mayoría de los casos, ajustar el procedimiento para cada especie (7, 15, 19).

Aunque se han realizado varios esfuerzos para lograr la crioconservación eficiente de semen de Cachama Blanca, 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. 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. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad y fertilidad de semen de Cachama Blanca, crioconservado con cinco diferentes sustancias crioprotectoras: glicerol, dimetil sulfóxido, metanol, propilenglicol y etilenglicol, empleando dos diluyentes basados en leche entera y yema de huevo.

### Materiales y métodos

Fueron utilizados 15 machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) de 4 a 6 años de edad, con peso corporal de  $4.8 \pm 1.1$  kg, nacidos y criados en cautiverio en la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL - UNILLANOS), los cuales fueron sometidos a inducción de la espermiación, mediante la administración IM de extracto de hipófisis de carpa (4.0 mg/kg). El semen fue obtenido 24 a 36 h después de la administración de la hormona, mediante masaje aplicado en dirección cráneo – caudal del abdomen y colectado en tubos de ensayo volumetrados. Se determinaron las características macroscópicas y microscópicas del semen, siguiendo los procedimientos descritos por Cruz-Casallas (11). Dentro de las variables macroscópicas se analizó el volumen seminal, el color y la viscosidad y entre las características

microscópicas se determinó la movilidad masal, el tiempo de activación, la concentración espermática, el número de espermatozoides por kg de pez y la viabilidad espermática.

Se utilizaron dos diluyentes: diluyente 1 (D1) y diluyente 2 (D2) y cinco sustancias crioprotectoras: glicerol (GLY), dimetil sulfóxido (DMSO), metanol (MET), propilenglicol (PPG) y etilenglicol (ETG). La composición de D1 fue glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) 5.5 g; yema de huevo 7.0 mL y agua destilada c.s.p. 100 mL y la de D2 leche entera en polvo 15 g y agua destilada c.s.p. 100 mL.

Con D1 se evaluaron como sustancias crioprotectoras: 5% (D1-DMSO 5 o D1-GLY 5), 10% (D1-DMSO 10 o D1-GLY 10) o 15% (D1-DMSO 15 o D1-GLY 15), de dimetil sulfóxido o Glicerol, respectivamente, mientras que con D2: 5% (D2-MET 5, D2-PPG 5 o D2-ETG 5), 10% (D2-MET 10, D2-PPG 10 o D2-ETG 10) o 15% (D2-MET 15, D2-PPG 15 o D2-ETG 15) de metanol, propilenglicol o etilenglicol, respectivamente.

Concluida la evaluación, el semen y los diluyentes fueron colocados en un recipiente con hielo con el fin de reducir lentamente la temperatura y mantenerla estable entre los 4 y 5°C. Posteriormente, cada crioprotector - diluyente se mezcló con el semen en proporción 1:4 y se empacó manualmente en pajillas francesas de 0.5 mL (IMV, Instrument de Médecine Vétérinaire, Minneapolis, USA), las cuales se mantuvieron refrigeradas (4 a 5°C) durante media hora. Transcurrido ese tiempo las pajillas fueron expuestas en posición horizontal durante 15 min a vapores de nitrógeno líquido (-76°C) y finalmente inmersas en nitrógeno líquido a -196°C. Ocho a 15 días después fueron seleccionadas al azar cinco pajillas por tratamiento, descongeladas en baño María a 35°C y evaluada la movilidad, tiempo de activación, viabilidad y fertilidad. La fertilidad se evaluó únicamente en ocho tratamientos, cuyos porcentajes de movilidad masal posdescongelación fueron superiores al 20 %. Para este propósito se emplearon 4 gramos (ca. 1200 huevos por gramo) de huevos de cachama y 0.5 mL de semen crioconservado (1 pajilla) para cada repetición (n = 6). La incubación se realizó en recipientes plásticos de 2.0 l y la fertilidad se evaluó 6 horas posinseminación, calculando la proporción de huevos fertilizados en cada uno de los protocolos estudiados.

### Análisis estadístico

La información correspondiente a las características seminales fue analizada a través de estadísticas descriptivas (n=15). El efecto de las sustancias crioprotectoras y de sus concentraciones sobre la movilidad y sobrevivencia espermática, fue analizada a través de análisis de varianza (ANOVA) o de la prueba de Kruskal-Wallis (30), seguido de la prueba de Dunn. Los resultados de los protocolos de criopreservación, en términos de tasas de fertilidad, fueron analizados mediante pruebas de "t" no pareada o ANOVA, según el número de tratamientos incluidos en un análisis simultáneo. Previo a cualquier evaluación estadística, los datos fueron sometidos a pruebas de Bartlett (18) para determinar su homogeneidad y orientar el tipo de análisis estadístico a efectuar. En todos los casos,  $p < 0.05$  fue utilizado

como criterio estadístico para revelar diferencias significantes.

### Resultados

La tabla 1 muestra la media y el error estándar de las características seminales macro y microscópicas observadas en los 15 individuos estudiados. En general, los valores mostraron baja variabilidad: aunque las muestras presentaron una viscosidad entre 3 y 4, todas fueron de coloración blanca, sugiriendo una alta concentración espermática. El volumen fue de  $13.4 \pm 1.5$  mL y la movilidad masal  $92 \pm 1$  %. Por su parte, el tiempo de activación presentó un valor mínimo de 60 segundos y un valor máximo de 119 seg. Finalmente, la concentración espermática fluctuó entre  $8.3 \times 10^9$  y  $27.9 \times 10^9$  mL<sup>-1</sup> espermatozoides por mL.

**Tabla 1.** Características macroscópicas y microscópicas de semen de Cachama Blanca, obtenido por estrujamiento de machos maduros, 24 a 30 h después de la administración IM de 4.0 mg/kg de extracto de hipófisis de carpa (EPC). Los valores corresponden a media  $\pm$  error estándar (n =15).

Características macroscópicas	
Volumen (mL)	13.4 $\pm$ 1.5
Color	Blanco
Viscosidad (1 -4) <sup>1</sup>	3 $\pm$ 0.5
Características microscópicas	
Movilidad masal (%)	92 1
Tiempo de activación (seg.)	79.4 4.5
Concentración espermática (sptz.mL-1)	17.7 x 10 <sup>9</sup> 1.8 10 <sup>9</sup>
Número de espermatozoides. kg de pez	53.4 x 10 <sup>9</sup> 8.4 10 <sup>9</sup>
Viabilidad espermática (%)	95 0.2

<sup>1</sup> Evaluada subjetivamente en una escala de 1 – 4, siendo 4 el mayor grado de viscosidad.

La tabla 2 presenta los resultados de movilidad masal, tiempo de activación y de viabilidad para cada uno de los 15 tratamientos evaluados. En primer lugar, puede observarse que los mayores porcentajes de movilidad masal fueron observados en aquellas muestras de semen crioconservadas con D2-PPG 5% ( $64 \pm 2.4\%$ ) y D2-MET 10% ( $57 \pm 4.9\%$ ), los cuales fueron superiores ( $p < 0.05$ ) a las observadas en los tratamientos D1-DMSO 10%, D1-DMSO 15%, D2-ETG 5%, D2-ETG 10%, D2-ETG 15%, D2-PPG 15%, D2-MET 5%, D2-MET 15%, D1-GLY 5%, D1-GLY 10% y D1-GLY 15%.

El mayor tiempo de activación fue obtenido con los tratamientos D2-PPG 5% ( $183 \pm 5$  seg) y D2-ETG 10% ( $181 \pm 34$  seg), valores significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a aquellos observados en los tratamientos D1-DMSO 5%, D1-DMSO 10%, D1-DMSO 15%, D2-MET 5%, D2-MET 15%, D1-GLY 5%, D1-GLY 10% y D1-GLY 15%.

Con relación al porcentaje de espermatozoides vivos, se observó que el tratamiento D2-MET 10% ( $29 \pm 4$  %) presentó un mayor porcentaje ( $p < 0.05$ ) que los tratamientos D1-DMSO 5%, D2-ETG 5%, D2-

ETG 10%, D2-ETG 15%, D2-PPG 5%, D2-PPG 10%, D2-PPG 15%, D2-MET 15%, D1-GLY 5%, D1-GLY 10% y D1-GLY 15%.

Los resultados de las pruebas de fertilidad son mostrados en la tabla 3. La fertilidad fue evaluada únicamente en aquellos tratamientos cuyos porcentajes de movilidad posdescongelación fue superior al 20%; por lo tanto esta prueba se llevó a cabo en apenas 8 de los 15 tratamientos estudiados. El tratamiento D2-ETG

5% mostró mayor porcentaje de fertilidad ( $38 \pm 5\%$ ) que el tratamiento D2-PPG 5% y D2-PPG 10%. Por otra parte, el tratamiento D1-DMSO 10% mostró mayor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de fertilidad ( $36 \pm 6\%$ ) que el tratamiento D2-PPG 5%. Las demás diferencias estadísticas están indicadas en la tabla correspondiente. En todos los casos el porcentaje de fertilidad de los tratamientos evaluados fue inferior ( $p < 0.05$ ) al obtenido con semen fresco ( $89.4 \pm 4.4\%$ ).

**Tabla 2.** Movilidad masal, tiempo de activación y viabilidad posdescongelación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachyomus*), crioconservado con cinco diferentes sustancias crioprotectoras. Los valores corresponden a media  $\pm$  error estándar ( $n = 5$ ).

Tratamiento	Movilidad (%)	Tiempo de activación (seg)	Viabilidad (%)
D1-DMSO 5%	$55 \pm 4.5^{ab}$	$103 \pm 3.4^{cde}$	$11 \pm 3^{bcd}$
D1-DMSO 10%	$40 \pm 3.5^{abcd}$	$88 \pm 11^{cde}$	$22 \pm 7^{ab}$
D1-DMSO 15%	$2 \pm 0.7^f$	$63 \pm 13^{de}$	$23 \pm 3^a$
D2-ETG 5%	$37 \pm 8.8^{bcd}$	$161 \pm 7^{abc}$	$10 \pm 4^{bcd}$
D2-ETG 10%	$21 \pm 8.2^{def}$	$181 \pm 34^a$	$4 \pm 2^{cd}$
D2-ETG 15%	$30 \pm 0.8^{cde}$	$118 \pm 13^{abcd}$	$1 \pm 1^d$
D2-PPG 5%	$64 \pm 2.4^a$	$183 \pm 5^a$	$13 \pm 4^{abcd}$
D2-PPG 10%	$53 \pm 7.3^{abc}$	$172 \pm 17^{ab}$	$15 \pm 2^{abcd}$
D2-PPG 15%	0	0	$4 \pm 2^{cd}$
D2-MET 5%	$47 \pm 10.0^{ab}$	$105 \pm 8^{bcde}$	$19 \pm 4^{abc}$
D2-MET 10%	$57 \pm 4.9^{ab}$	$133 \pm 5^{abcd}$	$29 \pm 4^a$
D2-MET 15%	$10 \pm 2.2^{ef}$	$87 \pm 5^{de}$	$11 \pm 2^{bcd}$
D1-GLY 5%	$8 \pm 2.7^{ef}$	$78 \pm 25^{de}$	$1 \pm 0.5^d$
D1-GLY 10%	$1 \pm 0.2^f$	$40 \pm 2^e$	$0.1 \pm 0.01^d$
D1-GLY 15%	$3 \pm 1.0^f$	$60 \pm 22^{de}$	0

D1 = diluyente 1: glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) 5,5 g; yema de huevo 7.0 mL y agua destilada c.s.p. 100 mL

D2 = diluyente 2: leche entera en polvo 15 g y agua destilada c.s.p. 100 mL.

DMSO = dimetil sulfóxido; GLY = glicerol; ETG = etilenglicol; PPG = propilenglicol; MET = metanol.

<sup>a,b,c,d,e,f</sup> Entre filas, medias con letra común son estadísticamente iguales ( $p > 0.05$ )

**Tabla 3.** Movilidad masal y fertilidad posdescongelación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachyomus*), crioconservado con dimetil sulfóxido, etilenglicol o propilenglicol. Los valores corresponden a media  $\pm$  error estándar ( $n = 6$ ).

Tratamiento	Movilidad masal (%)	Fertilidad (%)
D1-DMSO 5%	$55 \pm 4.5^{bcd}$	$25 \pm 4^{bc}$
D1-DMSO 10%	$40 \pm 3.5^{bcde}$	$36 \pm 6^b$
D2-ETG 5%	$37 \pm 8.8^{cde}$	$38 \pm 5^b$
D2-ETG 10%	$21 \pm 8.2^e$	$28 \pm 9^b$
D2-ETG 15%	$30 \pm 0.8^{de}$	$24 \pm 2^{bd}$
D2-PPG 5%	$64 \pm 2.4^b$	$2 \pm 1^{cde}$
D2-PPG 10%	$53 \pm 7.3^{bcd}$	$1 \pm 0.1^{cde}$
D2-MET 10%	$57 \pm 4.9^{bc}$	$16 \pm 8^{be}$
Control (semen fresco)	$90 \pm 4.0^a$	$89.4 \pm 4.4^a$

D1 = diluyente 1: glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) 5,5 g; yema de huevo 7.0 mL y agua destilada c.s.p. 100 mL

D2 = diluyente 2: leche entera en polvo 15 g y agua destilada c.s.p. 100 mL.

DMSO = dimetil sulfóxido; GLY = glicerol; ETG = etilenglicol; PPG = propilenglicol MET = metanol.

<sup>a,b,c,d,e</sup> Entre filas, medias con letra común son estadísticamente iguales ( $p > 0.05$ )

## Discusión

La mayoría de las características seminales observadas en este trabajo difieren de las reportadas en la literatura. Por ejemplo, Cortés y Vargas (10) reportan un volumen seminal de  $2.1 \pm 1.3$  mL en animales mantenidos en cautiverio y un tiempo de activación de  $345.3 \pm 218$  seg. Igualmente, estos mismos autores señalan una concentración espermática para la especie casi cinco veces superior. Esta divergencia en los datos puede deberse a que los procedimientos empleados para hacer las observaciones fueron diferentes o a que los trabajos fueron realizados durante una diferente época del año.

La evaluación del semen post-descongelación evidenció una dramática disminución en características como: movilidad, viabilidad y fertilidad, cuando comparadas con las observadas en el semen fresco, lo cual refleja los daños sufridos por los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación. Sin embargo los porcentajes de movilidad post-descongelación fueron superiores a aquellos observados Tiersch *et al* (31) en razorback sucker (*Xyrauchen texanus*), utilizando sustancias crioprotectoras similares (etilen glicol y propilen glicol) y a las mismas concentraciones (5% y 10%).

Fogli da Silveira *et al* (13) observaron 20% de células viables en semen congelado de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando como crioprotector DMSO; este resultado es similar al obtenido en el presente trabajo cuando se utilizó DMSO como crioprotector en concentraciones del 10% y 15%. Así mismo Gallant *et al* (14) obtuvieron

resultados similares ( $17.6 \pm 0.8$  % de espermatozoides vivos) cuando congeló semen de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) usando como crioprotector DMSO al 10%.

Los resultados de fertilidad obtenidos con semen criopreservado con DMSO concuerdan con los observados por Pardo (27) en Yamú (*Brycon siebenthalae*) y también con aquellos reportados Fogli da Silveira *et al* (13) en Pacú (*Piaractus mesopotamicus*); sin embargo, son inferiores a los reportados por Ciereszco *et al* (8) con semen de muskellunge (*Exos masquinungy*), a pesar que este último autor reportó porcentajes de movilidad inferiores. Tomados en conjunto, estos resultados corroboran la observación reportada por varios autores (24, 29) de ausencia de relación directa entre el porcentaje de movilidad post-descongelación y el índice de fertilidad.

Los tratamientos que mejor preservaron las características seminales de movilidad y viabilidad y con aceptables porcentajes de fertilidad, fueron el diluyente yema de huevo con DMSO al 10% y leche entera con Metanol al 10%. Con respecto al índice de fertilidad posdescongelación, el tratamiento leche entera con etilenglicol al 5% fue el que presentó mejores resultados. Igualmente se comprobó, que la calidad seminal observada en términos de la movilidad posdescongelación no mantiene una relación directa con los índices de fertilidad, ya que semen descongelado de baja movilidad presentó resultados aceptables de fertilidad. Finalmente, no se recomienda el uso del glicerol como crioprotector para la congelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

## Agradecimientos

Este trabajo contó con apoyo financiero del Instituto de Investigaciones de la Orinoquía Colombiana (IIOC) - Universidad de los Llanos, Convocatoria proyectos semilla Año 2001. Los autores agradecen las correcciones y contribuciones del Profesor Dr. Evoy Zaniboni Filho y de la Profesora Gilma Hernández Arévalo, durante la preparación del manuscrito.

## Summary

*Evaluation of five cryoprotectant for cryopreservation of Cachama Blanca (Piaractus brachypomus) mil.*

*Cachama Blanca (Piaractus brachypomus) is a fish of the Orinoco River basin from Colombia; it has been considered one of the most important native species for the continental Colombian aquaculture. The use of the cryopreserved semen for the assisted reproduction in these species*

could bring great possibilities in the genetic development; despite the efforts carried out to obtain an efficient protocol for semen cryopreservation, the fertilization rate has been lower than the results of fresh semen. The aim of this work was to evaluate the quality and fertility of semen of Cachama Blanca cryopreserved with five different cryoprotectant: glycerol, dimethyl sulphoxide, methanol, propyleneglycol and ethylene glycol. Semen of 15 male adults was used,  $4.8 \pm 1.1$  kg of body weight, the spermiation was induced with pituitary carp extract (PCE), 4.0 mg.kg body weight IM. The semen was collected by gentle stripping, the samples were collected in graduated tubes and were maintained at environment temperature ( $26^{\circ}\text{C}$ ) until evaluation. The results are mean  $\pm$  error standard. Before the dilution, the masal motility was  $92 \pm 1\%$  and the sperm concentration was  $17.7 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^9$  spermatozoa by mL. Two extenders were used: D1 (glucose [ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ] 5.5 g; egg yolk 7.0 mL and distilled water c.s.p. 100 mL) and D2 (whole milk powder 15 g, distilled water c.s.p. 100 mL). For D1 was used like cryoprotector 5% (D1-DMSO 5 o D1-GLY 5), 10% (D1-DMSO 10 o D1-GLY 10) o 15% (D1-DMSO 15 o D1-GLY 15) of dimethyl sulphoxide and glycerol, respectively. For D2, 5% (D2-MET 5, D2-PPG 5 o D2-ETG 5), 10% (D2-MET 10, D2-PPG 10 o D2-ETG 10) o 15% (D2-MET 15, D2-PPG 15 o D2-ETG 15) of methanol, propyleneglycol or ethyleneglycol, respectively. The higher masal motility post thawing percentages were ( $p < 0.05$ ) observed when L-PPG ( $64 \pm 2.4\%$ ) y L-MET 10 ( $57 \pm 4.9\%$ ). On the other hand, the highest fertilization percentages were obtained with cryopreserved semen using D2-ETG 5 ( $38 \pm 53\%$ ) y D1-DMSO 10 ( $36 \pm 6\%$ ). However, these percentages were lower ( $p < 0.05$ ) when compared with the other samples of fresh semen.

**Key words:** cryoprotectant, cryopreservation, fish, semen.

## Referencias

- Arias JA. Apuntes sobre el cultivo de la Cachama en el Meta. Agrometa 1988; 20: 9-10.
- Arias JA, Vásquez W, Orrego J, Isaza M. Avances en la Reproducción inducida de *Piaractus brachypomus*, Cachama Blanca. Boletín Red de Acuicultura 1989; 3: 9-10.
- Arias JA. Apuntes sobre la biosistemática de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Memorias XXI Congreso Latinoamericano de Zoología. 1990; 43 - 45.
- Bejarano S, Ramírez M. Estudios de histología normal de cuatro órganos de importancia diagnóstica (tegumento, branquias, hígado y riñón) en la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de los Llanos, Villavicencio. 1990. 81 p.
- Bobadilla N, Verjan N. Estudios electroforéticos e inmunoelectroforéticos de las proteínas plasmáticas de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) clínicamente sanas, procedentes de cultivos comerciales. Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de los Llanos, Villavicencio. 1998. 242 p.
- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni Filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. J Fish Biol. 2003; 63: 472-89.
- Ciereszko A, Dabrowski K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquacult. 1993; 109: 367-73.
- Ciereszko A, Dabrowski K, Lin F, Christ SA, Toth GP. Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. Transactions of the American Fisheries Society. 1999; 128: 542-48.
- Corredor MA, Eslava PR, Iregui CA, Moreno PA. Patologías branquiales de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) en estanques de ceiba. Veterinaria Al Día. 1997; 3: 5-11.
- Cortés G, Vargas R. Análisis y criopreservación de semen de cachama (*Piaractus brachypomus*). Tesis de grado, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá. 1991. 70 p.
- Cruz-Casallas PE. Técnicas de laboratorio para la evaluación de la calidad seminal en peces. Orinoquía. 2001; 5: 155-63.
- Eslava PR, Hernández CP, Gómez LA. Efecto del estrés por manejo y transporte, sobre los parámetros de hematología y química sanguínea de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev ACOVEZ. 1995; 20: 83-92.
- Fogli da Silveira W, Kavamoto ET, Narahara MY. Avaliação espermiática, preservação criogenica do semen do pacu *Piaractus mesopotamicus*, proveniente de reprodução induzida. Boletim do Instituto de pesca. 1990; 17: 1-13.
- Gallant RK. Comparison of different extenders for the cryopreservation of Atlantic salmon spermatozoa. Theriogenol. 1993; 40: 479-86.
- Gwo JC, Strawn K, Longnecker MT, Arnold CR. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquacult. 1991; 94: 335-75.
- Hernández A, Muñoz D, Ferraz de Lima J, De Fex R, Vásquez W. Estado actual del cultivo de *Colossoma* y

- Piaractus* en Brasil, Colombia, Panamá, Perú y Venezuela. Boletín Red de Acuicultura. 1992; 6: 3-27.
17. Herrera DC, Eslava PR, Iregui CA. Aspectos de anatomía macro y microscópica del bazo de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev ACOVEZ. 1996; 21: 16-21.
  18. Johnson N, Leone F. Statistics and Experimental Design. En: Engineering and physical sciences. New York: John Wiley; 1974; 241-44.
  19. Lahnsteiner F, Patzner RA, Welsmann T. 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. 1992. 279 p.
  20. Leung KP, Jamieson BGM. Live preservation of fish gametes. En: Jamiesson BGM, editor. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge: University Press; 1991; 245-69.
  21. Munkittrick KR, Moccia RD. Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production - scale artificial fertilization program. Theriogenol. 1984; 21: 645-59.
  22. Muñoz D, Vásquez W, Cruz PE. Inducción de la ovulación y el desove de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*), con buserrelina LH-RH análogo. III Reunión Red Nacional de Acuicultura, Cali, Valle, 1989; 21 – 25.
  23. Muñoz D, Vásquez W, Cruz PE. Reproducción inducida de la Cachama Blanca, *Piaractus brachypomus*, con mGnRH-A. Boletín Red de Acuicultura. 1991; 5: 3-6.
  24. Oda S, Igarashi Y. Sperm activating proteins from unfertilized eggs of the pacific herring (*Clupea pallasai*). Development, growth and differentiation 1995; 37: 257-61.
  25. Pardo SC, Atencio VJ, Arias JA. Contribución al conocimiento del aparato circulatorio de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Dalia. 1998; 3: 15-19.
  26. Pardo CS, Suárez MH. Evaluación de tres niveles de administración de alimento en el período de ceba de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de los Llanos, Villavicencio, 1991. 93 p.
  27. Pardo J. Congelación de semen de Yamú (*Brycon siebenthalae*). Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de los Llanos, Villavicencio, 2000. 71 p.
  28. Phronen J. Composition and cryopreservation of sperm from some Finnish teleost fish. Finnish Fish Res. 1994; 15: 27-48.
  29. Pillai M; Shields T. Isolation and partial characterization of the sperm motility initiation factor from eggs of the pacific herring (*Clupea pallasai*). J Exp Zool. 1993; 269: 336-42.
  30. Siegel S. Nonparametric statistics for the behavioral science. New York: McGraw-Hill. 1956; 117 – 27.
  31. Tiersch TR, Williamson JH, Carmichael GJ, Gorman OT. Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. Transactions of the American Fisheries Society 1998; 127: 95-104.