

Estado actual de la crioconservación de semen de peces tropicales en Colombia: resultados y perspectivas

Pablo Emilio Cruz-Casallas, MVZ, MSc, PhD; Yohana María Velasco-Santamaría MV y Víctor Mauricio Medina-Robles MVZ, MSc.

Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (GRITOX).
Instituto de Acuicultura - Universidad de los Llanos
Villavicencio - Meta
pecruz@telecom.com.co

Introducción

La aplicación de la biotecnología en el control de los procesos reproductivos se ha convertido en una herramienta de suma importancia para el mejoramiento de la producción animal y conservación de las especies. La crioconservación se define como una técnica para la conservación de tejidos, células u otros materiales biológicos a muy baja temperatura (generalmente a -196°C), a la cual permanecen genéticamente estables y metabólicamente inertes. Entre las células más comúnmente sometidas a procesos de crioconservación se encuentran los espermatozoides de diferentes especies domésticas y silvestres, los cuales han sido ampliamente utilizados en los procesos de inseminación artificial y fertilización in vitro, tanto en programas de mejoramiento genético como de conservación.

Durante los últimos 20 años la publicación de artículos científicos sobre crioconservación de semen de especies acuáticas ha presentado un aumento continuo (Figura 1). Según Tiersch y Masik (2000), entre 1953 y 1996 se han publicado más de 185 artículos científicos sobre este tema, involucrando aproximadamente 83 familias diferentes, siendo los salmónidos la familia más estudiada (36% de todos los reportes). Estos resultados contrastan con los reportes publicados en especies tropicales, en las cuales ha sido incipiente el desarrollo y aplicación de esta tecnología.

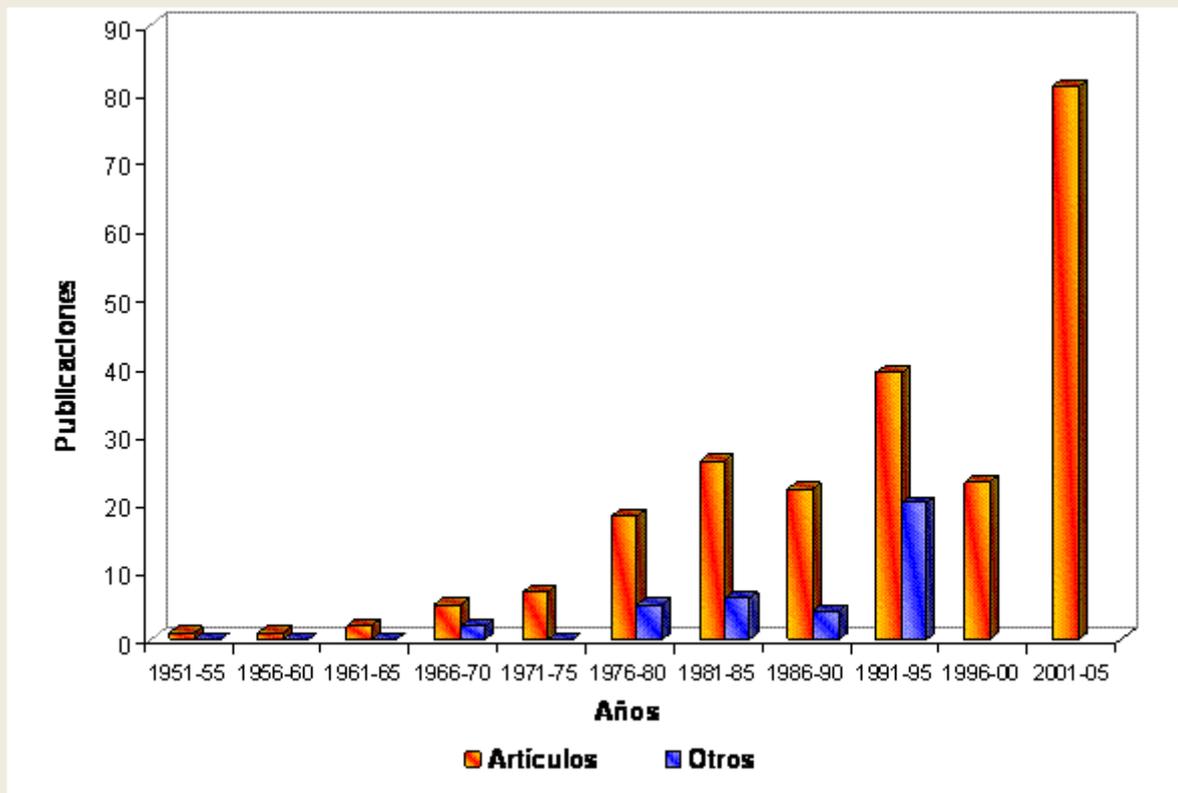


Figura 1. Variación del número de publicaciones en periódicos internacionales sobre crioconservación de semen de peces, durante los quinquenios correspondientes al periodo 1950 - 2005. Adaptado de Tiersch y Masik (2000).

Igual que en muchas especies de interés zootécnico, la crioconservación de gametos de peces ofrece importantes ventajas para la industria de la acuicultura. En primer lugar, aumenta la posibilidad de reproducir especies por fuera de su estación reproductiva, facilita el movimiento e intercambio de material genético entre productores, mejora la eficiencia en la utilización de parentales y contribuye a la conservación de las poblaciones silvestres, al disminuir la captura de reproductores del hábitat natural de la especie (Medina-Robles et al., 2005a). Otras ventajas que pueden derivarse de la aplicación de esta tecnología en teleósteos, son las siguientes:

1 Mejoramiento genético a través de la utilización masiva de los mejores reproductores. 2 Incremento de la protección

sanitaria, permitiendo la introducción de nuevas líneas genéticas con mínimo riesgo de transmisión de patógenos a los sistemas de producción. 3 Suministro permanente de gametos para la óptima utilización en criaderos o en investigación. 4 Facilidad de transporte de material genético entre criaderos, realizando protección genética con gametos y embriones crioconservados.

En el ámbito internacional son muchas las especies de peces de interés comercial cuyos gametos, particularmente espermatozoides, han sido crioconservados exitosamente (ver anexo 1). En contraste, la crioconservación de semen de peces en Colombia es un campo relativamente nuevo, en el cual todavía no se ha logrado muchos progresos prácticos a escala comercial. De hecho, hasta la presente ninguna de las granjas nacionales dedicadas a la producción comercial de alevinos emplea rutinariamente semen crioconservado en sus procesos de fertilización, recurriendo siempre a reproductores mantenidos en cautiverio o, en la mayoría de los casos, a ejemplares capturados y retirados de su hábitat natural. Sin embargo, durante los últimos años el Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos ha ejecutado varios proyectos de investigación, orientados principalmente a la crioconservación de semen de peces nativos tropicales, tales como cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), yamú (*Brycon amazonicus*) y bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*). El presente documento, describe los procedimientos utilizados en estas especies, así como los resultados más importantes.

Procedimiento para la crioconservación de semen de peces

El procedimiento para la crioconservación de semen de peces en términos generales no varía mucho entre las diferentes especies. Las principales etapas del proceso se describen a continuación.

1. Selección de los reproductores

Para la obtención del semen deben seleccionarse individuos sexualmente maduros y durante la época reproductiva de la especie. Los reproductores deben ser revisados periódicamente con el fin de identificar aquellos que presenten signos de seminación después de un suave masaje abdominal en sentido cráneo-caudal. La presencia de semen en la papila genital indica que el individuo ha alcanzado la madurez gonadal y por lo tanto, puede ser sometido al tratamiento hormonal para inducir la espermiación (Arias et al., 2002).

Los animales preseleccionados son llevados a estanques pequeños o piletas de manejo, donde son identificados, pesados y medidos (longitud total). Inicialmente se realiza la estimación indirecta de la concentración espermática por medio del espermatocrito. Para el caso del yamú (*B. amazonicus*) se deben seleccionar animales con espermatocrito mayor de 12%, los cuales son posteriormente sometidos al tratamiento hormonal para la maduración final de las gónadas y la espermiación, utilizando una única inyección intramuscular de extracto de hipófisis de carpa (EHC), equivalente a 4 mg.kg⁻¹ de peso corporal. La hormona se diluye en solución salina fisiológica, hasta un volumen suficiente para administrar entre 0.5 y 1.0 mL por animal.

2. Obtención del semen

El semen se obtiene 18 a 20 horas después de la inyección del EHC. Los reproductores son previamente tranquilizados por inmersión durante 3 a 5 minutos en una solución de 2-fenoxietanol (300 ppm, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Cuando los animales pierden el eje de nado se retiran inmediatamente de la solución anestésica, y las aletas y el abdomen deben secarse cuidadosamente para evitar el contacto del semen con agua durante su obtención, ya que ésta activa la movilidad de los espermatozoides. De igual manera, debe realizarse una suave presión sobre la papila urogenital, con el objetivo de eliminar restos de agua, orina o heces. El semen es obtenido mediante masaje abdominal en sentido cráneo-caudal, colectándolo directamente en un tubo de vidrio o de plástico de 15 mL aforado, estéril y seco. El masaje es suspendido cuando haya evidencia de contaminantes en el semen tales como sangre, bilis, orina, heces o agua. En todos los casos, muestras contaminadas no deben procesarse, ya que estas sustancias disminuyen la calidad seminal (Dreanno, 1998). La figura 1 ilustra la secuencia de eventos para la obtención del semen en yamú (*B. amazonicus*).

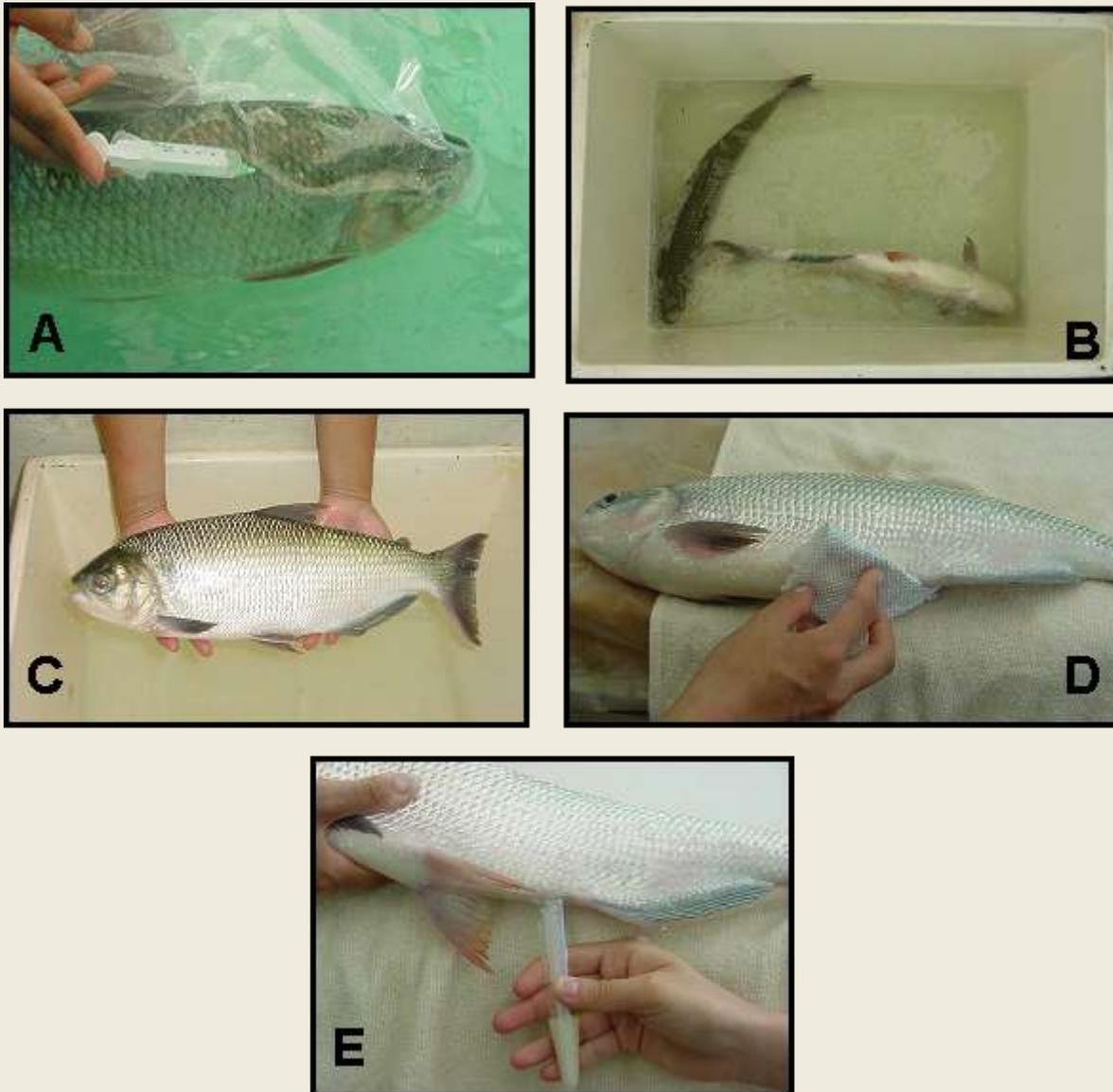


Figura 1. Obtención de semen de yamú (*B. amazonicus*) para crioconservación. A, inducción hormonal con EHC vía IM para maduración final de las gónadas. B, tranquilización por inmersión en 300 ppm de 2-fenoxietanol, obsérvese la pérdida del eje de nado como indicador del estado de tranquilización. C, manipulación del animal tranquilizado. D, secado de la región abdominal, aletas y papila urogenital previo a la obtención del semen. E, obtención del semen por estrujamiento en sentido cráneo-caudal y recolección en tubos estériles aforados. Tomado de Cruz-Casallas et al., 2006.

3. Evaluación del semen pre congelación

Después de recolectada la muestra se realiza la evaluación seminal, con el fin de conocer la calidad del semen pre congelación. Este procedimiento consta de una evaluación macroscópica y microscópica y debe hacerse inmediatamente después de la obtención de la muestra.

3.1 Evaluación macroscópica

Volumen seminal: se determina directamente en el tubo aforado de recolección y se expresa en mL.

Color: se registra para evidenciar la posible presencia de sustancias contaminantes, siendo blanco puro o marfil el color de una muestra ideal.

Evalúadas las variables anteriores, la muestra debe ser mantenida a temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) por no más de 30 min, tiempo durante el cual debe realizarse la evaluación microscópica (Cruz-Casallas et al., 2005).

3.2 Evaluación microscópica

Concentración espermática: permite conocer el número de células espermáticas por unidad de volumen. El método más utilizado es el hemocitómetro, que consiste en diluir una muestra de semen con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%), en una proporción que varía de acuerdo con la concentración espermática (1:1000 - 1:2000). Posteriormente se realiza el conteo individual de los espermatozoides en una cámara contadora de partículas (Neubauer o Makler).

Movilidad masal y tiempo de activación: determina la movilidad masal de la muestra, activando una gota de semen (20 µL) con agua (180 µL) y se registra la duración del movimiento de los espermatozoides. Las muestras aptas para congelación deben presentar movilidad masal superior a 80% y un tiempo de activación de 40 a 50 seg.

4. Congelación del semen

El semen puede ser procesado individualmente o mezclando muestras provenientes de varios machos de calidad espermática similar. En este último caso se recomienda determinar nuevamente el número de espermatozoides por µL, con el fin de conocer la concentración final del material seminal a congelar.

4.1 Preparación del diluyente

El diluyente más utilizado es una solución en agua destilada estéril de 5.5% (p:v) de glucosa, 12% (v:v) de yema de huevo de gallina y 10% (v:v) de dimetilsulfóxido (DMSO) como sustancia crioprotectora. La Tabla 1 muestra los porcentajes de fertilidad observados con este diluyente, utilizando DMSO o sustancias crioprotectoras alternativas, en las tres especies estudiadas en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos en Villavicencio.

Tabla 1. Composición de los diluyentes y porcentajes de fertilidad observados en tres especies ícticas de la Orinoquía Colombiana, utilizando semen crioconservado.

| Especie | Yema de huevo (%) | Glucosa (%) | Crioprotector (%) | | | Fertilidad (%) | Referencia |
|--|-------------------|-------------|-------------------|-----------------|----------------|----------------|---|
| | | | DMSO | MET | ETG | | |
| Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>) | 12 | 5.5 | 10 | -- | -- | 58.2±10.8 | Cruz-Casallas <i>et al.</i> , 2004 |
| | | | 15 | -- | -- | 18.9±6.4 | |
| | | | 10 | -- | -- | 54.0±3.0 | Velasco-Santamaría <i>et al.</i> , 2006 |
| Cachama blanca (<i>Piaractus brachipomus</i>) | 12 | 5.5 | 10 | -- | -- | 36.0±6.0 | Navarro <i>et al.</i> , 2004 |
| | | | -- | 10 ¹ | -- | 16.0±8.0 | |
| | | | -- | -- | 5 ¹ | 38.0±5.0 | |
| Bagre rayado (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>) | 20 | 5.5 | 7.5 | -- | -- | 35.0± 1.0 | Pinzón-Arciniegas <i>et al.</i> , 2005 |

* Este valor corresponde solamente a la movilidad espermática.

1 Diluyente a base de leche entera en polvo y agua destilada.

En el caso de los diluyentes que utilizan DMSO como crioprotector, primero se mezcla la glucosa con aproximadamente el 60% del agua destilada, previamente calentada a 37° C y luego se adiciona la cantidad total de DMSO. La yema de huevo debe incorporarse inmediatamente antes de la utilización del diluyente y cuando la reacción exotérmica del DMSO con el agua haya terminado. Finalmente, se adiciona la cantidad suficiente de agua destilada para completar el volumen de diluyente deseado. Es recomendable no almacenar diluyente, ya que se favorece la proliferación bacteriana.

4.2 Empacado y congelación

Semen y diluyente se mezclan a temperatura ambiente (28 ± 1° C) en proporciones que dependerán de la concentración y de la dosis inseminante establecida para la especie (1:4 - 1: 10, semen:diluyente). La Figura 2 ilustra el efecto del número de espermatozoides por ovocito, seminando con semen fresco (A) o crioconservado (B) en yamú.

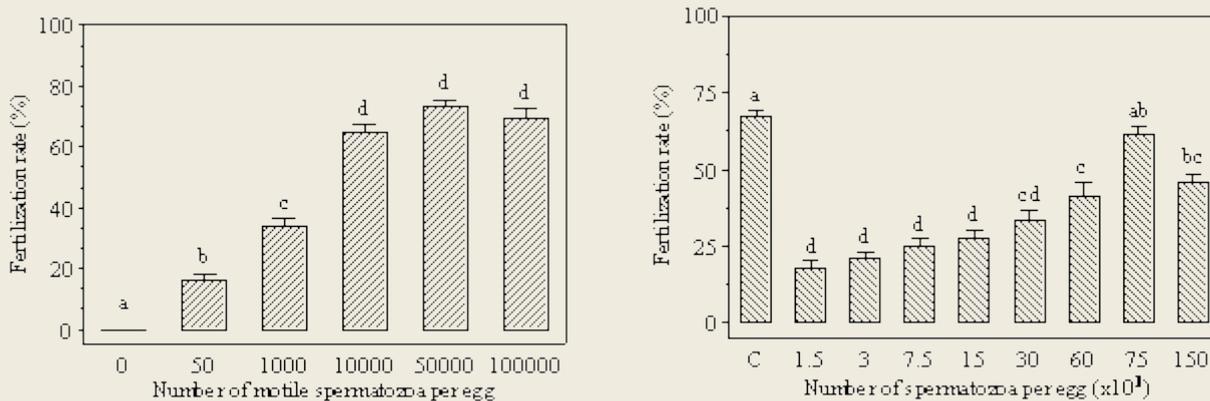


Figura 2. Efecto del número de espermatozoides por ovocito seminando con semen fresco (A) o criopreservado (B) en yamú (*B. amazonicus*).

Inmediatamente después se empaqueta en pajillas (0.5 mL o macrotubos de 4.0 mL (Minitub, Abfüll - und Labortechnik GmbH & Co., KG), las cuales deben sellarse en sus extremos con polivinilo y algodón o con esferas de acero inoxidable.

Para la congelación, las pajillas se colocan en posición vertical en un soporte construido con polímero de PVC y aluminio, diseñado según la longitud de las pajillas y la altura del termo de congelación. La Figura 2 ilustra el soporte utilizado en el Laboratorio del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos.

En el caso de semen de yamú y cachama blanca, una vez dispuestas las pajillas en el soporte, se introducen en un termo seco de vapores de nitrógeno líquido (Taylor-Wharton, CP 100, Theodore, AL, USA) durante 30 min, el cual permite una tasa de enfriamiento rápido (27.3° C/min desde 28 a -20° C, 29.9° C/min desde -20 a -100° C, 5.5° C.min⁻¹ desde -100 a -196° C). Alcanzada la temperatura de criopreservación de -196° C (30 min. después de la introducción de las pajillas en vapores de nitrógeno), las pajillas se trasladan rápidamente a un termo de almacenamiento (Taylor-Wharton HC 35, Theodore, AL, USA), sumergiéndolas directamente en el nitrógeno líquido, allí teóricamente pueden permanecer por tiempo indefinido.



Figura 2. Soporte de polímero de PVC y aluminio utilizado para la congelación seminal en yamú (*Brycon amazonicus*). Las pajillas son ubicadas de forma vertical. Nótese la sonda de la termocoupla insertada en una de las pajillas para evaluar el descenso de temperatura durante la congelación.

El volumen del sistema de empaque teóricamente podría influir sobre los porcentajes de movilidad y fertilidad posdescongelación de semen criopreservado, sin embargo, las diferencias observadas no son estadísticamente

significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Movilidad espermática y porcentaje de fertilidad de semen de yamú y cachama blanca empacado en diferentes volúmenes de empaque, usando como crioprotector DMSO.

| Empaque | <i>Brycon amazonicus</i> | | <i>Piaractus brachypomus</i> | |
|-------------|---|------------|------------------------------|------------|
| | Movilidad | Fertilidad | Movilidad | Fertilidad |
| 0.5 mL | 35 ± 2 | 54 ± 3 | 28.3 ± 4 | 79.5 ± 6 |
| 1.8 mL | 39 ± 2 | 48 ± 2 | -- | -- |
| 2.5 mL | 33 ± 2 | 51.2 ± 2 | 28.3 ± 2 | 82.1 ± 4 |
| 4.0 mL | 39 ± 3 | 52 ± 2 | -- | -- |
| 5.0 mL | -- | -- | 33.3 ± 2 | 87 ± 1 |
| Referencias | Velasco-Santamaría <i>et al.</i> , 2006 | | Ramírez <i>et al.</i> , 2005 | |

5.Descongelación del semen

Las pajillas congeladas y conservadas en nitrógeno líquido, deben ser descongeladas por inmersión directa en baño de agua a 35° C durante 90 seg. Para este propósito, un baño María o un recipiente artesanal, debe prepararse previamente con agua a dicha temperatura, con el objetivo de que el intervalo entre el retiro de la pajilla del nitrógeno líquido y la inmersión en el baño de descongelación, sea lo más corto posible (< 5 seg). Con el fin de determinar la temperatura de descongelación que ofrece mejores resultados en cuanto a movilidad, tiempo de activación y fertilidad, se han llevado a cabo en yamú (*B. amazonicus*) varios experimentos evaluando tres temperaturas de descongelación (35, 60 u 80° C). Las pajillas de 0,5 mL descongeladas a 60° C u 80° C han mostrado una caída drástica y altamente significativa de la movilidad espermática (p

Tabla 3. Movilidad y tiempo de activación espermática post-descongelación de semen de yamú (*Brycon amazonicus*) crioconservado en pajillas de 0,5, 1,8, 2,5 o 4,0 mL y descongelado a diferentes temperaturas. Los datos corresponden a la media ± EE.

| Volumen de la pajilla (mL) | Movilidad (n = 13) (%) | | | Tiempo de activación (n = 7) (seg) | | |
|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Temperatura de descongelación (° C) | | | Temperatura de descongelación (° C) | | |
| | 35 | 60 | 80 | 35 | 60 | 80 |
| 0,5 | 35,3±2,3 ^b | 13,7±4,6 ^c | 7,2±2,2 ^c | 57,0±4,8 ^{ab} | 47,8±1,7 ^{bc} | 38,6±6,1 ^c |
| 1,8 | 42,0±2,4 ^{ab} | 38,9±3,1 ^b | 36,8±2,8 ^b | 59,4±5,2 ^{ab} | 60,4±2,7 ^a | 55,0±1,5 ^{ab} |
| 2,5 | 37,5±1,5 ^b | 35,6±3,3 ^b | 40,0±1,0 ^b | 59,7±7,4 ^{ab} | 59,2±5,0 ^{ab} | 57,0±3,5 ^{ab} |
| 4,0 | 47,0±1,6 ^a | 40,2±2,8 ^b | 37,9±2,3 ^b | 60,2±2,4 ^{ab} | 59,8±4,3 ^{ab} | 55,8±3,2 ^{ab} |

a,b,c Dentro de cada variable, medias con sobrescritos distintos son significativamente diferentes (p<0,05).

Referencias bibliográficas

Arias CJ, Zaniboni-Filho E, Pardo-Carrasco SC, Atencio-García V, Vásquez-Torres W. Desarrollo gonadal y efectos de la domesticación y la restricción alimenticia de yamú *Brycon siebenthalae* en cautiverio. En: Memorias VIII Jornada de Acuicultura. Villavicencio, Meta, 2002; p. 55-63.

Babiak I, Glogowski J, Luczynski MJ, Luczynski M, Demianowicz W. 1999. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of Northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology* 52:473-479.

Bart AN, Wolfe D F, Dunham R A. 1998. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. *Transaction of American Fisheries Society* 127:819- 824.

Ciereszko A, Dabrowski K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109:367-373.

Ciereszko A. 1999. Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved Muskellunge spermatozoa. *Transaction of American Fisheries Society* 128:542-548.

- Cruz-Casallas PE, Lombo-Rodríguez DA, Velasco-Santamaría YM. 2005. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research* 36: 682-86.
- Cruz-Casallas PE, Pardo-Carrasco S, Arias-Castellanos JA, Lombo-Castellanos PE, Lombo-Rodríguez DA, Pardo-Mariño JE. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *Journal of the World Aquaculture Society* 35(4):529-535.
- Cruz-Casallas PE., Medina-Robles VM., Velasco-Santamaría YM. 2006. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* (En prensa).
- Dreanno C, Suquet M, Desbruyères E, Cosson J, Le Delliou H, Billard R. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 169: 247-62.
- Fabbrocini A, Lubrano-Lavadera S, Rispoli S, Sansone G. 1999. Cryopreservation of Seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40:46-53.
- Fogli da Silveira W, Kavamoto ET, Narahara MY. 1990. Avaliação espermática, preservação criogénica e fertilidade do sêmen do Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *Boletim Instituto do Pesca* 17:1-13.
- Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R. 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 144:265-274.
- Linhart O, Rodina M, Cosson J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41:241-250.
- Medina-Robles VM., Velasco-Santamaría YM., Cruz-Casallas PE. 2005a. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18(1): 34-48.
- Medina-Robles VM., Velasco-Santamaría YM., Cruz-Casallas PE. 2005b. Tasa de congelación-descongelación de semen de yamú (*Brycon amazonicus*) empacado en pajillas de diferentes volúmenes y su efecto sobre la calidad espermática postdescongelación. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18(4):331.
- Navarro OJ, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachyomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17 (Suplemento):53-59.
- Ohta H, Kawamura K, Unuma T, Takegoshi Y. 2001. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *Journal of Fish Biology* 58:670-681.
- Phronon J. 1994. Composition and cryopreservation of sperm from some Finnish teleost fish. *Finnish Fisheries Research* 15: 27-48.
- Pinzón-Arciniegas SM., Mojica-Rodríguez JE., Cruz-Casallas PE. 2006. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766). *Orinoquía* 9(2): 28-37.
- Ramírez MJA, Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles, VM, Cruz-Casallas PE. 2005. Crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachyomus* Cuvier, 1818): efectos del volumen de empaque y de la sustancia crioprotectora sobre la calidad seminal. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18(4):331.
- Richardson GF, Wilson CE, Crim LW, Yao XZ. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture* 174:89- 94.
- Steinberg H, Hedder A, Baulain R, Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws. *Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. University of Texas at Austin. 1995; 147p.
- Taddei AR, Barbato F, Abelli L, Canese S, Moretti F, Rana KJ, Fausto AM, Mazzini M. 2001. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefrozen, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology* 42(4): 244-255.
- Tiersch TR, Figiel ChR, Wayman WR, Williamson JH, Carmichael GJ, Gorman OT. 1998. Cryopreservation of sperm of the endangered Razorback sucker. *Transaction of American Fisheries Society* 127:95-104.
- Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles VM, Cruz-Casallas PE. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture* (En prensa).
- Viveiros ATM, Lock EJ, Woelders H, Komen J. 2001. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cryobiology* 43:276-287.
- Yao Z, Crim LW, Richardson GF, Emerson CJ. 2001. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture* 181:361-375.

Anexo 1. Resultados de experiencias de crioconservación de semen en algunos peces teleósteos (Modificado de Medina-Robles et al., 2005).

| Especie | ¹ Diluyente+ crioprotector ² Tasa de dilución | ¹ Osmolaridad ² pH ³ Sistema de envasado | ¹ Tiempo de equilibrio. ² Velocidad de enfriamiento | Condición de descongelación | Resultados | Referencia |
|---------------------------------------|--|--|--|--|--|---------------------------------------|
| <i>Piaractus brachyomus</i> | ¹ (A) 5.5% Glucosa + 7% Yema de huevo + 10% DMSO ¹ (B) 15% Leche entera + 5% ETG ² 1:4 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.5 mL | ¹ En hielo hasta 4 ^o C. ² ND | Baño de agua a 35° C, tiempo ND. | (A) 36±6% fertilidad (B) 38±5% fertilidad | Navarro et al., 2004 |
| <i>Brycon amazonicus</i> | ¹ 5.5% glucosa + 12% Yema de huevo + 10 % DMSO. ² 1:4 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.5 ml | ¹ < 5 min. ² Vapores de NL por 15 min. hasta -76° C y luego a NL | Baño de agua a 34° C por 30 seg. | 63.1% motilidad. 58.2% fertilidad | Cruz-Casallas et al., 2002 |
| <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> | ¹ 5.5% glucosa + 12% yema de huevo + 7.5% DMSO ² 1:4 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.5 ml | ¹ < 5 min. ² 9.6° C /min. hasta -120° C y luego a NL | Baño de agua a 35° C por 30 seg. | 35±1% movilidad | Pinzón- Arciniegas et al., 2006 |
| <i>Clarias gariepinus</i> | ¹ Ginzburg Fish Ringer + Metanol (2.47 M). ² 10% v/v | ¹ 244 mOsm/kg ² 7.6 ³ Pajillas de 1 ml | ¹ ND ² 5 min a -40° C -38° C a -2 a -5° C/min. y luego a NL | Baño de agua a 27 °C por 3 min. | >60% Edosión | Viveiros et al., 2001 |
| <i>Tunakia limbata</i> | ¹ 90% Suero fetal bovino (FBS) + Glucosa 300mM + 10 % Metanol ² 1:40 | ¹ ND ² ND ³ Tubos acrílicos 80 µl | ¹ 3-60 min. ² 9.2 ± 0.2° C/min. hasta -40° C y luego a NL | Baño de agua a 20° C por 10 seg | 30-40% Motili- dad (Hasta 30 seg activación) | Ohta et al., 2001 |

| Especie | ¹ Diluyente+ crioprotector ² Tasa de dilución | ¹ Osmolaridad ² pH ³ Sistema de envasado | ¹ Tiempo de equilibrio. ² Velocidad de enfriamiento | Condición de descongelación | Resultados | Referencia |
|------------------------------------|--|---|--|--|--|-------------------------|
| <i>Diplodus puntazzo</i> | ¹ 0.17 M Clorhidrato de Sodio + 15% DMSO (A). 0.1 M Citrato de Sodio + 10% DMSO (B). ² 1:10; 1:5 | ¹ 282 mOsm/L ² 7.5 ³ Pajillas de 0.5 ml | ¹ 15 min. ² 9° C/min. de 4° C a -80° C y luego a 360 °C/min. hasta NL. | Baños de agua a 28° C por 20 seg (580° C/min. hasta -2° C y 133° C/min. hasta 20° C) | >50% de motili- dad con menos daños morfoló- gicos para (B) | Taddei et al., 2001 |
| <i>Macrozoarces americanus</i> | ¹ Diluyente de semen de Ocean pout+ 20% DMSO ² 1:3 | ¹ 302 mOsm/kg ² 7.5 ³ Pajillas de 0.25 y 1.7 ml | ¹ NR ² Vapores de NL a 9 °C/min hasta - 95 °C, luego a NL | 30 °C por 7 seg | 50-70% motili- dad | Yao et al., 2000 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | ¹ Medio Kurokura + 10% DMSO ² 1:5 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 2 ml | ¹ 4° C por 2 a 4 h ² 4° C/min de 4 a - 9° C, 11° C/min de -1.1 a -80 °C, 6 min. a -80 °C y luego a NL | Baños de agua a 35° C por 110 seg | 56% Fertiliza- ción 52% Eclósión | Linhart et al., 2000 |
| <i>Esox masquinongy</i> | ¹ Diluyente Erdahl y Graham + 10% DMSO + 10% Yema de huevo ² 1:4 | ¹ ND ² ND ³ Pellets de 0.1 ml | ¹ NR ² Directamente en hielo seco (-79° C) por 3-5 min. y luego a NL | En Tris-HCL 30 mM a temperatura ambiente por 5 a 7 seg. | 46.2% de Edo- sión | Ciereszko, 1999 |
| <i>Esox lucius</i> | ¹ 0.6 M Sucrosa + 15% DMSO + 10% Lipoproteínas de baja densidad (LDL). ² 1:3 | ¹ ND ² ND ³ Pellets de 0.08 ml | ¹ Mantenido entre 0 a 2° C por 40 seg. ² Directamente a hielo seco (-79 °C) por 5 min. y luego a NL. | Rápida: en solución de des- congelación (120 mM NaCl + Dilu- yente de fertiliza- ción FD) a 30°C. | 69.8% de Edo- sión | Babiak et al., 1999 |

| Especie | ¹ Diluyente+ crioprotector ² Tasa de dilución | ¹ Osmolaridad ² pH ³ Sistema de envasado | ¹ Tiempo de equilibrio. ² Velocidad de enfriamiento | Condición de descongelación | Resultados | Referencia |
|---------------------------------|--|--|--|---|---|--------------------------------|
| <i>Sparus aurata</i> | ¹ 1% NaCl + 5% DMSO (A). 1% NaCl + 10% Etilen glicol (B). 1% NaCl + 10% Propilen glicol (C). ² 1:6 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.25 ml | ¹ 10 min. ² 10° C/min. de 0 a -150° C y luego a NL. | Baños de agua a 30° C (15° C/min.) | (A) >65% motilidad. (B y C) 50% motilidad. | Fabbroini et al., 1999 |
| <i>Pleuronectes ferrugineus</i> | ¹ 0.137...M NaCl, 0.011...M KCl, 0.004...M Na ₂ HPO ₄ + 10% Propilen glicol. ⁴ ND | ¹ 240 mOsm/kg 4.7 ³ Pajillas de 0.25 y 1.7ml | ¹ ND ² 11.5° C/min. de 5 a -15° C, 16.7° C/min. de -15 a -45° C, luego hasta -95° C y entonces a NL ³ 30 min. a 19° C. ² 91 ± 9° C/min. y luego a NL. | Baños de agua a 30° C por 7 seg. | 59.2% Fertilidad 52.5% Edosión | Richardson et al., 1999 |
| <i>Xyrauchen texanus</i> | ¹ C-F HBSS + 10% Metanol (A). C-F HBSS + 10% DMSO (B). ² 1:1 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.5 y 2.5 ml. | ¹ 30 min. a 19° C. ² 91 ± 9° C/min. y luego a NL. | Baños de agua entre 20 - 40° C por 7-9 seg. | 18 ± 4 % de motilidad (A). 9 ± 4 % de motilidad (B). | Tiersch et al., 1998 |
| <i>Ictalurus furcatus</i> | ¹ HBSS + 15% leche en polvo + 15% Metanol (A). HBSS + 15% leche en polvo + 10% DMSO (B). ² 1:3; 1:24 | ¹ ND 4.2 ³ Pajilla de 0.5 y 1 ml. | ¹ 3 min. ² Vapores de NL a 6...cm sobre la fase líquida por 6 min. hasta -66° C y luego a NL. | A temperatura ambiente de 25° C (a una tasa de 390° C/min.) | 0 % fertilidad (A). 32% fertilidad (B) | Bart et al., 1998 |
| <i>Thymallus thymallus</i> | ¹ 103...mM NaCl, 40...mM KCl, 1...mM CaCl ₂ , 0.8...mM MgSO ₄ , 20...mM Hepes + 1.5 % Albumina sérica Bovina + 7% Yema de huevo + 0.5% Sucrosa + 10% Metanol. ² 1:3 | ¹ ND 7.8 ³ Pajillas de 0.5 ml. | ¹ ND ² Vapores de NL a 1.5...cm de la fase líquida (-110 ± 2° C) por 5 min. y luego a NL. | Baños de agua a 25° C por 30 seg. | 95.3% Fertilización. | Lahnsteiner et al., 1996 |
| Especie | ¹ Diluyente+ crioprotector ² Tasa de dilución | ¹ Osmolaridad ² pH ³ Sistema de envasado | ¹ Tiempo de equilibrio. ² Velocidad de enfriamiento | Condición de descongelación | Resultados | Referencia |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | ¹ Solución de sucrosa 0.6 M + 10% DMSO (A). Solución de sucrosa 0.6 M + 20% DMSO (B). ² 1.5:2.5 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 5 ml. | ¹ ND ² Vapores de NL a -180° C y luego a NL. | Baños de agua a 25° C por 35 seg. | 81% fertilidad (A). 83.8 % fertilidad (B). | Steinberg et al., 1995 |
| <i>Acipenser fulvescens</i> | ¹ Sucrosa 0.6...M + 10% DMSO. ² 1:3 | ¹ Hipertónica con respecto al plasma seminal. ² ND ⁴ Pellets 0.1 ml | ¹ 1 min. ² Directamente a NL dentro de viales plásticos. | ND | 19.2 % de motilidad. | Cierieszko y Dabrowski, 1993 |
| <i>Piaractus mesopotamicus</i> | ¹ Diluyente Stein y Bayrle + 10% DMSO ² 1:3 | ¹ ND ² ND ³ Pajillas de 0.5 ml | ¹ ND ² 2-5° C por medio de agua con cubos de hielo; 30° C/min. de 5 a -80° C y luego NL | Agua a 70-80° C por 3-4 seg. | 21% fertilidad | Fogli da Silveira et al., 1990 |

ND= No determinado NR= No realizado NL= Nitrógeno líquido

- Medio Kurokura= 1284 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 2.4 mM NaHCO₃.
- Diluyente Ocean Pout semen = 183 mM NaCl, 10.25 mM KHCO₃, 1.45 CaCl₂, 0.84 mM MgSO₄, 0.15 mM Glucosa.
- Solución salina de inhibición de motilidad espermática buferada (BSMIS)= 75 mmol/L NaCl, 70 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgSO₄, 20 mmol/L Tris.
- Diluyente Erdah y Graham= 0.29 g CaCl₂, 0.4 g MgCl₂, 0.5g Na₂HPO₄, 5.1 g KCl, 11.7 g NaCl, 0.2 g Acido cítrico, 20 g Glucosa, 20 ml de 1.27 g 100 ml⁻¹ KOH, 20 ml de 5.3 g 100 ml⁻¹ bicina, suplementada a 2 L de agua destilada.
- Diluyente Ginzburg fish Ringer= 123.2 mM NaCl, 3.75 mM KCl, 3.0 mM CaCl₂, 2.65 mMNaHCO₃.
- Diluyente de fertilización FD= 0.9% NaCl, 1 mM Ca, buferado a pH 9.0 con 20 mM Tris + 30 mM glicina.
- Solución salina balanceada Hanks HBSS= 8 g/l NaCl, 0.40 g/l KCl, 0.14 g/l CaCl₂, 0.20 g/l MgSO₄, 0.06 g/l Na₂HPO₄, 0.03 g/l

KH_2PO_4 , 0.17 g/l NaHCO_3 , 1.0 g/l Glucosa.

- Solución salina balanceada Hanks libre de calcio CF-HBSS= 8 g/l NaCl, 0.40 g/l KCl, 0.20 g/l MgSO_4 , 0.06 g/l Na_2HPO_4 , 0.03 g/l KH_2PO_4 , 0.17 g/l NaHCO_3 , 1.0 g/l Glucosa.
 - Diluyente Stein y Bayle= 750 mg NaCl, 200 mg NaHCO_3 , 38 mg KCl, 100 mg Glucosa, 20 ml Yema de huevo, 100 m.
-