

## Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*)

Adriana Fresneda<sup>1</sup>, Biol Mar, Ms; Gustavo Lenis<sup>2</sup>; Biol Esp.; Eucario Agudelo<sup>2</sup>, Zoot.; Martha Olivera Ángel<sup>1,2</sup>, MV, Dr. Sci. Agr.  
<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, <sup>1</sup>Fisiología y Biotecnología de la Reproducción, Grupo de Reproducción. Universidad de Antioquia,  
 AA 1226, Medellín, Colombia  
 molivera@catios.udea.edu.co

(Recibido: 14 julio, 2003; aceptado: 19 enero, 2004)

### Resumen

La Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*), carácido originario de las cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas fue introducida en la cuenca del Magdalena Medio. Especie rústica de rápido crecimiento, carne de gran aceptación y excelentes condiciones para la piscicultura. No se reproduce en cautiverio, siendo necesaria la administración exógena de hormonas para inducir la ovulación y la espermiación. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del tratamiento hormonal sobre el espermograma de reproductores de cachama blanca y determinar el porcentaje de fertilización y eclosión de huevos utilizando semen crioconservado. Se evaluaron 26 reproductores provenientes de la estación piscícola de San José del Nus de la Universidad de Antioquia. A doce machos se les indujo la espermiación mediante la administración IM de 2.5 mg/kg de extracto de hipófisis de carpa, y 14 sirvieron como control. Posterior a la evaluación seminal se diluyó en DMSO o en Metanol y se congeló. Una pajilla de semen (80% de viabilidad) de cada uno de los grupos, se descongeló a temperatura ambiente (28°C) se activó con 3 ml de bicarbonato de sodio 3 M y se depositó sobre 1 gr de huevos. La fertilidad fue evaluada a las seis horas, determinando la proporción entre huevos en estado de botón y huevos degenerados (blancos). El semen fresco de los dos tratamientos difiere en el volumen del eyaculado (mayor en los animales inducidos) y en el pH que disminuye ligeramente en los animales inducidos. Los valores de motilidad y tiempo de activación entre los dos crioprotectores fue similar con cualquiera de los dos crioprotectores. El porcentaje de fertilización y eclosión de larvas fue diferente dependiendo de la hembra utilizada. Las diferencias entre los porcentajes de fertilización comparando los dos crioprotectores o los machos inducidos o no inducidos no fue estadísticamente significativa. Se concluye que la cripreservación de semen es una forma fácil de mantenerlo para inseminar poblaciones de cachama.

**Palabras clave:** activación, cuadro espermático, diluyente, fertilización, motilidad

### Introducción

La Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*), es un carácido originario de las cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas e introducida en la cuenca del Magdalena Medio. Es una especie rústica de rápido crecimiento, carne de gran aceptación en el mercado y excelentes condiciones para la piscicultura.

Se han realizado investigaciones tendientes a conocer su biología, Arias (1); anatomía, Herrera *et*

*al* (27), y Pardo *et al* (38); hematología básica, Eslava *et al* (16); sanidad, Bejarano y Ramírez (3), Corredor *et al* (12), Bobadilla y Verjan (5); hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales Pardo y Suárez (39) y manipulación de sus ciclos reproductivos bajo condiciones de cautiverio, Arias *et al* (2), Muñoz *et al* (34,35), Vásquez y Gómez (42,43). La disminución en la diversidad genética observada actualmente en los planteles de reproductores de las granjas dedicadas a

la producción de alevinos, obliga a convalidar o desarrollar tecnologías que permitan el intercambio de material seminal entre los productores o el aprovechamiento de gametos que puedan obtenerse de individuos silvestres. Una alternativa para este propósito la constituye la crioconservación del semen, previa evaluación de su potencial reproductivo.

La caracterización seminal permite identificar parámetros de normalidad, con el fin de seleccionar padrotes e identificar posibles donantes para el banco de germoplasma. Las investigaciones relacionadas con el tema se han orientado al estudio de peces pertenecientes a la familia de los salmónidos dentro de los que se destacan los trabajos de Gwo *et al* (24), Maisse (33), Ciereszko (11), Lahnsteiner *et al* (30), Labbe *et al* (29), Ogier de Baulny *et al* (37), Drokin *et al* (15), Gwo *et al* (25), Tan-Fermin *et al* (44), Glogowski *et al* (21); Harvey y Kelley (26) y a la familia de los ciprinidos: Calvi *et al* (8,9), Lubzens *et al* (31,32), Kang *et al* (28).

Algunas especies tropicales han sido caracterizadas. Flogli Da Silveira *et al* (17, 18, 19), estudiaron la *Rhamdia hilarii*, *Colossoma mitreri* y la *Prochilodus scrofa*. En Colombia Bernal y Uribe (4) caracterizaron la *Prochilodus reticulatus*, Cruz *et al.* (Sin publicar) la *Brycon siebenthalae*, varios grupos de investigación caracterizaron la *Piaractus brachyomus* (7, 13, 22, 36) y también se encontraron reportes sobre la *Pseudoplatystoma fasciatum* (6, 23).

La Cachama Blanca es una especie que no se reproduce espontáneamente en cautiverio, siendo necesaria la administración exógena de hormonas para inducir la maduración final, la ovulación y el desove o en el macho la espermiación; la inseminación puede realizarse de forma seminatural, permitiendo que el macho fertilice los huevos directamente, o efectuando la inseminación en seco, previa obtención de los gametos mediante estrujamiento de los parentales. La incubación de los huevos fertilizados se lleva a cabo en incubadoras de flujo ascendente, siendo posible obtener larvas y posteriormente alevinos durante casi todo el año.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del tratamiento hormonal sobre el espermograma de reproductores de Cachama Blanca

y determinar el porcentaje de fertilización y eclosión de huevos utilizando semen crioconservado.

## Materiales y métodos

Se evaluaron 26 reproductores provenientes de la estación piscícola de San José del Nus de la Universidad de Antioquia, durante los meses de julio y agosto (época lluviosa). A doce machos de 4-5 años de edad, 1.5-2 kg y 35-40 cm de longitud, se les indujo la espermiación mediante la administración IM de 2.5 mg/kg de extracto de hipófisis de carpa, y 14 sirvieron como control. El semen fue recolectado mediante masaje cráneo-caudal del abdomen del pez 8 horas después de administrada la hormona. El semen se recolectó con ayuda de una jeringa estéril para evitar su contaminación por heces (22). Se evaluaron las características fisicoquímicas y microscópicas del semen: color, observación directa usando la escala de Bernal y Uribe (4), pH, papel indicador de pH (escala 5-10), aspecto, observación directa, motilidad (posterior a la activación), vitalidad, tinción Nigrosina-Eosina para espermograma (10), concentración espermática, conteo de células cámara de Neubauer.

Posterior a la evaluación, el semen se diluyó en uno de los siguientes medios de criopreservación:

### Diluyente I

DMSO 5%, 5.4 g de glucosa, 0.8 g de NaCl, 5 ml de DMSO, 15 ml de yema de huevo. Se lleva a 100 ml de agua destilada. Grado de Dilución 1: 7 (semen: diluyente)

### Diluyente II

Metanol 8%, se diluyen 8 ml de metanol en 100 ml de agua destilada. Aparte se diluye 15 gr leche en polvo entera en 100 ml de agua destilada. Se mezclan en partes iguales. Grado de Dilución 1: 10 (semen: diluyente)

Un pool de semen de los reproductores inducidos hormonalmente y uno de los animales sin inducción se diluyó en los dos crioprotectores, se empacó en pajillas plásticas de 0.5 ml y se vitrificó colocándolo directamente en nitrógeno líquido, donde se conservó hasta su utilización.

Para las pruebas de fertilidad los huevos fueron obtenidos de hembras inducidas hormonalmente

mediante la aplicación de dos dosis de EPC: 0.5 mg/kg y 4.5 mg/kg, con un intervalo de 12 horas, según el procedimiento descrito por Cortés (13). El desove tuvo lugar a las 240 horas grado (aproximadamente 8 a 10 horas) después de la administración de la segunda dosis. Posterior a la última inyección, se extrajo la hembra del estanque y se realizó un masaje ventral cráneo caudal con el fin de extraer los huevos, los cuales se depositaron en una bandeja plástica. Una pajilla de semen (80% de viabilidad) proveniente de cada uno de los grupos (con inducción, sin inducción, con diluyente I y con diluyente II) se descongeló a una temperatura ambiente de 28°C, se activó con 3 ml de bicarbonato de sodio 3 M y se depositó sobre 1 gr. de huevos (~1000 huevos/g). Se mezclaron con una pluma, se lavaron con agua de la pileta para eliminar el exceso de crioprotector, e inmediatamente se colocaron en incubadoras de 1litro, con agua corriente a 25°C de temperatura. La fertilidad fue evaluada a las seis horas postinseminación a partir de una muestra de aproximadamente 150 huevos, determinando la proporción entre huevos en estado

de botón y huevos degenerados (blancos); 18 horas después se contó el porcentaje de larvas eclosionadas.

#### *Análisis estadístico*

Los datos fueron reportados en media  $\pm$  error estándar. Los valores de porcentajes se transformaron en arcoseno antes de su análisis estadístico. Para la comparación de las características del semen entre animales inducidos y los sin inducir, se aplicó una prueba de t-student, donde un valor de  $p < 0.05$  fue considerado suficiente para indicar diferencias estadísticamente significativas.

#### **Resultados**

En la tabla 1 se presentan las características del cuadro espermático en animales inducidos y no inducidos. Con excepción del volumen del eyaculado y el pH, ninguna de las otras características seminales fue significativamente diferente, es relevante el aumento de volumen pues aumenta tres veces cuando los machos son inducidos.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas y microscópicas del semen de *Piaractus brachypomus* sometidos o no a inducción hormonal.

| ITEM  | Animales inducidos (12) | Animales sin inducir (14) |
|---|-------------------------|---------------------------|
| Color                                       | Blanco                  | Blanco                    |
| Aspecto                                     | Lechoso                 | Cre moso                  |
| Volumen (ml)                                | 0.83 $\pm$ 0.4a         | 0.27 $\pm$ 0.2b           |
| pH  | 8.83 $\pm$ 0.2a         | 8.6 $\pm$ 0.2b            |
| Movilidad (%)                               | 91.2 $\pm$ 4.3a         | 92.5 $\pm$ 2.6a           |
| Tiempo de activación (s)                    | 100.6 $\pm$ 92.6a       | 72.64 $\pm$ 49.2a         |
| Viabilidad (%)                              | 86 $\pm$ 6a             | 93 $\pm$ 3.2a             |
| Concentración (sptz x 10 <sup>10</sup> /ml) | 3 $\pm$ 0.6a            | 3 $\pm$ 1.1a              |

a, b entre columnas, letras distintas presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )

La motilidad del espermatozoide, medida en porcentaje de espermatozoides móviles y el tiempo que dura la activación, una vez usado cualesquiera de los crioprotectores, fue similar (véase Tabla 2).

La inseminación de los huevos de tres hembras diferentes a partir de semen congelado con uno de los dos crioprotectores, produjo tasas de fertilización

diferentes dependiendo de la hembra y de si el macho había sido inducido o no hormonalmente (véase Tabla 3). El porcentaje de fertilización cuando se usa metanol, es mayor cuando el semen proviene de machos inducidos. Cuando el semen fue congelado con DMSO los porcentajes de fertilización son mejores con machos inducidos en la hembra 2 y 3, y con semen proveniente de machos sin inducir cuando se usa la hembra 1.

**Tabla 2.** Movilidad postdescongelación de espermatozoides de *Piaractus brachyomus*.

| Crioprotector | Animales sin Inducción |              | Animales Inducidos |              |
|---------------|------------------------|--------------|--------------------|--------------|
|               | Movilidad (%)          | Tiempo (s)   | Movilidad (%)      | Tiempo (s)   |
| Metanol       | 77.9 ± 6.6             | 165.3 ± 35.4 | 78.2 ± 6.4         | 151.9 ± 26.4 |
| DMSO          | 80.0 ± 9.0             | 153.2 ± 22.1 | 80.3 ± 7.7         | 158.3 ± 34.5 |

**Tabla 3.** Porcentaje de fertilización y eclosión de larvas posterior a la inseminación con semen criopreservado

| Crioprotector | Hembra | Porcentaje de fertilización |               | Porcentaje de Eclosión |               |
|---------------|--------|-----------------------------|---------------|------------------------|---------------|
|               |        | Sin inducción               | Con inducción | Sin inducción          | Con inducción |
| Metanol       | 1      | 5                           | 20            | 5                      | 20            |
|               | 2      | 17                          | 70.7          | 17                     | 70.7          |
|               | 3      | 40                          | 55            | 40                     | 55            |
| DMSO          | 1      | 30.6                        | 3.6           | 30.6                   | 3.6           |
|               | 2      | 35.4                        | 68            | 35.4                   | 68            |
|               | 3      | 37.5                        | 45            | 37                     | 45            |

Los mejores porcentajes de fertilización con semen congelado en metanol como en DMSO se obtuvieron con machos inducidos y fertilizando la hembra 2.

Al realizarse una sola repetición del experimento, solamente se puede hablar de tendencias y no se puede asegurar estadísticamente el resultado.

### Discusión

Como se demuestra en los resultados, la inducción hormonal de los machos produce un mayor volumen de semen, no influye sobre la calidad del mismo, ni en fresco, ni posterior a la descongelación. Los resultados reportados en esta investigación con respecto al volumen seminal, se encuentran dentro de los rangos (véase tabla 4), en cambio el pH está por debajo, los valores reportados son más neutros, los hallados en este experimento son más alcalinos, muy posiblemente debido a la calidad del agua como lo reporta Bernal (4), quien dice que el pH del agua afecta el pH del semen. El porcentaje de motilidad y el tiempo de activación es un poco mayor en nuestro reporte, pero aparentemente no es el parámetro predictor de la efectividad de la fertilización, ya que como se demuestra en los resultados hay una variabilidad dependiendo de la hembra.

En la piscicultura, el uso de biotecnologías reproductivas (inducción hormonal criopreservación,

inseminación en seco) se constituye en una gran ayuda para la preservación de recursos genéticos, para la producción a gran escala, y el intercambio de material genético con fines de mejoramiento.

Durante los periodos en que los machos producen semen de buena calidad, se pueden inducir hormonalmente los reproductores, coleccionar y congelar el material seminal. Los métodos son sencillos y aseguran mantener en un banco suficiente material biológico.

Este estudio muestra como el semen de los machos inducidos puede ser congelado en cualquiera de los dos diluyentes y que si comparamos estos resultados con lo reportado por la literatura (véase Tabla 5) se puede decir que los resultados obtenidos son mejores que los obtenidos en otros experimentos con cachama y similares a los obtenidos en trucha y pacú, pero se encuentran por debajo del curimatá.

No fue motivo de este trabajo analizar la fertilidad por parte de las hembras, sin embargo al analizar los resultados se ve una clara influencia de la hembra sobre los porcentajes de fertilización. Se propone marcar los reproductores y hacer un seguimiento tanto de la calidad del semen, como de la fertilidad de los huevos para hacer selección.

**Tabla 4.** Características seminales reportadas en la literatura de diferentes *Piaractus*.

| Especie                        | Volumen (ml)        | pH                 | Motilidad (%)       | Duración (seg)    | Concentración (mg/mL)   | Referencias                    |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <i>Piaractus mesopotamicus</i> | 3.3                 |                    | 72                  |                   | 55.09 x 10 <sup>6</sup> | Flogli da Silveira et al (19). |
| Pacú                           | 5.02                |                    | 90                  |                   | 28.07 x 10 <sup>6</sup> | Flogli da Silveira et al (20). |
|                                | 2.09 <sup>(2)</sup> |                    |                     |                   |                         | Cortés, (13).                  |
|                                | 2.22 <sup>(1)</sup> |                    |                     | 267.5             | 6.9 x 10 <sup>10</sup>  | Caleño, (7).                   |
| <i>Piaractus brachipomus</i>   | 1.27 <sup>(2)</sup> |                    |                     |                   |                         |                                |
| Cachama Blanca                 | 0.38 <sup>(1)</sup> | 7.1 <sup>(1)</sup> | 61.8                | 53 <sup>(1)</sup> | 4.6 x 10 <sup>10</sup>  | González et al (22).           |
|                                | 6.68 <sup>(2)</sup> | 7.4 <sup>(2)</sup> |                     | 90 <sup>(2)</sup> | 4.4 x 10 <sup>10</sup>  |                                |
|                                | 0.8 <sup>(1)</sup>  | 7.3 <sup>(1)</sup> | 86.1 <sup>(1)</sup> | 60 <sup>(1)</sup> |                         | González y Fresneda (23).      |
|                                | 1 <sup>(2)</sup>    | 7.6 <sup>(2)</sup> | 92.1 <sup>(2)</sup> | 50 <sup>(2)</sup> |                         |                                |

<sup>(1)</sup> Animales con tratamiento hormonal

<sup>(2)</sup> Animales sin tratamiento hormonal

**Tabla 5.** Porcentaje de fertilización con semen criopreservado reportados en la literatura.

| Especie  | Fertilización       | Autor                                      |
|--|---------------------|--|
| <i>Onchorhynchus mykiss</i> , Trucha Arco Iris | 70 - 84.8           | Stoss y Holtz (40, 41).                    |
| <i>Piaractus mesopotamicus</i> , Pacú          | 24.5 - 28.2         | Coser y Godinno (14).                      |
| <i>Prochilodus scrofa</i> , Curimatá           | 78.01 - 92.68       | Brand,O (6).                               |
| <i>Piaractus brachipomus</i> , Cachama blanca  | 13 - 60<br>5 - 15.5 | Caleño,O (7).<br>Gonzalez y Fresneda (23). |

### Summary

#### Induced spermiation and semen cryopreservation in White Cachama (*Piaractus brachypomus*).

*White Cachama (Piaractus brachypomus)* is a caracid fish originating in the Orinoco and Amazon basin and also introduced into the mid Magdalena basin.

This species is rustic and very precocious, its meat is very well accepted, therefore this fish has excellent conditions for aquaculture programs. One difficulty with cachama is that it does not reproduce spontaneously in captivity and ovulation and spermiation need to be hormonally induced. The objective of this work was to evaluate the effect of hormonal treatment on the spermiogram and quantify the rate of fertilization and hatching using cryopreserved semen. Twenty six males were used, belonging to the fish station of San José del Nus (Universidad de Antioquia). Twelve were induced with IM administration of hypophysis carp extract (2.5 mg/kg) and 14 were used as controls. Semen was diluted with dimethyl sulfoxide (DMSO) or with methanol and freezed. One straw of frozen semen for each group was thawed at room temperature. The viability was 80%. Activation of semen was stimulated with 3 M sodium bicarbonate; the semen from one straw was deposited over 1 gr of eggs. Fertility was evaluated 6 hr. after insemination by determining the proportion of bottom eggs vs degenerated white eggs. Results: All semen parameters tested before freezing were identical, except the volume which was higher in the induced specimens. Also, after freezing, motility and lapse of activation were similar for both types of cryoprotectants. The only difference was found to be based on the female, but the male or the treatment yielded no significant differences.

**Key words:** sperm activation, fertilization, female, glicerol, DMSO

## Referencias

1. Arias CJA. Apuntes sobre la biosistemática de la Cachama Blanca *Piaractus brachypomus*. Memorias XXI Congreso Latinoamericano de Zoología 1990:43.
2. Arias CJA, Vásquez W, Orrego J, Isaza M. Avances en la Reproducción inducida de *Piaractus brachypomus*, cachama blanca. Boletín Red de Acuicultura 1989;3,1:9-10.
3. 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 pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, 1992.
4. Bernal W, Uribe M. Caracterización del semen de bocachico (*Prochilodus reticulatus* Steindachner, 1878) y evaluación de la motilidad después de la conservación en frío. Tesis, Facultad Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, 1993. 131p.
5. Bobadilla N, Verjan N. Estudios electroforéticos e inmuno-electroforéticos de las proteínas plasmáticas de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) clínicamente sanas, procedentes de cultivos comerciales. Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, 1998.
6. Brand O. Caracterización y preservación del semen del Bagre Rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766). Tesis Facultad Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, 1996. 131p.
7. Caleño O. Pruebas de fertilidad con semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*, Cuvier, 1818) criopreservado mediante dos extendidos diferentes. Tesis Facultad Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, 1995. 131p.
8. Calvi S, Zoccarato I, Gasco L, Andrione A. Motility of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio* L.) milt: effects of diluent, Cryopreservation and thawing procedures. Riv Ital Acquacolt 1993; 28, 4: 187-95.
9. Calvi S, Zoccarato I, Gasco L, Andrione A. Effect of trehalose and/or albumina addition and methanol concentration on motility of cryopreserved semen (*Cyprinus carpio* L.). Riv Ital Acquacolt 1994; 29, 2: 45-51.
10. Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad, CECOLFES. Espermograma. Laboratorio de Andrología. Bogotá, 1988; 13 p.
11. Ciereszko A, Dabrowski K. Effect of a sucrose-DMSO extender supplemented with pentoxifylline or blood plasma on fertilizing ability of cryopreservation rainbow trout spermatozoa. The Progressive Fish-Culturist 1996; 58:143-45.
12. 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.
13. Cortés G. Caracterización del semen de Cachama «*Piaractus brachypomus*» (Cuvier, 1818). Pices-Characidae. Tesis de pregrado, Facultad de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 1991. 131p.
14. Coser A, Godinho H. Capacidade de fertilizacao de ovocitos e semen de curimata pacu (*Prochylodus marggravii*) em condicoes experimentais. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia, 39ª Brasília, DF, 1987: 884p.
15. Drokin, S., H. Stein y H. Bartscherer. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta*). Cryobiology 1998; 37:263-70.
16. 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*). Revista ACOVEZ 1995; 20,4.
17. Flogli Da Silveira W, Kavamoto ET, MA, Narahara M. Avaliacao qualiquantitativa e criopreservación - preservacao em forma de «pellets» do semen do bagre (*Rhamdia hilarii*). Resumo 33 reuniao anual do sociedade brasileira para o progresso da ciencia. Salvador, Bahía, Brasil, 8-15 de Julio 1981: 620.
18. Flogli Da Silveira W, Kavamoto ET, MA, Narahara M. Avaliacao da qualidade e criopreservación - preservacao em forma de «pellets» do semen do bagre (*Rhamdia hilarii*). (Valenciennes, 1840). B Inst. Pesca 1985;12,4: 7-11.
19. Flogli Da Silveira W, Kavamoto ET, Cestarolli MA. Qualiquantitativa e preservacao criogenica do semen do pacú *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), provenientes de reproducao induzida. Anais do XV Congreso Brasileiro de Zoología 1988; Curitiba, Paraná, Brasil: 283.
20. Flogli Da Silveira W, Kavamoto ET, Cestarolli MA, Godinho H, Ramos S, Salveira . Avaliacao spermatica, preservacao criogenica e fertilidade do semen do Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), proveniente de reproducao induzida. B. Inst. Pesca 1990; 17: 1-13.
21. Glogowski J, Kwasnik M, Piros P, Dabrowski K, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H y Ciereszko A. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter : semen parameters and cryopreservation success. Aquaculture Research 2000; 31:289-96.
22. González OE, Díaz J, Lara R. Criopreservación de semen en algunas especies de peces tropicales de importancia económica y comercial de la orinoquia colombiana (*Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*), Fase 1, Proyecto del CIC UJTL- INPA 1998.
23. González OE, Fresneda A. Criopreservación de semen en algunas especies de peces tropicales de importancia económica y comercial de la orinoquia colombiana (*Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*) Fase 2, Proyecto del CIC UJTL INPA 2000.
24. Gwo JC, Kurokura H, Hirano R. Cryopreservation of spermatozoa from Rainbow trout, common carp and marine Puffer nippon suisan Gakkaiishi. Bull Jap Soc Sci Fish 1993; 59,5: 77-782.
25. Gwo JC, Ohta H, Okuzawa K, Wu HC. Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). Theriogenology 1999; 51:569-82.

26. Harvey B, Kelley RN. Practical methods for chilled and frozen storage of tilapia spermatozoa. The second international symposium on Tilapia in Aquaculture. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila 1988:187-9.
27. Herrera DC, Eslava PR, Iregui CA. Aspectos de anatomía macro y microscópica del bazo de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Revista ACOVEZ 1996; 21, 1: 16-21.
28. Kang JH, Yoshizaki G, Homma O, Strussman CA, Takashima F. Effect of an osmotic differential on the efficiency of gene transfer by electroporation of fish spermatozoa. Aquaculture 1999; 173: 297-307.
29. Labbe C, Crowe LM y Crowe JH. Stability of the lipid component of Trout sperm plasma membrane during freeze-thawing. Cryobiology 1997; 34:176-82.
30. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA. Physiological and biochemical determination of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation. Journal of applied. Aquaculture 1996; 6, 4:47-73.
31. Lubzens E, Rothbard S, Hadani A. Cryopreservation and viability of spermatozoa from the ornamental japanese carp (Nishikigoi). The Israeli Journal of Aquaculture 1993; 45, 4: 169-74.
32. Lubzens E, Daube N, Pekarsky I, Magnus Y, Cohen A, Yusefovich F, Feigin P. Carp (*Cyprinus carpio L.*) spermatozoa cryobanks - strategies in research and application. Aquaculture 1997; 155: 13-30.
33. Maisse G. Comparison of different carbohydrates for the cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. Aquatic Living Resources 1994; 7:217-9
34. Muñoz D, Vásquez W, Cruz PE. Reproducción inducida de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomun*) con mGnRH-A. Boletín Red de Acuicultura 1991; 5, 3: 3-6.
35. Muñoz D, Vásquez W, Cruz PE. Inducción de la ovulación y el desove de la cachama blanca *Piaractus brachypomus*, con buserelina LH-RH análogo. III Reunión Red Nacional de Acuicultura. Cali, Valle, Colombia, Noviembre 1-3 1989.
36. Neira J. Caracterización y Congelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica de los Llanos, Villavicencio, 1991. 110p.
37. Ogier de Baulny B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maisse G. Flow cytometric evaluation of mitochondria activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Cryobiology 1997; 34: 141-9.
38. Pardo CSC, Atencio GVJ, Arias CJA. Contribución al conocimiento del aparato circulatorio de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Dalhia 1998; 3: 15-9.
39. Pardo S, Suárez MH. Evaluación de tres niveles de administración de alimento en el período de ceba de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, 1991.
40. Stoss J, Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution sperm, sperm density and interval between thawing and insemination. Aquaculture 1981; 22: 97-104.
41. Stoss J, Holtz W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluents, sperm from deferent males and interval between sperm collection and freezing. Aquaculture 1983; 31:275-82.
42. Vásquez W, Gomes SZ. Histomorfología de ovocitos durante el proceso de maduración gonadal en la Cachama Blanca, *Piaractus brachypomus* (CUVIER 1818). Revista. ACOVEZ 1996<sup>a</sup>; 21, 3: 18-24.
43. Vásquez W, Gomes SZ. Efecto de los niveles de proteína y energía de la dieta sobre el desarrollo del ovario en la cachama blanca *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1818). Revista ACOVEZ 1996<sup>b</sup>; 21, 4: 10-6
44. Tan-Fermin JD, Miura T, Adachi S, Yamauchi K. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). Aquaculture. 1999; 171: 323-38.