



Orinoquia

ISSN: 0121-3709

orinoquia@hotmail.com

Universidad de Los Llanos

Colombia

Ramirez-Merlano, Juan A.; Medina Robles, Victor M.; Cruz-Casallas P.E., Pablo E.

Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes

Orinoquia, vol. 14, núm. 1, junio, 2010, pp. 59-71

Universidad de Los Llanos

Meta, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89615714007>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes

Fish cryopreservation spermatozoa, an approach Siluriformes

Juan A. Ramirez-Merlano¹; Victor M. Medina Robles²;
Pablo E. Cruz-Casallas P.E.³

¹Profesional en Acuicultura, MSc

² Médico Veterinario Zootecnista, MSc, Profesor Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos

³ Médico Veterinario Zootecnista, MSc, PhD, Profesor Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos

Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismo Acuáticos - GRITOX. Instituto de Acuicultura de los Llanos - IALL. Universidad de los Llanos, A.A 110. Villavicencio, Colombia,
juanantonioramirez.merlano@gmail.com

Recibido: Agosto 11 de 2009. Aceptado: Junio 17 de 2010

RESUMEN

Esta revisión recopila información concerniente a la crioconservación de semen de peces, tomando como base las experiencias realizadas en diferentes especies de bagres. Los siluriformes incluyen géneros con un alto potencial en la acuicultura continental, sin embargo, las investigaciones en este campo son escasas. La introducción de esta metodología en la industria piscícola ha generado beneficios en pro de mejorar la población y la diversificación de especies con destino a una producción comercial. La crioconservación involucra ciertos parámetros en busca de una eficiencia en los protocolos y en procura de disminuir los daños causados por el estrés mecánico y los cambios extremos de temperatura, los cuales inducen una disminución de la población espermática. Los diferentes protocolos de congelación difieren ampliamente en la respuesta postdescongelación en factores como movilidad, estructura y funcionalidad de la célula espermática, características que pueden generar una respuesta adversa en la fertilización de los oocitos, y las cuales son discutidas en este artículo.

Palabras claves: crioconservación, crioprotectores, espermatozoide, siluriformes.

ABSTRACT

This review compile information concerning to fish semen cryopreservation, based on experiences in different species of catfish. The siluriformes include genera with a high potential for the continental aquaculture. However, the investigations in this field are scarce. The introduction of this method in the

fish farming industry has generated benefits in pro of improving the population and the diversification of species with destiny to commercial production. The cryopreservation involves certain parameters in search of efficiency in the protocols and it offers of diminishing the damages caused by the mechanical stress and the extreme temperature changes, which induce a decrease in the sperm population. Different freezing protocols vary widely in answer post-thawed on factors such as motility, structure and function of the sperm cell, factors such as motility, structure and function of the sperm cell, features that may generate an adverse response in the fertilization of oocytes, and which are discussed in this article.

Key words: cryopreservation, cryoprotectans, spermatozoa, siluriformes.

INTRODUCCIÓN

Una forma de contribuir a la conservación de la diversidad e integridad genética de las especies, aumentar su posibilidad de reproducción por fuera de la estación reproductiva, facilitar el movimiento e intercambio de material genético y contribuir a la disminución de la presión sobre las poblaciones silvestres, se da por medio de la estandarización de métodos y/o protocolos encaminados a la crioconservación de sus gametos. De igual forma, para producir especies de importancia comercial, es necesario tener un abastecimiento permanente de gametos viables, que aseguren un *Stock* constante de larvas, lo cual puede obtenerse a través de la reproducción artificial haciendo uso de gametos crioconservados.

La crioconservación seminal, ha evolucionado considerablemente desde el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol (Polge *et al.*, 1949), permitiendo que el semen crioconservado sea utilizado y reconocido como un método para la reproducción asistida en varias especies de animales (Fabbrocini *et al.*, 2000). A nivel mundial, el semen congelado es usado como una herramienta esencial en los programas de mejoramiento animal, proyectándose como una estrategia para el mismo objetivo en la industria piscícola mejorando la eficiencia en la utilización de los parentales y contribuyendo a disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercidas por los piscicultores en procura de nuevos sementales (Medina-Robles *et al.*, 2005). Adicionalmente, este proceso ha sido ampliamente reconocido en este campo, como una herramienta biotecnológica para el almacenamiento de los gametos por periodos indefinidos de tiempo,

especialmente en aquellas especies de peces en peligro de extinción (Cloud *et al.*, 1990; Harvey, 1991).

A través de los años los trabajos de crioconservación de semen, han establecido protocolos conducidos al mejoramiento del proceso de crioconservación seminal (Dreanno *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Sin embargo, en teleósteos los procesos de crioconservación de semen muestran aun una viabilidad espermática postdescongelación por debajo del 50 % de la población (Watson, 2000; Linhart *et al.*, 2005), lo cual ha sido relacionado con una serie de factores y cambios biofísicos durante el proceso de congelación y post descongelación. Este proceso ha sido estudiado con una amplia trayectoria en salmonídos y ciprinídos (Lubzens *et al.*, 1997; Lahnsteiner, 2000), siendo escasos los métodos de crioconservación reportados para silúridos, teniendo principalmente como objeto de estudio al catfish africano (*Clarias gariepinus*) (Horváth y Urbányi, 2000; Viveiros *et al.*, 2000), el catfish europeo (*Silurus glanis*) (Ogier de Baulny *et al.*, 1999) y el *Pangasius hypophthalmus* (Kwantong y Bart, 2003).

En Colombia se ha generado un creciente interés por individuos del orden Siluriforme debido a la aceptación comercial de su carne y a su potencial para la acuariofilia (Rodríguez, 1991). Especies como el bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y especies del género Sorubim presentan una alto potencial para la piscicultura continental Colombiana (Moreno *et al.*, 1993; Mojica *et al.*, 2002). No obstante, al igual que para el panorama mundial, los trabajos publicados en cuanto a crioconservación seminal son aún muy escasos (Pinzon *et al.*, 2005; Medina-Robles *et al.*,

2007). De esta manera, el propósito de la presente revisión es mostrar los componentes de la crioconservación de semen y sus efectos sobre la célula espermática de peces teleósteos integrando los resultados encontrados para silúridos con respecto a la tecnología de crioconservación espermática.

CARACTERÍSTICAS DEL ORDEN SILURIFORME

La ictiofauna de agua dulce de Colombia es una de las más diversas del neotrópico, siendo importante en el aporte de la fauna de Suramérica, especialmente en caracidos y silúridos (Roberts, 1972; citado por Cala, 1990).

Los siluriformes representan el cuarto orden dentro de los vertebrados y dentro de los Ostiorophysis, son el grupo de peces más diversificados y extensamente distribuido a nivel mundial, con más de 30 familias, 412 géneros y cerca de 2400 especies (Pinna, 1998). Su distribución es muy amplia, al igual que una gran diversidad de formas. Después de los caracidos es el grupo de mayor número de especies de agua dulce en América (Galvis *et al.*, 1997).

Los silúridos o bagres se caracterizan por la no presencia de escamas, cuerpo desnudo o con placas y/o escudos óseos, cuerpo cilíndrico, algunos son muy alargados y otros anguiliformes; presentan barbillas en la región oral, nasal y/o mentoniana, y cuando están presentes las aletas pélvicas se ubican en posición abdominal, pudiendo tener una aleta adiposa (Provenzano, 1980; Galvis *et al.*, 1997).

Dentro de los silúridos la familia Pimelodidae, es una de las más representativas, comprendiendo más de 60 géneros y abarcando alrededor de 300 especies distribuidas desde México hasta Argentina (Galvis *et al.*, 1997). Estos bagres presentan cuerpo desnudo, tres pares de barbillas usualmente muy largas y aleta adiposa (Cala, 1990). Estas especies son muy apetecidas por su excelente calidad de carne, su uso como pesca deportiva y como ornamental en su etapa juvenil (Padilla *et al.*, 2001). La mayoría de los silúridos son de hábitos carnívoros

alimentándose preferiblemente de peces, microcrustáceos y larvas de insectos y en la fase adulta su alimentación es piscívora (Padilla *et al.*, 2001; Zaniboni-Filho, 2003).

GENERALIDADES DEL ESPERMATOZOIDE EN PECES

En peces teleósteos, la actividad sexual es generalmente estacional y los espermatozoides son inmóviles en el tracto genital (Müller *et al.*, 1994), estos al ser liberados al medio ambiente acuoso, deben responder a condiciones fisicoquímicas como: cambios en la presión osmótica, balance iónico y pH (Cosson *et al.*, 1999), lo cual permite su activación por un corto periodo de tiempo, limitado a pocos segundos en varias especies (Yu *et al.*, 2002; Cosson, 2004), siendo necesario para lograr la fertilización una adecuada movilidad y velocidad de desplazamiento progresivo (Tabares *et al.*, 2005). Las células espermáticas de los teleósteos, a diferencia de los mamíferos son relativamente simples, compuesta por una cabeza desprovista de acrosoma, lo cual está relacionado con la presencia en el oocito de un orificio conocido como micrópilo (Andrade *et al.*, 2001; Grassiotto *et al.*, 2001) permitiendo la entrada del espermatozoide al ovulo y se produzca la singamia. Los espermatozoides en algunas especies presentan una cabeza esférica, con una longitud entre 2 a 4 μm y un collar que forma una pieza media, donde se ubican los centriolos y 2 a 9 mitocondrias (Callard y Callard, 1999; Cosson *et al.*, 1999). El flagelo está constituido por el axonema en arreglo de nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central (Callard y Callard, 1999, Cosson *et al.*, 2000), con una longitud entre 20 y 100 μm y una membrana plasmática que forma una especie de aleta en el plano horizontal confiriéndole una forma acintada (Cosson *et al.*, 1999). El flagelo de *Silurus asotus* y *Silurus microdorsalis* poseen aproximadamente 61 y 57 μm de largo, respectivamente (Kwon y Kim, 2004). Los siluriformes presentan un espermatozoide con un flagelo o biflagelo acuasperma sin acrosoma (Maggese *et al.*, 1984), siendo de tipo acuaespermatozoides (Grassiotto *et al.*, 2001).

El papel principal del espermatozoide es el transporte del genoma nuclear hasta el oocito, para realizar este proceso, el espermatozoide está equipado con estructuras especializadas como la membrana plasmática, organelos con disposición específica como las mitocondrias, y especializaciones como el flagelo, los cuales garantizan la interacción particular con el oocito y sus envolturas (Knobil y Neill, 1999).

La membrana plasmática juega un papel importante en la respuesta del espermatozoide al entorno, las características propias de la membrana le confieren al espermatozoide la capacidad dinámica para regular diferentes actividades celulares y rutas de señalización que pueden conducir entre otros a la activación de la movilidad espermática (Tabares *et al.*, 2005). La composición y organización lateral de la membrana plasmática regula la afinidad por factores de adhesión, controla la permeabilidad de solutos hidrofílicos y dirige eventos de fusión y señalización celular (Frits y Baren, 2000). Además de lo anterior, presenta una proporción lipídica, compuesta por un 70 % de fosfolípidos, 25 % de lípidos neutros y 5 % de glicolípidos (Eddy y O'Brien, 1994; Muller *et al.*, 1994) y una organización asimétrica en los diferentes dominios de la membrana que le da una fluidez especial (Frits y Baren, 2000).

PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

A pesar que la crioconservación garantiza el mantenimiento del espermatozoide por largos períodos de tiempo, esta puede ocasionar daño irreversible a la membrana plasmática por la formación de cristales de hielo, o por la despolarización de la membrana como consecuencia del intercambio iónico, conllevando a la activación y capacitación espermática espontánea (Lahnsteiner *et al.*, 2000). Cuando las células son expuestas a la congelación, están sujetas a diversos cambios resultado de las interacciones agua-solutos lo que permite la formación de hielo a través de la cristalización a temperaturas de aproximadamente -50°C (Holt, 2000). El proceso de cristalización toma lugar intracelularmente cuando el agua en su fase líquida pasa a sólida en forma de

cristales. El medio externo también cambia a forma sólida, lo que conlleva a que la concentración de solutos en los canales residuales aumente progresivamente, mostrándolo hiperosmótico con respecto a la célula, e induciendo la salida de agua y la concentración de solutos intracelulares (Mazur, 1980), conllevando a una deshidratación (Castelleni *et al.*, 1996). Durante el proceso contrario que involucra la descongelación celular, este conlleva a un consecuente flujo de agua al interior de la célula, lo cual puede causar la ruptura de la membrana (Drokin *et al.*, 1998). Diferencias en la composición de lípidos del plasma seminal y la membrana del espermatozoide ha sido observada como factor importante en la diferenciación de la habilidad del espermatozoide en la congelación (Parks y Lynch, 1992).

Efecto de la crioconservación sobre la célula espermática

La crioconservación de espermatozoides de agua dulce generalmente reduce la fertilidad post descongelación del semen; este daño del esperma ha sido monitoreado por medio de estudios de bioquímica y de ultra estructura celular (Billard, 1983; Ogier de Baulny *et al.*, 1997).

En *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta*, se ha reportado previo a la congelación una distribución homogénea de partículas en la superficie del protoplasma, las cuales varían posterior a la crioconservación adoptando formas de partículas ubicadas dentro de grupos en la superficie protoplasmática de la cabeza y la cola (Drokin *et al.*, 1998; Taddei *et al.*, 2001), esto como resultado de la inducción de una fase de transición en los lípidos de la membrana citoplasmática dándose una redistribución espacial de sus componentes, proceso que ha sido atribuido a la separación lateral de lípidos y a la agregación de proteínas de membrana. Lo anterior origina cambios en la permeabilidad de la membrana de la célula y daños en el transporte de enzimas (Holt y North, 1984), siendo uno de los parámetros de control a la crioresistencia del espermatozoide y afectando probablemente la integridad fisiológica después de la descongelación.

La severidad del efecto de los cambios de temperatura es dependiente de la tasa de enfriamiento, presentándose principalmente entre los -12 y -20 °C (Watson, 1981). La explicación para estos fenómenos no es completamente clara, pero es probable que exista una relación en la fase de transición de los lípidos como resultando de la separación de fases y la pérdida de permeabilidad selectiva de la membrana (Watson y Morris, 1987). Zachariassen y Kristiansen (2000) y Viveiros *et al.* (2001), atribuyen la aparición del primer núcleo de hielo o nucleación, a temperaturas entre -5 y -15 °C, donde se adhieren moléculas de agua promoviendo así la formación de núcleos de hielo de mayor tamaño y generando cambios de temperatura a medida que avanza el crecimiento de los núcleos de hielo siendo letal para la célula. El tamaño de los cristales de hielo formados durante la congelación está directamente relacionado con la velocidad de enfriamiento y el grado de hidratación intracelular. La descongelación lenta probablemente favorece en mayor proporción la aparición de lesiones celulares ya que permite la consolidación de cristales de hielo microscópico en formas mayores.

La magnitud de daños criogénicos, durante la congelación y descongelación puede resultar en la disminución de la movilidad en asociación con reducción en la velocidad y la fertilidad. Entre estos daños podemos encontrar los siguientes:

Daño morfológico

Los procesos de crioconservación tienen una influencia significativa en la morfología, integridad y función del espermatozoide. Entre estos, la integridad de la membrana plasmática y la función de la mitocondria son los dos factores más importantes para mantener la viabilidad del espermatozoide. Se ha observado daño morfológico por procesos de ruptura de la membrana plasmática en la cabeza, pieza media y cola, así como en la mitocondria (Zhang *et al.*, 2003), como resultado de la pérdida de la envoltura densa de estas (Zachariassen y Kristiansen, 2000). Taddei *et al.* (2001),

ha atribuido la formación de protuberancias en el flagelo y la cabeza a la pérdida de cromatina nuclear.

Daño en la mitocondria

Las alteraciones de la membrana plasmática, son inductores de pérdida en la posibilidad de fusión entre el espermatozoide con la membrana del oocito, siendo afectada de igual forma la organización mitocondrial conllevando probablemente a la disminución de la movilidad espermática. La funcionalidad de la mitocondria juega un papel importante en la activación espermática, ya que suministra la energía en forma de ATP necesaria para un prolongado tiempo de activación (Ogier de Baulyn *et al.*, 1997; Medina-Robles *et al.*, 2005). Para trucha arcoíris se ha observado una disminución en la producción de ATP postdescongelación, esta disminución puede resultar del estrés osmótico durante la adición de los crioprotectores o el congelamiento del agua externa de la célula (Ogier de Baulyn *et al.*, 1997). En catfish europeo (*Silurus glanis*), se observaron porcentajes que variaron entre 6 y 47 % de espermatozoides con una membrana intacta y una mitocondria funcional (Ogier de Baulyn *et al.*, 1999) después del proceso de crioconservación. La duración de los movimientos de los espermatozoides de los peces es muy corto como es el caso de *Clarias gariepinus* y *Pangasius bocourti* 40 y 48 s, respectivamente (Cacot *et al.*, 2003; Mansour *et al.*, 2005) y las pérdidas de ATP del espermatozoide durante la congelación-postdescongelación pueden ser crucial para la movilidad postdescongelación; esta hipótesis está fortalecida por la respuesta del espermatozoide de *Oncorhynchus mykiss* cuyo nivel de ATP y movilidad decrecen considerablemente después de la descongelación (Ogier de Baulyn *et al.*, 1997), en contraste, se observó niveles altos de ATP postdescongelación en espermatozoides de catfish europeo, con respecto al semen fresco, utilizando como crioprotector dimetil acetamida (DMA), probablemente se atribuye a una resistencia del espermatozoide de esta especie en presencia de DMA (Ogier de Baulyn *et al.*, 1999).

Daño en el DNA

Los efectos de la congelación y postdescongelación en los procesos de viabilidad espermática son comúnmente asociados en términos de movilidad, fertilidad y alteraciones ultraestructurales y poco reportado los efectos en la integridad genética. Labbe *et al.* (2001), reporta para trucha arcoíris que la crioconservación solo afectó la estabilidad del DNA del semen y no perjudica la calidad y supervivencia espermática. El daño en el genoma podría ser solo un componente menor del daño causado a las células por la crioconservación (Labbe *et al.*, 1995). De igual forma, se reporta para especies como *Dicentrarchus labrax* (Zilli *et al.*, 2003), *Oncorhynchus mykiss*, *Sparus aurata* (Cabrita *et al.*, 2005), un alto porcentaje de la fragmentación del DNA a causa de la crioconservación, sin afectar la movilidad y los porcentajes de fertilidad.

Deterioro fisiológico

La evaluación de la calidad espermática post descongelación es uno de los análisis principales en la determinación de la calidad del semen sometido a la crioconservación. Dentro de esto, la movilidad es una de los indicativos mas importantes para la estimación de la calidad del semen fresco y su comparación con el semen crioconservado (Lahnsteiner *et al.*, 1996b). Los resultados después de la crioconservación indican una reducción en la viabilidad del semen comparado con el semen fresco. Usualmente la crioconservación provoca un bajo porcentaje de movilidad, disminución del tiempo de activación y la presencia de altos porcentajes de movimientos circulares (Lahnsteiner *et al.*, 2000; Wamecke y Pluta, 2003). Aunque el criodano exacto que reduce la velocidad del nado todavía es desconocido, se puede afirmar que este evento reduce la probabilidad de que el espermatozoide alcance el micrópilo (Lahnsteiner *et al.*, 2000). El criodano morfológico del espermatozoide podría explicar la baja viabilidad y las bajas tasas de fertilidad en contraste con lo reportado para semen fresco.

ELEMENTOS DE LA CRIOCONSERVACIÓN SEMINAL

Los procesos de crioconservación incluyen una serie de variables durante su ejecución, involucrando aspectos como la dilución del semen con los diluyentes, concentración de las sustancias crioprotectoras, periodo de equilibrio, tasas de congelación, volúmenes de empaque, tiempos de descongelación y evaluación de la dosis seminante.

Diluyentes

El daño celular está relacionado con la formación de hielo, puesto que pocas células sobreviven a un superenframineto (*supercooling*) a aproximadamente -15 °C, pero cuando el medio que rodea a las células contiene concentraciones de solutos de protección como el glicerol y el dimetil sulfoxido (Me_2SO), muchos tipos de células sobreviven a la congelación, de tal modo que la congelación y descongelación se lleve a cabo de una manera apropiada (Mazur, 1980).

Los diluyentes son soluciones que tienen como función proteger la integridad del espermatozoide ante la acción tóxica de los productos generados por su propio metabolismo durante el proceso de crioconservación, así como los cambios bruscos de temperatura y el aumento en el volumen seminal. Para el proceso de crioconservación de semen en peces los diluyentes se han generado con ciertas características en su composición, descritas por Ramos (1996). Como son, la no presencia de sustancias tóxicas, simulación con la composición y osmolaridad seminal de cada especie, capacidad amortiguadora para proteger a los espermatozoides de las variaciones de pH, poseer sustancias que favorezcan la anaerobiosis, tales como citratos, fosfatos, glucosa, fructosa y yema de huevo y leche. Miskolcz *et al.* (2005), reporta la utilización de diluyentes a base de fructosa y la utilización de DMSO al 10 % para la crioconservación de semen de catfish africano (*Clarias gariepinus*). En recientes reportes Villalobos-Sánchez y Osorio-Velandia (2007), reportan la utilización de solución Glucosa-

yema de huevo para la crioconservación de semen de barbilla (*Rhamdia sebae c.f.*), ciertos diluyentes poseen una acción termoprotectora, la cual es ejercida por la fracción lípidica compuesta por lectina y cefalina y una acción conservadora dada por la fracción lipoproteíca, mientras la glucosa suministran energía a los espermatozoides para los procesos vitales y el aporte de electrolitos (sustitutos) para el mantenimiento de la presión osmótica (Ramos, 1996).

Agentes Crioprotectores

La finalidad de los crioprotectores es mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado, previniendo el daño celular durante el proceso de congelación y descongelación, con características tales como: solubles en soluciones acuosas de electrolitos, atravesar las membranas celulares y no ser tóxicos a altas concentraciones (Vincet *et al.*, 1998; Mizukami *et al.*, 1999)

El crioprotector no solo está diseñado para la prevención de la criogenesia sino para ayudar a la célula espermática a iniciar la movilidad, subsecuentemente cuando el espermatozoide empieza a mover el flujo de ATP hacia el flagelo con corta duración (Oda y Morisawa, 1993; Ohta *et al.*, 1997).

Encontramos diversas sustancias distribuidas en dos grupos de acuerdo a su permeabilidad en la membrana. Aquellas sustancias como el glicerol, metanol, etilenglicol, butanediol, acetamida y el dimetil sulfóxido (DMSO), los cuales poseen un bajo peso molecular (Mizukami *et al.*, 1999), y el segundo grupo son aquellas sustancias que no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular como el polivinil alcohol (PVA), hialuronato de sodio y la albumina (Mizukami *et al.*, 1999). Una vez que ingresan los crioprotectores al citoplasma, por medio del gradiente de concentración, el fluido intracelular puede ser superenfriado a temperaturas entre -5 y -15°C, sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a la disminución del punto de congelación por medio de la reducción de las interacciones entre las moléculas de agua (Vincent *et al.*, 1998).

Leung y Jamieson (1991), reportan al DMSO presenta una rápida penetración entre células y relativamente bajo control de toxicidad a baja temperatura, este crioprotector ha sido ampliamente recomendado y la opción preferida de los crioprotectores.

Tasas de congelación

Durante el proceso de congelación la célula espermática está envuelta en muchos cambios que pueden originar una disminución en la sobrevivencia espermática. Uno de estos cambios es la aparición del primer núcleo de hielo, usualmente ocurre después que la solución es enfriada a una temperatura entre -5 y -15°C fenómeno conocido como nucleación (Zachariassen y Kristiansen, 2000; Viveiros *et al.*, 2001). A medida que progresa el enfriamiento el medio comienza a transformarse en hielo, y la concentración de solutos en los canales residuales no congelados aumenta progresivamente, convirtiendo el medio externo hiperosmótico con respecto a la célula (Mazur, 1980). La tasa de enfriamiento juega un papel muy importante, cuando la congelación es lenta, se alcanza un equilibrio a través del eflujo de agua, pero si la congelación es muy rápida, la célula no puede perder agua lo suficientemente rápido para alcanzar el potencial de equilibrio, congelándose el agua intracelularmente (Watson, 2000; Viveiros *et al.*, 2001). La congelación en vapores de NL ha sido una de las técnicas más utilizadas en peces.

Volumen de empaque

Tradicionalmente se ha utilizado pajillas de 0.25 y 0.5 mL en los procesos de crioconservación de semen de varias especies, para fertilizar pequeñas cantidades de oocitos (Lahnsteiner *et al.*, 1996a). Sin embargo el congelamiento de semen en grandes volúmenes fue reportado por primera vez en mamíferos, mostrando resultados satisfactorios en toros y cerdos (Brown *et al.*, 1991; Torreta *et al.*, 1996). Protocolos de crioconservación de semen en macrotubos (5.0 mL), también han sido probados para algunas especies de peces de agua dulce, tales como *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner *et al.*, 1997),

Salmo trutta fario, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* (Richardson *et al.*, 2000), *Polyodon spathula* (Brown y Mims, 1999), *Silurus glanis* (Bart *et al.*, 1998), entre otras.

Descongelación espermática

La evaluación del semen post-descongelación, en los procesos de crioconservación son importantes, ya que se pueden evidenciar los posibles daños sufridos por los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación, considerado como uno de los parámetros más sensibles durante la crioconservación.

La descongelación se efectúa por inmersión en baños de agua, durante este proceso son importantes el control de los tiempos y la temperatura, con el fin de disminuir el efecto de recristalización y el efecto por el cambio térmico.

El rango de temperatura de descongelación utilizado en crioconservación de semen de peces es muy amplio, desde temperaturas cercanas a las de refrigeración de 4°C hasta temperaturas por encima de los 80°C (Lahnsteiner *et al.*, 2000). Las características de movilidad, viabilidad y fertilidad comparadas con el semen fresco en especies como *Xyrauchen texanus* (Tiersch *et al.*, 1998) muestran valores muy bajos, en contraste con lo observado en Cachama blanca y Yamú (*Brycon amazonicus*), las cuales mostraron en general valores mayores a 40% (Navarro *et al.*, 2004; Velasco-Santamaría *et al.*, 2004). En la tabla 1, se observa los resultados de las

metodologías propuestas en la crioconservación en algunas especies de siluridos.

Expectativas de investigación

Suramérica representa un alto potencial para la acuicultura continental, apesar de estas características la acuicultura en Colombia se basa principalmente en el cultivo de únicamente tres especies ícticas: tilapia roja (*Oreochromis sp*), cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Negret, 2005). Esta limitada oferta de especies ha generado la necesidad de promover investigación hacia la ampliación de la oferta de especies de interés comercial dentro de la cadena piscícola, una de las especies que ha promovido el interés son los siluridos por su excelente carne y su buena aceptación en el mercado nacional.

La crioconservación en especies de siluridos, muestran la necesidad de mejorar ciertas técnicas y optimizar ciertos parámetros, desde la obtención del semen, pasando por la evaluación de cada uno de los componentes relacionados con procesos, hasta los procesos de fertilización. Sin duda, investigaciones a nivel de membrana celular nos daría parámetros de una alta significancia para la toma de decisiones en los ajustes de los protocolos.

Por otra parte, esta biotecnología nos encamina hacia la conservación de la biodiversidad de nuestros recursos pesqueros asegurando la permanencia de los stocks naturales, la cual ha tolerado una alta presión antrópica durante las últimas décadas.

Tabla 1. Metodologías propuestas y resultados en la crioconservación seminal para diferentes especies de siluríidos

Especie	Diluyente	Crioprotector	Volumen de empaque	Tasa de congelación	Resultados	Spz/ ocitos	Referencia
<i>Clarias gariepinus</i>	5% de Glucosa	11% Glicerol	Pajillas de 1 mL	-11°C/min a -70°C, y luego a NL	Congelación 51%, control: 51%	245 X 10 ³	Steyn y Van Vuren, 1987
	4% Glucosa	9% Glicerol	Pajillas de 1mL	-5°C/min a -70°C, y luego a NL	NM	ND	Vander Walt et al., 1993
	Ginzburg Fish Ringer	10% MET	Pajillas de 1 mL	5°C/min de -2°C a 38°C y luego a NL	>60% eclosión	ND	Viveros et al., 2001
<i>Clarias batrachus</i>	0.6 % de NaCl	10% Glicerol	Pajillas de 1.5 mL	Directamente a -70°C, almacenado a -70°C	75% control	13.6 X 10 ⁶	Paddi y Mondal, 1995
<i>Ictalurus furcatus</i>	HBSS + 15% leche en polvo	15% MET	Pajillas de 0.5 y 1 mL	Vapores de NL a 6 cm sobre la fase líquida por 6 min hasta -66°C y luego a NL	0% fertilidad	ND	Bart et al., 1998
<i>Pangasius lamaudii</i>	0.9% NaCl	10% DMSO	Pajillas de 0.5 mL	25°C a -80°C a 10°C/min	67.10±5% de movilidad y 48.03±1.3% de fertilidad	6.64x10 ⁸ /200 gr de oocitos	Kwantong y Bart, 2006
<i>Silurus glanis</i>	Solución de Mounib	DMA entre 5 y 15%; Glicerol 5 a 15%; MET 5 a 15% y PG 5 a 15%	Pajillas de 0.5 mL	Congelados por 20 min en VNL a 3 cm sobre la fase líquida del NL	Movilidad entre 4 y 60%	ND	Ogier de Baulny et al., 1999
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	5.5% de Glucosa + 12% yema de huevo	7.5% DMSO	Pajillas de 0.5 mL	-9.6°C/min hasta -120°C y luego a NL	35% motilidad	ND	Pinzon et al., 2005
	Glucosa 5.5 %, yema de huevo 12%	12 MET	Pajillas de 0.5 mL	NM	11.6 % Motilidad	ND	Medina-Robles et al., 2007

ND= No determinado; NL= Nitrogeno Líquido; MET= Metanol; DMSO= Dimetil sulfóxido; Solución Mounib= (g/L) 12mM sucrosa, 6.5 mM glutonion reducido y 100 mM KHC₃ (Mounib, 1978); Diluyente Ginzburg fish Ringer= 123.2 mM NaCl, 3.75 mM KCl, 3.0 mM CaCl₂, 2.65 mM NaHCO₃. Solución salina balanceada Hanks libre de calcio CF-HBSS= 8 g/l NaCl, 0.40 g/l KCl, 0.20 g/l MgSO₄, 0.06 g/l Na₂HPO₄,

REFERENCIAS

- Andrade RF, Bazzoli N, Rizzo ES. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tiss. Cell.* 2001; 33: 524-532.
- Bart AN, Wolfe DF, Dunhan RA. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. *Trans am Fish Soc.* 1998;127: 819-570.
- Billard R. Ultrastructure of trout spermatozoa: Changes after dilution and deep-freezing. *Cell Tissue Res.* 1983; 228: 205-218.
- Brown GG, MIMS SD. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt. *J. World Aquacult. Soc.* 1999; 30: 245-249.
- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology.* 2005; 50: 144-153.
- Callard GV, Callard IP. 2003. Spermatogenesis in nonmammals. In: *Encyclopedia of reproduction IV* (ed. by Knobil, E. and Neill, J.D.). Academic Press. New York. pp. 563-570.
- Castelleni C, Bizzarri AR, Cannistraro S. 1996. Water volume of rabbit spermatozoa measured by electron paramagnetic resonance at different temperatures. 6th World Rabbit Congress Toulouse. pp. 55-58.
- Cala P. 1990. Diversidad, adaptaciones ecológicas y distribución geográficas de las familias de peces de agua dulce de Colombia. *Revista de la academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales.* 17: 67pp.
- Chen SL, Ji XS, Yu GC, Tian YS, Sha ZX. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*), and application to large-scale fertilization. *Aquaculture.* 2004; 236: 547-556.
- Cloud JG, Miller WH, Levanduski MJ. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. *Progr Fish-Cult.* 1990; 52: 51-53.
- Cosson J, Billard R, Cibert C, Dréanno C. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C, editor. *The Male Gamete: from basic knowledge to clinical applications.* Vienna: Cache river press. pp. 161-186.
- Cosson J, Linhart O, Mins SD, Shelton WL., Rodina M. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J. Fish Biol.* 2000; 56: 1348-1367.
- Cosson, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aqua Int.* 2004; 12: 69-85.
- Drokin S, Stein H, Bartscherer H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta* F. Fario). *Cryobiology.* 1998; 37: 263-270.
- Eddy EM, O'Brien DA. 1994. The spermatozoon. In: Knobil E, Neil JD, editors, 2nd edition. *The physiology of Reproduction.* New York: Raven press. pp. 29-77.
- Fabbrocini A, Lubrano SL, Rispoli S, Sansone G. Cryopreservation of Seabream (*Sparus aurata*) Spermatozoa. *Cryobiology.* 2000; 40: 46-53.
- Frist MF, Baren MG. Dynamic of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Bioch et Bioph Acta.* 2000; 1469: 197-235.
- Galvis G, Mojica JI, Camargo M. 1997. *Peces del Catatumbo.* Ecopetrol: OXY:SHELL-Asociación Cravo Norte. D, Vinni Edi. Ltda., Santa Fe de Bogotá. 118 pp.
- Grassiotto Q, Negräu JN, Carvalho ED, Foresti F. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *J. Fish Biology.* 2001; 59: 1494-1502.
- Harvey B. 1991. Gene banking for pacific salmon: technology assessment and applications in British Columbia. *Aquacult Industry Development Report.* pp. 1400-1404.

- Holt WV, North RD. partially irreversible cold-induced lipid phase transition in mammalian, sperm plasma membrane domains: Freeze-fracture study. *J Exp Zool.* 1984; 230: 473-483.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod Sci.* 2000; 62: 3-22.
- Horváth A, Urbányi B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquacult. Res.* 2000; 31: 317-324.
- Knobil E, Neill D. 1999. *Encyclopaedia of reproduction*. Academic Press, New York.
- Kwon AS, Kim KH. A comparison of ultrastructures of spermatozoa of two Catfish, *Silurus asotus* and *Silurus microdorsalis* (Teleostei: Siluridae). *Korean. J. Ichtyol.* 2004; 16 (2): 128-134.
- Kwantong S, Bart AN. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. *Aquacult. Res.* 2003; 34: 887-893.
- Labbe C, Maisse G, Müller K, Zachowski A, Kaushik S, Loir M. Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout sperm plasma membrane. *Lipids.* 1995; 30: 23-33.
- Labbe C, Martoriat A, Devaux A, Maisse G. Effects of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in Rainbow Trout. *Mol Reprod Develop.* 2001; 60: 397-404.
- Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner RA. Cryopreservation of semen of the grayling *Thymallus thymallus* and the Danube salmon *Hucho hucho*. *Aquaculture.* 1996a; 144: 265-274.
- Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner RA. Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* semen quality for cryopreservation. *J. Appl Aquacult.* 1996b; 6: 47-73.
- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology.* 2000; 54: 1477-1496.
- Linhart O, Rodina M, Flajshans M, Gela D, Kocour M. Cryopreservation of European Catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology.* 2005; 51: 250-261.
- Lubzens E, Daube N, Pekarsky I, Magnu Y, Cohen A, Yusefovich F, Feigin P. Carp (*Cyprinus carpio L.*) spermatozoa criobanks- strategies in research and application. *Aquaculture.* 1997; 155: 13-30.
- Maggese MC, Cukier M, Cussac VE. Morphological changes, fertilizing ability and motility of Rhamdiasapo (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. *Rev. Brasil. Bio.* 1984; 44: 541-546.
- Mazur P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. En 9th International congress on animal reproduction and artificial insemination. Madrid, España. pp. 99-114.
- Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev Colom Cienc Pec.* 2005; 18(1): 34-48.
- Medina Robles VM, Guarnizo Pineda M, Ramírez Merlano JA, Otero Paternina AM, Mira T, Pacheco Murillo R, Velasco Santamaría YM, Cruz Casallas PE. 2007. Caracterización y ensayos preliminares de crioconservación seminal de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus, 1766). En memorias XIII Jornada de Acuicultura. Universidad de los Llanos. pp. 68-72.
- Mizukami A, Carrell DT, Peterson CM. Cryopreservation of embryos. En: *Encyclopedia of reproduction*. Utah: Academic Press. 1999; 1: 765-772.
- Mojica JL, Castellanos C, Usma S, Álvarez R. 2002. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto de ciencias naturales. Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá Colombia. pp.129-131.
- Moreno TCA, Valderrama BM, Beltran GC. 1993. Épocas de Reproducción talla media de madurez gonadal y análisis de la problemática con referencia en las tallas de captura del bagre rayado

- (*Pseudoplatystoma fasciatum*; Linnaeus 1766) en el medio Magdalena-sector Barrancabermeja. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA), Bogotá D.C.
- Müller K, Labbé C, Zachowski A. Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrane. *Bioch et Bioph Acta*. 1994;1192: 21-26.
- Navarro OJ, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev Col Cienc Pec.* 17(supl): 53-59.
- Oda S, Morisawa M. Rises of intracellular Ca²⁺ and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1993; 25: 171-178.
- Ohta H, Tanaka H, Kagawa H, Okuzawa K, Iinuma N. Artificial fertilization using testicular spermatozoa in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci.* 1997; 63: 393-396.
- Ogier de Baulny B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maisse G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout spermatozoa. *Cryobiology*. 1997; 34: 141-149.
- Ogier de Baulny B, Labbe C, Maisse G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*. 1999; 39: 177-184.
- Padhi BK, Mandal RK. Cryopreservation of spermatozoa of two Asian freshwater catfishes, *Heteropneustes fossilis* and *Clarias batrachus*. *J Aquacult in the tropics*. 1995; 10: 23-28.
- Padilla PP, Bocanegra FA, Orbe RI. Reproducción inducida de la doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* y desarrollo embrionario - larval. *Folia Amazónica*. 2001; 12(1-2): 141-154.
- Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 1992; 29: 255-66.
- Pinna M CC. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba L. R.; Reis, R. R.; Vari R. P., Lucena Z. M. S., Lucena C. A. *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. pp. 279-330.
- Pinzón Arciniegas SM, Mojica Rodríguez JE, Cruz Casallas PE. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766). *Orinoquia*. 2005; 9(2): 28-37.
- Polge C, Smith AV, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (London)*. pp. 164: 666.
- Provenzano F. Biología de *Pimelodus blochii* Valencienes, 1840 (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) en los Llanos de Venezuela. Trabajo de grado [1980]. Se Localiza en la Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela.
- Ramos S. 1996. Anotaciones sobre inseminación artificial. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá.
- Richardson GF, Miller TL, McNiven MA. Cryopreservation of Arctic charr *Salvelinus alpinus* semen in various extenders and three sizes of straw. *Aquacult. Res.* 2000; 31: 307-315.
- Rodríguez CA. Bagres malleros y cuerderos en el bajo río Caquetá. Estudios de la Amazonía Colombiana. *Tropembos*. 1991; 2: 79-86.
- Steyn GJ, Van vuren JHL. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture*. 1987; 63: 187-193.
- Tabares C, Tarazona A, Olivera MA. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev Col Cienc Pec.* 2005; 18:2: 149-161.
- Taddei AR, Barbato, Abelli L, Canese S, Moretti F, Rana KJ, Fausto AM, Mazzini M.. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology*. 2001; 42: 244-255.

- Tiersch TR, Williamson JH, Carmichael GJ, Gorman OT. Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. *Transactions of the American Fish Sci.* 1998; 127: 95-104.
- Torreta ME, Wevar CA, Forchetti OD, Moschetti E. Effect of freezing at different levels above liquid nitrogen, with or without a thawing diluent, on the post thawing quality of boar semen frozen in large straws. *Av. Prod. Anim.* 1996; 21: 179-184.
- Vander Walt ID, Vanderbank FH, Steyn GJ. The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for conservation of genetic diversity in Africa catfish *Clarias gariepinus*. *Comp Biochem Physiol.* 1993; 106A: 313-318.
- Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE, Calderón-Fonseca AE, Medina-Robles VM. 2004. Crioconservación de semen de Yamú (Brycon siebenthalae): efecto del volumen de empaque y de la temperatura de descongelación sobre la calidad seminal. En memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura. pp. 108-109.
- Vincent C, Pruliere C, Pajot-Augy E, Campion E, Douzou P. Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophysical Chemistry.* 1998; 29, 161-169.
- Medina Robles VM, Velasco Santamaría YM, Cruz Casallas PE. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev Col Cienc Pec.* 2005; 18(1), 34-48.
- Medina Robles VM, Guarnizo Pineda M, Ramírez Merlano JA, Otero Paternina AM, Mira T, Pacheco Murillo R, Velasco Santamaría YM, Cruz Casallas PE. 2007. Caracterización y ensayos preliminares de crioconservación seminal de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus, 1766). En memorias XIII Jornada de Acuicultura. Universidad de los Llanos. pp. 68-72.
- Villalobos Sánchez MA, Osorio Velandia DM. 1997. Ensayos preliminares de crioconservación de semen de Barbilla (*Rhamdia sebae* c.f.). Universidad de los Llanos. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. 40 p.
- Viveiros ATM, So N, Komen J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology.* p.p1395-1408.
- Viveiros ATM, Lock EJ, Woelders H, Komen J. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cryobiology.* 2001; 43: 276-287.
- Wamecke D, Pluta HJ. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture.* 2003; 187: 361-375.
- Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In "The effects of Low Temperatures on Biological Membranes" (Eds G.J. Morris and A. Clarke.). (Academic Press: London). pp. 189-218.
- Watson PF, Morris GJ. 1997. Cold shock injury in animal cells. In 'Temperature and Animal Cells. Symposium of the Society for Experimental Biology'. No. 41. (Eds K. Bowler and B.J. Fuller.). (The company of Biologists: Cambridge). pp. 311-340.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod Sci.* 2000; 60(61): 481-492.
- Yu S, Kojima N, Hakomori SI, Kudo S, Inoue S, Inoue Y. Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-to-carbohydrate interaction between (KDN) GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3-like epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 2854-2859.
- Zachariassen KE, Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology.* 2000; 41: 257-279.
- Zaniboni Filho E. 2003. Piscicultura das espécies nativas de água doce. En: Aqüicultura - Experiências Brasileiras. Florianópolis. Editora da UFSC, cap. 14, pp. 337-369.
- Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YY, Wang CL, Sawant MS, Li J, Chen SL. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology.* 2003; 60: 989-996.
- Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology.* 2003; 47: 227-235.