

1998-D

694001064

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



ESTANDARIZACIÓN DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE
SEMEN DE TILAPIA (*Oreochromis spp.*)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

OLGA AVALOS GARCÍA

ZAPOPAN, JALISCO DICIEMBRE DE 1999



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

C. OLGA AVALOS GARCIA
P R E S E N T E .

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "ESTANDARIZACION DE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE TILAPIA (*Oreochromis spp*)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al M.V.Z. JUAN JESUS ROA VIDAL, y como asesor al M.C. RAFAEL LEON SANCHEZ.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., MARZO 09 DE 1998


M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION


M. EN C. JOSE LUIS NAVARRETE HEREDIA
SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION

COMITE DE
TITULACION



c.c.p. M.V.Z. JUAN JESUS ROA VIDAL.- Director del Trabajo.
c.c.p. M.C. RAFAEL LEON SANCHEZ.- Asesor del Trabajo.
c.c.p. El expediente del alumno.

AOB/JLNH/memn*

**C. COMITÉ DE TITULACIÓN DE LA DIVISIÓN
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.-**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante: **Olga Avalos García** código **694001064** con el título: **Estandarización de la criopreservación de semen de Tilapia (*Oreochromis spp*)**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 26 de Agosto de 1999

EL DIRECTOR DE TESIS:

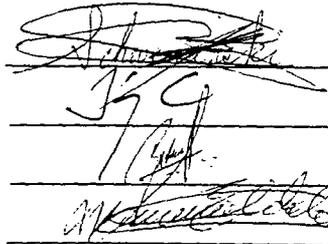
M. en C. JUAN JESÚS ROA VIDAL

EL ASESOR:

C. Dr. RAFAEL LEÓN SÁNCHEZ

SINODALES:

- 1. M.V.Z. SERGIO SHEWEMINSKI**
 - 2. M.C. EDUARDO JUÁREZ CARILLO**
 - 3. C. Dr. RAFAEL LEÓN SÁNCHEZ**
- SUPL. BIOL. MAURILIO SOTO ESPINOZA**



ESTA TESIS ESTA DEDICADA A:

MIS PADRES:

María del Carmen García Guadián

Juan Avalos Santana

Y A MIS HERMANOS:

María del Carmen Avalos García

Alicia Avalos García

María Antonieta Avalos García

Juan Avalos García

César Alejandro Avalos García

POR SU APOYO Y CONFIANZA INCONDICIONAL

AGRADECIMIENTOS

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

De la Generación 1994-1998, y especialmente a:

Patricia Castro Reyes

Jaime Alberto Madrigal Pulido

Por su apoyo técnico y moral, pero sobre todo por su amistad.

A MIS MAESTROS:

Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias

M. en C. Juan Jesús Roa Vidal

C. Dr. Rafael Leon Sánchez

Y sabios consejos

Y a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta tesis, con un reconocimiento especial a:

Dra. Martha Rodríguez Gutiérrez

Quim. Hilda Palacios Juárez

Biól. Antonio Veloz Calvario

Biól. Maurilio Soto Espinoza

Ing. Pablo Torres

Por su amable colaboración en el aspecto académico, técnico, Gracias.

Este estudio forma parte del proyecto: Desarrollo biotecnológico de un banco regional de genoma de Tilapia (apoyado por el Conacyt con el No. 4052-PB) , y se realizo en el laboratorio de Morfofisiología del departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Guadalajara, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, en un tiempo comprendido de marzo de 1998 a marzo de 1999, el lote de reproductores utilizados provinieron del centro acuicola las Pintas de la SEMARNAP, Jalisco y el centro acuicola los Belenes de la Universidad de Guadalajara.

DIRECTOR: M. En C. JUAN JESUS ROA VIDAL.

ASESOR: C. Dr. RAFAEL LEON SÁNCHEZ.

**"Estandarización de la criopreservación de
semen de Tilapia (*Oreochromis spp*)".**

CONTENIDO

	PÁGINAS
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	40
LITERATURA CITADA	42
ANEXOS, CUADROS Y GRÁFICOS	
A) PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	46
B) PREPARACIÓN DE COLORANTES	48

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

PÁGINAS

TABLAS:

1. Calidad del semen de Tilapia previa a la criopreservación	19
2. Características del semen de Tilapia para antes de la criopreservación	19
3. Evaluación de la motilidad del semen de Tilapia antes y después de la congelación en nitrógeno líquido	20
4. Evaluación de la viabilidad del semen de Tilapia antes y después de la congelación en nitrógeno líquido	21
5. Evaluación de la morfología del semen de Tilapia antes y después de la congelación en nitrógeno líquido	22
6. Análisis estadístico para la prueba de motilidad precongelación	23
7. Análisis estadístico para la prueba de motilidad postcongelación	24
8. Análisis estadístico para la prueba de viabilidad precongelación	25
9. Análisis estadístico para la prueba de viabilidad postcongelación	26
10. Análisis estadístico para la prueba de morfología precongelación	27
11. Análisis estadístico para la prueba de morfología postcongelación	28

FIGURAS:

1. Imagen de la motilidad de espermatozoides de Tilapia criopreservados	30
2. Imagen de la viabilidad de espermatozoides de Tilapia criopreservados	31
3. Imagen de morfología la de espermatozoides de Tilapia criopreservados	32

GRÁFICAS:

1. Curva óptima descenso de la temperatura	29
2. Comparación de los resultados en motilidad	33
3. Comparación de los resultados en viabilidad	34
4. Comparación de los resultados en morfología	35

RESUMEN

En México la mayoría de los estudios sobre el manejo de la reproducción en peces están orientados hacia aspectos de fecundidad, fertilidad, maduración ovárica y selección de hembras para lote de reproductores, entre otros; descuidando el papel que desempeñan los machos en este proceso.

Este trabajo está orientado a establecer la estandarización de la criopreservación de semen de Tilapia (*Oreochromis spp*), tomando como referencia estudios realizados en otros grupos de peces. Lo anterior permite tener la posibilidad de formar un banco de gemoplasma que apoyara fuertemente el manejo de la reproducción de esta especie en el ámbito nacional.

En la estandarización de la técnica de criopreservación los tratamientos que se utilizaron fueron: glicerol, glicerol+glucosa, DMSO, DMSO+glucosa, etilenglicol y etilenglicol+glucosa, teniendo como resultados al etilenglicol y etilenglicol+glucosa como los crioprotectantes que arrojaron mejores beneficios en motilidad para el uso de esta técnica presentando una motilidad de 50% y 53.6%, y en la prueba de viabilidad los mejores resultados se observaron en etilenglicol+glucosa con 89.8% y glicerol+glucosa con 90.7% y en la prueba de morfología se observó que en todos los tratamientos en que se adicionó glucosa se tiene el menor número de anomalías espermáticas.

INTRODUCCIÓN

Actualmente México esta pasando por una etapa de cambios y ajustes económicos, políticos, sociales y de relaciones internacionales con el fin de superar el subdesarrollo del país. Además, el continuo incremento de las poblaciones humanas es un problema que implica la necesidad urgente de optimizar fundamentalmente los recursos aplicados al área de producción, tales como los productos agropecuarios, estos recursos que actualmente, como fuente de alimento están llegando a sus límites, por lo que se requiere una búsqueda de otras fuentes de alimento y un mejor aprovechamiento de los recursos ya existentes.

La acuicultura entendida como el cultivo de organismos acuáticos en sistemas controlados, representa una alternativa productiva, con una amplia gama de especies para ser cultivadas que den respuesta a la demanda creciente de alimentos; además este cultivo es altamente redituable, ya que la mayoría de estos organismos son eficientes transformadores de alimento en proteína corporal, una parte de la eficiencia se debe al hecho de que no necesitan que desperdiciar energía para su propio soporte, ya que sus cuerpos son soportados por el agua; además no gastan calorías para mantener una temperatura constante esto debido a su condición como poiquilotemo.

En particular, desde su introducción en México en 1964, la Tilapia ha representado una fuente de alimentos y empleos constituyendo una actividad económica importante en los cuerpos de agua epicontinentales. Esto se refleja en las estadísticas pesqueras, al registrarse una producción aproximada de 70,392 toneladas en 1998, ocupando el primer lugar en pesquerías de aguas dulces (SEMARNAP, 1999).

La Tilapia posee importancia en la producción de proteína de origen animal en las agua tropicales y subtropicales de todo el mundo, particularmente en los países en desarrollo.

Los atributos que convierten a la Tilapia en uno de los organismos más apropiados para la piscicultura son su rápido crecimiento, resistencia a enfermedades, elevada productividad, tolerancia a desarrollarse en condiciones de alta densidad, capacidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno y a diferente grado de salinidad, así como la habilidad de nutrirse a partir de una amplia gama de alimentos naturales y artificiales (especies micrófagas). Además, la calidad de la carne es excelente, puesto que la textura es firme, de color blanco y no posee huesos intermusculares, lo cual hace que constituya un pescado altamente apetecible para el consumidor (Morales, 1988).

En las últimas décadas se han incorporado diversas líneas genéticas en los centros piscícolas de la Secretaría de Pesca. Algunas de ellas han demostrado ser eficientes desde el punto de vista productivo; sin embargo el manejo de estas no ha tenido una base científica sostenible, por lo cual, con el tiempo se han perdido sus características fundamentales, notándose una baja tasa de crecimiento y, por lo tanto en rendimiento acuícola.

Para mantener la calidad genética de las especies que se importan y ofrecer a los productores líneas de alto valor, es necesario contar con un banco de genoma, que asegure disponer de especies idóneas desde el punto de vista del productor. Para ello se requiere de tecnología especializada que permita conservar el material genético de organismos altamente productivos u organismos en peligro de extinción (Arredondo, 1996).

Una de las tecnologías que pueden dar gran soporte a los bancos de germoplasma es la criogenia, esta técnica obtiene y emplea la temperatura por debajo de 120°K (-153°C), los sistemas criogénicos empezaron a utilizarse en la industria en los años 20 de este siglo (Suárez, 1997).

La criopreservación de espermatozoides es el almacenaje de semen a baja temperaturas, el uso de esta técnica en el semen de peces es de mucha utilidad durante la práctica del manejo de la reproducción, como por ejemplo en las especies en que los ovarios y testículos maduran en diferente tiempo, siendo así una excelente alternativa para optimizar la reproducción artificial, mantenimiento de líneas y familias de elevado valor genético, facilidad de los cambios de semen entre centros de reproducción, incluso la constitución de bancos de germoplasma (Derivaux, 1985; Rodríguez, 1992¹; Rodríguez, 1992²).

Este trabajo está orientado a establecer la estandarización de la criopreservación de semen de Tilapia, tomando como referencia estudios realizados en otros grupos de peces, lo anterior permite tener la posibilidad de formar un banco de germoplasma que apoyará el manejo de la reproducción de esta especie en el ámbito nacional.

ANTECEDENTES

La mojarra Tilapia hace referencia a un grupo de peces ciclidos de la tribu Tilapinni originaria del Africa Oriental. Algunas de sus especies han sido cultivadas en estanques desde el año 1,000 a. C. no obstante, es hasta el presente siglo cuando esta especie recibe la atención de los acuicultores a nivel mundial (Arredondo, 1996).

El cultivo de la Tilapia se inició en México en 1964, con la importación de los primeros ejemplares procedentes de la Universidad de Auburn, Alabama, EUA. Las cuales fueron depositadas en la Estación Piscícola de Temascal, Oaxaca, de donde fueron distribuidas ampliamente en una gran cantidad de cuerpos de agua naturales y artificiales en las zonas tropical y templada del país. Las especies introducidas en este año fueron identificadas como: *Tilapia rendalli*, *Oreochromis mossambicus* y *O. aureus* (Arredondo et al., 1994).

En 1978, se introdujo la Tilapia del Nilo (*O. niloticus*) en el mismo sitio procedente de Panamá. En 1981, *O. mossambicus* var. *roja* y *O. urolepis hornorum* provenientes de Parlamento, Florida, EUA. En 1986 la primera línea roja de *O. niloticus* procedente de la Universidad de Stirling, Escocia. En 1987 nuevamente se introduce *O. urolepis hornorum*, y *O. mossambicus*, así como la *Tilapia zillii* y a partir de este año tanto el gobierno a través de la entonces Secretaría de Pesca, gobiernos de los estados así como algunos productores privados introducen nuevas variedades como la Tilapia híbrido rojo, procedente de Puerto Rico, la Tilapia blanca conocida como Rocky Mountain, la *O. aureus* procedente de Cuba y la *O. aureus* azul, entre otras (Arredondo, 1996). En 1991 se importaron algunos lotes de Tilapia procedentes de Egipto, Panamá y Costa Rica y fueron introducidos en los centros Acuicolas de la Secretaría de Pesca. (Arredondo et al., 1994)

Si bien existe en nuestro país todas las especies y variedades de Tilapia antes mencionadas, las más utilizadas en la acuicultura son las que tiene hábitos alimenticios micrófagos como es el caso de *O. niloticus*, *O. aureus* y *O. mossambicus* y las especies del género *Tilapia* que son preferentemente herbívoras, han sido relegadas y no se producen ya crías. (Arredondo, 1996).

Las Tilapias son peces teleósteos pertenecientes a la familia Cichlidae, la cual se caracteriza porque sus miembros presentan una coloración atractiva. Los ciclidos son nativos de África, América Central y la parte tropical de América del sur. Estos se diferencian de la gran mayoría de peces dulceacuicolas por la presencia de un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza, el cuerpo es generalmente comprimido a menudo discoidal, raramente alargado; en muchas especies la cabeza del macho es invariablemente mayor que la de la hembra; algunas veces con la edad y el desarrollo se presenta en el macho tejidos grasos en la región anterior y dorsal de la cabeza (dimorfismo sexual). (Morales, 1991).

Fisiología de la Reproducción.

Las especies de *Oreochromis* son heterosexuales, su fecundación es externa y el número de huevecillos por hembra varía según la especie y en su tamaño, generalmente para su reproducción en cautiverio el número de hembras debe ser mayor que el de los machos en una proporción de 4:1 (Hepher, 1985).

El sistema endocrino juega un importante papel en la maduración de los peces. La diferenciación de las gónadas ocurre en etapas tempranas, entre los 16 y 20 días (tomando como referencia en primer día en que dejó de ser alevín). Posteriormente, las gónadas empiezan a definirse, las femeninas se desarrollan de 7 a 10 días antes de las masculinas (Arredondo et al., 1994).

Maduración sexual

Los organismos alcanzan la madurez sexual a partir de los 2 o 3 meses y a una longitud de 8 a 16 cm. Los factores que influyen en la maduración sexual son el fotoperíodo; la temperatura (la cual debe permanecer por arriba de los 24°C) y la presencia del sexo opuesto (Arredondo, 1996). Estos factores están involucrados como estímulos en la secuencia de los aspectos endocrinos reproductivos, de tal manera que asegura la aparición de las actividades sexuales cuando las condiciones del medio son favorables para la sobrevivencia de las crías. La frecuencia de desoves varía considerablemente dependiendo de los factores ambientales, pudiendo ser desde 6 hasta 16 veces al año. (Arredondo et al., 1994). En México se ha observado reproducciones hasta 10 veces al año. (Morales, 1991).

El apareamiento de las tilapias está motivado por los mismos factores externos que la madurez sexual, suscitándose un comportamiento característico que involucra la construcción del nido por el macho el cual presenta territorialidad, cortejo del macho hacia la hembra: oviposición y fecundación de los huevos, así como la incubación bucal por parte de las hembras. (Arredondo et al., 1994).

Producción de Gametos

La gametogénesis se presenta como respuesta de la interrelación de factores externos y mecanismos endocrinos, regulada por el sistema nervioso central. La percepción de los estímulos ambientales como son fotoperiodo, temperatura, salinidad, etc. está controlada por el sistema nervioso, incluyendo el paso desde los receptores sensoriales: ojos, piel y glándula pineal; hasta el hipotálamo, incluyendo a la producción de hormonas hipotalámicas en los extremos terminales de los axones nerviosos que se encuentran en estrecho contacto con la hipófisis formando la neurohipófisis (García, 1991). Los mensajeros químicos producidos por el hipotálamo pasan a la hipófisis vía axónica estimulando la producción de hormonas gonadotrópicas entre otras. La acción de las gonadotropinas en la gónada propicia la producción de esteroides sexuales, que son los responsables directos de la maduración de los gametos (García, 1991; Rodríguez, 1992²).

Se cree que la maduración de las gónadas en el pez se efectúa como resultado de un aumento en la secreción de gonadotropinas. El efecto de las gonadotropinas en la regulación de la reproducción es indirecta, y se efectúa a través de esteroides sexuales, en el caso de los machos por andrógenos como la testosterona (Rodríguez, 1992¹; Rodríguez, 1992²). La duración del proceso de espermatogénesis en teleósteos puede durar entre 4 y 23 días, dependiendo de las condiciones ambientales (Rodríguez, 1992²).

Los peces producen un considerable número de gametos. El macho produce varios cientos de millones de espermatozoides por año por kilogramo de peso corporal, o más de 100×10^6 /g de testículo por día lo cual es diez veces superior a la producción registrada para los mamíferos. La concentración de espermatozoides por mililitro de semen es muy elevada en la Trucha y Pico entre 10 y 40×10^9 ; 14×10^9 en carpa y 30×10^9 en la Perca. Sin embargo, solo una parte de estos espermatozoides pueden ser colectados en algunas especies durante el período reproductivo por ejemplo en la Trucha solo un 20%, el resto queda en los testículos donde son gradualmente reabsorbidos (Billard, 1988).

El número de huevecillos por hembra es generalmente alto, dependiendo la especie y el tipo de reproducción. La fecundidad relativa es el número de huevos por unidad de peso corporal, y esta es menor en especies tales como: Salmonidos ya que produce huevecillos muy grandes, Poecílidos que son ovovivíparos y Tilapias que incuban los huevecillos (Billard, 1988).

Morfología de Gametos

La morfología del espermatozoide, es muy variada en los teleósteos. La característica principal es la ausencia de acrosoma (Billard, 1988; Mattei, 1993), solo en algunos teleósteos como *Gambusia affinis*, *Lepadogaster lepadogaster* y *Oncorhynchus mykiss* se observan estructuras en el frente de sus células germinales, que son al parecer vestigios de vesículas acrosomales. (Mattei, 1993).

La cabeza de los espermatozoides es generalmente esférica como en el caso de Ciprinidos y Tilapias, o ligeramente alargada como en la Trucha, presentando una elongación más evidente en el Guppi. El óvulo está caracterizado por un núcleo muy grande revestido por un corión el cual puede tener uno ó varios micropilos (Billard, 1988).

Fisiología del espermatozoide

Las dos características fisiológicas más estudiadas entre las especies son: la inmovilidad de los espermatozoides en el tracto genital y el tiempo extremadamente corto de nado una vez en que la motilidad es conseguida. Estas peculiaridades han sido estudiadas en su mayor parte en Salmonidos, pero no son específicas para peces, también han sido encontradas en otros vertebrados inferiores como los anfibios y en invertebrados como el erizo de mar. Hay muy poca información disponible en otras especies. La inmovilidad en Salmonidos es debido a la presencia de K^+ en el líquido seminal, también hay factores como la elevación de la presión osmótica o sucrosa que pueden inhibir la motilidad. Los factores causantes de provocar la inhibición de la motilidad en otras especies aún no se han esclarecido. (Billard, 1988).

Se ha reportado que la motilidad se puede incrementar por el uso de la solución fertilizante de Woynarovich y Horváth, debido a que sus componentes activan a las mitocondrias del espermatozoide por el aumento del AMPc y por el decremento de K^+ (Rodríguez, 1992¹; Rodríguez 1992²).

Las técnicas de recolección de semen varían de acuerdo a las especies: para el caso de los peces, se realiza por el método de canulación o tomado directamente del ejemplar con un tubo de ensaye (Rodríguez, 1992³), o pueden ser colectado con una jeringa: Antes de la recolección el pez es generalmente anestesiado (Billard, 1988; Rodríguez, 1992¹; Rodríguez, 1992³).

Criopreservación de semen

El almacenamiento a largo plazo de gónadas, es enfocado a una gran variedad de aplicaciones tales como la conservación de recursos genéticos ya sea productos de la domesticación o en forma natural, quizás en especies en peligro de extinción o como herramienta en la producción; de hecho uno de los primeros éxitos en congelación fue la utilización de espermatozoides congelados de Arenque para la producción de crías en otoño cuando en condiciones normales es en primavera, reportado por Blaxter en 1953, la congelación de esperma de Arenque fue realizada a -40°C en Dióxido de Carbono sólido, y después del almacenamiento se practico una exitosa inseminación artificial (Purdon, 1990).

El almacenaje de semen puede ser muy útil en la práctica del manejo de la reproducción en peces. Saad y colaboradores en 1988, sugirieron que la criopreservación de semen es una buena alternativa para optimizar la reproducción artificial (García, 1991; Rodríguez, 1992¹; Rodríguez, 1992³). Algunas aplicaciones sobre estas técnicas son también reportadas por autores como: Stoss en 1983, quien centra sus estudios sobre la conservación de gametos de peces y fisiología del espermatozoide y Billard en 1984 sobre la conservación de gametos de peces para la inseminación artificial (Billard, 1988; García, 1991).

La mayoría de las publicaciones sobre el tema han sido enfocadas a especies de importancia económica o a las que presentan peligro de extinción. Sin embargo, las técnicas frecuentemente empleadas pueden ser ajustadas para cualquier tipo de peces practicando estudios preliminares sobre fisiología y conservación de gametos (Billard, 1988; Kurokura, 1984; Mace, 1994; Moore, 1987; Purdon, 1990).

Es escasa la bibliografía sobre criopreservación de semen de *Oreochromis spp.*, sin embargo, existen estudios sobre la preservación de semen por periodos cortos y criopreservación realizados en Arenque, Bacalao, Róbalo, Carpa, Trucha y Salmón del Atlántico, (Billard, 1988; Cloud, 1990; Cloud, 1997; Figiel, 1997; Kamar, 1987; Kurokura, 1984; Scheerer, 1989; Yoo, *et al.*, 1987; Whitler, 1982).

Los espermatozoides pueden actualmente conservarse en nitrógeno líquido a temperaturas tan bajas como -196°C y sobrevivir con fertilidad relativamente alta, después de descongelados. Sin embargo, aproximadamente un 50% de espermatozoides de una población no selecta mueren o se inmovilizan durante la congelación y descongelación (Derivaux, 1985; Salisbury, 1978). La lesión es causada por: 1) La formación de cristales internos que afectan a la estructura del espermatozoide, 2) la concentración de soluto que se produce conforme el agua pura se elimina del medio de suspensión del interior y el exterior de las células, y 3) por las interacciones de ambos factores físicos (Derivaux, 1985; Purdon, 1990; Salisbury, 1978).

Para aplicar la técnica de criopreservación de semen en cualquier especie se requiere: Un crioprotector, para evitar la criofractura, causada por la cristalización; un líquido diluyente, con sustancias que nutran a los espermatozoides por periodos prolongados y por último un antibiótico para evitar el desarrollo bacteriano (Billard, 1988; Derivaux, 1985; García, 1991; Salisbury 1978).

En estudios realizados por diversos autores se recomienda una relación de semen de 20%, crioprotectante 15% y solución diluyente de 65% (García, 1991; Kurokura, 1984, Rodríguez, 1992³).

Hay un gran número de agentes crioprotectores, estos están clasificados en dos grupos: Crioprotectores intracelulares permeables, en estos se encuentran el glicerol, dimetil sulforxido (DMSO), etileno, dietileno, trietileno, metanol, dimetil acetamida (DMA) entre otros; y los crioprotectores extracelulares no permeables como: sacarosa, lactosa y glucosa (Salisbury, 1978); sin embargo los crioprotectores utilizados con mayor frecuencia en criopreservación de gametos de peces son DMSO y metanol (Figiel, 1997).

El DMSO es el crioprotectante que ha dado mejores resultados para congelar espermatozoides de Salmón ya que otros crioprotectores, presentan baja fertilidad después de la descongelación (Cloud, 1997).

Hervey B.J. y R.N. Kelley en 1988 reportaron un método práctico para congelación de semen de Tilapia, utilizando como crioprotectante intracelular metanol al 5% y leche descremada en polvo al 15%, obteniendo como resultado después de la descongelación una motilidad de 39%.

El punto crioscópico del líquido seminal en la mayoría de los peces es aproximadamente de -65°C , pudiéndose utilizar, en lugar de nitrógeno líquido, hielo seco, cuya temperatura es de -79°C . (Martin, 1988).

HIPÓTESIS

Los agentes crioprotectantes, se usan para proteger la célula cuando es sometida a bajas temperaturas. es decir evita o disminuye el daño celular causado por la cristalización, de tal manera que al aplicar la técnica de criopreservación al semen de Tilapia (*Oreochromis spp*) se previene o disminuye el daño celular, sin afectar significativamente la calidad espermática.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estandarizar la técnica de congelación en semen de Tilapia.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluar la calidad del semen de los machos reproductores de Tilapia antes y después de ser sometidos al congelamiento.
- 2) Congelar los espermatozoides utilizando como crioprotectantes intracelulares (DMSO, glicerol y etilenglicol), y glucosa como crioprotectante extracelular.
- 3) Determinar la curva óptima de congelación

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

El material biológico se obtuvo de 30 machos reproductores proporcionados por la SEMARNAP y de un centro acuicola de la Universidad de Guadalajara localizado en los Belenes, Zapopan, Jalisco; con edad entre 4 y 6 meses y un peso de 250 a 500 g; dichos reproductores fueron mantenidos en peceras de 70 litros (un organismo por pecera) teniendo bajo control los parámetros de: Temperatura a 28°C mediante termostatos de 75 watt, oxígeno disuelto 5 mg/lit mediante aireadores de cabeza de poder, fotoperíodo a 12 horas luz, así mismo se monitorearon y mantuvieron en condiciones óptimas para la especie estudiada otros parámetros fisicoquímicos del agua (pH, amonio y nitritos), los organismos evaluados se aclimataron durante una semana antes de la extracción del semen.

Recolección de semen

Se sedaron los machos que se utilizaron como donadores de semen, con bicarbonato de sodio a razón de 650 mg por litro de agua, por tiempo de diez minutos, inmediatamente se seco el exceso de agua con una franela húmeda, sujetándose por la cabeza y la región caudal se movió suavemente hacia los lados para la relajación de la musculatura, se les dio masaje y posteriormente se presiono en los flancos desde atrás de los operáculos hacia el poro genital, siguiendo la región donde se localizan las gónadas y se colectó el semen, se terminó cuando el flujo fue nulo a la presión.

El semen se colecto en una jeringa con aguja de punta roma, se manejo suavemente tratando de evitar el daño mecánico de los espermatozoides, después se coloco en un tubo Ependorf previamente pesado.

Determinación de la calidad del semen.

Inmediatamente después de la extracción de semen se evaluaron la motilidad, viabilidad morfológica, densidad, y número de espermatozoides por mililitro.

Las pruebas de motilidad, viabilidad y morfología fueron también realizadas después de que el semen fue sometido a la congelación.

1. Prueba de motilidad

La motilidad del espermatozoide está dada por la morfología y la viabilidad, de su vigor dependerá en gran parte el éxito de la fecundación.

Se identificó básicamente un primer momento: En el que el movimiento fue rápido y vibrante llevándose un registro del tiempo hasta que la vibración general disminuyó.

Para medir el porcentaje de motilidad se usó un sistema de conteo modificado por Kurura, 1984 y consistió en una escala de 6 puntos basada en el porcentaje de motilidad del espermatozoide, como se especifica en la siguiente tabla:

Calificación	Características	Porcentaje de motilidad (%)
0	Todos muertos	0
1	Débilmente activos	1-15
2	Oscilante	5-30
3	Movimiento	30-50
4	Activos	50-70
5	Excelente	70-100

Método

Para observar el movimiento se colocó una gota de semen en un portaobjetos adicionando posteriormente una gota de solución fertilizante (ver anexo I) se cubrió suavemente con un cubre objetos y observó al microscopio en 40x cada 15 segundos, tomando el tiempo hasta que la vibración general declinó.

2. Prueba de viabilidad

La viabilidad determina el número de espermatozoides vivos y muertos, se aplicó mediante la técnica de Bloom (ver anexo I).

Método.

En un porta objetos se colocó una gota de semen y fue mezclada con una gota de igual proporción de la solución de eosina-nigrosina, elaborándose un frotis lo más delgado posible. Los espermatozoides muertos se tiñeron intensamente de rojo y rosa mientras que los vivos permanecieron transparentes esto fue apreciable en el microscopio óptico con el objetivo 100x.

3. Prueba de morfología

Al observar la morfología las muestras generalmente presentan un elevado porcentaje de formas anormales que tienden a ser de baja fertilidad. Para su evaluación se utilizó la técnica de Coffin, 1986 (ver anexo I).

Método.

La técnica de Coffin (1986), fue la utilizada para evaluar la morfología y consistió en:

1. Se preparó un frotis delgado sobre un porta objetos elaborado con una pequeña gota para evitar así que quedará muy concentrado.
2. Fijación por aire y calor.
3. Se adicionó cloramida al 1%, dejándola durante 3 minutos para extraer el moco.
4. Se enjuaga con agua y a continuación con alcohol al 95%.
5. Secando mediante papel secante.
6. Tinción de 2 - 5 min. con el colorante preparado con fucsina fenólica de Zienhl Nielsen, 2 partes; Solución alcohólica concentrada de eosina, una parte, y alcohol al 95%.
7. Se lavó con agua.
8. Tinción para contrastar con azul de metileno de Loeffler por el lapso de unos segundos.
9. Se eliminó el exceso de colorante al lavarse con agua.
10. Observación al microscopio óptico en objetivo 40x.

Mediante esta técnica se observó al microscopio óptico en objetivo 40x que las cabezas de los espermatozoides se tiñeron de púrpura, las colas y las porciones intermedias, en rojo o rosa.

4. Prueba de número de espermatozoides

Esta prueba se realizó mediante el conteo del número de espermatozoides por mililitro, se utilizó una solución diluyente (ver anexo II).

Esta determinación se practicó mediante la cámara de Neubauer, empleando la técnica de Coffin, (1986) modificada por Rodríguez (1992).

Método

Se utilizó una pipeta de glóbulos rojos con la cual se tomo de la muestra de semen llevándola a la marca de 0.1, posteriormente se coloca en la solución diluyente hasta llegar a la marca de 101, se deja de succionar retirando el tubo de hule colocando el dedo índice y el pulgar en cada extremo de esta, se procedió a agitar vigorosamente la pipeta en un lapso de 15 segundos antes de proceder al llenado de la cámara de Neubauer.

Llenado de la cámara de Neubauer

Se desecharon las tres primeras gotas de la pipeta de glóbulos rojos y se procedió a llenar por capilaridad el área central finamente graduada de la cámara, se deja reposar durante 5 minutos y se observa al microscopio.

En el microscopio se empleo el objetivo seco fuerte (40X), se contaron los espermatozoides presentes en los cuadros de las esquinas y el cuadro central (cinco en total), excluyéndose los espermatozoides que estaban adheridos a las paredes de dichos cuadros.

Calculo del número de espermatozoides

Con este método, si el número de espermatozoides obtenido de los 5 cuadros es similar, se procede a sacar el promedio y éste valor es multiplicado por 5×10^6 a la 6 para obtener dadas las diluciones, el número de espermatozoides por mililitro.

5. Prueba de densidad

Esta prueba fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$D = W / V$$

En donde:

D = densidad

W = peso del semen (g) y

V = Volumen del semen (ml).

Método

Se tomó un volumen determinado, en un tubo Ependorf graduado y posteriormente se pesó en una balanza analítica en la cual previamente se había pesado el tubo, y por diferencia de pesos se obtuvo el peso del semen.

Las pruebas que realizaron fueron necesarias para la selección del semen comprobando así que este reúne las mejores características en cuanto a calidad y cantidad, además de permitirnos calcular del volumen de los diluyentes que se utilizaron posteriormente en el proceso de criopreservación.

Enfriamiento y congelación

El proceso de enfriamiento ocurrió gradualmente (de 30°C a 5°C) permaneciendo en el refrigerador aproximadamente 45 minutos, durante este tiempo se realizó la evaluación cualitativa y cuantitativa del semen.

El semen antes de comenzar el enfriamiento fue previamente mezclado con un una solución de líquido diluyente (ver anexo II) y crioprotectante, presentando los siguientes tratamientos:

1. Semen + líquido diluyente + DMSO
2. Semen + líquido diluyente + Glicerol
3. Semen + líquido diluyente + Etilen-gilcol
4. Semen + líquido diluyente + DMSO + Glucosa
5. Semen + líquido diluyente + Glicerol + Glucosa.
6. Semen + líquido diluyente + Etilen-glicol + Glucosa

Para las diluciones se realizó la relación de semen de 20%, crioprotectante 15% y solución diluyente de 65%, además se adiciono estreptomycin (ver anexo II) para evitar el florecimiento bacteriano. Posteriormente se envaso en pajillas plásticas de 0.5 ml las cuales fueron identificadas para llevar un registro y finalmente se procedió a congelar partiendo de una temperatura de 5°C tiempo en que se completo el proceso de equilibrio.

En el proceso para congelar, se empleo la congelación suave:

Partiendo de 5°C hasta llegar a -30°C en un tiempo máximo de 8 minutos en vapor de nitrógeno líquido, luego se sumergió directamente en nitrógeno líquido, la curva de descenso fue de aproximadamente 5°C/min.

Las pajillas se descongelaron en:

- Baño María a una temperatura de 32°C, de esta manera el proceso de descongelación duró aproximadamente 30 segundos, al cabo de los cuales el semen alcanzo los 5°C, dando como resultado una descongelación rápida. Posteriormente se realizaron las pruebas de motilidad, viabilidad y morfología.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en el estudio consistieron en conteos antes y después de el proceso de congelación, la prueba estadística que se utilizo fue el análisis de Varianza para obtener la variabilidad entre tratamientos, y para hacer el analisis de significancia de las diferencias o de las comparaciones entre las medias de las muestras se aplico el método de Contrastes Ortogonales (Reyes 1980, Little, 1976).

RESULTADOS

En el presente estudio se utilizó como material biológico semen de *Oreochromis spp.* El cual fue sometido a diferentes pruebas tanto cualitativas como cuantitativas antes de ser criopreservado. De los seis diferentes tratamientos a evaluar se hicieron siete repeticiones de cada uno, repartidas en once fechas de recolección, los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1.

En la Tabla N° 2 se muestra un resumen del total de semen fresco utilizado, el total de diluyente y crioprotector, el volumen total de semen (20%) + diluyente (65%) + crioprotector (15%), el número total de viales (42 viales) y número de viales por ensayo (7 viales).

En la tabla 3 y Gráfica 2, se describe la evaluación de la motilidad antes y después de la congelación, en este mismo orden (antes y después) son citados los porcentajes que presentaron los diferentes tratamientos a lo largo de la evaluación, donde se encontró que la media para el DMSO fue de 94% y 36.1%, Así mismo para el DMSO+glucosa fue de 95.9% y 38.6%; Para el Etilenglicol fue de 92.4% y 50%, en Etilenglicol+glucosa fue de 97% y 53%; En Glicerol fue de 94.1% y 15%, par Glicerol+glucosa fue de 95.4% y 19.3%.

En la tabla 4 y Gráfica 3, se describe la evaluación de la viabilidad antes y después de la congelación, en este mismo orden (antes y después) son citados los porcentajes que presentaron los diferentes tratamientos a lo largo de la evaluación, donde se encontró que la media para el DMSO fue de 90.3% y 87.9%, Así mismo para el DMSO+glucosa fue de 93.1% y 90.1%; Para el Etilenglicol fue de 90.9% y 86.4%, en Etilenglicol+glucosa fue de 90.4% y 89.3%; En Glicerol fue de 82.6% y 80.7%, par Glicerol+glucosa fue de 92.9% y 90.7%.

En la tabla 5 y Gráfica 4, se describe la evaluación de la morfología antes y después de la congelación, en este mismo orden (antes y después) son citados los porcentajes que presentaron los diferentes tratamientos a lo largo de la evaluación, donde se encontró que la media para el DMSO fue de 10.3% y 12%, Así mismo para el DMSO+glucosa fue de 11% y 12.8%; Para el Etilenglicol fue de 8.4% y 11.1, en Etilenglicol+glucosa fue de 10.3% y 11.8%; En Glicerol fue de 8.4% y 14.5%, par Glicerol+glucosa fue de 8.4% y 10.4%.

Cabe mencionar que los porcentajes antes citados hacen referencia a el porcentaje de anomalías presentes en las muestras.

En la gráfica 1, se describe la curva de descenso de la temperatura que se practicó para cada tratamiento, al descongelar, se evaluó la motilidad (Figura 1), viabilidad (Figura 2) y morfología (Figura 3) cuyos resultados aparecen en las tablas 3, 4 y 5 respectivamente.

El análisis de varianza para la motilidad precongelación (Tabla 6.1) reflejo que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, así mismo en la Tabla 7.1 en la motilidad postcongelación si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos observándose a el etilenglicol y el etilenglicol+ glucosa como el crioprotectante que arrojó mejores resultados (Tabla 7.2).

El análisis de varianza para la viabilidad precongelación (Tabla 8.1) reflejo que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, así mismo en la Tabla 9.1 en la viabilidad postcongelación si se encontró diferencias significativas entre tratamientos presentándose una respuesta positiva a la adición de glucosa en los tratamientos (Tabla 9.2).

El análisis de varianza para la morfología precongelación (Tabla 10.1) reflejo que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, así mismo en la Tabla 11.1 en la morfología postcongelación si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos observándose una marcada mejoría a la adición de glucosa acentuándose en el etilenglicol+ glucosa (Tabla 11.2).

Tabla 1. Calidad del semen de *Oreochromis spp.* previa a la criopreservación.

Fechas de colección	Vol. En ml	Densidad gr/ml	Motilidad óptima en seg.	Motilidad en %	Viabilidad en %	Morfología (% de células anormales)	Nº esp/ml x10 ⁶
01/Junio	0.6	1.222	0.437	94	88	10	125
05/Ago.	0.45	1.103	0.473	97	91	12	90
06/Ago.	0.4	1.161	0.529	100	96	10	83
02/Oct.	0.5	1.456	0.419	91	99	12	199
08/Oct.	0.4	1.300	0.519	100	100	15	140
14/Oct.	0.3	1.398	0.451	95	82	5	144
22/Oct.	0.3	1.486	0.301	75	80	15	220
27/Oct.	0.25	0.833	0.450	95	90	6	150
28/Oct.	0.9	1.140	0.450	95	95	10	145
28/Oct.	0.3	1.025	0.538	100	90	7	670
29/Oct.	0.3	1.045	0.500	100	95	5	530

Tabla 2. Características del semen de *Oreochromis sp* para antes de criopreservar.

Volumen de semen fresco	4.7 ml.
Volumen de diluyente	15.193 ml.
Volumen de crioprotector	3.488 ml.
Volumen total de semen + diluyente-crioprotector	23.381 ml.
Número de pajillas de 0.5 ml c/u	42
Número de pajillas por tratamiento (6 tratamientos con 7 repeticiones c/u.	7

Tabla 3. Evaluación de la motilidad del semen de Tilapia , antes y después de la congelación en nitrógeno líquido.

Nº de repeticiones	D M S O		DMSO + GLUCOSA		ETILEN GLICOL		ETILEN GLICOL + GLUCOSA		GLICEROL		GLICEROL + GLUCOSA	
	% de motilidad precongelación	% de motilidad postcongelación	% de motilidad precongelación	% de motilidad postcongelación	% de motilidad precongelación	% de motilidad postcongelación	% de motilidad precongelación	% de motilidad postcongelación	% de motilidad precongelación	% de motilidad postcongelación	% de motilidad precongelación	% de motilidad postcongelación
1	94	35	94	35	97	55	94	45	94	20	94	20
2	100	35	97	40	95	45	100	55	100	10	97	20
3	95	40	100	40	75	45	100	55	75	20	97	15
4	100	35	95	40	95	50	95	50	100	10	95	15
5	95	38	95	35	95	55	95	55	95	20	100	15
6	75	30	95	40	95	55	95	60	100	10	95	25
7	99	40	95	40	95	45	100	55	95	15	90	25
Media	94	36.1	95.9	38.6	92.4	50	97	53.6	94.1	15	95.4	19.3

Tabla 4. Evaluación de la viabilidad del semen de Tilapia antes y después de la congelación en nitrógeno líquido.

N° de repeticiones	D M S O		DMSO + GLUCOSA		ETILEN GLICOL		ETILEN GLICOL + GLUCOSA		GLICEROL		GLICEROL + GLUCOSA	
	% de viabilidad precongelación	% de viabilidad postcongelación	% de viabilidad precongelación	% de viabilidad postcongelación	% de viabilidad precongelación	% de viabilidad postcongelación	% de viabilidad precongelación	% de viabilidad postcongelación	% de viabilidad precongelación	% de viabilidad postcongelación	% de viabilidad precongelación	% de viabilidad postcongelación
1	88	85	88	87	88	80	91	90	88	85	88	82
2	96	95	91	90	96	90	82	80	96	70	91	90
3	96	95	98	95	98	90	80	80	80	69	91	90
4	100	87	95	92	82	80	95	95	90	82	95	94
5	82	80	95	90	90	89	95	95	90	87	95	94
6	80	83	90	88	90	86	95	92	90	90	95	94
7	90	90	95	89	90	90	95	93	95	82	95	91
Media	90.3	87.9	93.1	90.1	90.9	86.4	90.4	89.3	82.6	80.7	92.9	90.7

Tabla 5. Evaluación de la morfología del semen de Tilapia, antes y después de la congelación en nitrógeno líquido.

Nº de repeticiones	D M S O		DMSO + GLUCOSA		ETILEN GLICOL		ETILEN GLICOL + GLUCOSA		GLICEROL		GLICEROL + GLUCOSA	
	% de morfología precongelación	% de morfología postcongelación	% de morfología precongelación	% de morfología postcongelación	% de morfología precongelación	% de morfología postcongelación	% de morfología precongelación	% de morfología postcongelación	% de morfología precongelación	% de morfología postcongelación	% de morfología precongelación	% de morfología postcongelación
1	10	15	10	10	10	10	12	17	10	15	10	12
2	10	10	12	12	10	10	5	5	10	15	12	12
3	10	10	15	15	15	18	15	17	15	22	12	14
4	15	20	10	15	5	8	10	10	7	15	10	-
5	5	6	10	-	6	12	10	-	7	10	5	7
6	15	15	10	13	6	10	10	-	5	10	5	7
7	7	8	10	12	7	10	10	10	5	-	5	-
Media	10.3	12	11	12.8	8.4	11.1	10.3	11.8	8.4	14.5	8.4	10.4

NOTA: El porcentaje de morfología hace referencia a el porcentaje de anomalidades.

Tabla 6. Transformación: Arcosen $\sqrt{1-\%}$ en motilidad precongelación.

REPETICIONES		2	3	4	5	6	7	TOTAL	PROMEDIO
TRATAMIENTO									
DMSO	0.247	0.078	0.226	0.078	0.226	0.524	0.1	1.479	0.211286
DMSO+GLUCOSA	0.247	0.174	0.078	0.226	0.226	0.226	0.226	1.403	0.200429
ETILENGLICOL	0.174	0.226	0.524	0.226	0.226	0.226	0.226	1.828	0.261143
ETILENGLICOL+ GLUCOSA	0.247	0.078	0.078	0.226	0.226	0.226	0.078	1.159	0.165571
GLICEROL	0.247	0.078	0.524	0.078	0.226	0.078	0.226	1.457	0.208143
GLICEROL+ GLUCOSA	0.247	0.174	0.174	0.226	0.078	0.226	0.322	1.447	0.206714
Suma								8.773	

$$\Sigma x^2 = 2.344$$

$$SC_{\text{TOTALES}} = 2.344 - 1.833 = 0.511$$

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = 1.865 - 1.833 = 0.032$$

$$SC_{\text{ERROR}} = 0.511 - 0.032 = 0.479$$

Tabla 6.1. Análisis de Varianza

Fuente de varciación	GL	SC	CM	F Observado FC	F requerido F 0.05 F0.01
Tratamientos	5	0.032	0.006	0.462 N.S.	2.48 3.58
Error	36	0.479	0.013		
Total	41	0.511			

No hay diferencia significativa entre tratamientos.

Tabla 7. Transformación: Arcoseno $\sqrt{1-\%}$ en motilidad postcongelación.

REPETICIONES	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL	PROMEDIO
TRATAMIENTO									
DMSO	0.633	0.633	0.685	0.633	0.664	0.58	0.685	4.513	0.644710
DMSO+GLUCOSA	0.633	0.685	0.685	0.685	0.633	0.685	0.685	4.691	0.670143
ETILENGLICOL	0.835	0.735	0.735	0.785	0.835	0.835	0.735	5.495	0.785000
ETILENGLICOL+ GLUCOSA	0.735	0.835	0.835	0.785	0.835	0.886	0.835	5.746	0.820857
GLICEROL	0.464	0.322	0.464	0.322	0.464	0.322	0.398	2.756	0.393714
GLICEROL+ GLUCOSA	0.464	0.464	0.398	0.398	0.398	0.524	0.524	3.17	0.452857
Suma								26.371	

$$\Sigma X^2 = 17.695$$

$$SC_{\text{TOTALES}} = 7.695 - 16.558 = 1.137$$

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = 17.604 - 16.558 = 1.046$$

$$SC_{\text{ERROR}} = 1.137 - 1.046 = 0.091$$

Tabla 7.1. Análisis de Varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Observado FC	F requerido F0.05 F0.01
Tratamientos	5	1.046	0.209	69.667**	2.48 3.58
Error	36	0.091	0.003		
Total	41	1.137			

** La diferencia significativa entre los tratamientos es muy marcada tanto a nivel de 0.05 como 0.01.

Tabla 7.2. Contrastes Ortogonales

	DMSO	DMSO + glucosa	Etilen- Glicol	Etilen- Glicol + Glucosa	Glicerol	Glicerol + Glucosa					
Comparación	4.513	4.691	5.495	5.746	2.756	3.170	ΣC_i^2	Q ²	FC	F0.05	F0.01
Glucosa Vs No Glucosa	-1	+1	-1	+1	-1	+1	8	0.711	5.848 *	4.11	7.39
Etilenglicol Vs(DMSO+ Glicerol)/2	-1	-1	+2	+2	-1	-1	12	54.652	214.492**	4.11	7.39
DMSO Vs Glicerol	+1	+1	0	0	-1	-1	4	16.745	127.828**	4.11	7.39
Interacción	+1	-1	0	0	-1	+1	4	0.058	0.663 N.S.	4.11	7.39
Etilenglicol Vs Etilenglicol con Glucosa	0	0	+1	-1	0	0	2	0.063	1.69 N.S.	4.11	7.39

* Hay respuesta a la adición de glucosa a el nivel de 0.05

** Definitivamente el Etilenglicol es superior que el DMSO y el Glicerol a 0.05 y 0.01

** Evidentemente el DMSO es mucho mejor que el Glicerol a 0.05 y 0.1

Tabla 8. Transformación: Arcoseno $\sqrt{1-\%}$ en viabilidad precongelación.

REPETICIONES	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL	PROMEDIO
TRATAMIENTO									
DMSO	0.354	0.201	0.201	0.078	0.438	0.464	0.322	2.058	0.294000
DMSO+GLUCOSA	0.354	0.305	0.142	0.226	0.226	0.322	0.226	1.801	0.257286
ETILENGLICOL	0.354	0.201	0.142	0.438	0.322	0.322	0.322	2.101	0.300143
ETILENGLICOL+ GLUCOSA	0.305	0.438	0.464	0.226	0.226	0.226	0.226	2.111	0.301571
GLICEROL	0.354	0.201	0.464	0.322	0.322	0.322	0.226	2.211	0.315857
GLICEROL+ GLUCOSA	0.354	0.305	0.305	0.226	0.226	0.226	0.226	1.868	0.266857
Suma								12.15	

$$\Sigma x^2 = 3.871$$

$$SC_{\text{TOTALES}} = 3.871 - 3.515 = 0.356$$

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = 3.532 - 3.515 = 0.017$$

$$SC_{\text{ERROR}} = 0.356 - 0.017 = 0.339$$

Tabla 8.1. Análisis de Varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Observado FC	F requerido FO.05	F0.01
Tratamiento s	5	0.017	0.003	.333 N.S.	2.48	3.58
Error	36	0.339	0.009			
Total	41	0.336				

No hay diferencia significativa entre tratamientos a nivel de 0.05 y 0.01

Tabla 9. Transformación: Arcoseno $\sqrt{1-\%}$ en viabilidad postcongelación.

REPETICIONES	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL	PROMEDIO
TRATAMIENTO									
DMSO	0.398	0.226	0.226	0.369	0.464	0.425	0.322	2.43	0.347143
DMSO+GLUCOSA	0.369	0.322	0.226	0.287	0.322	0.354	0.338	2.218	0.316857
ETILENGLICOL	0.464	0.322	0.322	0.464	0.338	0.383	0.322	2.615	0.373571
ETILENGLICOL+ GLUCOSA	0.322	0.464	0.464	0.226	0.226	0.287	0.268	2.257	0.322429
GLICEROL	0.398	0.58	0.591	0.438	0.369	0.322	0.438	3.136	0.448000
GLICEROL+ GLUCOSA	0.458	0.322	0.322	0.247	0.247	0.247	0.305	2.148	0.306857
Suma								14.804	

$$\Sigma x^2 = 5.567$$

$$SC_{\text{TOTALES}} = 5.567 - 5.218 = 0.349$$

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = 5.315 - 5.218 = 0.097$$

$$SC_{\text{ERROR}} = 0.349 - 0.097 = 0.252$$

Tabla 9.1. Análisis de Varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Observado FC	F requerido F0.05 F0.01
Tratamientos	5	0.097	0.019	2.714 *	2.48 3.58
Error	36	0.252	0.007		
Total	41	0.349			

*Si hay diferencias significativas entre tratamientos a nivel de 0.05

Tabla 9.2. Contrastes Ortogonales

	DMSO	DMSO + glucosa	Etilen- glicol	Etilen- Glicol + Glucosa	Glicerol	Glicerol + Glucosa					
Comparación	2.43	2.218	2.615	2.157	3.136	2.148	ΣC_i^2	Q ²	FC	FO.05	F0.01
Glucosa Vs No Glucosa	-1	+1	-1	+1	-1	+1	8	2.748	0.288**	4.11	7.39
Etilenglicol Vs(DMSO+ Glicerol)/2	-1	-1	+2	+2	-1	-1	12	0.151	0.288 N.S.	4.11	7.39
DMSO Vs Glicerol	+1	+1	0	0	-1	-1	4	0.405	2.98 N.S.	4.11	7.39
Interacción	+1	-1	0	0	-1	+1	4	0.002	3.143 N.S.	4.11	7.39
Etilenglicol Vs Etilenglicol con Glucosa	0	0	+1	-1	0	0	2	0.1208	1.143 N.S.	4.11	7.39

**Evidentemente si se presenta una respuesta positiva a la glucosa a nivel de 0.05 y 0.01

Tabla 10. Transformación: A sen $\sqrt{1-\%}$ en Morfología precongelación.

REPETICIONES	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL	PROMEDIO
TRATAMIENTO									
DMSO	0.322	0.322	0.322	0.398	0.226	0.398	0.268	2.256	0.322286
DMSO+GLUCOSA	0.322	0.354	0.398	0.322	0.322	0.322	0.322	2.362	0.337429
ETILENGLICOL	0.322	0.322	0.398	0.226	0.247	0.247	0.268	2.03	0.290000
ETILENGLICOL+ GLUCOSA	0.354	0.226	0.398	0.322	0.322	0.322	0.322	2.266	0.323714
GLICEROL	0.322	0.322	0.398	0.368	0.368	0.226	0.226	2.23	0.318571
GLICEROL+ GLUCOSA	0.322	0.354	0.354	0.322	0.226	0.226	0.226	2.03	0.290000
Suma								13.174	

$$\Sigma x^2 = 4.263$$

$$SC_{\text{TOTALES}} = 4.263 - 4.132 = 0.131$$

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = 4.145 - 4.132 = 0.013$$

$$SC_{\text{ERROR}} = 0.131 - 0.013 = 0.118$$

Tabla 10.1. Análisis de Varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Observado FC	F requerido F0.05 F0.01
Tratamientos	5	0.013	0.003	1.00 N.S.	2.48 3.58
Error	36	0.118	0.003		
Total	41	0.131			

Tabla 11. Transformación: A sen $\sqrt{1-\%}$ en morfología postcongelación.

REPETICIONES	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL	PROMEDIO
TRATAMIENTO									
DMSO	0.398	0.322	0.322	0.464	0.247	0.398	0.287	2.438	0.348286
DMSO+GLUCOSA	0.322	0.354	0.398	0.398		0.369	0.354	2.195	0.365833
ETILENGLICOL	0.322	0.322	0.438	0.287	0.354	0.322	0.322	2.367	0.338143
ETILENGLICOL+ GLUCOSA	0.425	0.226	0.425	0.322			0.322	1.72	0.344000
GLICEROL	0.398	0.398	0.488	0.398	0.322	0.322		2.326	0.387667
GLICEROL+ GLUCOSA	0.354	0.354	0.383		0.268	0.268		1.627	0.325400
Suma								12.673	

$$\Sigma X^2 = 4.586$$

$$SC_{\text{TOTALES}} = 4.586 - 4.461 = 0.125$$

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = 4.475 - 4.461 = 0.014$$

$$SC_{\text{ERROR}} = 0.125 - 0.014 = 0.111$$

Tabla 11.1. Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Observado FC	F requerido F0.05 F0.01
Tratamientos	5	0.014	0.017	5.667 **	2.53 3.70
Error	30	0.111	0.003		
Total	35	0.125			

**Si hay diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de 0.0.5 y 0.01

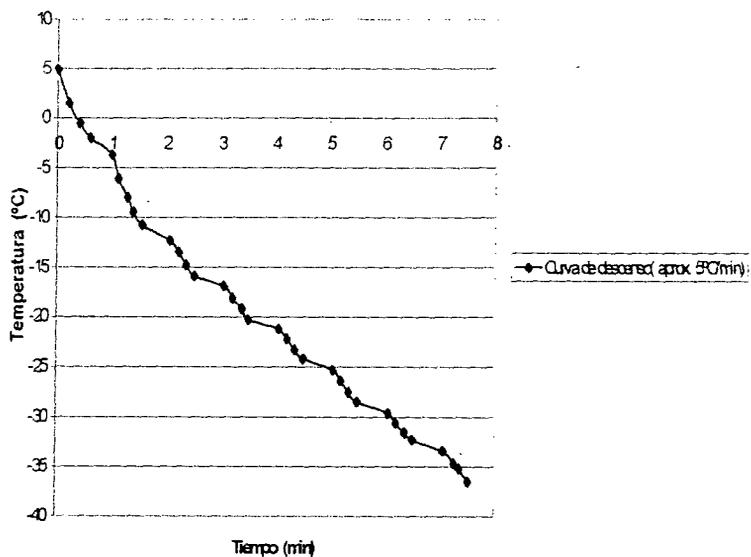
Tabla 11.2. Contrastes Ortogonales

	DMSO	DMSO + glucosa	Etilen- Glicol	Etilen- Glicol + Glucosa	Glicerol	Glicerol + Glucosa	ΣC_i^2	Q^2	FC	F0.05	F0.01
Comparación	2.438	2.195	2.367	1.72	2.326	1.627					
Glucosa Vs No Glucosa	-1	+1	-1	+1	-1	+1	8	2.525	20 **	4.17	7.58
Etilenglicol Vs (DMSO+ Glicerol)/2	-1	-1	+2	+2	-1	-1	12	0.199	0.007 N.S.	4.17	7.58
DMSO Vs Glicerol	+1	+1	0	0	-1	-1	4	0.482	0.007 *	4.17	7.58
Interacción	+1	-1	0	0	-1	+1	4	0.208	2.223 N.S.	4.17	7.58
Etilenglicol Vs Etilenglicol con Glucosa	0	0	+1	-1	0	0	2	0.418	18 ***	4.17	7.58

** Si se presenta respuesta positiva a la adición de glucosa a nivel de 0.05 y 0.01

*Evidentemente el DMSO es mejor que el Glicerol a un nivel de significancia de 0.05

**Definitivamente el Etilenglicol+glucosa presenta mejor respuesta que el Etilenglicol a nivel de 0.0.5 y 0.01



Gráfica 1. La curva de congelación muestra la curva de descenso de la temperatura a la que se sometieron las pajillas, dicha curva fue la óptima, ya que presentó los mejores resultados para el congelamiento de semen, esta se realizó cuidando los cambios térmicos iniciándose con la solidificación, pasando a vapores de nitrógeno y posteriormente estas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) el tiempo que permanecieron las pajillas fue durante dos semanas.

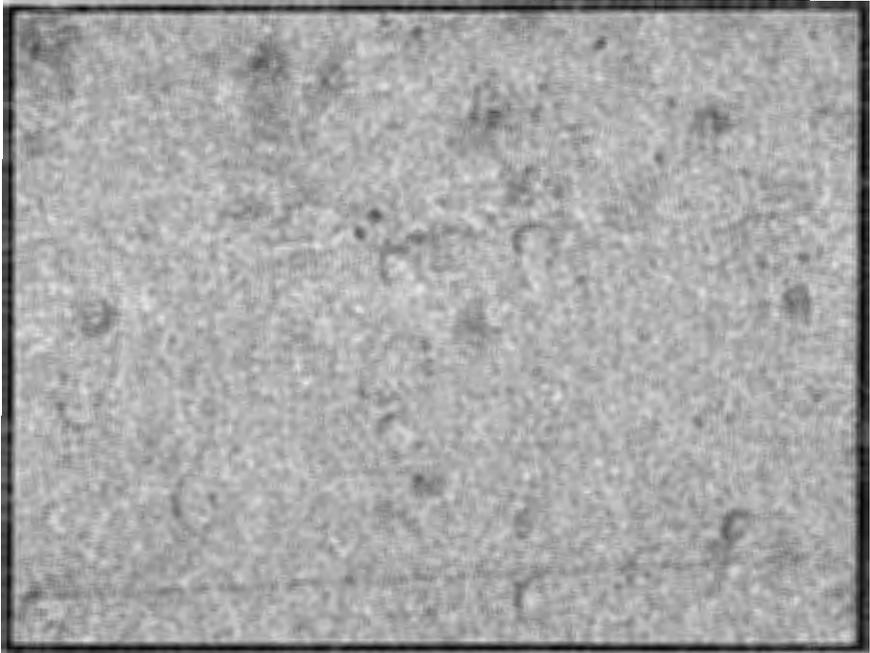


Figura 1. Muestra la imagen de espermatozoides de Tilapia (*Oreochromis spp*) sometidos a procesos criogénicos donde son evaluados para su motilidad. Amplificación 100X.

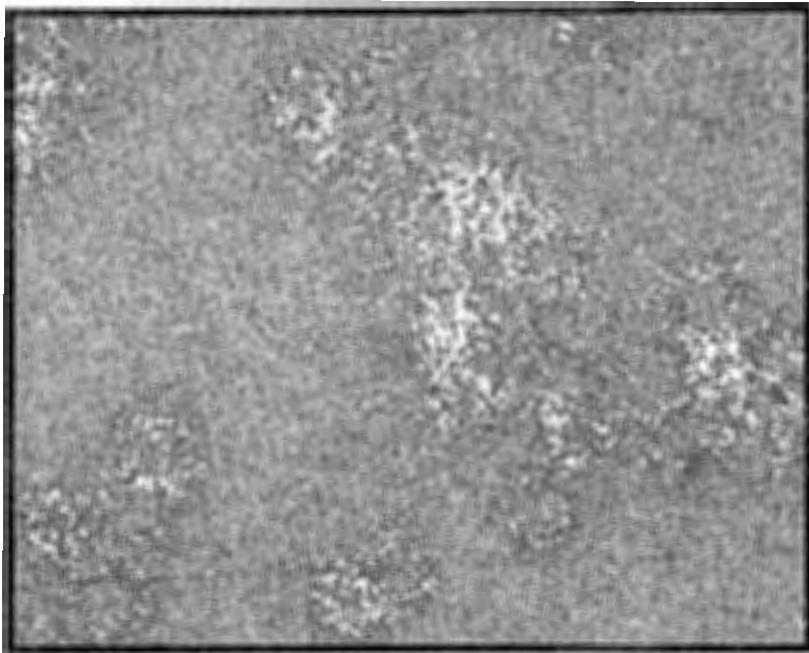


Figura 2. Esta imagen muestra la viabilidad de los espermatozoides de Tilapia (*Oreochromis spp*) criopreservados. Las células vivas permanecieron sin teñir. Amplificación 100X.

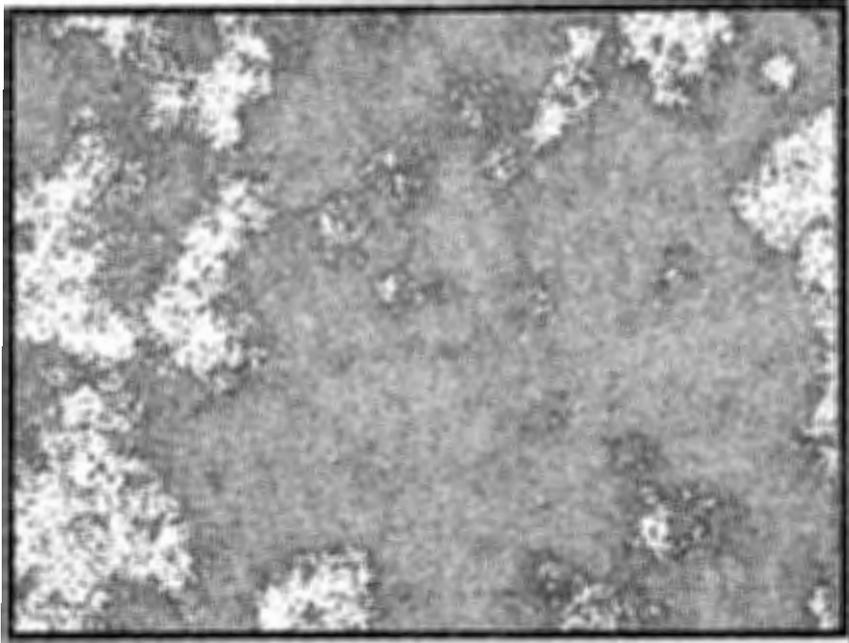
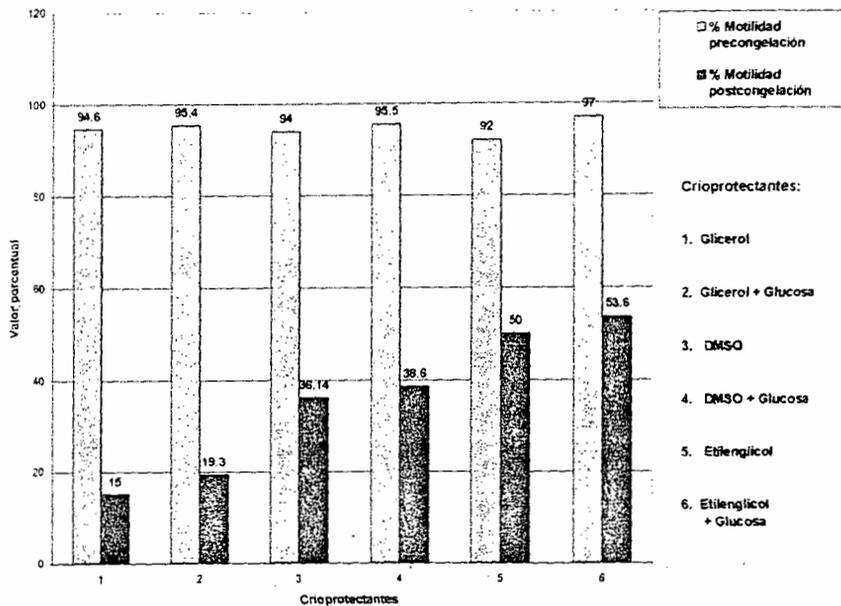
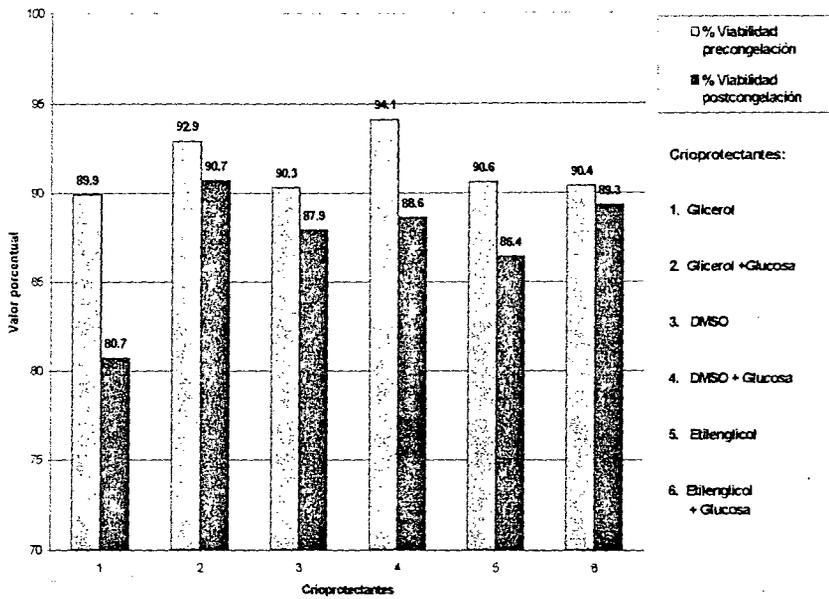


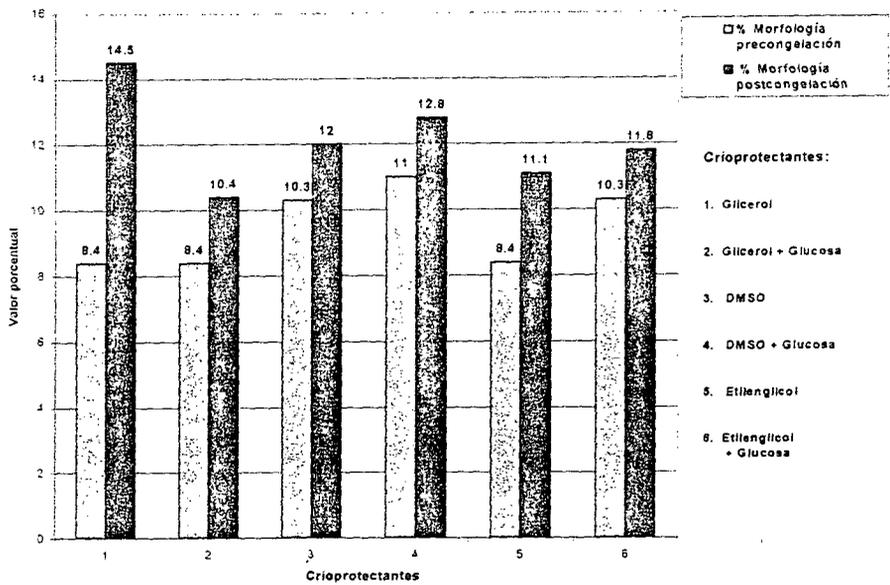
Figura 3. Esta imagen muestra la morfología de espermatozoides de Tilapia (*Oreochromis spp*) sometidos a criopreservación. Amplificación 100X.



Gráfica 2. Comparación de los resultados en la motilidad.



Gráfica 3. Comparación de los resultados en viabilidad.



Gráfica 4. Comparación de los resultados en morfología.

DISCUSIÓN

En la Tabla No. 1 presenta un incremento significativo en el número de espermatozoides por ml. De las dos últimas muestras, esta diferencia es debida probablemente, a la utilización de un mayor número de machos reproductores además de que estos organismos presentaron mayor talla y peso, teniendo un promedio 30 cm de longitud total, y un peso de 470 gr. a comparación de los ejemplares utilizados en las muestras anteriores, presentaron un promedio de 26.46 cm de longitud total y un peso de 314.06 gr. Cabe mencionar que además de la técnica de conteo directo de células (técnica de Coffin) existen otras técnicas con mayor grado de confiabilidad para el conteo espermático tales como colorímetro fotoeléctrico y el contador electrónico de Partículas citados por Bearden en 1982.

Cuando se practicó la prueba de motilidad se observó una disminución de movimiento a mayor tiempo transcurrido desde la colecta, además en el método que se utilizó para extraer el semen (aspiración de esperma mediante jeringa y aguja de punta roma), se tuvo contacto directo con oxígeno y este gas debilita a los espermatozoides para reanimarlos, se utilizó la solución fertilizante de Woynarovich y Harváth, debido a que sus componentes activan a las mitocondrias del espermatozoide por el disparo intracelular de AMPc y por el decremento de K^+ y se observó la activación inmediata de los espermatozoides, lo cual reafirma lo dicho por Rodríguez, 1992.

De acuerdo a Rodríguez, 1992¹, la motilidad en solución fertilizante de 240-360 segundos y densidades cercanas a 1 son los dos factores principales a tomar en cuenta en la criopreservación; Kurokura, 1984 recomienda utilizar semen que presente alta motilidad, para pruebas de criopreservación y afirma que por esto presenta mayor poder fecundante; las muestras de semen de los reproductores presentó ésta característica y se puede observar que la motilidad mayor corresponde a organismos cuya densidad de semen tiene valores cercanos a 1, como se observa en la Tabla No. 1.

Se ha utilizado el porcentaje de espermatozoides vivos en una muestra como verificación de la motilidad, al aplicar la prueba de viabilidad se debe tener cuidado en el tiempo que transcurra desde el momento en que se obtiene el semen, así como el tiempo de secado de las laminillas ya que si se permiten que estas sequen lentamente, algunos espermatozoides mueren y son teñidos antes de que se termine el proceso de secado, ocasionado con dichos factores una indicación falsa del porcentaje de espermatozoides vivos. El porcentaje de células vivas siempre será mayor que el porcentaje de motilidad (Bearden, 1982); tomando en cuenta lo anterior y comparándolo con los resultados observados en la Tabla No. 1, donde se observa una diferencia de 7 de 11 en que la viabilidad es menor que la motilidad lo cual indica el hecho de que la motilidad fue tomada inmediatamente después de la extracción del semen y tomando en cuenta que todas las pruebas fueron realizadas por una sola persona, el tiempo transcurrido entre una prueba y otra es el que induce este rango de error.

Generalmente en las muestras de semen se pueden tener desde 5% espermatozoides anormales hasta llegar a casi 100% en caso extremo, sin embargo la fertilidad se ve afectada cuando el número de espermatozoides anormales es mayor al 20 o 25% de acuerdo a Bearden, 1982, en relación a lo dicho anteriormente en la tabla No. 1 se observó un porcentaje aceptable de anomalías obteniendo un promedio de 10% en total, presentándose como anomalía más frecuente la presencia de gotas citoplásmicas en cabeza y cuerpo del espermatozoide, lo cual puede estar asociado con espermatozoides inmaduros, ya que las gotas citoplásmicas se forman en el cuello de los espermatozoides durante la espermiogénesis (Bearden, 1982); con menor frecuencia se observaron espermatozoides con desprendimiento de flagelos, al parecer ocasionados por daño mecánico el cual pudo ser ocasionado al manipular el semen (Salisbury, 1978).

En la Tabla No. 2 se presenta por un resumen de las características totales del semen antes de criopreservarlo, la cantidad de diluyente y crioprotector fueron determinadas en relación a la cantidad total de semen recolectada, tomando en cuenta los porcentajes recomendados por Kurokura et al 1984, (Stoss, 1983 y Billard 1980 citados en García 1991 y Rodríguez, 1992); la relación entre semen, diluyente y crioprotector fue de 20%, 65% y 15% respectivamente. En dicha Tabla también se cita el número total de viales con .5 ml c/u utilizados este a su vez dependió del volumen total de semen, diluyente y crioprotector, los viales consisten en pipetas plásticas de .5 ml con 113 mm de largo y un diámetro de 2.8 mm, la cual es recomendada por Bearden, 1982, quienes mencionan que la mayor parte de estudios indica que la pipeta tiene la ventaja de incrementar la supervivencia de los espermatozoides, en comparación con otros tipos de viales, otra ventaja es el menor espacio que ocupa al almacenarse en una unidad de campo o congelación (termo de NL) confirmado por Salisbury en 1978 De las 42 pajillas 7 correspondieron a cada tratamiento (6 tratamiento).

Después de mezclar y sellar las pajillas se introdujeron estas en un refrigerador a 5°C temperatura recomendada por diversos autores Bearden, 1982. Deruvaux, 1985 y Salisbury, 1978; para que se lleve a cabo el proceso de equilibrio el semen permaneció en el refrigerador 45 minutos, tiempo suficiente para que los espermatozoides establezcan contacto con el crioprotector y este comience a actuar, cada tratamiento corresponde a una combinación diferente de crioprotectantes.

Las Tablas No. 3, 4 y 5 hacen referencia a cada uno de los tratamientos y los resultados en motilidad, viabilidad y morfología respectivamente en la pre y postcongelación, Las pruebas de motilidad y viabilidad después de la congelación fueron las determinantes en la calidad de semen postcongelación. Aún cuando la fertilización es el último criterio para determinar la calidad del esperma criopreservado de acuerdo con Yoo, 1987 y Whittler, 1982, es también una prueba poco practicada debido a la escasa disponibilidad de óvulos, ya que esta es restringida por la temporada reproductiva de la especie.

En este trabajo se tomo las pruebas de motilidad y viabilidad como parámetros determinantes para el evaluar el éxito de la criopreservación(Ver gráfica 2 y gráfica 3). Los resultados más bajos corresponden a el glicerol con 15% y 80.7% respectivamente, lo anterior probablemente se debe a la densidad del glicerol, ya que las muestras obtenidas presentaron la apariencia de viscosidad, de acuerdo a Yoo, 1987, En estudios realizados en Salmon relativo a el daño ocasionado por la pérdida de proteínas reportando que el mayor porcentaje de daño se presento en las muestras donde se utilizo el crioprotectante glicerol, en comparación con el DMSO, el cual presento menor daño celular.

El glicerol+glucosa mostró mejoría, pero aun así presentó resultados muy bajos en motilidad (19.3%), Cabe mencionar que en los ensayos en que se adiciono glucosa se registro un incremento de la motilidad, esto debido al papel que desempeña la glucosa como estabilizador de la presión osmótica y como fuente de energía como señala Rodríguez, 1992¹. La viabilidad en este caso fue de 90.7%

Para el ensayo con DMSO se presentó una motilidad postcongelación de 36.14% y de 38.6% al adicionar glucosa, la viabilidad fue de 87.9% y 88.6% respectivamente; estos resultados así como también los obtenidos en la motilidad son comparables a los obtenidos por Harvy y Kelly, 1988, al criopreservar semen de Tilapia (*Oreochromis mosambicus*) utilizando metanol al 5% como crioprotectante intracelular y leche descremada al 15% como crioprotectante extracelular, obteniendo una motilidad de 39.2% de un número total de muestras de 60.

Los mejores resultados para la motilidad después de la congelación se obtuvieron al utilizar el crioprotectante etilenglicol presentando 50% y 53.6% al adicionar glucosa, la viabilidad fue de 86.4% y 89.

Al comparar los resultados de los 6 tratamientos respecto al descenso de la viabilidad postcongelación se observó cambios mínimos), lo cual indica que mientras que en la motilidad se presenta un cambio muy drástico al comparar los diferentes ensayos, la viabilidad presenta un rango mínimo de cambio. fenómeno que se confirma al observar la gráfica 3, correspondiente a la prueba de morfología. en relación a lo antes mencionado se observa que el proceso de criopreservación afecta en mayor proporción la motilidad de el espermatozoide.

Al evaluar los diferentes tratamientos por medio del método estadístico de análisis de varianza (ANOVA) se encontró que tanto en las pruebas de motilidad viabilidad y morfología precongelación no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que en estas mismas pruebas en la postcongelación si presentaron diferencias significativas por lo que se aplico la prueba de contrastes ortogonales para especificar dichas diferencias.

En las Tablas 7.1 y 7.2 correspondiente a la motilidad postcongelación, se observó una diferencia muy marcada entre tratamientos, pudiendo precisar que el mejor crioprotactante es el Etilenglicol luego el DMSO y el peor el Glicerol, también se puede apreciar una ligera diferencia al adicionar Glucosa, sin embargo solo es apreciado al 95% de confiabilidad.

En las Tablas 9.1 y 9.2 correspondientes a la viabilidad postcongelación se observó un diferencia significativa al 95% de confiabilidad, sin embargo al 99% no hay diferencias significativas, debido a esto al aplicar los contrastes ortogonales sólo se aprecia una diferencia significativa en relación a la adición de glucosa a los tratamientos esto tanto al 95% y 99% de confiabilidad.

En las Tablas 11.1 y 11.2 correspondientes a la morfología postcongelación se observó una diferencia significativa entre tratamientos, apreciándose que el crioprotectante que presento menores anomalidades es el DMSO a una confiabilidad del 95% sin embargo al 99% no has diferencias significativas, también se observó una marcada diferencia en la adición de glucosa en los tratamientos hasta el 99% de confiabilidad asi como una diferencia marcada entre etilenglicol y etilenglicol + glucosa.

CONCLUSIONES

1. La utilización de la técnica de criopreservación es una alternativa viable para optimizar el manejo de la reproducción de especies de importancia comercial como *Oreochromis spp.*
2. La prueba de viabilidad para espermatozoides criopreservados, no presenta cambios significativos durante los seis tratamientos.
3. El mayor porcentaje de motilidad en semen criopreservado es observado con etilenglicol + glucosa.
4. En los tratamientos en donde se adicionó el crioprotectante extracelular glucosa, se obtuvo un incremento en motilidad, viabilidad y morfología, a comparación en los que solo se usó el crioprotectante intracelular.
5. La curva de óptima de congelación se obtuvo mediante una congelación suave a un descenso de temperatura de aproximadamente 5°C.

GLOSARIO

- Acrosoma.-** Estructura en forma de casquete que cubre la cabeza del espermatozoide.
- Alevin.-** Estadio inmediato a la eclosión, en este estadio el pez aun conserva su saco vitelino.
- Andrógenos.-** (Gr. *andros* hombre y *gennan* producir). Cualquier sustancia que posee actividades masculinizantes, como testosterona o cualquier otra de las hormonas sexuales masculinas.
- Axon.-** (Gr. *axon* eje). Fibra nerviosa que conduce impulsos en dirección opuesta al cuerpo de la célula.
- Canulación.-** Acción de canular. Entubar.
- Corion.-** Membrana extraembrionaria en reptiles, aves y mamíferos que forma la cubierta externa alrededor del embrión y en los mamíferos contribuye a la formación de la placenta.
- Criofractura.-** Fractura provocada por frío.
- Crioscópico.-** Punto de congelación.
- Crioprotector.-** Sustancia que proporciona protección contra la congelación y descongelación.
- Cristalización.-** Acción de cristales.
- Desove.-** Puesta de huevos de ciertos peces y anfibios.
- Enfriamiento.-** Es el proceso de cambio de estado de un objeto o sustancia producto de la extracción del calor o disminución de la temperatura.
- Epicontinental.-** Relativo a lo que se encuentra dentro del continente.
- Espermatogénesis.-** Proceso mediante el cual se lleva a cabo la producción de espermatozoides.
- Esteroides.-** Compuestos que contiene un sistema cíclico de pentanohidrofenanteno. Existen en la mayoría de las plantas y animales. En los animales son esenciales para el funcionamiento del organismo. Este grupo comprende las hormonas sexuales, ácidos biliares, etc.
- Fotoperiodo.-** Cambios que ocurren entre la duración del día y la noche (luz y oscuridad).
- Fecundidad relativa.-** Es el número de huevos por unidad de peso corporal.
- Gametogénesis.-** Producción de células germinativas especializadas, también llamadas gametos.
- Germoplasma.-** Relativo a las células germinales como: espermatozoides, óvulos, embriones esporas, tejidos germinales, etc.
- Heterosexual.-** Individuo atraído por individuos del sexo opuesto.
- Hipófisis.-** (Gr. *hypophysis* crecimiento por debajo). Pequeña glándula situada por debajo del encefalo y produce numerosas hormonas.
- Hipotálamo.-** (Gr. *hypo* debajo y *thalamos* cámara interior). Región del cerebro anterior. suelo del tercer ventrículo, que contiene varios centros para controlar actividades viscerales, equilibrio del agua, temperatura, sueño etc.
- Maduración sexual.-** Es la capacidad de reproducirse.
- Micropilo.-** Pequeño poro u orificio presente en los óvulos de los peces y lugar por donde penetra el espermatozoide.
- Permeable.-** (Lat. *permeabilis* penetrable). Que se deja atravesar por cuerpos fluidos y radiaciones.
- Pineal.-** Glándula pequeña ovalada que se encuentra delante del cerebro.
- Teleósteo.-** (Gr. *tele* extremo y *osteon* hueso). Miembro de los grupos más avanzados de peces actinoptérgios; incluye casi todas las especies conocidas.

LITERATURA CITADA

- Arredondo F. J. L., et al. 1994. **Desarrollo científico y tecnológico de genoma de Tilapia**. Secretaría de Pesca. Ed. U.A.M.I. México, D.F. 89pp.
- Arredondo F. J. y S. Lozano G. 1996. **El cultivo de Tilapia en México**. Primer curso internacional de producción de Tilapia, de la Facultad de Medicina Veterinaria U.A.M.I.-U.N.A.M. México, D.F. pag. 7-18.
- Bearden, H.J. y J.W. Funquay, 1982., **Reproducción animal aplicada**. Ed. El Manual Moderno, México, D. F., 358pp.
- Billard, R. 1988. **Artificial insemination and gamete management in fish**. Marine Behaviour and physiology , París, pág. 3-21.
- Brown, G.G. 1997. **Fertilization of eggs with crypreserved milt of paddlefish, *Polydon spatula*, and some insinghts on future cryopreservation approaches**. World Aquaculture Society book of abstracts. Washigton, U.S.A.
- Caffey, H. R. And Tiersch. 1997 **Cost analysis of integration cryopreservation into an existing hatchery**. World Aquaculture Society book of abstracts. Washigton, U.S.A.
- Cloud, G.J., W. H. Miller y M.J. Levanduski, 1990. **Cryopreservation of sperm means to store salmonid germ plasm and trasfer genes from wild fish to hatcery population**. The Progressive Fish-Culturist 52:51-53.
- Cloud. G.J. 1997. **Cryopreservation of salmonid sperm: utility and the precautions**. World Aquaculture Society book of abstracts. Washigton, U.S.A.

- Coffin, L. 1986. **Laboratorio clínico en medicina veterinaria**. La Prensa Médica Mexicana. México. 334pp.
- Derivaux, J. 1985. **Reproducción de los animales domésticos**. Ed. Acribia. España. 486pp.
- Figiel, R. C. And Tiersch, T.R.1997. **Comprehensive literature review of fish sperm cryopreservation**. World Aquaculture Society book of abstracts. Washigton, U.S.A.
- Garcia Angel María Cristina., 1991., **Criopreservación de líquido seminal de *Cyprinus carpio specularis***. Ed. Casa abierta al tiempo., 39pp.
- Harvy, J.B., Kelly, N.R 1988. **Practical methods for chilled and frozen of Tilapia spermatozoa**. World Aquaculture Society book of abstracts. Washigton, U.S.A.
- Henderson E. N. And J.E. Dewar. 1957. **Short-term storage of brook trout milt**. The Progressive Fish-Culturist 169-171.
- Hepher, B. 1985, **Cultivo de peces comerciales**. Ed.. Limusa. 316pp.
- Kamar, K. 1987. **A comparative study of various extenders for cryopreservation of carp spermatozoa**. Indian J. of Animal Sciences. 58 (11): 1355-1360.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M. and Iwahashi, M., 1984. **Cryopreservation of carp sperm**. Aquaculture. 37:267-273.
- Little M. T. y Jackson H. F., 1976. **Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura**. Ed. Trillas. México, D.F. 270pp.
- Mace, F.T. and Harvey, J. 1994. **Estabilishing a gene bank for aquaculture in Colombia**. World Aquaculture 25(21)26-28.

- Martin, E., Espinoza, E. Y Josa, A. 1988. **Criopreservación en nitrógeno líquido de semen canino**. En: XII Jornadas Nacionales de A.V.P.A. Fac. Vet. UNAM. 157-163 p.
- Mattei, X. And Thiom, O. T. 1993. **Acrosome-like in the spermatozoa of teleosteos fish**. Can., J. Zool. 71:883-888
- Moore, A. A. 1987. **Short term storage and cryopreservation of walleye semen**. The progressive fish-culturist. Iowa,USA. 49: 40-43
- Morales, D. A. 1988. **Manual técnico para el cultivo de la Tilapia en los centros acuicolas de la Secretaría de Pesca**. 1^a edición. Secretaría de Pesca.
- Morales D. A. 1991. **La Tilapia en México**. Ed. AGT. México. 190pp.
- Purdon, E.C. 1990. **Genetic and Fish Breeding**. Ed. ELSEVIER.Netherlands. 340pp.
- Reyes, C. P. 1980. **Bioestadística Aplicada**. Edi. Trillas. México. D.F. 216pp.
- Rodríguez G. M. 1992. **Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gónadica en peces**. Ed.AGT. México. 65pp.
- Rodríguez G. M. 1992. **Temas actuales sobre reproducción en Téléosteos**. Pesca, Universidad Autonoma Metropolitana. México. D.F. 119pp.
- SEMARNAP., 1998. **Anuario Estadístico de Pesca**. México, D.F. 244pp
- Salisbury, G.W., 1978. **Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bovidos**. Segunda edición. Ed. Acribia. España. 831pp.
- Scheerer, D.P., G.H. Thotgaard. 1989. **Improve fertilization by cryopreserved rainbow trout semen treated with theophylline**. The Progressive Fish-Culturist 51:179-182.

- Stoss, J. 1986. **Cryopreservation of fish sperm-how good are present techniques.** International council for the exploration of the sea. Copenhagen. 5 pp.
- Suárez Madin, J. C. 1997. **Manual de Física de las bajas temperaturas.** La Habana, Cuba .
- Yoo, B. Y., Mary, A. R., y A. James., W. 1987. **Loss of protein from spermatozoa of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) because of criopreservación.** Can. J. Zool. Canada. 65: 9-13.
- Whitler, F., C. 1982. **Cryopreservation of spermatozoa of some freshwater fishes cultured in shouth and shoutheas Asia.** Aquaculture, 26: 395-398.

ANEXO I.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES.

Solución fertilizante

- Urea 3 g
- Cloruro de Sodio (NaCl) 4 g
- Agua destilada 1000 ml

Técnica de Bloom tomada de Lynch *et al* (1972) modificada por Rodríguez, 1992¹: Solución de eosina - nigrosina

- Citrato de sodio 1.45 g
- Eosina azulosa 0.835g
- Nigrosina 5.0 g
- Agua destilada 50 ml

Esta solución se prepara mezclando el citrato de sodio en el agua destilada, a la que se agrega la eosina azulosa y la nigrosina disolviéndola bien, se pone durante 20 minutos en baño María y se pasa por un filtro Watman del No. 1.

Solución alcohólica concentrada de eosina (Lynch *et al*., 1972) en Rodríguez, 1992¹:

- Eosina 1g
- Agua destilada 20 ml
- Alcohol absoluto 80 ml

La eosina se disuelve en el agua destilada. posteriormente se le agrega el alcohol.

Solución diluyente para conteo de esperatozoides (Coffin, 1986)

- Bicarbonato de sodio 5.0 g
- Formol 1 c³
- Agua destilada 100 c³

Solución diluyente para criopreservación

NaCl	440*
KaCl	62*
CaCl ₂	22*
MgCl ₂	8*
NaHCO ₃	20*

*Miligramos del compuesto en 100 ml. De solución buffer pH 7. (Kurokura, 1984).

ANEXO II

PREPARACION DE COLORANTES

Fucsina fenólica DE Ziehl Nielsen (Lynch *et al* 1972) en Rodríguez, 1992¹:

-Fucsina básica pulverizada	5.0 g
- Fenol	25 g
- Alcohol de 95 grados	50 ml
- Agua destilada	100 ml

Se disuelve la fucsina en fenol con un poco de agua en baño de agua hirviendo; se añade el alcohol y se mezcla, se agrega el resto de agua y se filtra antes de usar.

Azul de metileno de Loeffler (Lynch *et al.*,1982) en Rodríguez, 1992¹:

- Solución saturada de azul de metileno en alcohol	30 ml
- Solución de hidróxido de potasio (1 por 10 000) en agua	100 ml