



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Ensayos preliminares en la búsqueda de dilutores para el transporte y la criopreservación de espermatozoides de *Doncella Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855)

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en
Hidrobiología y Pesquería

AUTOR

Rubén Alexis BRICEÑO BERNAL

ASESOR

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Briceño, R. (2020). *Ensayos preliminares en la búsqueda de dilutores para el transporte y la criopreservación de espermatozoides de Doncella Pseudoplatystoma punctifer (Castelnau, 1855)*. Tesis para optar el título de Biólogo con mención en Hidrobiología y Pesquería. Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	0000-0002-0655-937X
DNI o pasaporte del autor	46796197
Código ORCID del asesor	0000-0002-8301-5536
DNI o pasaporte del asesor	06449624
Grupo de investigación	BIOTRA
Agencia financiadora	Perú Universidad Nacional Mayor de San Marcos Fondo de promoción de Trabajo de Tesis del Vicerrectorado de Investigación Aprobado con Código N° B18100504 con RR N°: 05969-R-18
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	- Perú, Huánuco, Leoncio Prado / Fundo ``El encanto de Saipay`` Huánuco (9°06'25.5"S 76°01'13.3"W) - Perú, Iquitos, Maynas, San Juan Bautista / Centro de Acuicultura ``Nuevo Horizonte`` Loreto (FONDEPES - IQUITOS) (4°04'17.4"S 73°26'45.6"W) -Perú, Ucayali, Coronel Portillo, Campo Verde / Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) Ucayali (8°38'28.9"S 74°57'04.0"W)
Disciplinas OCDE	Biología marina, Biología de agua dulce, Limnología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.12



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 11:00 horas del 29 de setiembre de 2020, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/gah-vwyy-osc>, el jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** de **RUBÉN ALEXIS BRICEÑO BERNAL**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **057-EPCB-2019**, el titulado expuso su tesis: **“ENSAYOS PRELIMINARES EN LA BÚSQUEDA DE DILUTORES PARA EL TRANSPORTE Y LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE DONCELLA *Pseudoplatystoma punctifer* (CASTELNAU, 1855)”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **Aprobado con máximos honores**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Hidrobiología y Pesquería** a **RUBÉN ALEXIS BRICEÑO BERNAL** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 12:50 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 29 de setiembre de 2020.

Mg. FERNANDO RETUERTO PRIETO
(PRESIDENTE)

Mg. GUILLERMO ALVAREZ BEJAR
(MIEMBRO)



UNMSM

Firmado digitalmente por VALDIVIA
CUYA Martha Esther FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 29.09.2020 13:11:15 -05:00

Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)

Blgo. MAX HIDALGO DEL AGUILA
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi madre Carolina, esto es por ti.

AGRADECIMIENTOS

A BIOAQUAL S.A.C y a SAN FERNANDO S.A, empresas que hicieron posible este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Fisiología de la Reproducción (LFR) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) que me acogió y permitió desarrollar mi investigación de principio a fin.

A mi querida asesora y segunda madre, Martha Valdivia, por su apoyo incondicional, por ver en mí lo que nadie pudo ver, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por estar siempre presente desde entonces en los momentos cruciales de mi vida, por sus consejos, conocimientos y por su plena confianza en mis capacidades.

A mi madre Carolina, mi abuela Melva y a mi hermano Franco, por estar a mi lado y guiarme en todo aspecto de mi vida y por confiar ciegamente en mí siempre.

A mis doncellas, Lourdes Fernández y Aracely Yarasca, por su apoyo desinteresado, por su buena predisposición en brindarme su valioso tiempo, por confiar en mi buen criterio, por las risas eternas y por soñar juntas conmigo en un brillante y exitoso futuro.

A Maria del Pilar Suarez y Andrea Pella, por estar pendientes siempre de mí y por la culminación de este trabajo, por hacer más llevadero mis días.

A la Doctora Guadalupe Contreras, al Biólogo Carlos Álvarez y al Profesor Guillermo Álvarez por el esfuerzo realizado en la obtención de muestras para el presente trabajo.

Al Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) en Pucallpa y a FONDEPES en Iquitos, por acogerme amablemente y brindarme la ayuda necesaria.

A todos quienes me apoyaron en las interminables amanecidas: Ian Lavado, Carmen Coveñas, Jorge Lazo y Josué Ventura. Les estaré eternamente agradecido.

Al Fondo de promoción de Trabajo de Tesis del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos aprobado con Código N° B18100504 con RR N°: 05969-R-18 sin el cual no hubiese podido culminar el presente trabajo de tesis de pregrado.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	2
2.1	Sistemática	2
2.2	Descripción especie	4
2.2.1	Distribución geográfica.....	4
2.2.2	Alimentación.....	5
2.2.3	Reproducción natural	5
2.2.4	Pesca.....	6
2.3	Criopreservación de espermatozoides de peces.....	6
2.3.1	Dilutores.....	8
2.3.2	Crioprotectores permeables	8
2.3.3	Crioprotectores no permeables	8
2.3.4	Tasa de congelamiento	8
2.3.5	Calidad espermática.....	9
2.3.6	Efectos de la crioconservación sobre la calidad espermática	9
2.3.7	Citotoxicidad de los dilutores.....	10
3.	HIPÓTESIS	10
4.	OBJETIVOS	10
4.1	Objetivo General	10
4.2	Objetivos Específicos.....	11
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1	Localización del área de muestreo.....	11
5.2	Material biológico	12

5.3	Material de Laboratorio	13
5.4	Reactivos e insumos	13
5.5	Metodología y plan de trabajo	14
5.5.1	Diagrama de flujo	14
5.5.2	Recolección de espermatozoides.....	15
5.5.3	Transporte de espermatozoides.....	15
5.5.4	Efecto de crioprotectores sobre la movilidad espermática	16
5.5.5	Congelamiento de gametos.....	16
5.5.6	Descongelado	17
5.5.7	Análisis de la muestra	17
6.	RESULTADOS.....	18
6.1	Parámetros espermáticos	18
6.2	Determinación de solución para el transporte de material espermático... 18	
6.3	Protocolo de manipulación de gónadas y extracción de espermatozoides	19
6.4	Parámetros espermáticos de muestra transportada.....	23
6.5	Pruebas específicas en muestras sin movilidad espermática (semen extraído a través de masajes abdominales).....	24
6.5.1	Criopreservación de semen sin movilidad espermática	25
6.6	Pruebas en muestras con movilidad espermática	27
6.6.1	Pruebas de citotoxicidad por 8 horas en espermatozoides con presencia de movilidad espermática.....	27
6.6.2	Criopreservación de espermatozoides con presencia de movilidad espermática.....	29

7.	DISCUSIÓN.....	33
8.	CONCLUSIONES.....	43
9.	RECOMENDACIONES.....	43
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
11.	ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	2
Tabla 2. Dilutores espermáticos a utilizarse para la prueba de transporte de semen de doncella a 4 °C.	15
Tabla 3. Dilutores utilizados para la citotoxicidad y criopreservación de espermatozoides de doncella.	16
Tabla 4. Características seminales de las muestras de espermatozoides de doncella	18
Tabla 5. Movilidad masal de espermatozoides gonadales de doncella diluido en las soluciones de transporte propuestas durante 48 horas.	19
Tabla 6 Porcentaje de semen a partir de individuos reproductores machos de doncella obtenidas mediante masaje según las distintas zonas de muestreo	20
Tabla 7. Porcentaje de muestras seminales de doncella obtenidas con movilidad observable mediante la activación espermática para cada tipo de metodología de extracción.....	20
Tabla 8. Movilidad masal de espermatozoides de doncella ante dos metodologías de extracción	22
Tabla 9. Movilidad de muestra espermática de doncella ante dos metodologías de extracción	24
Tabla 10. Viabilidad de semen de doncella transportado después del proceso de criopreservación.	26
Tabla 11. Movilidad progresiva de la muestra espermática de doncella transportada, obtenido bajo distintos métodos de extracción, después de ocho horas de estar diluida en los distintos crioprotectores propuestos.	28
Tabla 12. Comparación de la movilidad progresiva post descongelación de la muestra espermática de doncella transportada obtenida por eyaculación diluida en distintos crioprotectores propuestos y bajo dos métodos de congelación.	30
Tabla 13. Comparación de la movilidad progresiva post descongelación de la muestra espermática de doncella transportada obtenida por extracción directa de la gónada diluida en distintos crioprotectores propuestos y bajo dos métodos de congelación.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de distribución de las distintas especies del género <i>Pseudoplatystoma</i> ...	3
Figura 2. <i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	4
Figura 3. Vista satelital del fundo ``El encanto de Saipay``	11
Figura 4. Vista satelital del Centro de Acuicultura ``Nuevo Horizonte``	12
Figura 5. Vista satelital del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA).....	12
Figura 6. Diagrama de flujo de las pruebas realizadas para la criopreservación de material espermático.....	14
Figura 7. Efectos del paso de las horas sobre la movilidad masal del semen de doncella diluido en las soluciones de transporte propuestas.....	19
Figura 8. Metodologías utilizadas para la recuperación de espermatozoides a partir de la gónada de doncella.	21
Figura 9. Comparación de la movilidad masal de espermatozoides de doncella obtenidas por dos metodologías de extracción.	22
Figura 10. Comparación de la movilidad progresiva de las muestras seminales de doncella obtenidas con dos metodologías de extracción.....	24
Figura 11. Prueba de eosina Y para observar la viabilidad espermática de doncella..	25
Figura 12 Viabilidad del semen de doncella sin movilidad espermática, descongelados después de 5 días de haberse realizado la criopreservación en nitrógeno líquido en relación al porcentaje de viabilidad del semen fresco transportado.....	26
Figura 13. Comparación de la movilidad progresiva de la muestra espermática de doncella transportada, obtenido bajo por eyaculación y por extracción gonadal, después de ocho horas de estar diluida en los distintos crioprotectores propuestos.....	29
Figura 14. Movilidad progresiva de muestra espermática de doncella obtenida mediante eyaculación (masajes), utilizando una tasa de congelación controlada y vapores de nitrógeno líquido.	31

Figura 15 Movilidad progresiva de muestra espermática de doncella obtenida mediante extracción directa de la gónada, utilizando una tasa de congelación controlada y vapores de nitrógeno líquido 32

ANEXOS

Anexo 1. Toxicidad de crioprotectores sobre los espermatozoides extraído mediante extracción gonadal.....	52
Anexo 2. Toxicidad de crioprotectores sobre los espermatozoides extraído mediante masajes (eyaculado).....	53
Anexo 3. Valores de volumen y concentración espermática de reproductores machos en distintos trabajos de criopreservación en el Género Pseudoplatystoma.....	54
Anexo 4. Valores de peso y talla de reproductores machos en distintos trabajos de criopreservación en el Género Pseudoplatystoma.....	54
Anexo 5. Estanque de cultivo de doncella - Fundo ``EL ENCANTO DE SAIPAY``, Tingo María.	54
Anexo 6. Estanques de cultivo de doncella - Centro de Acuicultura ``Nuevo Horizonte``, Iquitos.....	55
Anexo 7. Estanque de cultivos de doncella - Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), Pucallpa.....	55
Anexo 8. Pesca de machos reproductores de doncella.....	56
Anexo 9. Obtención de peso y tamaño de doncella	56
Anexo 10. Recolección de semen mediante masajes abdominales realizados en el área abdominal de doncella.....	57
Anexo 11. Material espermático de doncella siendo diluido en la solución de transporte.....	57
Anexo 12. Grupo de trabajo del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción encargado del trabajo de la muestra de espermatozoides transportado exitosamente desde el lugar de muestreo. (UNMSM – Lima).	58

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo obtener información relevante para la buena manipulación, obtención, transporte y criopreservación de espermatozoides de *Pseudoplatystoma punctifer* (bagre rayado o doncella). Se determinó dos metodologías de obtención de material espermático a partir de machos reproductores de *Pseudoplatystoma punctifer*, resultando necesario el sacrificio del individuo para uno de ellos. Se realizaron pruebas con cuatro soluciones de transporte propuestas por SB, EG y solución B para los espermatozoides desde la zona de muestreo (ZONAS) a temperatura de refrigeración a 4°C (en una proporción de muestra en relación al medio de 1:4) y 24 medios de criopreservación utilizando crioprotectores permeables y no permeables.

La movilidad masales en dichas soluciones de transporte fueron de : 83.57 ± 8.52 y $92.14 \pm 2.44\%$ para las soluciones SB y su variación sin yema de huevo, $0 \pm 0\%$ para la propuesta por EG y $0 \pm 0\%$ para la solución B a las 24 horas, donde, la solución de transporte más adecuada para su almacenamiento durante periodos extendidos fue la SB sin presencia de yema de huevo, independientemente del método de colecta. En las pruebas de citotoxicidad se observó una mayor resistencia en los espermatozoides recuperados desde las gónadas (espermatozoides gonadales) que de los obtenidos mediante eyaculación enfrentados a los medios de criopreservación, mostrando mayor movilidad espermática en el transcurso de las 8 horas evaluadas. Para la criopreservación, la muestra transportada se diluyó en los 24 medios de criopreservación en una proporción de 1:4 (muestra - dilutor), las que fueron cargadas en pajillas de 0.5 mL. Se congeló la muestra utilizando dos metodologías, congelamiento rápido utilizando vapores de nitrógeno líquido y lento mediante el sistema termo controlado. La mayor movilidad espermática progresiva post descongelamiento para cada metodología fueron de (media \pm SD) $49.56 \pm 11.86\%$ en el medio compuesto por METANOL al 10% asociado a FRUCTOSA al 5.5%, utilizando vapores de nitrógeno líquido; mientras que fue de $35.55 + 6.96\%$ en el medio compuesto por METANOL 15% y GLUCOSA al 5.5% utilizando la congelación lenta. Para ambos casos la proporción de

muestra en relación al medio de criopreservación fue de 1:4. Ambos resultados fueron obtenidos de la muestra espermática obtenida gonadalmente.

Con estos resultados se concluyen en individuos machos de *Pseudoplatystoma punctifer* en los que por distintos factores (ambientales, alimentación, temporada) sea imposible obtener semen, es posible recuperar espermatozoides, directamente de la gónada mediante cortes, con parámetros espermáticos similares a los obtenidos por masajes. Además, es posible transportar y criopreservar dicho material espermático exitosamente.

Palabras clave: *Doncella, dilutor, DMSO, espermatozoide gonadal, metanol, semen.*

ABSTRACT

The objective of this research work was to obtain relevant information for the good handling, obtaining, transport and cryopreservation of sperm from *Pseudoplatystoma punctifer* "bagre rayado" or "doncella". Two different methodologies for obtaining sperm material were determined from male reproducers of *Pseudoplatystoma punctifer*, the sacrifice of the individual being necessary for one of these. Tests were carried out with 4 four different transport solutions, proposed as SB, EG and B, for sperm from the sampling area at a temperature of 4 ° C (the sample ratio with respect to the solution was 1:4) and 24 cryopreservation media using permeable and non-permeable cryoprotectants.

The mass motility in these transport solutions was: 83.57 ± 8.52 and $92.14 \pm 2.44\%$ for the SB solutions and their variation without egg yolk, $0 \pm 0\%$ for the EG and $0 \pm 0\%$ for Berrios solution at 24 hours, so the most appropriate transport solution for storage for extended periods was the SB solution without presence of egg yolk, suitable for storage for extended periods in a 1: 4 ratio with the sample to work independently of the sperm collection method. In cytotoxicity tests with cryopreservation media, a greater resistance of sperm recovered from the gonads (gonadal sperm) was observed than those obtained by ejaculation, showing greater sperm motility during the 8 hours evaluated. For cryopreservation, the transported sample was diluted in the 24 cryopreservation media in a ratio of 1: 4 (sample - diluent) and subsequently loaded into 0.5 mL straws. The sample was frozen in two ways, thermally controlled and uncontrolled slow freezing (nitrogen vapors). The greatest progressive sperm motility after thawing for each methodology was $49.56 \pm 11.86\%$ in the medium composed of 10% METANOL associated with 5.5% FRUCTOSE using liquid nitrogen vapors, while it was $35.55 + 6.96\%$ in the medium composed of METHANOL 15% and GLUCOSE 5.5% using slow freezing. Both results were obtained from the sperm sample obtained from the gonads.

With these results it is concluded that in male individuals of *Pseudoplatystoma punctifer* in which for different factors (environmental, food, season) it is impossible to obtain semen, it is possible to recover sperm directly from the gonad by cutting, with sperm parameters

similar to those obtained by massage. In addition, it is possible to transport and cryopreserve sperm material successfully.

Keywords: *Doncella, dilutor, DMSO, gonadal sperm, methanol, semen.*

1. INTRODUCCIÓN

La actividad acuícola ha crecido en gran manera en todo el mundo en las últimas décadas. La acuicultura mundial se ha visto aumentada desde 1970, siendo la región de América Latina en donde este crecimiento se ha visto acelerado debido principalmente al clima favorable junto con la disponibilidad de los recursos y de agua dulce (Velásquez *et al.*, 2014). En esta última década ha habido un acelerado desarrollo de esta actividad en nuestro país, pasando de una producción de 6.600 Tm en el 2006 a 92.200 Tm en el 2011 (Ríos 2016).

Las especies emblemáticas en la acuicultura de la Amazonía peruana son el paco (*Piaractus brachipomus*) y la gamitana (*Colossoma macropomum*) debido a los grandes avances en las técnicas para su reproducción, la calidad de su carne y su fácil manejo. (Campos, 2015). Por otra parte, el bagre rayado, *Pseudoplatystoma punctifer* (llamado a partir de ahora doncella en la presente publicación) se encuentra ampliamente distribuido en la cuenca amazónica (Goulding *et al.*, 1996), especie de gran interés debido a su gran tamaño y excelente sabor, cuenta con gran demanda en los mercados de Brasil, Colombia y Venezuela (Lopes *et al.*, 1996). El cultivo en nuestro país se encuentra en fase experimental, necesiándose importar los alevinos de dichos países en donde la crianza de esta especie está más desarrollada. Este cultivo experimental se realiza principalmente en Tarapoto, Iquitos y Pucallpa. (PRODUCE).

Con la finalidad de mejorar la producción se han realizado una gran variedad de trabajos de investigación referentes a la criopreservación espermática de diversas especies de peces amazónicos. Esto es debido a que la criopreservación de semen de peces tiene una gran importancia en la acuicultura, debido a que permite el acceso de gametos maduros cuando se requieran (De Baulny *et al.*, 1997). De esa forma se puede lograr incrementar la producción artificial para la crianza como para la posible reproducción de cierta especie. Durante estos últimos 25 años, pese a que un gran número de protocolos de espermatozoides de peces han sido desarrollados, no se ha logrado aún determinar alguno que permita la técnica a escala comercial (Llasaca, 2013).

Adicional a esto, es necesario plantear protocolos que permitan mantener el semen en óptimas condiciones durante prolongados periodos de tiempo (horas) a condiciones de refrigeración (sin llegar a la congelación), produciendo el menor daño posible a las células espermáticas, permitiendo de esta manera transportar dicho material a laboratorios especializados, pudiendo obtenerse datos no muy distantes a los que se obtendrían si se hubieran utilizado semen fresco y recién colectado. Dicho mantenimiento ayudará a perfeccionar un protocolo de criopreservación de semen para la especie de forma específica. De igual manera este transporte adecuado podría servir como medio en la producción de alevinos en sitios alejados de la zona de colecta de semen, sin la necesidad de llegar a congelar dicha muestra espermática.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Sistemática

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Pseudoplatystoma punctifer*

Reino	ANIMALIA
Phylum	CHORDATA
Subphylum	VERTEBRATA
Superclase	GNATHOSTOMATA
Clase	OSTEICHTHYES
Subclase	ACTINOPTERYGII
Orden	SILURIFORMES
Familia	PIMELODIDAE
Subfamilia	PIMELODINAE
Género	<i>Pseudoplatystoma</i>
Especie	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>

Pseudoplatystoma (Bleeker, 1862) es un género conformado por bagres neotropicales, la cual no está definida totalmente su sistemática a causa de pocos estudios taxonómicos. Se encuentra distribuidos ampliamente desde México a lo largo de la selva amazónica hasta Argentina.

Hasta relativamente poco (año 2006) se creía que estaba conformada por tres especies: *P. corruscans* (Spix y Agassiz), *P. fasciatum* (Linnaeus) y *P. tigrinum* (Valenciennes). A partir de la revisión sistemática por parte de Buitrago – Suárez y Burr (2007) se describieron cinco especies diferenciadas en el número de vértebras, patrones de coloración y forma del cuerpo: *P. magdaleniatum* (Buitrago-Suares y Burr, 2007), *P. metaense* (Buitrago-Suárez & Burr 2007), *P. orinocoense* (Buitrago-Suares y Burr, 2007), *P. punctifer* (Castelnau, 1855) y *P. reticulatum* (Eiggenmann y Eignmann, 1889).

Un estudio reciente (Torrico *et al.*, 2009) sugiere que las especies *P. fasciatum* y *P. punctifer* poseen la misma base genética contradiciendo a la investigación de Buitrago – Suárez y Burr, 2007, evidenciando un posible error en la identificación en las especies del género *Pseudoplatystoma* en dicho trabajo.

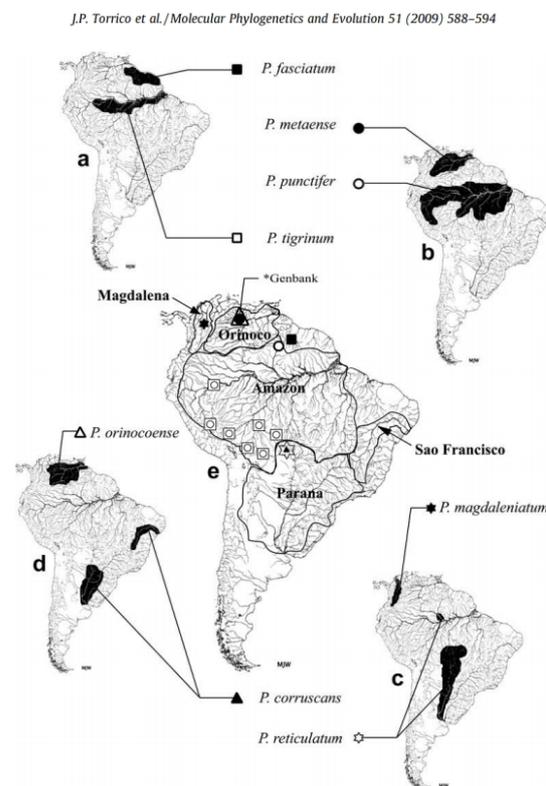


Figura 1. Áreas de distribución de las distintas especies del género *Pseudoplatystoma* según Buitrago-Suarez y Burr, 2007. (Imagen tomada de Torrico *et al.*, 2009)

2.2 Descripción especie

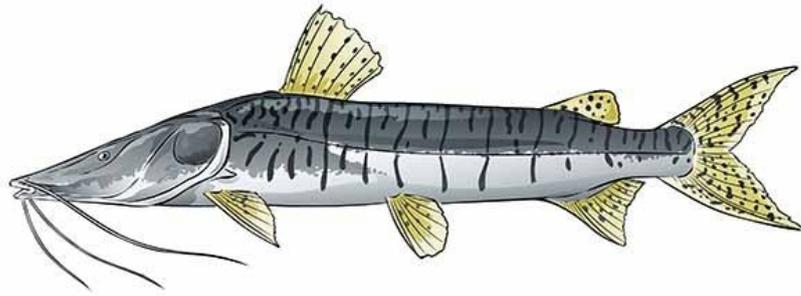


Figura 2. *Pseudoplatystoma punctifer* (Ilustración de Juan Cristobal Calle)

La doncella posee la piel desnuda (sin escamas) y son reconocidas principalmente por poseer una cabeza deprimida dorso-ventralmente, deprimida con los lados casi rectos. (Inturias, 2008). Presenta además fontanela corta y un hocico homogéneamente ancho a lo largo de la cabeza. También hay presencia de tres pares de barbilones: dos pares blancos (mentonianos) y un par negro (maxilar) (Salas *et al.*, 2009).

Mientras que el vientre es de color claro, el cuerpo presenta coloración gris en la zona dorsal y los flancos observándose presencia de bandas verticales claras y oscuras transversales. Se observa una espina dura en cada una de las aletas pectoral y dorsal. (Salas *et al.*, 2009), estas aletas además presentan pequeñas manchas oscuras (Guarnizo Pineda, 2003).

2.2.1 Distribución geográfica

Pseudoplatystoma punctifer posee una amplia distribución en la cuenca del Amazonas, se le puede encontrar en aguas superficiales como lagunas, zonas inundadas y canales de ríos. (Salas *et al.*, 2009). Resulta difícil de encontrar ejemplares en los estuarios, se les encuentra generalmente en la cabecera de los ríos, canales y a lo largo de los distintos arroyos de la selva lluviosa. (Barthem y Goulding, 1997)

Se encuentra presente en la zona Sur de América desde Colombia hasta Argentina (Escobar, 2001). Esta especie suele preferir los sitios protegidos con ramas o troncos sumergidos, también como vegetación acuática. (Reid, 1983).

2.2.2 Alimentación

Según Reid, 1983 *P. punctifer* se encuentra muy activo en el día, cazando su alimento principalmente en las mañanas, a diferencia del resto de especies del mismo género, que poseen una alimentación nocturna. Es un depredador activo, utiliza sus barbillas para buscar alimento mientras se desplaza por los alrededores (Reid, 1983).

El *P. punctifer* es carnívoro. Los individuos hasta los 10 centímetros prefieren insectos en su dieta, posteriormente hasta alcanzar los 40 centímetros de longitud se alimentan principalmente de camarones. De adultos prefieren presas mayores a 10 centímetros de longitud. El alimento de origen vegetal aparece en su dieta de forma muy ocasional (Cortés Millán, 2003). También puede incluir en la dieta a otros individuos pertenecientes al género *Pseudoplatystoma*. (Guarnizo Pineda, 2003).

2.2.3 Reproducción natural

En nuestra Amazonía, la época de reproducción de esta especie es entre noviembre y abril, siendo de enero a marzo, su nivel máximo de reproducción (Cortés Millán, 2003).

Con la finalidad de desovar, realiza migraciones, presentando 66,000 óvulos por kg de peso (fecundidad relativa) (Salas *et al.*, 2009). Los huevos depositados por la hembra en el canal del río, no presentan cuidado parental. Al terminar su desarrollo larval (3 meses aproximadamente), los alevinos se encuentran en las zonas de las áreas inundables para terminar su crecimiento (Cortés Millán, 2003).

La longitud media de madurez sexual en individuos machos es de 72 cm, mientras que en la hembra es de 77.9 cm de longitud estándar. (Salas *et al.*, 2009)

2.2.4 Pesca

La doncella es un bagre muy aprovechado, debido a la alta demanda de su carne en el mercado nacional e internacional. Ocupa el primer lugar en desembarques en comparación a otros bagres con 228 toneladas anuales aproximadamente. (Salas *et al.*, 2009)

2.3 Criopreservación de espermatozoides de peces

La criopreservación de semen de peces se ha realizado exitosamente en varias especies de distintas partes del mundo. (Tiersch, 2008). Facilita la obtención artificial de individuos debido a que esta técnica mantiene la capacidad de los espermatozoides de fecundar ovocitos, durante un largo tiempo (Viveiros y Godinho, 2009)

Para poder determinar un protocolo de criopreservación de espermatozoides para cierta especie en especie específico es imprescindible realizar diversas pruebas a fin de optimizar las etapas del proceso: pre congelamiento, congelamiento y descongelamiento de los espermatozoides (Dupré y Espinoza, 2004). Por otra parte, esta criopreservación de semen de peces no resulta ser una técnica perfecta, pues tendrá efectos sobre la calidad espermática en la muestra descongelada, comprometiendo a la capacidad de los espermatozoides en fertilizar al ovocito y en el posterior desarrollo embrionario. (Maria *et al.*, 2006)

A fin de obtener una criopreservación espermática eficiente en muchas especies de peces amazónicos se han realizado diversos trabajos en este campo (Fabbrocini *et al.*, 2000). Generalmente se obtiene bajos índices de fertilidad a comparación de la muestra de semen fresco. Como indica *Calizaya y Yam, 2013*, esto es debido principalmente a que los protocolos utilizados son principalmente de estudios de especies marinas. En especies de silúridos existen estudios que datan del año 1987 (Steyn y Van Vuren, 1987) en donde utilizando Glicerol 11% junto a 5% de glucosa como dilutor obtuvo fertilización asistida de huevos exitosa para la especie *Clarias gariepinus*. En *Ictalurus fucatus* (Bart *et al.*, 1998) se realizó la criopreservación con METANOL al 15% junto a HBSS con 15% de leche en polvo como dilutor, obteniendo fertilidad nula. Kwantong y Bart, 2006 lograron obtener un 67.10%

de movilidad y un 48.03% de fertilidad en semen de *Pangasius lamarudii* utilizando DMSO 10% y NaCl 0.9%.

Se han realizado experimentos en la criopreservación del semen individuos del género *Pseudoplatystoma*, tal como describe Pinzón *et al.*, 2005 (*Pseudoplatystoma fasciatum*) en donde logró obtener movilidad post descongelamiento $35 \pm 1\%$ utilizando DMSO 7.5% como crioprotector y el dilutor compuesto por 5.5% de glucosa y 20% de Yema de huevo (YM). Medina-Robles *et al.*, 2007, por otra parte, describe al METANOL al 12% junto a glucosa 5.5% y YH 12%, como la mejor metodología para una posible fertilización artificial con un $11.6 \pm 1.6\%$ de movilidad masal post descongelación con muestra de la misma especie. Ramirez-Merlano *et al.*, 2011 por otra parte, obtuvo una movilidad de $36.8 \pm 4.3\%$ con material espermático de *Pseudoplatystoma metaense* utilizando DMA (dimetilacetamida) al 10% junto con glucosa al 5.5% y Yema de huevo al 12%. Herrera-Cruz *et al.*, 2019 realizó pruebas con espermatozoides de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. Logró obtener $22 \pm 7.1\%$ de movilidad post descongelamiento utilizando ETILENGLICOL al 10% acompañado de glucosa al 6%, leche en polvo al 3% y vitamina E al 4%.

Por otra parte, Pinzón *et al.*, 2005 realizó pruebas de toxicidad de crioprotectores sobre los espermatozoides de doncella, monitoreando la muestra durante 48 horas junto DMSO al 5%, 10% y 15% con glucosa al 5.5% o con el dilutor propuesto por Stein Bayrle, 1978 obteniendo mejores resultados con las muestras cuya concentración de DMSO era de 5% (la más baja). Medina-Robles *et al.*, 2007 también analizó semen con distintos dilutores en la etapa de pre congelamiento obteniendo como resultados que el DMSO 5% junto con la leche entera demostró ser menos tóxico ante los espermatozoides seguido del DMSO al 10% y yema de huevo al 12%, ambos con glucosa 5.5%. En el caso del METANOL al 10%, la menor toxicidad se da cuando fue acompañada de leche entera al 5% junto con glucosa al 5.5%.

2.3.1 Dilutores

Los dilutores son aquellas soluciones cuya función es de proteger y asegurar la integridad del espermatozoide ante los cambios bruscos de temperatura. (Ramirez-Merlano *et al.*, 2011). Poseen generalmente sustancias ricas en fosfatos, glucosa, fructosa, yema de huevo y leche a fin de favorecer la anaerobiosis, amortiguar los cambios de pH y simular la composición y osmolaridad seminal de la especie a trabajar. El añadir dilutores a la muestra producirá un aumento del volumen y la inhibición a su vez de la movilidad espermática de esta (Robles *et al.*, 2005).

2.3.2 Crioprotectores permeables

Los crioprotectores permeables ingresan a la célula penetrando la membrana celular, debido a que poseen bajo peso molecular tales como el glicerol, metanol, etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros (Suquet *et al.*, 2000). Estas sustancias van a permitir la congelación de la célula sin la formación de cristales de hielo, reduciendo las interacciones entre las moléculas de agua (Vincent *et al.*, 1998).

2.3.3 Crioprotectores no permeables

Son aquellas sustancias que no penetran la membrana celular a causa de su alto peso molecular. (Suquet *et al.*, 2000). Estos crioprotectores son utilizados para remover osmóticamente el agua dentro de la célula, para luego ser reemplazado por los crioprotectores permeables en el proceso de enfriamiento. Además, previene el choque osmótico controlando la rehidratación intracelular durante el proceso de criopreservación. (Robles *et al.*, 2005). Son los azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa o trehalosa y las proteínas que podemos encontrar en la yema de huevo. (Shlafer, 1981).

2.3.4 Tasa de congelamiento

Es necesario disminuir la temperatura gradualmente y controlada para ocasionar los menores daños posibles a las células, pudiendo ser estos por la formación de cristales de hielo o por choque osmótico. (Dupre y Espinoza, 2004). Esta velocidad de congelación es uno de los factores menos estudiados en la criopreservación de espermatozoides de peces.

(Rana, 1995). La tasa de enfriamiento debe de ser estudiada con detenimiento, debido a que debe de durar el tiempo exacto para permitir el flujo del agua dentro de las células hacia fuera de ellas y evitar la formación de cristales de hielo dentro de estas. (Cloud y Patton, 2008). La utilización de vapores de nitrógeno líquido es el método más utilizado de enfriamiento antes de sumergir la muestra espermática directamente al nitrógeno líquido. (Ramirez-Merlano *et al.*, 2011)

2.3.5 Calidad espermática

La calidad espermática se define, desde un punto de vista biológico como la capacidad que tiene el espermatozoide para fertilizar el ovocito y producir un embrión saludable. (Bobe y Labbé, 2010).

Es posible evaluar y determinar la calidad espermática tomando en cuenta diversos factores tales como la concentración espermática (espermatozoides), viabilidad espermática (viabilidad), movilidad espermática (intensidad y duración), estructura espermática y tasa de fertilización que estos poseen al encontrarse con ovocitos de la hembra. (Rurangwa *et al.*, 2001) También es viable utilizar otros parámetros que permiten inferir la calidad como integridad del ADN, actividad mitocondrial y la integridad de la membrana plasmática. (Martínez y Carrasco, 2010).

Kato *et al.*, 2001 reporta daños en los espermatozoides a causa de procesos tales como la criopreservación afectando negativamente a la calidad espermática y el posterior desarrollo embrionario.

2.3.6 Efectos de la crioconservación sobre la calidad espermática

La movilidad espermática ha sido considerada y por ende utilizada como la principal variable de calidad espermática (Rurangwa *et al.*, 2004). Durante el proceso de criopreservación es posible mencionar causas que derivarán en una disminución considerable en la calidad espermática: el efecto sobre la bicapa lipídica, material genómico del espermatozoide y daños en la integridad mitocondrial. (Kurland y Andersson, 2000) (Medina-Robles *et al.*, 2004).

Efectos adversos en la membrana lipídica del espermatozoide relacionados principalmente con la desorganización proteínas integrales se ve reflejado en una baja actividad enzimática y una baja tasa de difusión (Labbe *et al.*, 1997). El daño presente en el ADN, impiden la transcripción de genes nucleares o mitocondriales, por ende, no existirá un correcto abastecimiento energético en ausencia de proteínas fundamentales para este proceso, viéndose reflejado en una baja e incluso nula movilidad espermática (Martínez *et al.*, 2010).

2.3.7 Citotoxicidad de los dilutores

Si bien la criopreservación está basada en congelar células, este proceso es ayudado por soluciones químicas que, a su vez, van a afectar de manera distinta a cada grupo celular, variando la toxicidad producida al penetrar las células. (Rana, 1995). Por este motivo, los espermatozoides de cada especie responderán de diferente forma al tratamiento con los crioprotectores, haciendo a estos últimos, especie – específicos. (Yao *et al.*, 2000). Es de suma importancia determinar la toxicidad que existe de estas sustancias sobre las células debido a que se van a ver expuestas en el proceso de criopreservación (Anchoroguy *et al.*, 1991). Se han postulado, por ejemplo, que estos crioprotectores afectan a la síntesis y utilización de ATP, así como la modificación de la bicapa lipídica modificando el metabolismo, causando por ende daño celular irreversible. (Hammerstedt y Graham, 1992) (Holt, 2000)

3. HIPÓTESIS

Se puede obtener espermatozoides de *Pseudoplatystoma punctifer* con movilidad espermática después del mantenimiento, transporte y criopreservación en nitrógeno líquido.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- i. Desarrollar protocolos de almacenamiento en frío para la muestra espermática de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) que permita el transporte y el mantenimiento

de la muestra por periodos prolongados de tiempo, sin afectar la calidad espermática.

4.2 Objetivos Específicos

- ii. Determinar el impacto de los dilutores de criopreservación (citotoxicidad) sobre los espermatozoides de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*), transportado en condiciones de refrigeración por un periodo de 8 horas.
- iii. Determinar la factibilidad para criopreservar semen o espermatozoides gonadales transportado de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del área de muestreo

El muestreo se llevó a cabo los meses de abril a junio durante los años del 2018 y 2019 en las siguientes estaciones:

- Fundo "El encanto de Saipay"



Figura 3. Vista satelital del fundo "El encanto de Saipay" (FUENTE: Google Maps)

Se encuentra ubicado a 35 kilómetros al norte de Tingo María, Distrito de José Crespo y Castillo, en el departamento de Huánuco.

- Centro de Acuicultura "Nuevo Horizonte" (FONDEPES - IQUITOS)



Figura 4. Vista satelital del Centro de Acuicultura "Nuevo Horizonte" (FONDEPES - IQUITOS). (FUENTE: Google Maps)

Se encuentra ubicado en el Km. 38.8 del eje Carretero Iquitos - Nauta, Distrito de San Juan Bautista, en el departamento de Loreto.

- Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA)



Figura 5. Vista satelital del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). (FUENTE: Google Maps)

Ubicado a 60 km de Pucallpa, Distrito de Neshuya en el departamento de Ucayali.

5.2 Material biológico

Se utilizaron en total 9 individuos, reproductores, adultos, machos de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) provenientes del fundo "El encanto de Saipay" en Huánuco, del Centro de Acuicultura "Nuevo Horizonte" en Iquitos, y del Instituto Veterinario de

Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) en Ucayali. El peso promedio de los individuos fue de 2.3 ± 0.78 kilogramos, mientras que la talla total fue de 72.88 ± 4.17 centímetros.

5.3 Material de Laboratorio

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Lima. Se utilizaron microscopios ópticos acoplado a una cámara digital, computadoras con software dedicado para la observación de la muestra, micropipetas, laminas porta objetos con cubreobjetos de vidrio, pajillas para la criopreservación de muestra.

5.4 Reactivos e insumos

Se usaron los crioprotectores penetrantes DMSO y METANOL. También los azúcares GLUCOSA, FRUCTOSA, SACAROSA y TREHALOSA en polvo para las pruebas de criopreservación. También se utilizaron sales como BICARBONATO DE SODIO, CLORURO DE SODIO, CLORURO DE POTASIO, CLORURO DE CALCIO, CLORURO DE MAGNESIO, FOSFATO DE SODIO, HIDRÓXIDO DE POTASIO, SULFATO DE MAGNESIO. Además de otros compuestos como la BICINA, EOSINA y ÁCIDO CÍTRICO.

Para todo el proceso de criopreservación se utilizó constantemente NITRÓGENO LÍQUIDO para almacenar las muestras.

5.5 Metodología y plan de trabajo

5.5.1 Diagrama de flujo

Los procedimientos para la determinación del transporte y la criopreservación de material espermático se observa en la figura 6.

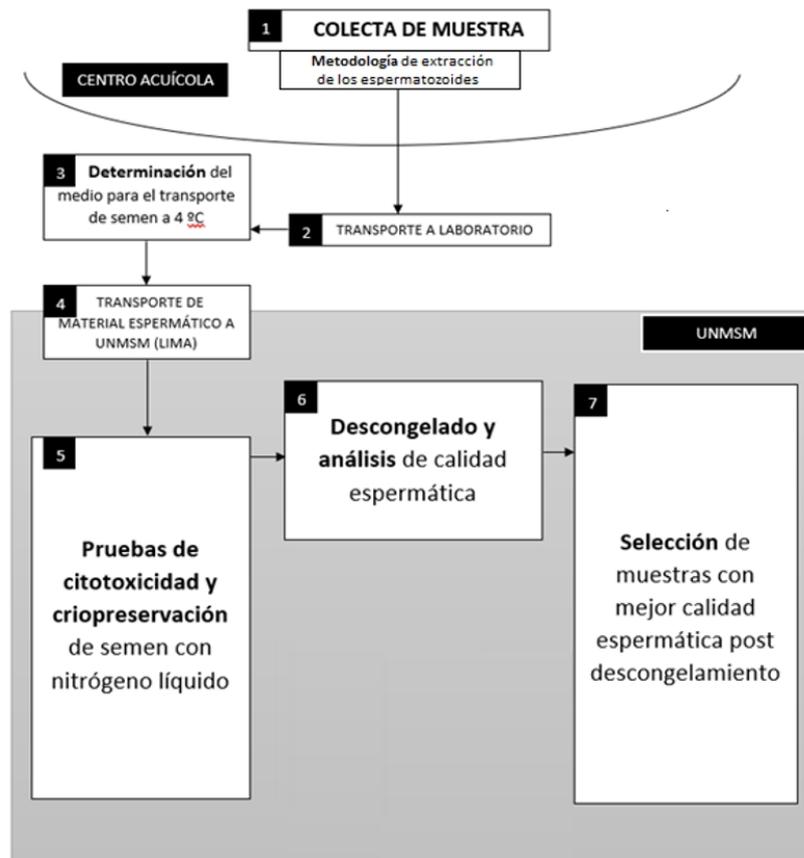


Figura 6. Diagrama de flujo de las pruebas realizadas para la criopreservación de material espermático. 1. La muestra colectada de los reproductores machos de doncella fueron mediante masajes (eyaculado) o extracción directa de la gónada. 2. La muestra fue transportada a un área en donde se procesó adecuadamente para las pruebas de transporte. 3. Los espermatozoides fueron diluidos en medios buffer y almacenados en frío para determinar el medio adecuado que mantenga la muestra en óptimas condiciones para el mantenimiento en frío. 4. Se transportó la muestra en la mejor solución de transporte buffer hacia el laboratorio de Fisiología de la Reproducción en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Lima. 5. Se realizaron pruebas de citotoxicidad y criopreservación en distintos dilutores utilizando nitrógeno líquido. 6 y 7. El material espermático descongelado fue analizado para determinar el medio que permitió una mayor movilidad espermática después de todo el proceso.

5.5.2 Recolección de espermatozoides

Mediante masajes

El semen fue extraído a través de masajes en el área abdominal y fue colectado utilizando frascos estériles. Se le realizó una inyección de 2mL de la hormona Conceptase® o Hipófisis de carpa en la base de la aleta pectoral 15 horas antes de la estimulación al pez.

Se registraron datos de color y volumen. El semen fue diluido en proporción de 1:4 con la solución propuesta SB (Stein y Bayrle.,1978). Luego retransfirió a tubos Falcon® transportada a condiciones de refrigeración (4 °C) hasta la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su posterior análisis.

Mediante extracción directa de la gónada

Se sacrificó al pez reproductor y se realizaron ensayos para extraer mediante recuperación de la gónada (testículo) espermatozoides cuyas características no difirieron del obtenido mediante eyaculación.

5.5.3 Transporte de espermatozoides

Se determinó las soluciones químicas adecuadas que permitieron el mantenimiento de los gametos en frío durante periodos cortos de tiempo (horas), y con un bajo efecto en la calidad espermática.

Se realizaron pruebas con los gametos de la especie en estudio, añadiéndolo a los dilutores espermáticos según autores tal como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Dilutores espermáticos a utilizarse para la prueba de transporte de semen de doncella a 4 °C.

Dilutores Espermáticos	
1	Stein y Bayrle (1978)
2	Erdhal y Graham (1984)
3	Berrios et al., (2010)

De esta forma, se transportó el semen con el respectivo dilutor con el cual se obtuvo mejores resultados desde el área de colecta hasta el laboratorio de Fisiología de la Reproducción en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Lima.

5.5.4 Efecto de crioprotectores sobre la movilidad espermática

Dicha prueba determinó el impacto de los dilutores descritos en la tabla 3 en un lapso de tiempo de 8 horas sobre los espermatozoides de doncella, transportado y mantenido en condiciones de refrigeración por más de 12 horas, en proporción 1:4 (semen – dilutor).

Tabla 3. Dilutores utilizados para la citotoxicidad y criopreservación de espermatozoides de doncella. (Glucosa, fructosa, sacarosa y trehalosa al 5.5%)

Composición del dilutor		
1	DMSO 5%	GLUCOSA
2	DMSO 5%	FRUCTOSA
3	DMSO 5%	TREHALOSA
4	DMSO 5%	SACAROSA
5	DMSO 10%	GLUCOSA
6	DMSO 10%	FRUCTOSA
7	DMSO 10%	TREHALOSA
8	DMSO 10%	SACAROSA
9	DMSO 15%	GLUCOSA
10	DMSO 15%	FRUCTOSA
11	DMSO 15%	TREHALOSA
12	DMSO 15%	SACAROSA
13	METANOL 5%	GLUCOSA
14	METANOL 5%	FRUCTOSA
15	METANOL 5%	TREHALOSA
16	METANOL 5%	SACAROSA
17	METANOL 10%	GLUCOSA
18	METANOL 10%	FRUCTOSA
19	METANOL 10%	TREHALOSA
20	METANOL 10%	SACAROSA
21	METANOL 15%	GLUCOSA
22	METANOL 15%	FRUCTOSA
23	METANOL 15%	TREHALOSA
24	METANOL 15%	SACAROSA

5.5.5 Congelamiento de gametos

Con la presente prueba se buscó determinar la viabilidad de la criopreservación de gametos de doncella, transportado en condiciones de refrigeración (tal como se detalló en el punto anterior), diluido en los diversos dilutores tal como se describe en la tabla 3 utilizando nitrógeno líquido. Se utilizaron pajillas para almacenar el semen y el dilutor en proporción 1:4 (Semen – Dilutor). La muestra fue expuesta a dos protocolos de congelación distintos.

- a. **Sin tasa de congelación (CONGELACIÓN RÁPIDA):** Se expuso las muestras a vapores de nitrógeno líquido por 30 minutos. Luego se sumergió directamente a este.
- b. **Con tasa de congelación (CONGELACIÓN LENTA):** Se descendió la temperatura de 4°C hasta -80°C en 15 minutos a 8,2 °C.min⁻¹ antes de sumergir las muestras en nitrógeno líquido.

Las muestras fueron mantenidas en esta condición por 5 días a -196°C en tanques de nitrógeno líquido.

5.5.6 Descongelado

Las muestras fueron retiradas del tanque de nitrógeno líquido por 30 minutos en una caja de tecnopor con una temperatura ambiente de 16° C (regulado por aire acondicionado). Posteriormente se trasladaron a otro ambiente a 21° C en donde fueron analizadas en un microscopio óptico para obtener datos de movilidad espermática.

5.5.7 Análisis de la muestra

- Movilidad masal

Con ayuda del microscopio se determinó en % aproximado del total de espermatozoides con movimiento.

- Movilidad espermática

Con ayuda del microscopio se determinó en % el total de espermatozoides con movimiento progresivos, no progresivos e inmóviles.

- a) Viabilidad espermática

Se utilizó eosina Y para determinar la viabilidad espermática y poder utilizarlo como principal indicador de la calidad espermática en las muestras sin movilidad espermática.

- Análisis estadísticos

Se utilizó el programa estadístico SPSS para el análisis estadístico y de acuerdo a su distribución y normalidad se utilizarán evaluaciones paramétricas o no paramétricas.

6. RESULTADOS

6.1 Parámetros espermáticos

Los parámetros espermáticos obtenidos de las muestras colectadas del presente trabajo de investigación se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características seminales de las muestras de espermatozoides de doncella ($n = 9$) (Promedio \pm desviación estándar) PROMEDIO DE TODAS LAS ZONAS DE MUESTREO

Característica seminal	Tipo de muestra espermática	
	Eyaculada	Gonadal
Volumen total (mL)	1.25 \pm 1.22	7.5
Concentración (sptz/mL) $\times 10^6$	9.4 \pm 11.4	16.28 \pm 0
Movilidad Progresiva (%) (Muestra transportada)	72.82 \pm 1.16	84.65 \pm 2.30
Vitalidad* (%) (Muestra transportada)	82.5 \pm 7.52	-

El volumen resulta ser más variable en la muestra eyaculada ya que depende del individuo, mientras que la muestra gonadal (según el protocolo visto más adelante) es deliberadamente de 7.5mL. La concentración también resulta ser variable en la muestra eyaculada como se puede observar en la **tabla 4**. Se observa, además, una mayor concentración en la muestra espermática extraída gonadalmente, debido a que se utiliza toda la gónada (mediante cortes) para un poco volumen de solución salina como medio de recuperación, haciendo posible recuperar una cantidad elevada y concentrada de espermatozoides según lo visto en el presente trabajo de investigación. La movilidad progresiva post transporte por otra parte resulta ser ligeramente mejor en la muestra gonadal lo que podría significar una mayor pureza y menor grado de contaminación en comparación del eyaculado que es afectada por agentes externos que se produce por el mismo muestreo y manipulación (orina, contaminantes, etc.).

6.2 Determinación de solución para el transporte de material espermático

Se realizó el análisis de la movilidad masal en la zona de muestreo (IVITA – Pucallpa) durante 48 horas con 5 réplicas. Se muestra en la figura 7 la disminución de la movilidad masal de la muestra ante estas soluciones de transporte. La solución propuesta por Stein y Brayle (1978) sin yema de huevo mantiene por hasta 24 horas la movilidad masal cercana al 100% (92.14 \pm 2.68% tal como se muestra en la **Tabla**

5) de los espermatozoides analizados. También se realizó pruebas con su variante con yema de huevo, viéndose a este tiempo un decaimiento notable de la movilidad masal respecto a la inicial. Por otra parte, la solución propuesta por Erdhal y Graham (1984) y la utilizada según Berrios *et al.*, 2010 mostraron inhibir completamente la movilidad espermática de las muestras en toda la prueba.

Tabla 5. Movilidad masal de espermatozoides gonadales de doncella diluido en las soluciones de transporte propuestas durante 48 horas. (n = 1) (Promedio ± desviación estándar)

Tiempo (h)	% Movilidad masal			
	Solución de transporte			
	Stein y Brayrle (1978)	Stein y Brayrle YH* (1978)	Erdhal y Graham (1984)	Berrios et al. (2010)
0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
2	100 ± 0	90 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
4	100 ± 0	90 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
6	100 ± 0	90 ± 2.89	0 ± 0	0 ± 0
8	92.85 ± 3.93	90 ± 2.89	0 ± 0	0 ± 0
12	92.14 ± 2.67	88.57 ± 8.52	0 ± 0	0 ± 0
18	92.14 ± 2.44	83.57 ± 8.52	0 ± 0	0 ± 0
24	92.14 ± 2.68	51.42 ± 10.69	0 ± 0	0 ± 0
30	86.42 ± 3.78	17.14 ± 15.77	0 ± 0	0 ± 0
39	19.28 ± 15.66	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
48	0.85 ± 1.86	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

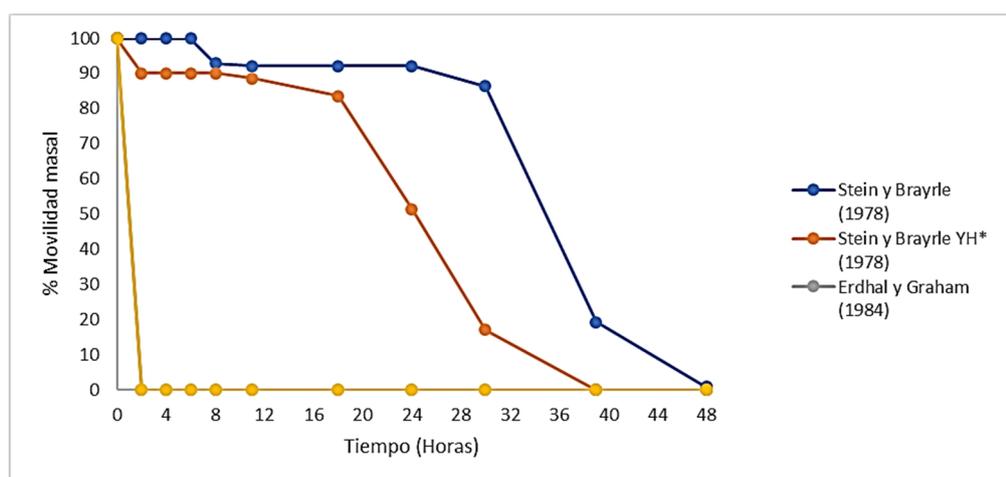


Figura 7. Efectos del paso de las horas sobre la movilidad masal del semen de doncella diluido en las soluciones de transporte propuestas.

6.3 Protocolo de manipulación de gónadas y extracción de espermatozoides

Se logró extraer espermatozoides de manera exitosa a partir de gónadas de reproductores los cuales no se obtuvieron muestra mediante masajes, pero no mostraron movilidad espermática post activación o no se pudo obtener muestra del individuo en su

gran mayoría. Los porcentajes de las muestras totales en las que se pudo extraer semen mediante masajes se observa en la **tabla 6**.

Tabla 6 Porcentaje de semen a partir de individuos reproductores machos de doncella obtenidas mediante masaje según las distintas zonas de muestreo (n = 11)

% de individuos con presencia de eyaculado según la zona de muestreo		
Zona de muestreo		
Fundo ``El encanto de Saipay``	Centro de Acuicultura ``Nuevo Horizonte``	IVITA
75%	100%	0%

Tal como podemos observar, los reproductores, inducidos mediante hormonas y estimulado a través de masajes, a los cuales se pudo obtener muestra de semen, difieren según el lugar de muestreo. En su totalidad, los reproductores provenientes del centro de acuicultura, ubicado en Iquitos, ``Nuevo Horizonte`` se les pudo coleccionar semen (n = 5), mientras que en el Fundo ``El encanto de Saipay`` (n = 4) hubo individuos en los que no se pudo obtener la muestra por este medio. Por otra parte, en IVITA, ubicado en Ucayali, ningún reproductor eyaculó al estimularse con masajes (n=2).

Para solucionar esta dificultad, se tuvo que sacrificar al reproductor y extraer una de las gónadas, de las cuales se obtendrían los espermatozoides. El porcentaje de movilidad presente con ambas formas de extracción se observa en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Porcentaje de muestras seminales de doncella obtenidas con movilidad observable mediante la activación espermática para cada tipo de metodología de extracción. (n = 9)

% Muestras con movilidad espermática	
Tipo de muestra espermática	
Eyaculado	12.5
Gonadal	100

Tal como se muestra, tan solo en el 16.67% de las muestras eyaculadas, presentaron movilidad espermática, mientras en la totalidad de muestras de los espermatozoides obtenidos por extracción gonadal, mostraron movilidad espermática.

Para determinar la metodología adecuada para la extracción de espermatozoides a partir de las gónadas, debido a lo ya antes mencionado, se tomó la movilidad masal de los espermatozoides gonadales en comparación al eyaculado obtenido mediante masajes

después de la activación espermática. Se utilizaron dos metodologías de recuperación de los espermatozoides (**Figura 8**):

- A) Recuperación de espermatozoides utilizando una gasa en modo de filtro con la gónada trozada.
- B) Recuperación de espermatozoides utilizando solución salina a la gónada con cortes superficiales y esperar a que los espermatozoides emerjan a la superficie a través de los cortes.

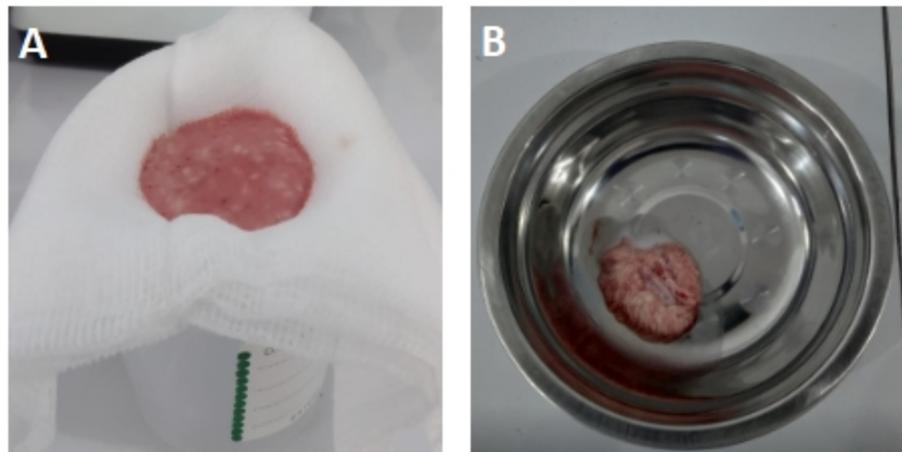


Figura 8. Metodologías utilizadas para la recuperación de espermatozoides a partir de la gónada de *Pseudoplatystoma punctifer*. A, recuperación con la gónada trozada. B, extracción de espermatozoides mediante cortes superficiales.

Para ambos casos se lograron extraer espermatozoides. Mediante el uso de gasas a modo de filtro se recuperaron espermatozoides junto a altas cantidades de glóbulos rojos, debido principalmente a los cortes profundos sobre los túbulos seminíferos de la gónada y de los diversos capilares sanguíneos presentes en él. Por el contrario, utilizando el método de recuperación con cortes superficiales, tal como se realiza en el epidídimo de los testículos de las alpacas (Banda *et al.*, 2010), no mostró presencia alguna de glóbulos rojos debido a que los cortes superficiales son realizados en zonas en donde no se evidencie estos capilares sanguíneos. Solo utilizando esta metodología se obtuvo movilidad masal de la muestra. La comparación con la observada en la muestra obtenida por eyaculación (masajes) se puede apreciar en la **tabla 8** y **figura 9**, en donde se observa una movilidad

masal similar a la obtenida por masajes. También se compara la movilidad espermática de estas muestras al ser transportadas durante 10 horas, resultando de igual forma, con valores similares.

Tabla 8. Movilidad masal de espermatozoides de doncella ante dos metodologías de extracción (muestra fresca y transportada) (n=3) (Promedio \pm desviación estándar)

*Datos de movilidad de muestra fresca obtenidos por trabajos realizados por Pinzón et al 2005 y Medina-Robles et al.,2007

% Movilidad masal		
Tipo de muestra espermática	Estado de la muestra	
	Fresca	Transportada
Eyaculado*	95 \pm 0	82.53 \pm 6.68
Gonadal	100 \pm 0	89.68 \pm 0.74

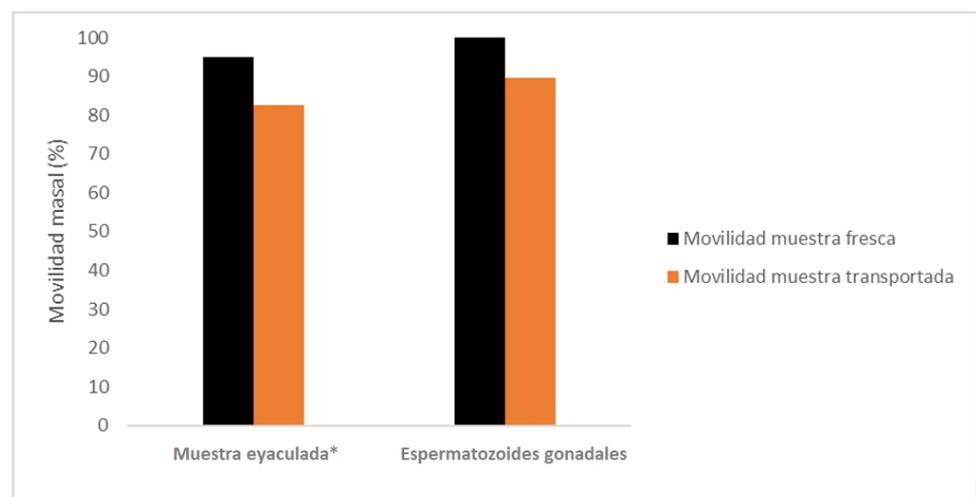


Figura 9. Comparación de la movilidad masal de espermatozoides de doncella obtenidas por dos metodologías de extracción. (Muestra fresca y transportada) *Datos de movilidad de muestra fresca obtenidos por trabajos realizados por Pinzón et al 2005 y Medina-Robles et al.,2007.

Debido a estos resultados se planteó un protocolo para la extracción de espermatozoides gonadales de doncella:

**PROCOLO DE EXTRACCIÓN DE ESPERMATOZOIDES A PARTIR DE
GÓNADAS DE *P. punctifer***

(Propuesto por este trabajo de investigación)

- 1) Sacrificar al animal.
- 2) Abrir la región abdominal del pez.
- 3) Extraer las gónadas del animal con cuidado.
- 4) Enjuagar las gónadas con suero fisiológico (cloruro de sodio al 0.9% o solución salina normal).
- 5) Colocar la mitad de una de las gónadas (hemigónada) en una placa de Petri.
- 6) Realizar 10 ligeros cortes en seco sobre la placa en la superficie de la hemigónada en zonas en donde no exista muchos capilares *para evitar la contaminación de los espermatozoides con sangre.*
- 7) Colocar la fracción de hemigónada boca abajo (con los cortes en contacto de la placa)
- 8) Añadir 2ml de suero fisiológico y remover la placa con movimientos horizontales con la finalidad que se mezclen los espermatozoides con el suero fisiológico hasta que el suero se vuelva turbio.
- 9) Remover el tejido gonadal. Recoger 1.5 ml de muestra con la pipeta y añadirlo a un tubo falcon® de TRANSPORTE con 6ml de solución
- 10) Remover suavemente (pipetear)
- 11) Mezclar la solución, sellar la tapa con parafilm, colocarlo en una bolsita plástica.
- 12) Colocarlo dentro de la caja aislante pequeña con 2 gelpacks. (la muestra debe de estar dentro del frasco estéril, para que no tenga contacto directo con los gelpacks).

6.4 Parámetros espermáticos de muestra transportada

La muestra espermática, independientemente de la forma de extracción, fue transportada al laboratorio de Fisiología de la Reproducción en UNMSM en Lima (aproximadamente 10 horas de transporte) a 4° C. Los datos de la movilidad

espermática se observan en la **tabla 9**, mientras que la **figura 10** grafica solo la movilidad espermática progresiva (espermatozoides que se desplazan) para ambas metodologías de extracción de espermatozoides. Se puede observar en los resultados que los espermatozoides obtenidos por extracción gonadal, mostraron una mayor movilidad progresiva y menor porcentaje de espermatozoides inmóviles.

Tabla 9. Movilidad de muestra espermática de doncella ante dos metodologías de extracción (n=2) (Promedio \pm desviación estándar)

% Movilidad de la muestra transportada			
Tipo de muestra espermática	Progresivo	No progresivo	Inmóviles
Eyaculado	72.82 \pm 1.16	9.71 \pm 7.84	17.47 \pm 6.72
Gonadal	84.65 \pm 2.30	5.03 \pm 1.56	10.33 \pm 0.74

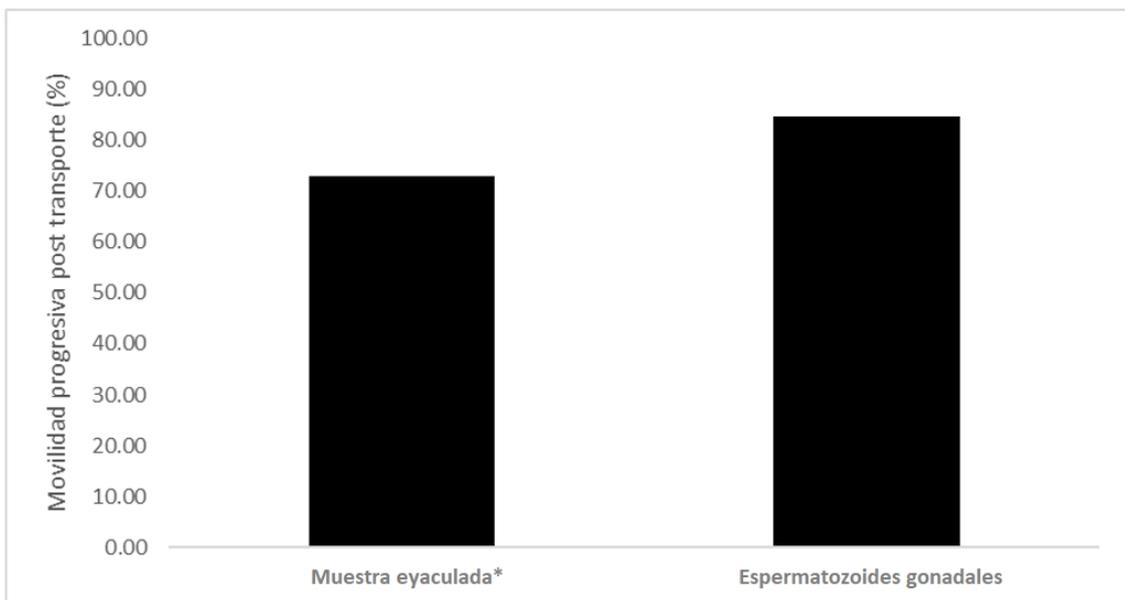


Figura 10. Comparación de la movilidad progresiva de las muestras seminales de doncella obtenidas con dos metodologías de extracción.

6.5 Pruebas específicas en muestras sin movilidad espermática (semen extraído a través de masajes abdominales)

Se realizaron pruebas específicas sobre las muestras que no presentaron movilidad espermática (muestras eyaculadas). Se trabajó exclusivamente con el parámetro de la viabilidad espermática (vitalidad). Para poder realizar este análisis, se utilizó EOSINA tal como se muestra en la **figura 11**.

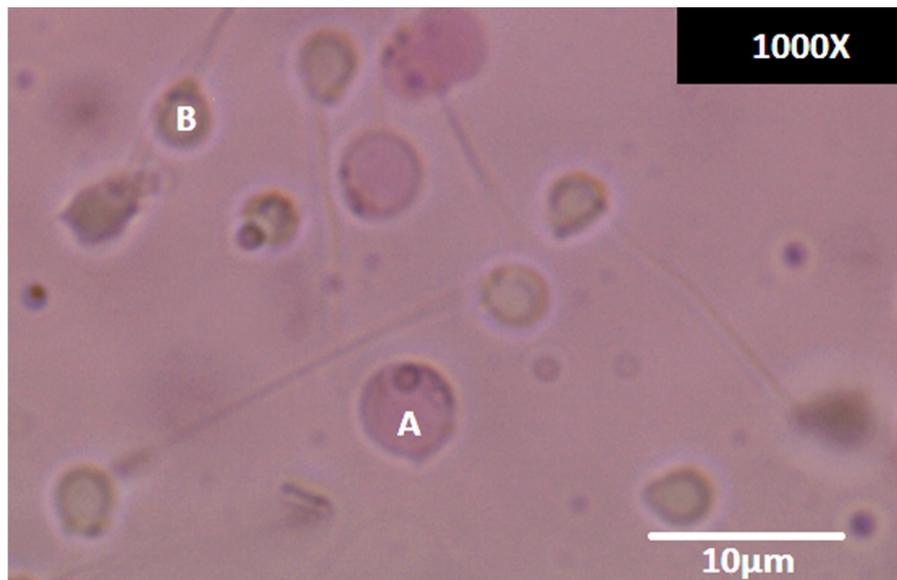


Figura 11. Prueba de eosina Y para observar la viabilidad espermática de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*). Los espermatozoides muertos se colorean de un color rojizo y aumentan su tamaño considerablemente(A) a diferencia de los vivos que mantienen un color claro y son de menor tamaño (B).

6.5.1 Criopreservación de semen sin movilidad espermática

Se congelaron las muestras con los dilutores propuestos por Pinzón *et. al* 2005 y Medina-Robles *et al.*,2007 a los cuales se le añadieron los azúcares propuestos por el presente trabajo. Se trabajó con DMSO al 10% y METANOL al 12%. Los resultados de la viabilidad post descongelación se pueden observar en la **tabla 10** y **figura 12**.

Tabla 10. Viabilidad de semen de doncella transportado después del proceso de criopreservación. Muestra no presentaba movilidad espermática alguna. (YH: yema de huevo; LE: leche entera) (Glucosa, fructosa, sacarosa y trehalosa al 5.5%) (n=3) (Promedio \pm desviación estándar)

Composición del dilutor				% Viabilidad post descongelación
1	DMSO 10%	-	-	0 \pm 0
2	DMSO 10%	GLUCOSA	-	0 \pm 0
3	DMSO 10%	FRUCTOSA	-	0 \pm 0
4	DMSO 10%	TREHALOSA	-	0 \pm 0
5	DMSO 10%	GLUCOSA	YH	0.62 \pm 0.7
6	DMSO 10%	FRUCTOSA	YH	1.62 \pm 2.28
7	DMSO 10%	TREHALOSA	YH	0 \pm 0
8	DMSO 10%	GLUCOSA	LE	0 \pm 0
9	DMSO 10%	FRUCTOSA	LE	0 \pm 0
10	DMSO 10%	TREHALOSA	LE	0 \pm 0
11	METANOL 12%	-	-	0 \pm 0
12	METANOL 12%	GLUCOSA	-	0 \pm 0
13	METANOL 12%	FRUCTOSA	-	0 \pm 0
14	METANOL 12%	TREHALOSA	-	0 \pm 0
15	METANOL 12%	GLUCOSA	YH	0 \pm 0
16	METANOL 12%	FRUCTOSA	YH	0 \pm 0
17	METANOL 12%	TREHALOSA	YH	0 \pm 0
18	METANOL 12%	GLUCOSA	LE	0 \pm 0
19	METANOL 12%	FRUCTOSA	LE	0 \pm 0
20	METANOL 12%	TREHALOSA	LE	0 \pm 0
Viabilidad Control (Muestra transportada)				82.5 \pm 7.52

Tal y como se puede apreciar en la **tabla 10**, según el análisis de viabilidad, solo en las muestras con el dilutor compuesto por DMSO al 10% acompañados de GLUCOSA o FRUCTOSA se encontraron células vivas, aunque en muy bajo porcentaje. En la **figura 12** se puede apreciar la notoria diferencia en comparación al control.

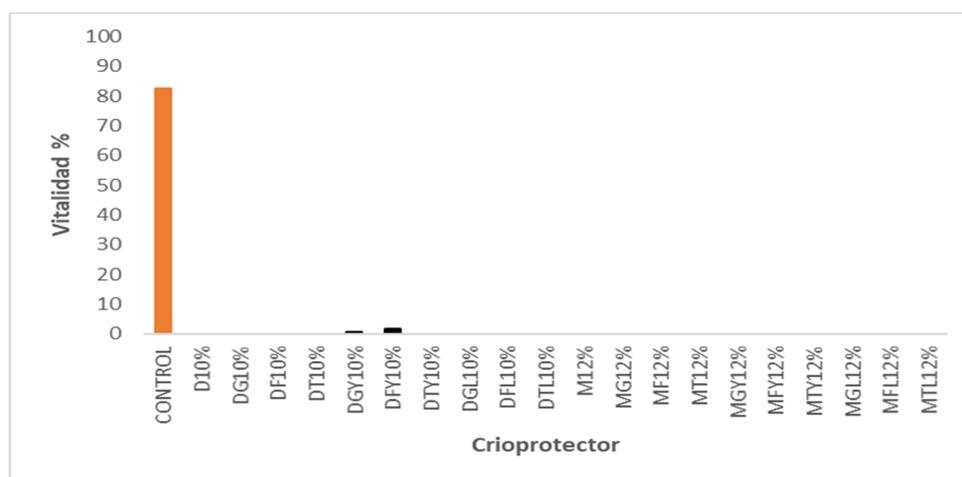


Figura 12 Viabilidad del semen de doncella sin movilidad espermática, descongelados después de 5 días de haberse realizado la criopreservación en nitrógeno líquido en relación al porcentaje de viabilidad

del semen fresco transportado. (Glucosa: G, fructosa: F y trehalosa: T al 5.5%) (Y: yema de huevo; L: leche entera) (n=3)

6.6 Pruebas en muestras con movilidad espermática

Se realizaron pruebas de citotoxicidad y de criopreservación a las muestras espermáticas con presencia de movilidad espermática (eyaculado y gonadal). El parámetro espermático utilizado fue la movilidad espermática, a diferencia de las muestras anteriores cuyo parámetro fue la de la viabilidad.

6.6.1 Pruebas de citotoxicidad por 8 horas en espermatozoides con presencia de movilidad espermática

La prueba de citotoxicidad constó en diluir a los espermatozoides (con ambas metodologías de extracción) en las soluciones crioprotectoras y observar la variación de la movilidad espermática durante 8 horas. Los resultados de esta prueba se pueden observar en la **tabla 11**.

Tabla 11. Movilidad progresiva de la muestra espermática de doncella transportada, obtenido bajo distintos métodos de extracción, después de ocho horas de estar diluida en los distintos crioprotectores propuestos. (Glucosa, fructosa, sacarosa y trehalosa al 5.5%) (n=2) (Promedio \pm desviación estándar)

Composición del dilutor			% Movilidad progresiva después de 8 horas de exposición	
			Tipo de muestra espermática	
			Eyaculado	Gonadal
1	DMSO 5%	GLUCOSA	14.18 \pm 0.81	30.9 \pm 7.28
2	DMSO 5%	FRUCTOSA	25.23 \pm 5.81	39.58 \pm 0
3	DMSO 5%	TREHALOSA	17.53 \pm 1.72	28.17 \pm 10.07
4	DMSO 5%	SACAROSA	11.62 \pm 1.03	26.37 \pm 11.19
5	DMSO 10%	GLUCOSA	2.01 \pm 2.84	16.88 \pm 1.38
6	DMSO 10%	FRUCTOSA	0 \pm 0	22.28 \pm 0.08
7	DMSO 10%	TREHALOSA	0.43 \pm 0.61	15.84 \pm 3.9
8	DMSO 10%	SACAROSA	0 \pm 0	17.54 \pm 0.33
9	DMSO 15%	GLUCOSA	0 \pm 0	14.34 \pm 0.67
10	DMSO 15%	FRUCTOSA	0 \pm 0	15.67 \pm 0.64
11	DMSO 15%	TREHALOSA	0 \pm 0	8.84 \pm 7.06
12	DMSO 15%	SACAROSA	0 \pm 0	0 \pm 0
13	METANOL 5%	GLUCOSA	48.17 \pm 1.57	43.62 \pm 1.38
14	METANOL 5%	FRUCTOSA	47.97 \pm 0.58	54.17 \pm 0
15	METANOL 5%	TREHALOSA	24.57 \pm 1.75	42.02 \pm 3.97
16	METANOL 5%	SACAROSA	31.53 \pm 3.74	25.74 \pm 4.85
17	METANOL 10%	GLUCOSA	34.77 \pm 3.26	54.11 \pm 11.87
18	METANOL 10%	FRUCTOSA	27.08 \pm 0.27	47.63 \pm 5.87
19	METANOL 10%	TREHALOSA	23.16 \pm 1.59	43.54 \pm 4.08
20	METANOL 10%	SACAROSA	37.82 \pm 1.85	37.41 \pm 1.48
21	METANOL 15%	GLUCOSA	24.01 \pm 4.94	47.63 \pm 0.08
22	METANOL 15%	FRUCTOSA	\pm	42.86 \pm 0
23	METANOL 15%	TREHALOSA	9.67 \pm 3.03	42.46 \pm 2.81
24	METANOL 15%	SACAROSA	3 \pm 0.21	43.96 \pm 0
Mov. progresiva Control			67.39 \pm 0	79.93 \pm 0

Tal como se puede observar de la **figura 13** existe una mayor movilidad espermática de los espermatozoides gonadales para casi la totalidad de los tratamientos con los dilutores propuestos a diferencia de los espermatozoides eyaculados. Además, se observa una menor citotoxicidad por parte del METANOL en comparación al DMSO.

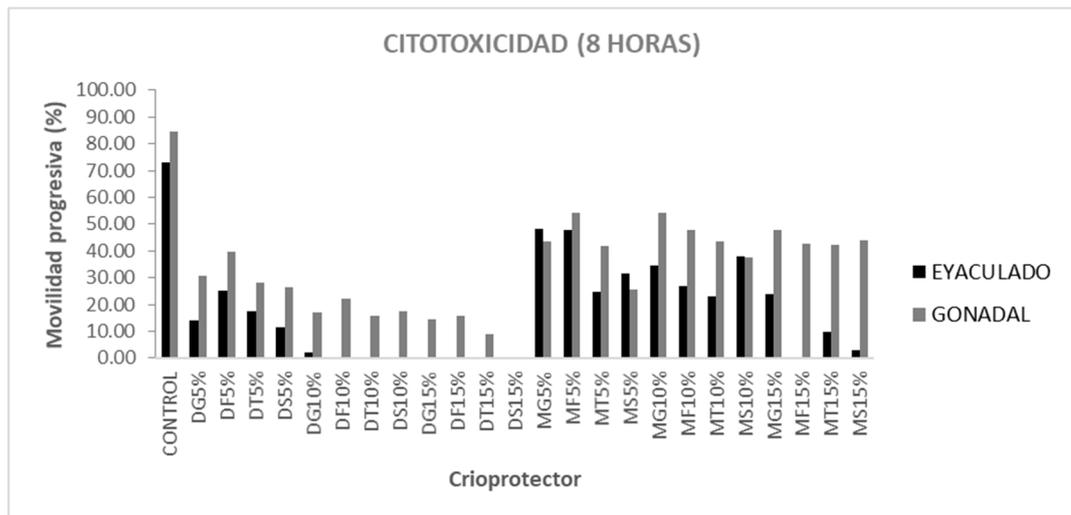


Figura 13. Comparación de la movilidad progresiva de la muestra espermática de doncella transportada, obtenido bajo por eyaculación y por extracción gonadal, después de ocho horas de estar diluida en los distintos crioprotectores propuestos. (Glucosa: G, fructosa: F, sacarosa: S y trehalosa: T al 5.5%) (n=2)

6.6.2 Criopreservación de espermatozoides con presencia de movilidad espermática

Se realizaron pruebas de criopreservación de los espermatozoides (eyaculados y gonadales) en nitrógeno líquido con 24 distintas soluciones crioprotectoras a distintas concentraciones tal como se observa en la **tabla 12 y 13**. Además se utilizaron dos tipos de congelación, una rápida (con vapores de nitrógeno líquido) y una lenta (con la utilización del sistema de cryobath). Adicionalmente esta comparación se ve mucho más apreciable en la **figura 14** y la **figura 15** correspondientes a las muestras obtenidas por eyaculación (masajes) y extracción gonadal (espermatozoides gonadales).

Tabla 12. Comparación de la movilidad progresiva post descongelación de la muestra espermática de doncella transportada obtenida por eyaculación diluida en distintos crioprotectores propuestos y bajo dos métodos de congelación. (Glucosa, fructosa, sacarosa y trehalosa al 5.5%) (n=1) (Promedio \pm desviación estándar)

Muestra espermática eyaculada			Movidad progresiva post descongelación(%)	
Composición del dilutor			Tipo de congelación	
			Lenta	Rápida
1	DMSO 5%	GLUCOSA	4.66 \pm 1.76	0 \pm 0
2	DMSO 5%	FRUCTOSA	17.61 \pm 1.34	0 \pm 0
3	DMSO 5%	TREHALOSA	0.42 \pm 0.6	0 \pm 0
4	DMSO 5%	SACAROSA	0.38 \pm 0.53	0 \pm 0
5	DMSO 10%	GLUCOSA	3.98 \pm 1.66	0 \pm 0
6	DMSO 10%	FRUCTOSA	11.55 \pm 3.05	0 \pm 0
7	DMSO 10%	TREHALOSA	1.85 \pm 2.62	0 \pm 0
8	DMSO 10%	SACAROSA	0 \pm 0	0 \pm 0
9	DMSO 15%	GLUCOSA	0.99 \pm 0.59	0 \pm 0
10	DMSO 15%	FRUCTOSA	0 \pm 0	0 \pm 0
11	DMSO 15%	TREHALOSA	0.61 \pm 0.87	0 \pm 0
12	DMSO 15%	SACAROSA	1.98 \pm 2.3	0 \pm 0
13	METANOL 5%	GLUCOSA	0.21 \pm 0.29	0 \pm 0
14	METANOL 5%	FRUCTOSA	0.21 \pm 0.29	0 \pm 0
15	METANOL 5%	TREHALOSA	0 \pm 0	0 \pm 0
16	METANOL 5%	SACAROSA	0 \pm 0	0 \pm 0
17	METANOL 10%	GLUCOSA	21.1 \pm 1.8	0 \pm 0
18	METANOL 10%	FRUCTOSA	34.21 \pm 0	0 \pm 0
19	METANOL 10%	TREHALOSA	9 \pm 4.41	0 \pm 0
20	METANOL 10%	SACAROSA	13.37 \pm 9.45	0 \pm 0
21	METANOL 15%	GLUCOSA	0 \pm 0	0 \pm 0
22	METANOL 15%	FRUCTOSA	0.15 \pm 0.21	0 \pm 0
23	METANOL 15%	TREHALOSA	0 \pm 0	0 \pm 0
24	METANOL 15%	SACAROSA	0.13 \pm 0.18	0 \pm 0
Mov. progresiva Control (Muestra transportada)			72.82 \pm 1.16	

En el caso de la muestra eyaculada, los espermatozoides congelados mediante la congelación rápida (en vapores de nitrógeno líquido), no mostraron movilidad espermática; por contraparte, los espermatozoides que fueron congelados utilizando la cámara de cryobath (congelación lenta), mostraron movilidad espermática en la mayoría de los tratamientos, siendo los que mayor porcentaje presentaron las muestras que fueron diluidas con METANOL al 10% con FRUCTOSA (34.21 \pm 0%) y con GLUCOSA (21.1 \pm 1.8%).

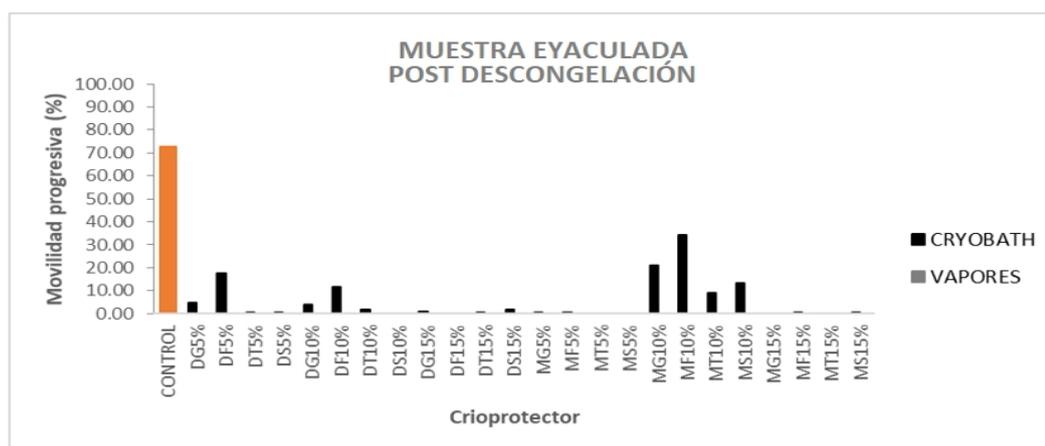


Figura 14. Movilidad progresiva de muestra espermática de doncella obtenida mediante eyaculación (masajes), utilizando una tasa de congelación controlada y vapores de nitrógeno líquido. Las muestras fueron descongeladas después de 5 días de haberse realizado la criopreservación. La gráfica muestra la relación con el porcentaje de viabilidad del semen fresco transportado. (Glucosa: G, fructosa: F, sacarosa: S y trehalosa: T al 5.5%) (n=1)

Tabla 13. Comparación de la movilidad progresiva post descongelación de la muestra espermática de doncella transportada obtenida por extracción directa de la gónada diluida en distintos crioprotectores propuestos y bajo dos métodos de congelación. (Glucosa, fructosa, sacarosa y trehalosa al 5.5%) (n = 1) (Promedio \pm desviación estándar)

Muestra espermática gonadal			Movidad progresiva post descongelación(%)	
Composición del dilutor			Tipo de congelación	
			Lenta	Rápida
1	DMSO 5%	GLUCOSA	30.86 \pm 2.13	0 \pm 0
2	DMSO 5%	FRUCTOSA	11.16 \pm 1.36	22.08 \pm 15.61
3	DMSO 5%	TREHALOSA	10.04 \pm 6.48	0 \pm 0
4	DMSO 5%	SACAROSA	6.46 \pm 1.28	0 \pm 0
5	DMSO 10%	GLUCOSA	1.93 \pm 1.87	1.55 \pm 2.2
6	DMSO 10%	FRUCTOSA	3.65 \pm 0	5.42 \pm 7.66
7	DMSO 10%	TREHALOSA	0 \pm 0	0.32 \pm 0.45
8	DMSO 10%	SACAROSA	2.77 \pm 1.29	0 \pm 0
9	DMSO 15%	GLUCOSA	29.63 \pm 8.05	0.28 \pm 0.4
10	DMSO 15%	FRUCTOSA	28.62 \pm 19.65	10.13 \pm 0
11	DMSO 15%	TREHALOSA	3.1 \pm 2.93	0 \pm 0
12	DMSO 15%	SACAROSA	5.87 \pm 0.62	0 \pm 0
13	METANOL 5%	GLUCOSA	21.49 \pm 0	8.4 \pm 5.21
14	METANOL 5%	FRUCTOSA	17.24 \pm 0	13.12 \pm 18.56
15	METANOL 5%	TREHALOSA	0 \pm 0	1.28 \pm 1.81
16	METANOL 5%	SACAROSA	0 \pm 0	0 \pm 0
17	METANOL 10%	GLUCOSA	24.53 \pm 0	34.79 \pm 8.41
18	METANOL 10%	FRUCTOSA	19.86 \pm 2.83	49.56 \pm 11.86
19	METANOL 10%	TREHALOSA	17.97 \pm 8.47	0 \pm 0
20	METANOL 10%	SACAROSA	-	3.75 \pm 4.13
21	METANOL 15%	GLUCOSA	35.55 \pm 6.96	28.79 \pm 15.69
22	METANOL 15%	FRUCTOSA	-	32.75 \pm 3.91
23	METANOL 15%	TREHALOSA	28.98 \pm 5.1	4.73 \pm 5.52
24	METANOL 15%	SACAROSA	28.09 \pm 1.56	11.11 \pm 0
Mov. progresiva Control (Muestra transportada)			84.65 \pm 2.30	

Al descongelar la muestra de espermatozoides gonadales, se observaron mayores porcentajes de movilidad espermática en comparación con la muestra eyaculada descongelada. Como se puede apreciar en la **figura 15**, existe movilidad espermática casi en la totalidad de dilutores con espermatozoides, con congelamiento rápido y lento; siendo nuevamente, como en el caso de la muestra eyaculada, la muestra con el dilutor compuesto por METANOL los que mejores resultados dio (sobre los compuestos con DMSO). A diferencia del caso anterior, la mayor movilidad espermática se obtuvo utilizando la congelación rápida, resultando en $49.56 \pm 11.86\%$, en la muestra cuyo dilutor estaba compuesto por METANOL al 10% con FRUCTOSA, mientras que el dilutor compuesto por METANOL al 10% con GLUCOSA, mostró movilidad espermática de $34.79 \pm 8.41\%$. Además, cabe resaltar que, utilizando la congelación lenta o controlada, la muestra con mayor porcentaje de movilidad espermática fue la que se encontraba con el dilutor compuesto por METANOL al 15% acompañado de GLUCOSA presentando un $35.55 \pm 6.96\%$ (**tabla 13**).

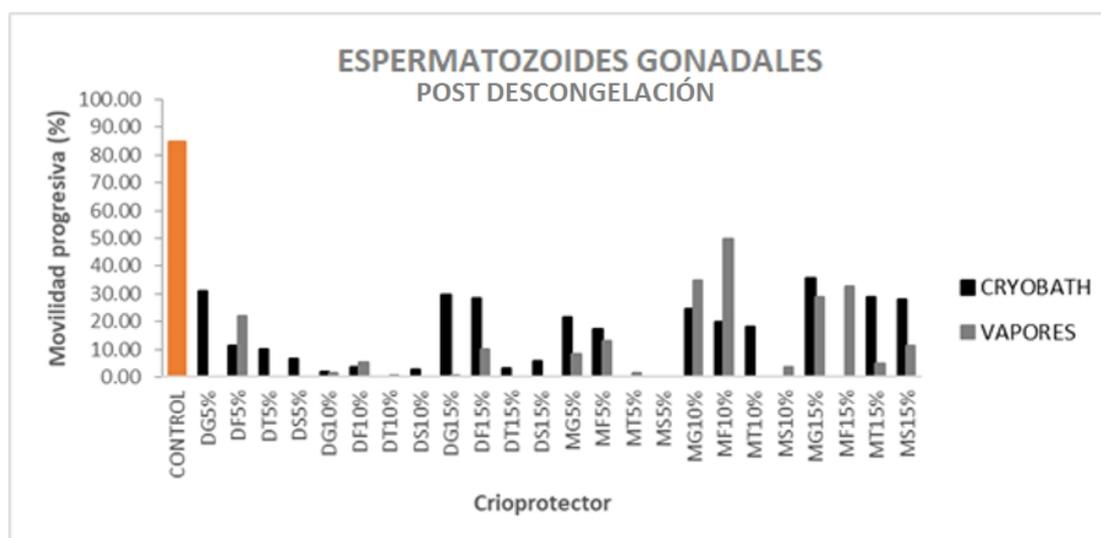


Figura 15 Movilidad progresiva de muestra espermática de doncella obtenida mediante extracción directa de la gónada, utilizando una tasa de congelación controlada y vapores de nitrógeno líquido. Las muestras fueron descongeladas después de 5 días de haberse realizado la criopreservación. La gráfica muestra la relación con el porcentaje de viabilidad del semen fresco transportado. (Glucosa: G, fructosa: F, sacarosa: S y trehalosa: T al 5.5%) (n=1)

7. DISCUSIÓN

La muestra obtenida en los distintos muestreos para el presente trabajo de investigación mostró presencia de movilidad variable, esencialmente en las obtenidas por eyaculación (masajes) con solo el 16.67% de presencia de movilidad. Trabajos realizados con muestra espermática en esta especie, no mencionan la falta de movilidad en algunas muestras. Las muestras obtenidas en el punto de muestreo (FONDEPES – IQUITOS) no mostraron movilidad espermática, lo que puede significar que dicha muestra presenta ausencia de movilidad causada posiblemente por el estado del reproductor, viéndose reflejado por el bajo volumen de semen en comparación a otros trabajos realizados con *Pseudoplatystoma* (anexo 3), como describe Pinzón *et al.*, 2005 en su investigación el cual obtuvo 3 ± 0.3 mL de muestra, mientras que Medina-Robles *et al.*, 2007, por su parte, logró obtener un promedio de 9.9 ± 3.2 mL de semen a partir de masajes. Herrera-Cruz *et al.*, 2019 en *Pseudoplatystoma magdaleniatum* obtuvo un promedio de 6.1 ± 4.3 mL de muestra seminal. Estos últimos volúmenes contrastan notablemente con los 1.25 ± 1.22 mL que se pudo obtener en nuestro muestreo, pese a que el peso y la talla total promedio son relativamente similares a los observados en estos trabajos mencionados (anexo 4).

Respecto a la concentración espermática resulta curioso observar la diferencia que existe entre los trabajos realizados en *Pseudoplatystoma* respecto al presente trabajo de investigación, siendo este el que menor concentración obtuvo de sus muestreos. Resulta interesante el ver que pese a que en el eyaculado se obtuvieron distintas concentraciones (nótese la alta desviación estándar) la muestra obtenida mediante extracción gonadal resultó ser mayor al promedio del eyaculado total.

El promedio del peso y el tamaño total es de 2.3 ± 0.3 kg y 61.3 ± 2.9 cm respectivamente y lo reportado por Medina-Robles *et al.*, 2007, por ejemplo, es de 1.9 ± 0.6 kg y longitud total de 58.2 ± 9.5 cm, observándose incluso ser mayor que este trabajo, aunque no se ve reflejado en la cantidad (volumen) de eyaculado recuperado y la concentración espermática. Esto podría deberse a dos factores: la temporada y el tipo de alimentación que tienen los reproductores. Según, Cortés Millán, 2003, la temporada

reproductiva es entre noviembre y abril, siendo de enero a marzo, su nivel máximo de reproducción. La recolección de muestra se realizó en los meses de febrero, marzo y abril, siendo este último muestreo, quizá el motivo por el que algunos reproductores no brindaron material espermático (eyaculado) pero, por otra parte, en la época óptima, se observó el poco eyaculado (en mL) ya antes mencionado. Respecto a la alimentación, como menciona López *et al.*, 2018, para una muestra de machos reproductores en peces óptima, es necesario una buena calidad de agua y una alimentación adecuada.

Cabe añadir también que inevitablemente la muestra se va a ver contaminada en mayor medida con restos de agua y orina causada por la manipulación y los propios masajes necesarios para lograr la extracción de semen, por lo que un bajo volumen de este, va a significar más susceptibilidad a la contaminación por agentes externos y otros factores, como la desecación y a los líquidos ya antes mencionados. Por el contrario, la muestra extraída directamente de la gónada (espermatozoides gonadales) muestra una buena movilidad espermática todas las veces en las que se trabajó. Se realizó de manera sencilla y no es necesario equipo muy complejo para lograr una extracción exitosa. Esta metodología se desarrolló y realizó debido a que los organismos destinados para el estudio no eyacularon en lo absoluto o el volumen resultó ser muy bajo, viéndose contaminada por la orina y/o sangre a causa de los masajes realizados. Para obtener los espermatozoides de esta forma fue necesario inevitablemente sacrificar al macho reproductor, por lo que no es posible sacarle provecho posteriormente como en el caso del macho del que se obtiene muestra por masajes.

Se logró obtener entonces muestra de espermatozoides con buena movilidad espermática (cerca al 100%) a través de la extracción gonadal. Esta metodología es realizada en pruebas de alpacas como lo describe Banda *et al.*, 2010, aunque no se ha reportado ni se ha estandarizado dicha metodología en peces. La movilidad espermática de los espermatozoides gonadales es similar a la muestra eyaculada que se pudo obtener, así como lo descrito en trabajos en donde lograron trabajar con reproductores, a los cuales

no fue necesario sacrificar debido a que la muestra de semen fue más accesible (*Pinzón et al 2005 y Medina-Robles et al., 2007*).

Existe, además, diferencias respecto al origen de los reproductores brindados para esta investigación, siendo los provenientes de Iquitos, (‘‘Nuevo horizonte’’) de los que se pudo obtener semen (muestra eyaculada) en su totalidad, a diferencia de las zonas de muestreo ubicados en Huánuco (Fundo ‘‘Encanto de Saipay’’) y Ucayali (IVITA). Esto podría deberse a que, en este primer punto de muestreo, se encuentran trabajando durante años con esta especie, tal como se muestra en el ‘‘PROTOCOLO DE REPRODUCCIÓN DE DONCELLA’’ (FONDEPES 2015) en donde vienen seleccionando y alimentado de manera óptima a los reproductores a diferencia de las otras estaciones de muestreo en donde su reproducción es aún experimental e incipiente, correspondiendo a lo expuesto por López *et al.*, 2018 en la relación que existe en la calidad de material espermático y una buena alimentación.

Se ha intentado encontrar una *solución inmovilizadora* para los espermatozoides de distintas especies de peces que permita mantener en reposo a los espermatozoides durante horas para el transporte o almacenamiento, tal es el caso de *Colossoma macropomum* (gamitana) en donde se probaron soluciones de sacarosa a distintas concentraciones que permitiera el mantenimiento de estos y posibilitando una posterior activación espermática.

Se determinó que utilizando una solución de 400 mM es posible mantenerlas a temperatura ambiente una hora aproximadamente manteniendo un porcentaje de movilidad espermática muy parecida al de la muestra fresca, mientras que, a las 7 horas, se mantiene aún por encima del 50% de movilidad espermática (Núñez, 2014); por contraparte, refrigerado y con esta misma solución de sacarosa, la muestra almacenada mostró movilidad mayor al 50% hasta 24 horas en comparación a la muestra fresca (Llasaca, 2014). Como indican los trabajos anteriores mencionados y los trabajos realizados en *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) es importante mantener la temperatura de 4°C (refrigeración) al realizar el transporte. Berrios *et al.*, 2010 trabajó y obtuvo resultados según la duración de la movilidad espermática en minutos, logrando obtener movilidad hasta

después de 12 días de extraída la muestra. Igualmente, Aguilar *et al.*, 2014, trabajó con el porcentaje de la movilidad espermática, y pudo obtener hasta 8 días de movilidad espermática, viéndose un decaimiento de notable de este parámetro espermático en el día 7. Este último trabajo además pudo resaltar la importancia de la proporción muestra – solución extender, siendo una proporción de 1:9 la que mejor resultados reportaron. Se probaron estos protocolos en doncella y se obtuvo resultados negativos, a comparación del utilizado por los autores ya mencionados en sus respectivas especies. Estos resultados, específicamente los de Aguilar *et al.*, 2014 demuestran que es posible mantener e inmovilizar el material espermático por varios días en condiciones de refrigeración, encontrando la solución adecuada para la presente especie en estudio, viéndose necesario realizar más pruebas hasta encontrar el adecuado. El resultado obtenido en esta investigación, concuerda con lo reportado por Pinzón *et al.*, 2015 en la utilización de la solución de Stein y Brayle, 1978, como medio para el mantenimiento por horas de los espermatozoides en individuos de este Género

. Se comprobó además que las soluciones inmovilizadoras propuestas para otras especies (y probadas en el presente trabajo de investigación) no resultan ser efectivas, sino por el contrario, contraproducentes, pues resultaron inhibir a la movilidad espermática de los espermatozoides en las primeras horas de su dilución. Es importante resaltar, además, que las pruebas de citotoxicidad según Pinzón *et al.*, 2005 con muestra fresca (eyaculado) no se observó movilidad espermática con DMSO al 15% después de 8 horas, pero en las pruebas realizadas en el presente trabajo de investigación, sí se reportó movilidad espermática proveniente de la que fue obtenida mediante extracción gonadal.

La muestra de semen sin movilidad, en la cual se utilizó la viabilidad como único parámetro de calidad espermática, se sometió a la criopreservación con pruebas específicas en las cuales se observan resultados negativos en comparación a las muestras que sí presentaron movilidad espermática y en la que se realizaron algunas pruebas similares. Si bien en trabajos en peces, como los realizados por Pinzón *et al.*, 2005 y Medina-Robles *et al.*, 2007 y otros como Kwantong y Bart, 2006 y Ogier de Baulny *et al.*, 1999 que

trabajaron con *Pangasius larnaudii* y *Silurus glanis* respectivamente, solo trabajan con movilidad espermática y no con la viabilidad espermática, aunque es posible utilizar este parámetro, pues es también un indicador de calidad espermática en términos de integridad de membrana (Rurangwa *et al.*, 2004). La utilización de este parámetro (vitalidad o llamado viabilidad en algunos casos) es utilizada generalmente como indicador de la calidad espermática en estudios de semen de mamíferos como se ve en el trabajo realizado en toros por Cabrera y Pantoja, 2012, en donde utilizan la viabilidad junto con la movilidad espermática, mientras que otros trabajos solo utilizan la viabilidad como único indicador de la calidad espermática (Garner y Johnson 1995).

Se empleó Eosina Y para la discriminación de las células vivas de las muertas (células con daños en la integridad de membrana) de acuerdo a la OMS (2010) para análisis de viabilidad espermática a diferencia de la utilizada por Guarnizo, M. (2007) o en el trabajo realizado por Montes, M. (2012) en donde utilizan Eosina-Nigrosina. En nuestro trabajo se pudo diferenciar adecuadamente, pese a no utilizar lo recomendado por los autores ya mencionados, ya que además de mostrar la coloración de la eosina, las células muertas muestran un tamaño mayor al de las vivas (figura 11).

No es conocido el mecanismo por el cual los crioprotectores afectan negativamente a la movilidad espermática en los peces, pero pese a ser muy efectivos para la criopreservación, es conocido que en altas concentraciones puede causar efectos tóxicos (Martínez y Carrasco 2010).

El DMSO ha sido utilizado la mayoría de veces, debido a que se puede obtener buenos resultados la mayoría de veces (Suquet *et al.*, 2000) (Viveiros y Godinho, 2009). Por contraparte, el DMSO es dañino para otras especies de peces, es por eso que es necesario encontrar otras alternativas que aseguren la supervivencia de espermatozoides congelados. (Martínez y Carrasco 2010). Otros crioprotectores han sido utilizados en pruebas de criopreservación en muestras espermáticas de peces como el Metanol en *Xyrauchen texanus* y *Pelteobagrus fulvidraco* (Tiersch *et al.*, 1998) (Pan *et al.*, 2008), Etilenglicol en *Piaractus brachipomus* (Navarro *et al.*, 2004), Metilenglicol en *Leporinus*

obtusidens (Koch *et al.*, 2007) y Dimetilacetamida en *Oncorhynchus mykiss* (McNiven *et al.*, 1993). En estos casos dichos crioprotectores mostraron ser efectivos al asegurar la movilidad post descongelamiento de las células espermáticas.

Las pruebas de toxicidad se realizaron con la finalidad de observar el efecto de los crioprotectores durante 8 horas sobre la muestra y de esta manera poder tener un panorama amplio que permita dilucidar el efecto que puede producir estos compuestos sobre los espermatozoides y su influencia sobre el decrecimiento de la movilidad espermática, y por ende la calidad espermática. Se utilizó este tiempo para comparar el efecto de los crioprotectores debido a que como muestra el trabajo de Pinzón *et al.*, 2005, a las 8 horas ya no existe movilidad alguna con el DMSO al 15% junto con Glucosa al 5,5%. Los resultados en el presente trabajo mostraron un efecto negativo mayor al visto en el trabajo antes mencionado. Podría ser debido a que la muestra (muestra eyaculada o espermatozoides gonadales) al ser transportada, cuenta ya con 10 horas desde su extracción, haciéndolo más susceptible al posible daño celular. Pruebas con el Metanol demostró tener baja toxicidad y bajo efecto en la movilidad de los espermatozoides doncella sin importar la concentración en la que se trabajó, 5%, 10% y 15%, a diferencia del DMSO, en donde a partir de 10% de concentración, ya se notó un decaimiento evidente en la movilidad espermática.

Por otra parte, se evidenció una resistencia mayor en los espermatozoides gonadales sobre el eyaculado, siendo las más contrastantes las cuales fueron expuestas al METANOL con 10% y 15% de concentración. Esto resultó ser una constante, tal como veremos más adelante con las pruebas de criopreservación. Resulta

También es de esperarse que la toxicidad de estos compuestos pueda extrapolarse y causar efectos negativos sobre los huevos y sobre el proceso de fecundación.

En el presente trabajo se utilizaron distintos dilutores variando el porcentaje para obtener resultados contrastantes. En diversos trabajos en peces se ha utilizado diferentes concentraciones de DMSO, por ejemplo, en *Lates calcarifer* el mejor resultado se obtuvo utilizando DMSO al 5% (Leung 1987), en *Brycon amazonicus*, el DMSO al 10% fue el

porcentaje óptimo para la criopreservación de esta especie (Cruz-Casallas *et al.*, 2004), mientras que en *Clupe payáís* el DMSO al 15% fue la concentración óptima según las pruebas realizadas (Pillai *et al.*, 1994). El Metanol ha sido utilizado en distintas especies de igual forma, en *Clarias gariepinus* el Metanol al 10% obtuvo mejores resultados para la criopreservación (Steyn y Van Vuren, 1987) y en *Ictalurus furcatus*, el Metanol al 15% mostró mejor movilidad espermática luego de dicho proceso igualmente (Bart *et al.*, 1998). Tal como podemos apreciar, a lo largo de los años, las investigaciones en criopreservación en peces, los mejores resultados de movilidad no resultan siempre con un porcentaje único de los crioprotectores, sino, depende de cada especie, por esto se trabajó variando porcentajes de estos, afín de obtener mayor movilidad espermática que los ya observados en los trabajos con doncella después del descongelado. Pinzón *et al.*, 2005 reporta como máxima movilidad progresiva $35 \pm 1\%$ habiendo utilizado DMSO al 7.5% y Glucosa 5.5%, suplementado con yema de huevo. Por otro lado, el trabajo realizado por Medina-Robles *et al.*, 2007 obtuvo 11.6 ± 1.6 de movilidad progresiva utilizando METANOL al 12% con Glucosa al 5.5% junto con leche entera o yema de huevo, a diferencia de los nuestros, los cuales presentaron hasta $49.56 \pm 11.86\%$ de movilidad progresiva post descongelamiento. Se debe resaltar que los resultados obtenidos en el presente estudio provienen de muestras almacenadas y transportadas durante 10 horas de viaje aproximadamente.

Mientras la tasa de enfriamiento aumenta, también lo hace la posibilidad que se forme hielo intracelular. Existe una tasa óptima para cada tipo de célula y por ende variará para cada especie. Esto se ve influenciado por varios factores, tales como el volumen celular, su estructura y la composición de la membrana. (Avila-Portillo *et al.*, 2016).

Se probaron en el presente trabajo dos metodologías de congelación, una rápida con vapores y otra más lenta, utilizando el CRYOBATH el cual estuvo programado con una tasa de congelación específica. Si bien no se reportan tasas ya probadas para esta especie debido a que trabajos anteriores como el realizado por Pinzón *et al.*, 2005 utilizaron solo los vapores de nitrógeno líquido para congelar la muestra antes de sumergirla al nitrógeno líquido (a 4 cm del nitrógeno líquido durante 5 minutos) y Medina-Robles *et al.*, 2007

(durante 30 minutos, no especifica distancia de la muestra con los vapores), se utilizó una previamente propuesta y probada con en una especie del mismo género (*Pseudoplatystoma metaense*) descrito por Ramirez-Merlano *et al.*, 2011, por lo que sería adecuado probar distintos protocolos y distintas tasas de congelación para obtener mejores resultados en la doncella. Las pruebas con esta tasa de congelación arrojaron resultados variables según la metodología de extracción de la muestra. Los espermatozoides gonadales extraídos con el protocolo ya detallado en los resultados del presente trabajo, mostró una mejor respuesta a los crioprotectores en la cual la muestra se vio diluida. Mientras que la muestra eyaculada, mostró nula movilidad en muchos crioprotectores utilizados, al mismo tiempo que en otros, se obtuvo resultados relativamente altos. De todas formas, se obtuvieron buenos resultados independientemente de la metodología de obtención de gametos. Gracias al uso de una tasa de congelación mediante el CRYOBATH se logró obtener $35.55 \pm 6.96\%$ de movilidad de los espermatozoides gonadales, y $34.24 \pm 0\%$ en muestra eyaculada post descongelamiento. Se observó además que las muestras enfrentadas a vapores de nitrógeno líquido (congelación rápida) se vieron más afectadas, siendo el eyaculado el que mostró nula movilidad post descongelamiento de sus espermatozoides. Por otra parte, los espermatozoides gonadales, mostraron más resistencia al congelamiento rápido con vapores, siendo nuestro resultado con mayor % de movilidad el que fue diluido con Metanol al 10% y con Fructosa al 5.5%, con una movilidad de $49.56 \pm 11.86\%$.

Pruebas en otras especies distintas, como la reportada en *Clarias gariepinus* (Steyn y Van Vuren, 1987) utilizan también una tasa de congelación de $11^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a -70°C antes de sumergirlo a nitrógeno líquido. Para la misma especie años más tarde Van der Walt *et al.*, 1993 utiliza una tasa de -5°C a 70°C previo al almacenamiento de nitrógeno líquido. Otros ejemplos de trabajos en donde no utilizan una tasa de congelación podemos observar en el realizado por Bart *et al.*, 1998 en donde utiliza solo vapores de nitrógeno líquido a 6 cm sobre la fase líquida durante 6 minutos antes de colocar la muestra en el nitrógeno líquido.

De igual manera Ogier de Baulny *et al.*, 1999 reporta utilizar vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos a 3 cm de estos en la especie de *Silurus glanis*.

También es importante mencionar la importancia de la utilización de pajillas o pajuelas como instrumento para el proceso de congelamiento, lo que permite una mayor área de contacto en la superficie de la muestra por congelar y dicho congelamiento sea más rápido que utilizando crioviales o pellets (Pinzón *et al.*, 2005)

Tradicionalmente se ha utilizado pequeño volumen de empaque para la criopreservación de peces: 0.25, 0.5 mL para poder fecundar cantidades pequeñas de ovocitos. (Lahnsteiner *et al.*, 1996) En el caso de trabajos en *Silurus glanis* (Ogier de Baulny *et al.*, 1999) y *Pseudoplatystoma punctifer* (Pinzon *et al.*, 2005; Medina-Robles *et al.*, 2007) utilizaron pajillas de 0.5 mL, al igual como se utilizó en el presente trabajo. Por otra parte, trabajos en criopreservación de semen de *Clarias gariepinus*, utilizaron pajillas de 1 mL (Steyn y Van Vuren, 1987; Van der Walt *et al.*, 1993; Viveros *et al.*, 2001). Es importante mencionar que también se han realizado trabajos utilizando macrotubos (5 mL) en especies de agua dulce como *Oncorhynchus mykiss*, *Polyodon spathula* y *Silurus glanis* (Lahnsteiner *et al.*, 1997; Brown y Mims, 1999; Bart *et al.*, 1998).

Las pruebas de citotoxicidad y de criopreservación, así como los del transporte arrojan resultados interesantes que podrían ser objeto de estudio en futuros trabajos de investigación. Debido al estado en el que la especie se encuentra en nuestro país y probablemente por temas ambientales, no se obtiene el volumen de muestra cómo se mencionan en trabajos realizados en la misma especie en otros países. Por lo que en muestras eyaculadas con bajo volumen es probable no encontrar movilidad de los espermatozoides a diferencia de las que pudieran ser extraídas directamente de la gónada sacrificando, obviamente, al reproductor macho. Esto es debido a que la muestra obtenida de la gónada se ve menos afectada por agentes como la orina, sangre, agua u otros contaminantes que el proceso de extracción con masajes conlleva inherentemente, viéndose reflejado en la resistencia por parte de los espermatozoides a las pruebas realizadas.

Utilizar esta metodología resulta ser viable en fondos en donde abunden los reproductores y exista una crianza sostenible de esta especie, ya que con un solo macho es posible realizar una fecundación exitosa en el proceso de obtención de alevinos. Resulta necesario entonces realizar pruebas de reproducción y producción de huevos fecundados con la muestra congelada (eyaculada y gonadal) para poder comparar las tasas de fecundación y determinar la viabilidad que del protocolo que el presente proyecto propone. Tal como lo menciona Padilla et al., 2001, la reproducción en centros acuícolas de *Pseudoplatystoma* se realiza en seco utilizando recipientes, haciendo sencilla y posible la utilización de muestras descongeladas. De esta manera se podría optimizar y mejorar la producción de semillas, ya no viendo necesario adquirirlos de otros sitios u obtenerlos del medio natural. También está demostrado que muchas especies de peces, al no encontrarse en su medio natural, realizan variaciones en su ciclo reproductivo, por lo no se reproducen al resistirse en desovar en los estanques en donde están en cautiverio (FONDEPES 2015), por lo que sumado a las técnicas de reproducción que se vienen realizando en distintos centros acuícolas, la recuperación y criopreservación de material espermático resulta ser necesario para una producción continua en temporadas en donde la reproducción se ve condicionada por la carencia de gametos masculinos.

Como queda claro, los resultados del presente trabajo pueden ser mejorados en cuanto se realicen más pruebas enfocados en el transporte, tratamiento, congelación (verificar la eficacia del guardado en pajillas y el volumen) y descongelación a fin de reducir la mortalidad causada por la manipulación incorrecta de la muestra. De igual forma es necesario variar las concentraciones de los dilutores con la finalidad de observar la variación que existe en cada uno de ellos y el efecto que puede causar en mayor o menor medida.

8. CONCLUSIONES

- Se pueden extraer espermatozoides directamente de la gónada en *Pseudoplatystoma punctifer* mediante cortes con una buena calidad espermática.
- Es viable transportar muestra espermática de *Pseudoplatystoma punctifer* en soluciones estabilizadoras hasta 12 horas manteniendo una buena calidad espermática.
- Es posible criopreservar exitosamente y obtener espermatozoides transportados con movilidad espermática de *Pseudoplatystoma punctifer* utilizando vapores de nitrógeno líquido (congelación rápida) o utilizando algún sistema que permita controlar la curva de congelación (congelación lenta).
- El METANOL afecta en menor medida a la movilidad espermática en las muestras de doncella, siendo al 10% de concentración, junto con GLUCOSA o FRUCTOSA, la mejor para realizar la criopreservación.
- Los espermatozoides de doncella obtenidos mediante extracción gonadal presentan mayor resistencia al proceso de criopreservación (toxicidad, congelamiento y descongelamiento) en comparación de la muestra eyaculada.

9. RECOMENDACIONES

- Se debe de tener mucho cuidado con la temperatura con la que se trabaje la muestra, ya que los espermatozoides deben de mantenerse en una temperatura adecuada.
- Es importante variar el porcentaje de DMSO y METANOL para encontrar la concentración óptima en la cual la toxicidad producida por estas sea aceptable en relación a la protección que estos crioprotectores otorgan a las células espermáticas en el proceso de congelamiento, viéndose reflejado en una buena movilidad espermática post descongelamiento.
- También es posible probar otros crioprotectores como Etilenglicol y Propilenglicol.

- Es necesario comprobar la tasa de fecundación que los espermatozoides gonadales descongelados tienen en comparación a la muestra eyaculada fresca (la que se utiliza en distintos centros acuícolas para la producción de alevinos de esta especie) para determinar la factibilidad en el uso de este protocolo.
- Los resultados obtenidos en este trabajo sirven como punto de partida a futuros trabajos que pretendan optimizar un protocolo de criopreservación en espermatozoides con una alta movilidad y viabilidad espermática en doncella.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-JUÁREZ, Marisela; RUIZ-CAMPOS, Gorgonio; PANIAGUA-CHÁVEZ, Carmen G. Cold storage of the sperm of the endemic trout *Oncorhynchus mykiss nelsoni*: a strategy for short-term germplasm conservation of endemic species. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 2014, vol. 85, no 1, p. 294-300.

ANCHORDOGUY, Thomas J., *et al.*, Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology*, 1991, vol. 28, no 5, p. 467-473.

ARAV, Amir, *et al.*, New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and cellular endocrinology*, 2002, vol. 187, no 1-2, p. 77-81.

ÁVILA-PORTILLO, Luz Mábel, *et al.*, Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 2016, vol. 57, no 4, p. 291-300.

BANDA, Jorge, *et al.*, Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2010, vol. 21, no 2, p. 145-153.

BART, Amrit N.; WOLFE, Dwight F.; DUNHAM, Rex A. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of channel catfish eggs. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1998, vol. 127, no 5, p. 819-824.

BERRÍOS, Olga, *et al.*, Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial. *Archivos de medicina veterinaria*, 2010, vol. 42, no 3, p. 179-186.

BOBE, Julien; LABBÉ, Catherine. Egg and sperm quality in fish. *General and comparative endocrinology*, 2010, vol. 165, no 3, p. 535-548.

BROWN, George G.; MIMS, Steven D. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1999, vol. 30, no 2, p. 245-249.

BWANGA, C. O. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1991, vol. 32, no 4, p. 431-453.

CABRERA, Próspero; PANTOJA, César. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 2012, vol. 23, no 2, p. 192-200.

CAMPOS BACA, Luis. El cultivo de la gamitana en Latinoamérica. 2015.

CLOUD, J.; PATTON, S. Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2009, p. 237-250.

CORTÉS MILLÁN, Gilberto Augusto. *Guía para el manejo, cría y conservación del bagre rayado Pseudoplatystoma punctifer Linneo*. 2003.

CRUZ-CASALLAS, Pablo E., *et al.*, Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2004, vol. 35, no 4, p. 529-535.

DE BAULNY, B. Ogier; LABBÉ, 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, vol. 39, no 2, p. 177-184.

DUPRÉ, Enrique; ESPINOZA, Carlos. Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico. *Investigaciones Marinas*, 2004, vol. 32, no 2, p. 3-9.

ERDAHL, David A.; GRAHAM, E. F. Cryopreservation of salmonid spermatozoa. *Cryobiology*, 1978, vol. 15, no 3, p. 362-364.

EVIA VELÁSQUEZ, Johana; HUERTO VELÁSQUEZ, Héctor; LIZARBE FERNANDEZ, Mónica. Evaluación financiera de plan de negocio industrial de peces amazónicos de “Acuicultura Ucayali”-ubicado en la ciudad de Pucallpa–Ucayali–Perú. 2014.

FABBROCINI, A., *et al.*, Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, 2000, vol. 40, no 1, p. 46-53.

FONDO NACIONAL DE DESARROLLO PESQUERO (FONDEPES). Protocolo de Reproducción de Doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*). Primera edición (2015). <https://www.fondepes.gob.pe/src/manuales/Protocolo-de-Doncella.pdf>

GARNER, Duane L.; JOHNSON, Lawrence A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of reproduction*, 1995, vol. 53, no 2, p. 276-284.

GOULDING, Michael; SMITH, Nigel JH; MAHAR, Dennis J. *Floods of fortune: ecology and economy along the Amazon*. Columbia University Press, 1996.

GUARNIZO PINEDA, Melissa, *et al.*, *Caracterización seminal y ensayos preliminares de crioconservación se Semen de Bagre Rayado (Pseudoplatystomas punctifer-linnaeus 1766)*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

HAMMERSTEDT, Roy H.; GRAHAM, James K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 1992, vol. 29, no 1, p. 26-38.

HERRERA-CRUZ, Edwin Enrique, *et al.* Crioconservación de semen de bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* con tres diferentes crioprotectores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2019, vol. 21, no 2, p. 55-62.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, 2000, vol. 62, no 1-3, p. 3-22.

INTURIAS CANEDO, A. D. Edad, crecimiento y reproducción de *Pseudoplatystoma punctifer* y *Pseudoplatystoma tigrinum* en la amazonia boliviana. 2008.

KATO, K. Viability growth and external morphology of meiotic-and mitotic-gynogenetic diploids red sea bream, *Pagrus major*. *J. Appl. Ichthyol.*, 2001, vol. 17, no 3, p. 97-103.

KOCH, J. F. A., *et al.*, Diluidores e crioprotetores na criopreservacao do semen de piapara *Leporinus obtusidens*. En *Proceedings of the 44th meeting of the Brazilian Animal Science Society, Jaboticabal, SP, Brazil*. 2007. p. 1-3.

KURLAND, C. G.; ANDERSSON, S. G. E. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64, no 4, p. 786-820.

KWANTONG, Samorn; BART, Amrit N. Cryopreservation of black ear catfish, *Pangasius larnaudii*, (Bocourt) sperm. *Aquaculture Research*, 2006, vol. 37, no 9, p. 955-957.

KWANTONG, Samorn; BART, Amrit N. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. *Aquaculture Research*, 2003, vol. 34, no 10, p. 887-893.

LABBE, Catherine; CROWE, Lois M.; CROWE, John H. Stability of the lipid component of trout sperm plasma membrane during freeze-thawing. *Cryobiology*, 1997, vol. 34, no 2, p. 176-182.

LAHNSTEINER, F., *et al.*, Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation. *Journal of Applied Aquaculture*, 1996, vol. 6, no 4, p. 47-73.

LAHNSTEINER, Franz; WEISMANN, T.; PATZNER, Robert. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (Hucho hucho). *Aquaculture*, 1996, vol. 144, no 1-3, p. 265-274.

LEUNG, Luke Kui-Po. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture*, 1987, vol. 64, no 3, p. 243-247.

LLASACA, CALISAYA, Ehrlich Yam. Efecto de diferentes tiempos de criopreservación sobre la viabilidad del semen de *Colossoma macropomum* "gamitana". 2013.

LLASACA, CALISAYA, Ehrlich Yam., *et al.*,Tiempo de latencia para semen colectado de *Colossoma macropomum* "Gamitana" en solución sacarosa. 2014.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, Juan C., *et al.*,Artículo de Revisión: La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 2018, p. 67-96.

LOPES, M. C., *et al.*,Alimentação de larvas de surubim pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829), em laboratório, na primeira semana. *Boletim Técnico del CEPTA*, 1996, vol. 9, p. 11-21.

MARIA, Alexandre Nizio, *et al.*,Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 2006, vol. 260, no 1-4, p. 298-306.

Martínez, José; Carrasco, Sandra. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana*, 2010, vol. 15, no 2, p. 3-23.

MCNIVEN, M. A. *Dimethyl-acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa.*--p. 943-948. En: *Theriogenology (USA)*.--Vol. 40, no. 5 (Nov. 1993).

MEDINA-ROBLES, V. M., *et al.*,Caracterización y ensayos preliminares de crioconservación seminal de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*-Linnaeus,

1766). *memorias XIII Jornada de Acuicultura. Villavicencio: Universidad de los Llanos*, 2007.

MONTES MONTES, Melissa. Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en Criopreservación de espermatozoides de Lengado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867). 2012.

NAVARRO, Oscar J.; SANTAMARÍA, Yohana M. Velasco; CASALLAS, Pablo E. Cruz. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2004, vol. 17, no 4, p. 53-59.

NUÑEZ, Jesus. Evaluación de una solución inmovilizadora para criopreservación del semen de *Colossoma macropomum*, "Gamitana". 2014.

PADILLA-PÉREZ, Palmira P.; ALCANTARA-BOCANEGRA, Fernando; ISMIÑO-ORBE, Rosa A. Reproducción inducida de la doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* y desarrollo embrionario-larval. *Folia Amazónica*, 2001, vol. 12, no 1-2, p. 141-154.

PAN, Jianlin, *et al.*, Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. *Aquaculture*, 2008, vol. 279, no 1-4, p. 173-176.

PILLAI, Murali C.; YANAGIMACHI, Ryuzo; CHERR, Gary N. In vivo and in vitro initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from the Pacific herring, *Clupea pallasii*. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, vol. 269, no 1, p. 62-68.

PINZÓN ARCINIEGAS, S. M.; MOJICA RODRÍGUEZ, J. E.; CRUZ CASALLAS, P. E. Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado.

RAMÍREZ-MERLANO, J. A.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Archivos de medicina veterinaria*, 2011, vol. 43, no 2, p. 135-144.

RANA, K. J. Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications. 1995.

RASUL, Z.; AHMED, N.; ANZAR, M. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*, 2007, vol. 68, no 5, p. 813-819.

RÍOS, Leoncio Ruiz. Estado de la acuicultura en el Perú. *Revista AquaTIC*, 2016, no 37.

RURANGWA, Eugène, *et al.*, Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 2001, vol. 55, no 3, p. 751-769.

RURANGWA, Eugène, *et al.*, The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 2004, vol. 234, no 1-4, p. 1-28.

SALAS, Alberto; BARRIGA, Maritza; ALBRECHT-RUIZ, Miguel; CHU, Fred; ORTEGA, Hernán. Información nutricional sobre algunos peces comerciales de la Amazonía peruana. 2009.

SHLAFER, M. Pharmacological considerations of cryopreservation. In "Organ Preservation for Transplantation" (AM Karow, Jr., and DE Pegg, Eds.). 1981.

STEIN, H.; BAYRLE, H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. En *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. EDP Sciences, 1978. p. 1073-1076.

STEYN, G. J.; VAN VUREN, J. H. J. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture*, 1987, vol. 63, no 1-4, p. 187-193.

SUQUET, M., *et al.*, Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research: Original Articles*, 2000, vol. 31, no 3, p. 231-243.

SUZUKI, Toru, *et al.*, Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. *Fisheries science*, 1995, vol. 61, no 2, p. 193-197.

TIERSCH, Terrence R. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2008, vol. 37, no SPE, p. 15-19.

TIERSCH, Terrence R., *et al.*, Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1998, vol. 127, no 1, p. 95-104.

VINCENT, Caroline, *et al.*, Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophysical Chemistry*, 1988, vol. 29, no 1-2, p. 161-169.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça; GODINHO, Hugo Pereira. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, vol. 35, no 1, p. 137-150.

YAO, Z., *et al.*, Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, 2000, vol. 181, no 3-4, p. 361-375.

11. ANEXOS

Anexo 1. Toxicidad de crioprotectores sobre los espermatozoides extraído mediante extracción gonadal.

Composición del dilutor		Movilidad espermática de la muestra gonadal						
		Tiempo de exposición						
		4 horas			8 horas			
		Progresivo	No progresivo	Inmóviles	Progresivo	No progresivo	Inmóviles	
1	DMSO 5%	GLUCOSA	47.65 ± 4.53	0 ± 0	52.35 ± 4.53	30.9 ± 7.28	1.16 ± 1.64	67.94 ± 8.92
2	DMSO 5%	FRUCTOSA	39.77 ± 0	0 ± 0	60.23 ± 0	39.58 ± 0	2.08 ± 0	58.33 ± 0
3	DMSO 5%	TREHALOSA	38.89 ± 0	0 ± 0	61.11 ± 0	28.17 ± 10.07	1.47 ± 2.08	70.36 ± 12.15
4	DMSO 5%	SACAROSA	27.76 ± 10.98	2.31 ± 3.26	69.93 ± 7.72	26.37 ± 11.19	3.74 ± 1.24	69.89 ± 9.95
5	DMSO 10%	GLUCOSA	20.76 ± 1.53	1.15 ± 1.63	78.09 ± 3.16	16.88 ± 1.38	3.41 ± 4.82	79.71 ± 3.44
6	DMSO 10%	FRUCTOSA	24.41 ± 1.53	1.67 ± 2.36	73.92 ± 0.83	22.28 ± 0.08	4.76 ± 6.73	72.96 ± 6.66
7	DMSO 10%	TREHALOSA	25.68 ± 0	0 ± 0	74.32 ± 0	15.84 ± 3.9	0.47 ± 0.66	83.69 ± 3.24
8	DMSO 10%	SACAROSA	19.72 ± 0	0 ± 0	80.28 ± 0	17.54 ± 0.33	1.92 ± 2.72	80.53 ± 2.39
9	DMSO 15%	GLUCOSA	15.81 ± 1.21	0.79 ± 1.11	83.4 ± 0.09	14.34 ± 0.67	0.93 ± 1.31	84.73 ± 1.98
10	DMSO 15%	FRUCTOSA	17.6 ± 2.84	0.65 ± 0.92	81.75 ± 1.93	15.67 ± 0.64	2.7 ± 0.74	81.63 ± 1.39
11	DMSO 15%	TREHALOSA	4.08 ± 0	0 ± 0	95.92 ± 0	8.84 ± 7.06	0.53 ± 0.75	90.63 ± 7.81
12	DMSO 15%	SACAROSA	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
13	METANOL 5%	GLUCOSA	47.68 ± 1.43	0 ± 0	52.32 ± 1.43	43.62 ± 1.38	0.68 ± 0.96	55.7 ± 2.33
14	METANOL 5%	FRUCTOSA	55.28 ± 3.47	0 ± 0	44.72 ± 3.47	54.17 ± 0	0.83 ± 0	45 ± 0
15	METANOL 5%	TREHALOSA	45.6 ± 3.28	0.75 ± 1.06	53.65 ± 2.22	44.83 ± 0	0 ± 0	55.17 ± 0
16	METANOL 5%	SACAROSA	28.85 ± 20.4	0 ± 0	71.15 ± 50.31	25.74 ± 4.85	1.77 ± 1.42	72.49 ± 6.27
17	METANOL 10%	GLUCOSA	55.41 ± 12.97	0 ± 0	44.59 ± 12.97	54.11 ± 11.87	0 ± 0	45.89 ± 11.87
18	METANOL 10%	FRUCTOSA	49.46 ± 3.6	3.19 ± 0.73	47.36 ± 2.86	47.63 ± 5.87	0 ± 0	52.37 ± 5.87
19	METANOL 10%	TREHALOSA	44.91 ± 3.2	0.74 ± 1.04	54.36 ± 2.16	43.54 ± 4.08	0 ± 0	56.46 ± 4.08
20	METANOL 10%	SACAROSA	38.2 ± 1.8	4.28 ± 0.47	57.52 ± 1.33	37.41 ± 1.48	1.3 ± 1.84	61.29 ± 0.35
21	METANOL 15%	GLUCOSA	51.92 ± 0	1.92 ± 0	46.15 ± 0	47.63 ± 0.08	1.74 ± 0.29	50.63 ± 0.2
22	METANOL 15%	FRUCTOSA	44.16 ± 0	2.6 ± 0	53.25 ± 0	42.86 ± 0	8.16 ± 0	48.98 ± 0
23	METANOL 15%	TREHALOSA	43.35 ± 2.56	0 ± 0	56.65 ± 2.56	42.46 ± 2.81	1.79 ± 2.53	55.75 ± 0.28
24	METANOL 15%	SACAROSA	46.56 ± 0.57	1.74 ± 2.46	51.71 ± 3.03	43.96 ± 0	0 ± 0	56.04 ± 0

Anexo 2. Toxicidad de crioprotectores sobre los espermatozoides extraído mediante masajes (eyaculado). (n=2) (Promedio ± desviación estándar)

Composición del dilutor	Movilidad espermática de la muestra eyaculada											
	Tiempo de exposición											
	4 horas		8 horas		12 horas		4 horas		8 horas		12 horas	
	Progresivo	No progresivo	Inmóviles	Progresivo	No progresivo	Inmóviles	Progresivo	No progresivo	Inmóviles	Progresivo	No progresivo	Inmóviles
1 DMSO 5%	37.6 ± 1.75	2.02 ± 1.26	60.38 ± 3	14.18 ± 0.81	1.76 ± 0.17	84.06 ± 0.64	10.91 ± 1.64	1.72 ± 2.44	87.36 ± 4.07	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
2 DMSO 5%	34.51 ± 0	1.77 ± 0	63.72 ± 0	25.23 ± 5.81	1.98 ± 0.97	72.79 ± 6.78	20.48 ± 0.68	1.61 ± 2.28	77.9 ± 2.97	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
3 DMSO 5%	21.68 ± 1.13	1.48 ± 1.2	76.84 ± 2.32	17.53 ± 1.72	0.63 ± 0.88	81.84 ± 2.6	11.89 ± 8.33	1.11 ± 1.57	87 ± 9.9	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
4 DMSO 5%	14.85 ± 0	1.98 ± 0	83.17 ± 0	11.62 ± 1.03	0.62 ± 0.87	87.76 ± 1.9	11.22 ± 1.46	2.41 ± 0.52	86.38 ± 0.94	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
5 DMSO 10%	3.16 ± 4.48	0.63 ± 0.9	96.2 ± 5.37	2.01 ± 2.84	2.15 ± 3.04	95.85 ± 5.88	1.04 ± 1.47	4.17 ± 5.89	94.79 ± 7.37	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
6 DMSO 10%	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	3.25 ± 4.59	0 ± 0	96.75 ± 4.59	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
7 DMSO 10%	0.47 ± 0.66	0 ± 0	99.53 ± 0.66	0.43 ± 0.61	0.29 ± 0.41	99.28 ± 1.02	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
8 DMSO 10%	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
9 DMSO 15%	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
10 DMSO 15%	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
11 DMSO 15%	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
12 DMSO 15%	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
13 METANOL 5%	59.7 ± 8.2	0 ± 0	40.3 ± 8.2	48.17 ± 1.57	1.96 ± 2.77	49.87 ± 1.21	37.31 ± 3.14	4.96 ± 0.43	57.73 ± 2.71	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
14 METANOL 5%	54.35 ± 0	0 ± 0	45.65 ± 0	47.97 ± 0.58	0 ± 0	52.03 ± 0.58	38.24 ± 0.66	4.95 ± 2.43	56.81 ± 1.77	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
15 METANOL 5%	26.51 ± 0	1.2 ± 0	72.29 ± 0	24.57 ± 1.75	1.61 ± 2.28	73.82 ± 4.03	21.12 ± 2.93	3.76 ± 0.83	75.12 ± 3.76	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
16 METANOL 5%	35.9 ± 4.69	0 ± 0	64.1 ± 4.69	31.53 ± 3.74	1.48 ± 2.1	66.99 ± 1.64	27.01 ± 1.7	5.79 ± 0.94	67.2 ± 0.76	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
17 METANOL 10%	36.47 ± 2.76	1.77 ± 2.5	61.76 ± 0.26	34.77 ± 3.26	3.72 ± 2.08	61.51 ± 1.18	32.21 ± 5.15	5.21 ± 0.64	62.58 ± 5.78	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
18 METANOL 10%	47.77 ± 0	0 ± 0	52.23 ± 0	27.08 ± 0.27	1.36 ± 1.93	71.55 ± 2.19	23.39 ± 3.82	2.81 ± 0.9	73.8 ± 2.92	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
19 METANOL 10%	25.32 ± 0	3.8 ± 0	70.89 ± 0	23.16 ± 1.59	6.11 ± 1.46	70.73 ± 3.05	21.64 ± 0.07	3.58 ± 3.46	74.78 ± 3.52	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
20 METANOL 10%	38.46 ± 0	3.85 ± 0	57.69 ± 0	37.82 ± 1.85	3.26 ± 4.61	58.92 ± 6.47	36.32 ± 0.66	3.24 ± 1.92	60.44 ± 2.58	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
21 METANOL 15%	27.78 ± 0	2.22 ± 0	70 ± 0	24.01 ± 4.94	3.78 ± 1.72	72.21 ± 6.66	24.55 ± 10.03	4.12 ± 1.34	71.33 ± 11.37	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
22 METANOL 15%	23.16 ± 0	1.05 ± 0	75.79 ± 0	-	-	-	25.53 ± 0	4.26 ± 0	70.21 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
23 METANOL 15%	21.36 ± 0	0.97 ± 0	77.67 ± 0	9.67 ± 3.03	1.08 ± 1.52	89.26 ± 1.51	-	-	-	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0
24 METANOL 15%	32.75 ± 3.1	3.1 ± 2.43	64.15 ± 5.53	3 ± 0.21	3.09 ± 1.02	93.91 ± 0.82	-	-	-	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0

Anexo 3. Valores de volumen y concentración espermática de reproductores machos en distintos trabajos de criopreservación en el Género *Pseudoplatystoma*. (Promedio \pm desviación estándar)

AUTOR	Volumen (mL)	Concentración
Pinzón <i>et al.</i> , 2005	3 \pm 0.30	23.4 \pm 1.69
Ramírez-Merlano <i>et al.</i> , 2005	10.14 \pm 1.83	35.18 \pm 3.8
Medina-Robles <i>et al.</i> , 2007	9.9 \pm 3.2	31.9 \pm 4.4
Herrera-Cruz <i>et al.</i> , 2019	6.1 \pm 4.3	54.7 \pm 22.9
Presente trabajo EYACULADO	1.25 \pm 1.22	9.4 \pm 11.4
Presente trabajo GONADAL	7.5 \pm 0	16.28 \pm 0

Anexo 4. Valores de peso y talla de reproductores machos en distintos trabajos de criopreservación en el Género *Pseudoplatystoma*. (Promedio \pm desviación estándar)

AUTOR	Peso (kg)	Talla (cm)
Ramírez-Merlano <i>et al.</i> , 2005	2.84 \pm 0.7	71.3 \pm 6.1
Medina-Robles <i>et al.</i> , 2007	1.6 \pm 0.6	58.2 \pm 9.5
Presente trabajo	2.3 \pm 0.30	61.3 \pm 2.9



Anexo 5. Estanque de cultivo de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) - Fundo "EL ENCANTO DE SAIPAY", Tingo María.



Anexo 6. Estanques de cultivo de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) - Centro de Acuicultura ``Nuevo Horizonte``, Iquitos.



Anexo 7. Estanque de cultivos de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) - Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), Pucallpa.



Anexo 8. Pesca de machos reproductores de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) - Fundo ``EL ENCANTO DE SAIPAY``, Tingo María.



Anexo 9. Obtención de peso y tamaño de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) - Fundo ``EL ENCANTO DE SAIPAY``, Tingo María.



Anexo 10. Recolección de semen mediante masajes abdominales realizados en el área abdominal de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) - Fundo "EL ENCANTO DE SAIPAY", Tingo María.



Anexo 11. Material espermático de doncella (*Pseudoplatystoma punctifer*) siendo diluido en la solución de transporte. Fundo "EL ENCANTO DE SAIPAY", Tingo María.



Anexo 12. Grupo de trabajo del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción encargado del trabajo de la muestra de espermatozoides transportado exitosamente desde el lugar de muestreo. (UNMSM – Lima).