

Efecto del pH y de la osmolalidad sobre la activación y tiempo de movilidad espermática en cachamas y bagres suramericanos

Effect of pH and osmolality on activation and time sperm motility in pacu and South Americans catfishes

David D. Rincón Rodríguez¹, Yoeli C. R. Méndez López² y Germán A. Poleo Camejo³

¹Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Decanato de Agronomía, Estación de Piscicultura. Correo electrónico: david.rincon@ucla.edu.ve. ²Universidad del Zulia (LUZ), Facultad Experimental de Ciencias, Laboratorio de Citogenética, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. ³Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Decanato de Agronomía, Estación de Piscicultura.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el tiempo de activación y la movilidad espermática del semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), cachama negra (*Colossoma macropomum*), bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y bagre sierra (*Oxydoras sifontesi*), bajo el efecto de diferentes pH (2,0 – 4,0 – 6,0 – 6,5 – 7,0 – 7,5 – 8,0 – 8,5 y 9,0) y osmolalidades (0, 100, 200, 250, 300, 350 y 400 mOsm kg⁻¹). El semen de ambas especies de cachama fue recolectado 18 horas luego de la inducción hormonal, utilizando 1 µgkg⁻¹ de Ova-RH[®]. Los bagres no fueron inducidos hormonalmente. Luego de recolectar el semen, se determinó su volumen y color, así como el tiempo de activación (TA) y la movilidad espermática (MOV) al colocar 10 µL de semen fresco y 10 µL de cada solución para su observación en el microscopio. Los tratamientos se evaluaron por duplicado y los datos fueron comparados mediante el procedimiento GLM (LSMEANS) en el programa estadístico SAS. Se observaron diferencias significativas para la MOV en el semen de cachama blanca y negra por efecto de la osmolalidad y pH (P<0,05). También se obtuvieron diferencias significativas (P<0,01) para el TA y la MOV por efecto de la osmolalidad en ambos bagres, no así para el pH. Los espermatozoides de cachama blanca y negra fueron activados, tanto por diferencias en la osmolalidad como por cambios en el pH de la solución externa, mientras que los espermatozoides de los bagres sierra y rayado solo fueron activados por cambios osmóticos.

Palabras clave: espermatozoides, semen, peces óseos, presión osmótica, maduración gonadal.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate motility and activation time in spermatozoa of red-bellied pacu (*Piaractus brachypomus*), black pacu (*Colossoma macropomum*), striped catfish (*Pseudoplatystoma fasciatum*) and ripsaw catfish (*Oxydoras sifontesi*), under the effect of different pH (2.0, 4.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 and 9.0), and osmolality (0, 100, 200, 250, 300, 350, and 400 mOsm.kg⁻¹). While semen from both species of Pacus were collected 18 hours after induction with Ova-RH[®] at 1 µg.kg⁻¹, catfish were not hormonally induced. Immediately, after semen collection, volume and seminal color were determined. Assessment of the percentage of motility (MOV) and activation time (TA) was carried out under a light microscope by placing 10 mL of fresh semen, and 10 mL of each solution with different pH and osmolality. Treatments were evaluated by duplicate, and data compared using the GLM (LSMEANS) procedure. There were observed significant differences in the MOV of semen of black and red-bellied pacu by the effects of changes in osmolality and pH (P<0.05). Spermatozoa of catfish only showed significant differences (P<0,01) in MOV and TA with changes in osmolality. Both, osmolality and pH were revealed as factors that affect sperm motility in Pacus, while sperm from catfishes is only activated by changes in osmotic pressure.

Key words: spermatozoid, semen, bony fish, osmotic pressure, gonadal maturation.

INTRODUCCIÓN

En algunos peces neotropicales, como la cachama blanca, cachama negra, coporos y bagres, los procesos de reproducción no culminan en cautiverio, persistiendo el desarrollo progresivo de las gónadas hasta las etapas finales de la maduración de los gametos; solo se detiene la secuencia antes de la liberación de éstos. Tanto la maduración gonadal como el desove, son dependientes de estímulos ambientales como la temperatura, fotoperíodo, pluviosidad, cambios de pH, transparencia del agua, conductividad y concentración de oxígeno, entre otros factores (Harvey y Hoar, 1980; Guerrero *et al.*, 2008). En peces, las variables movilidad espermática progresiva, duración del movimiento y concentración espermática han sido tradicionalmente utilizadas como predictores de la calidad seminal. Sin embargo, estas metodologías están basadas en observaciones subjetivas y de alta variabilidad según la precisión del evaluador (Ramírez *et al.*, 2011; Tiersch y Green, 2011).

Los espermatozoides de peces teleósteos difieren de los espermatozoides de mamíferos en aspectos importantes, tales como la inmovilidad en el fluido seminal, activación de la movilidad por contacto con el agua, corto tiempo de activación y la ausencia de acrosoma (Valdebenito *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2001). Mientras los espermatozoides de los peces se encuentren en el líquido seminal, permanecerán inmóviles y desarrollarán progresivamente la capacidad de desplazarse durante su tránsito por el conducto espermático.

Una vez liberados al medio, durante el desove, los espermatozoides son activados al entrar en contacto con el agua o algún líquido que altere el medio isosmótico del fluido seminal que los envuelve. El medio activador es propicio en ambientes naturales, siendo el agua salada para peces marinos y, por su parte, el agua dulce para peces de aguas continentales.

Estando activados, los espermatozoides cuentan con un periodo de movilidad limitado a pocos segundos: en este lapso de tiempo los espermatozoides pueden lograr la fecundación. Se ha determinado que los cambios en la presión osmótica, balance iónico o diferencias en el pH, son algunas de las condiciones fisicoquímicas

del medio que se relacionan con la activación de la movilidad espermática (Tanimoto *et al.*, 1994; Takai and Morisawa, 1995; Ren *et al.*, 2001).

Las variables activación y tiempo de movilidad espermática son específicas para cada especie; por tanto, el estudio de éstas es significativo en peces de relevancia comercial, ya que permite mejorar los protocolos de reproducción e incrementar la productividad.

Por consiguiente, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del pH y la osmolalidad sobre el tiempo de activación y la movilidad espermática de los peces: cachama blanca, cachama negra, bagre rayado y bagre sierra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los peces utilizados en la investigación pertenecían al inventario de reproductores de la Estación Piscícola de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", ubicada en el caserío Cañaveral, Yaritagua (estado Yaracuy, Venezuela), a los 10°7'3" Norte, 69°6'48" Oeste y 500 msnm.

Se seleccionaron cuatro ejemplares machos de cachama blanca, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818); cuatro de cachama negra, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816); cuatro de bagre rayado, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus 1766) y cuatro de bagre sierra, *Oxydoras sifontesi* (Fernández-Yépez, 1968), todos sexualmente maduros y expuestos a fotoperíodo natural.

La ingesta de los reproductores se realizó una vez al día, utilizando alimento concentrado comercial para peces (Puricachama®; Purina, Venezuela) con 28% de proteína cruda.

Condiciones experimentales

Osmolalidad. Se prepararon soluciones fisiológicas de Hank (Tiersch *et al.*, 1994), con ajuste de la presión osmótica, utilizando un osmómetro de punto de congelación (Micro-Osmette, PrecisionSystem INC, MA, USA). Para cada especie se evaluaron siete tratamientos experimentales: el primero (T₁) como grupo control (0 mOsmkg⁻¹) y los seis tratamientos

restantes se desglosaron de la siguiente forma: T₂ (100 mOsmkg⁻¹), T₃ (200 mOsm kg⁻¹), T₄ (250 mOsmkg⁻¹), T₅ (300 mOsm kg⁻¹), T₆ (350 mOsmkg⁻¹) y T₇ (400 mOsmkg⁻¹). Cada tratamiento se evaluó por duplicado.

pH. Se prepararon soluciones fisiológicas de Hank (Tiersch *et al.*, 1994) a las cuales se ajustaron el pH con HCl o NaOH, utilizando un potenciómetro (Oakton, PC510, IL, USA). Para cada especie se evaluaron nueve tratamientos experimentales, conformados bajo el siguiente esquema: T₁ (pH 2), T₂ (pH 4), T₃ (pH 6), T₄ (pH 6,5), T₅ (pH 7), T₆ (pH 7,5), T₇ (pH 8), T₈ (pH 8,5) y T₉ (pH 9). Cada tratamiento se evaluó por duplicado.

Tratamiento hormonal

Para la inducción hormonal se empleó una dosis única del análogo sintético comercial de hipófisis de salmón OVA-RH®, a razón de 1 µgkg⁻¹ de peso corporal para los machos de cachama blanca y cachama negra (Poleo y Mora, 2008; Rincón *et al.*, 2012). En los bagres no se empleó tratamiento hormonal para la obtención del semen.

Obtención del semen

Transcurridas 18 h desde la administración del inductor hormonal, las cachamas blancas y negras se extrajeron del agua, secando cuidadosamente sus aletas y abdomen para evitar el contacto del semen con el agua y de esta forma, prevenir su activación. Luego, se procedió a presionar levemente la papila urogenital, con el objeto de eliminar restos de agua, orina o heces (Fresnada *et al.*, 2004).

Al realizar masaje abdominal en sentido cráneo-caudal, se extrajo el semen a los peces, siendo recolectado directamente en tubos plásticos estériles de 15 ml que contenían solución fisiológica de Hank, ajustada a 280 mOsm kg⁻¹, en proporción 1:1, a fin de impedir la activación de los espermatozoides. El masaje fue suspendido de inmediato al evidenciarse contaminantes en el semen, tales como sangre, bilis, orina o heces (Cruz-Casallas *et al.*, 2006; Poleo y Mora, 2008).

Evaluación del volumen y color del semen

Cuando se obtuvo el semen de cada uno de los peces en estudio, se procedió a evaluar su volumen y color, a fin de obtener la cantidad

en mL requeridos y descartar la presencia de contaminantes (sangre, orina o heces) que pudiesen afectar su calidad (Cruz-Casallas, 2001; Navarro *et al.*, 2004; Cruz-Casallas *et al.*, 2006).

Evaluación del tiempo de activación y la movilidad espermática bajo efecto de la osmolalidad y pH

Para la evaluación del efecto de la osmolalidad sobre la movilidad espermática, se colocaron en siete portaobjetos por separado, 10 µL de semen y 10 µL de cada tratamiento. El porcentaje de los espermatozoides moviéndose activamente fue determinado mediante la utilización de un microscopio óptico con 40X de amplificación (Tiersch *et al.*, 1997).

La evaluación del efecto del pH sobre la movilidad se realizó de la misma manera, a excepción del agente de activación utilizado; en este caso, se emplearon 10 µL de cada tratamiento de pH a evaluar (Rincón *et al.*, 2012).

El tiempo de activación espermática se determinó empleando un cronómetro para registrar los segundos transcurridos desde el momento en que se activaron los espermatozoides hasta la inmovilidad del 90% de los mismos. Esta variable se midió en la misma lámina portaobjeto donde se evaluó la movilidad para cada uno de los tratamientos de osmolalidad y pH. Cada una de las evaluaciones de movilidad y tiempo de activación espermática de los tratamientos de osmolalidad y pH se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la variable volumen se expresaron como estadísticos descriptivos (M ± DE). Los valores de las variables de movilidad y tiempo de activación espermática fueron analizados mediante el procedimiento de modelos lineales generalizados (GLM) y el estadístico LSMEANS, a un nivel de significancia de P<0,05, mediante el paquete estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En peces continentales de interés productivo, los espermatozoides se encuentran en reposo en el líquido seminal (alrededor 300 mOsmkg⁻¹) y se activan cuando disminuye la presión

osmótica (<250 mOsm kg⁻¹) de la solución externa (Morisawa *et al.*, 1983). Lo contrario ocurre en peces marinos, donde la osmolalidad debe aumentar en el medio circundante para la activación de los espermatozoides, ya que el choque hiperosmótico induce un aumento de la concentración de K⁺ y Ca²⁺ intracelular, lo que provoca una acidificación interna (Morisawa *et al.*, 1983). Estas variaciones en los valores de osmolalidad han sido propuestas como parte del mecanismo activador/inhibidor de la movilidad espermática en peces (Takai y Morisawa, 1995; Tanimoto *et al.*, 1994; Cosson, 2004; Alavi y Cosson, 2006).

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se observan los valores obtenidos para las variables estudiadas, en cada tratamiento de osmolalidad y pH aplicados al semen de cachama blanca y cachama negra.

Al comparar los datos de los tratamientos para la osmolalidad, estos mostraron diferencias significativas para el semen de cachamas (P<0,05). La disminución en la presión osmótica ocasionó la activación espermática en ambas especies, concordando con lo expuesto por Tabares *et al.* (2005), quienes expresan que el

semen de peces tropicales se activa de manera inmediata al hacer contacto con el medio acuoso, por alteración de la composición del líquido seminal, ocasionada por la baja osmolalidad que presenta el agua dulce.

Los resultados mostraron que los espermatozoides de cachama blanca y cachama negra, se mantuvieron completamente inmóviles en la solución de 300 mOsm kg⁻¹, lo que probablemente corresponde a la osmolalidad isotónica del líquido seminal. Para activar completamente a los espermatozoides se requirió de soluciones por debajo de los 100 mOsm kg⁻¹ (Figura 1).

Comportamientos similares han sido observados en los espermatozoides de otros peces de agua dulce como el *Ictalurus punctatus*, *Xyrauchente xanus* y *Danio rerio* (Tiersch *et al.*, 1997; Tiersch *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2007). Un comportamiento interesante, no reportado en otras especies, es la activación de un pequeño porcentaje de espermatozoides de cachamas cuando se expusieron a presiones osmóticas de 350 y 400 mOsm kg⁻¹, mayores a la isotónica (Figura 1).

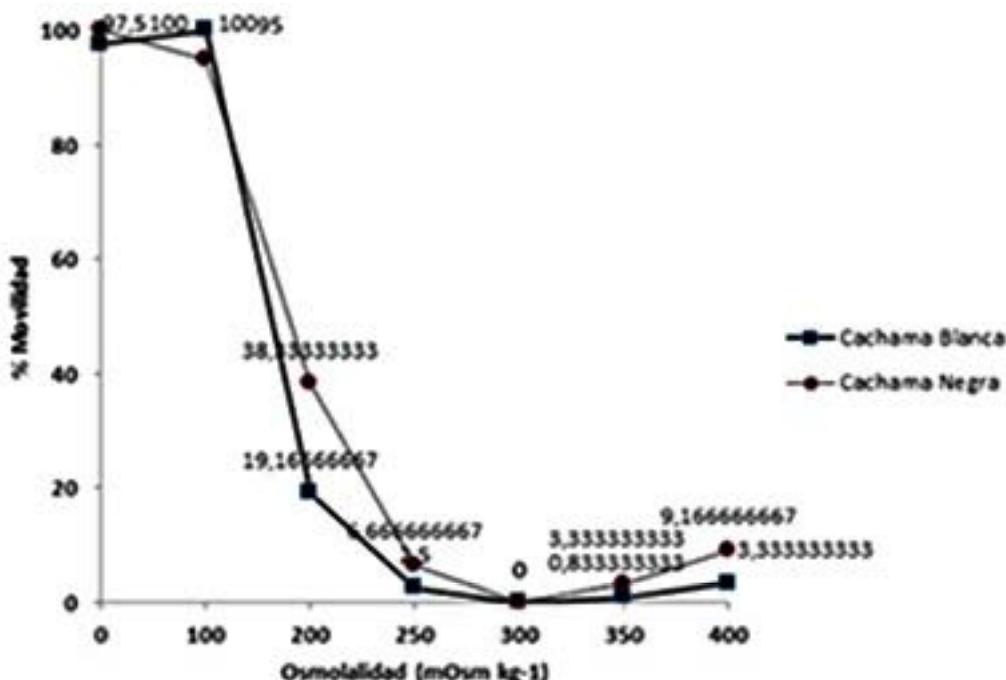


Figura 1. Efecto de la osmolalidad sobre la activación de la movilidad espermática de cachama blanca y cachama negra.

Durante los desoves artificiales, el tiempo de movilidad de los espermatozoides, una vez activados, constituye un factor de importancia debido a que estos se mueven por pocos segundos y, una vez inmóviles, pierden su capacidad de fecundar al ovocito por medios naturales. El incremento de este tiempo de movilidad, permitirá aumentar la probabilidad de fecundación. En la Figura 2 se observa que la activación de los espermatozoides de cachama con soluciones hipotónicas entre 0 y 100 mOsmkg⁻¹, permite la obtención de un mayor lapso de tiempo.

Diferentes investigaciones han demostrado que el pH intracelular y extracelular son elementos importantes en la regulación de la movilidad espermática en salmonidos, ciprinidos, esturiones y la lubina europea (Ingermann *et al.*, 2002; Alavi y Cosson, 2006; Öğretmen *et al.*, 2016). Cambios en el pH extracelular afectan el tiempo que permanecen los espermatozoides en movimiento, o bien pueden inhibir o potenciar la movilidad (Alavi y Cosson, 2005; Öğretmen *et al.*, 2016). Sin embargo, no se conocen reportes que señalen al pH como activador directo de la movilidad espermática en cachamas.

En el presente trabajo se pudo observar que los espermatozoides de cachama blanca y cachama

negra, se activan cuando son colocados en soluciones con distintos pH. Al comparar los valores obtenidos para los distintos tratamientos de pH se registraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el semen de ambas especies (Figura 3), a diferencia de otras especies como ciprinidos, salmónidos y esturiones, en los cuales el pH del medio tiene poca influencia en la movilidad espermática (Alavi y Cosson, 2005).

Los espermatozoides de cachama blanca mostraron actividad en medios con pH ácido, mientras que los de cachama negra se activaron con pH neutro, básico y ligeramente ácido (Figura 3). Esta información es particularmente importante para la preservación a corto o mediano plazo de los espermatozoides (Tiersch *et al.*, 1997; Marquez y Godinho, 2004), ya que una solución de extensión ajustada a un pH fuera del intervalo de inactivación, resultaría en la pérdida del potencial de fecundación.

Es importante señalar que las soluciones fisiológicas utilizadas para la extensión de la viabilidad de los espermatozoides, ya sean solución de Hank, Ringer o cualquier otra, deben prepararse al momento, ya que el pH en ellas puede variar considerablemente con el tiempo. Por ejemplo, el buffer de la solución de Hank y de Ringer está determinado por el bicarbonato

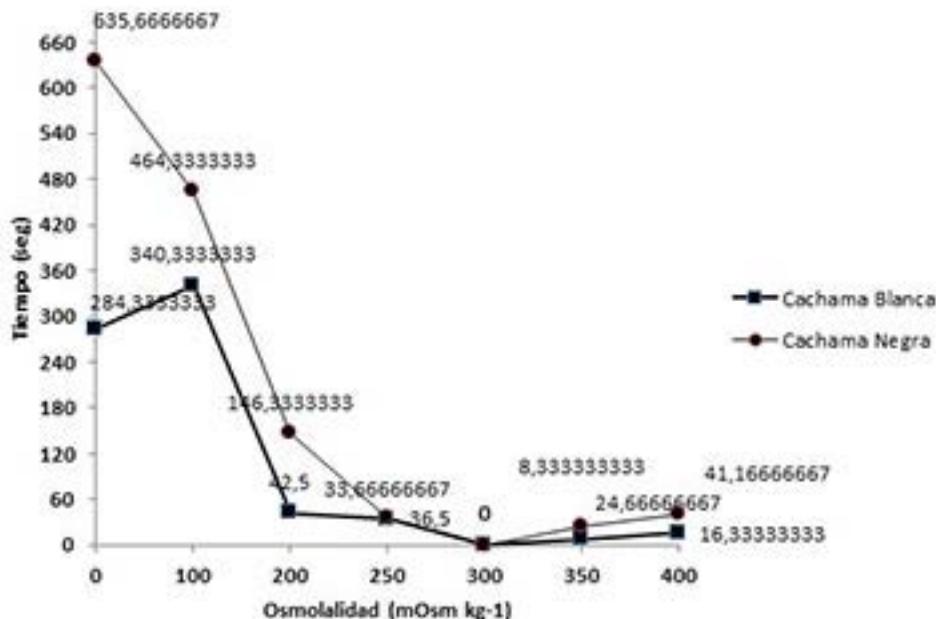


Figura 2. Efecto de la osmolalidad sobre el tiempo de movilidad espermática de cachama blanca y cachama negra.

de sodio; de tal forma, en la reacción del carbono inorgánico se puede liberar dióxido de carbono, el cual produce una disminución del pH de la solución.

Los espermatozoides de cachama blanca se movieron por más tiempo en soluciones ácidas

(pH 4 y 6), a diferencia de los espermatozoides de cachama negra que lo hicieron en pH básicos (Figura 4). Es probable que la susceptibilidad de los espermatozoides de *C. macropomum* y *P. brachypomus* a los cambios de pH puedan tener alguna implicación fisiológica y ecológica,

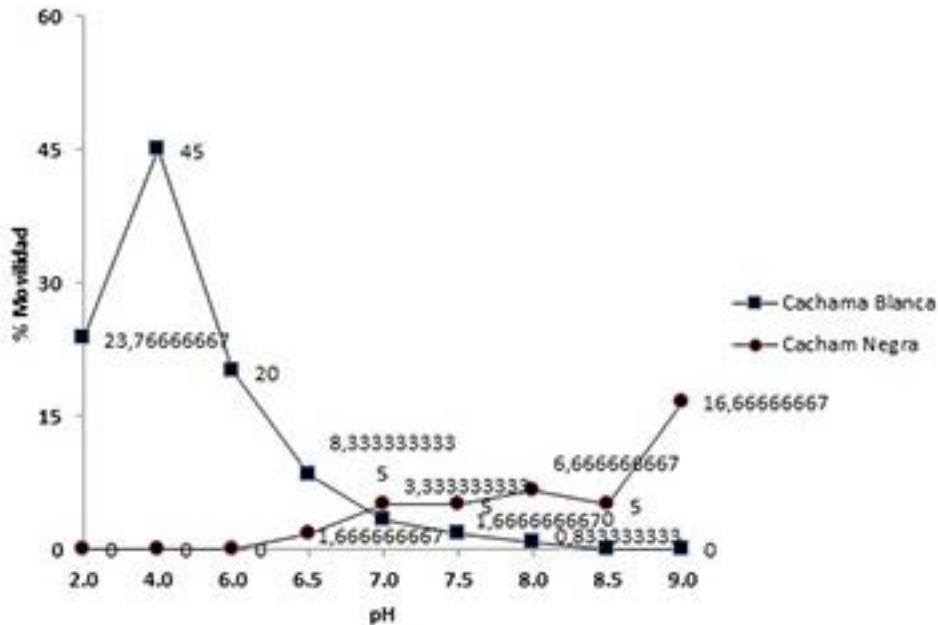


Figura 3. Efecto del pH sobre el comportamiento de la activación de la movilidad espermática de cachama blanca y cachama negra.

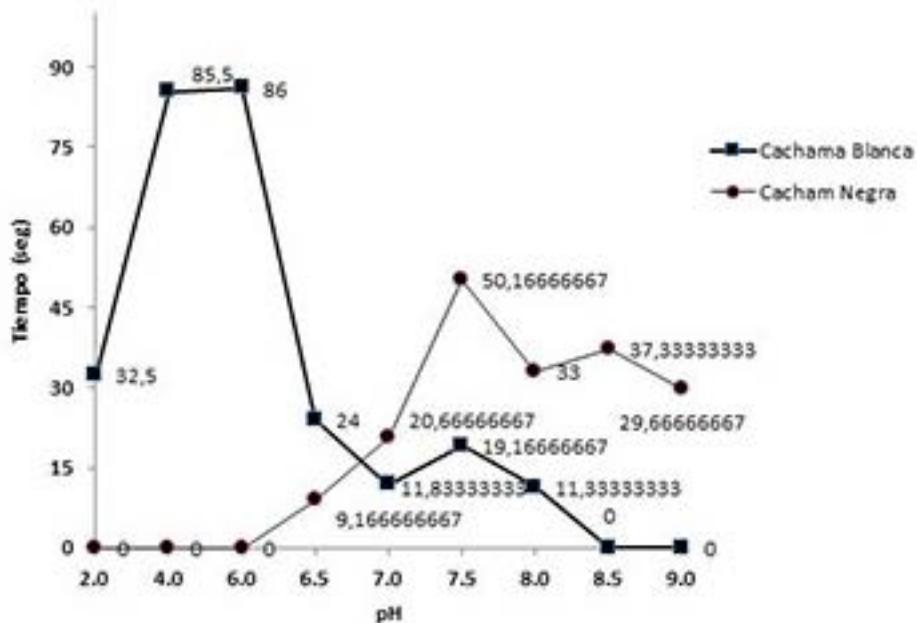


Figura 4. Efecto del pH sobre el tiempo de movilidad espermática de cachama blanca y cachama negra.

determinada por las características del entorno donde la fecundación de estos peces ocurre naturalmente.

Sin embargo, verificar esta hipótesis requiere una investigación dirigida al análisis de las características fisicoquímicas del agua de desove para estas dos especies.

En las figuras 5 y 6 se muestran los valores obtenidos de movilidad espermática para el bagre rayado y el bagre sierra, frente a soluciones con diferente osmolalidad. A diferencia de las cachamas, los espermatozoides de los bagres presentaron un comportamiento muy similar a los de otros peces de agua dulce (Tiersch *et al.*, 1994; Tiersch *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2007), los cuales son activados por cambios en la presión osmótica del medio acuático donde viven.

Se observaron diferencias significativas entre la movilidad de los espermatozoides activados con soluciones de diferente presión osmótica ($P < 0,05$). Soluciones entre 250 y 400 mOsm kg⁻¹, inactivaron por completo a los espermatozoides; aquellas con presión osmótica por debajo de la isotónica (<280 mOsm kg⁻¹), los activaron completamente (Figura 5).

Gracias a la abundancia de líquido seminal que se obtuvo del bagre rayado, se pudo calcular su osmolalidad, la cual se determinó en $254,5 \pm 18$ mOsm kg⁻¹. Esto concuerda con los resultados obtenidos (Figura 5 y 6), donde se evidenció que los espermatozoides se inactivaron completamente cuando se colocaron en una solución con 250 mOsm kg⁻¹.

Con respecto a la duración de la movilidad espermática luego de la activación, se observaron diferencias entre ambas especies (Figura 6). Los espermatozoides de bagre rayado permanecieron mayor tiempo en movimiento en las soluciones hipotónicas utilizadas (0, 100 y 200 mOsm kg⁻¹), respecto a los espermatozoides del pez sierra.

A diferencia de los resultados obtenidos en cachamas, el pH del medio externo no tuvo efecto sobre la activación de los espermatozoides de bagre rayado ni del bagre sierra, pues estos se comportaron de manera similar a otros peces de agua dulce (Tiersch *et al.*, 1994; Tiersch *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2007).

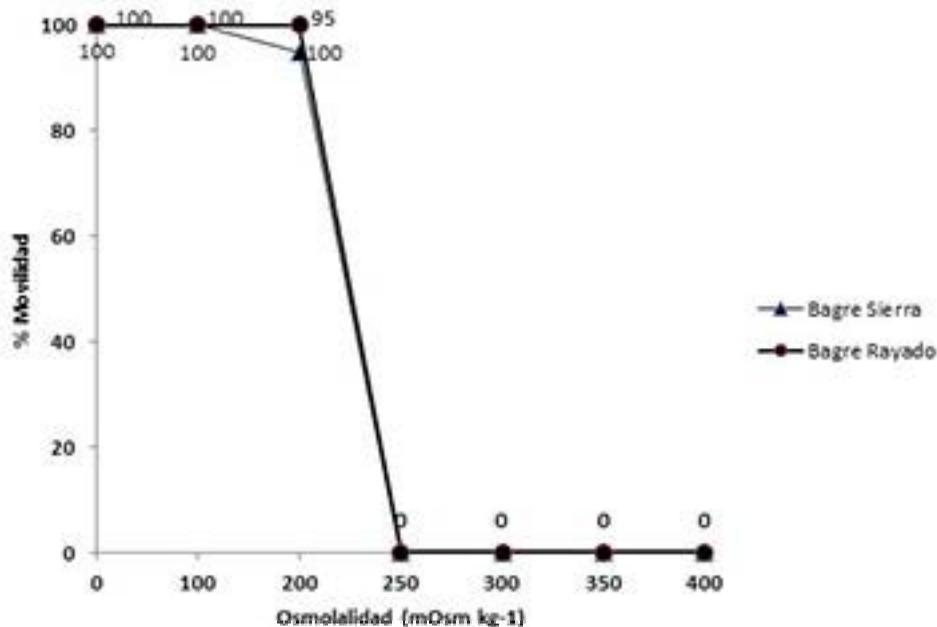


Figura 5. Efecto de la osmolalidad sobre la activación de la movilidad espermática de bagre sierra y bagre rayado.

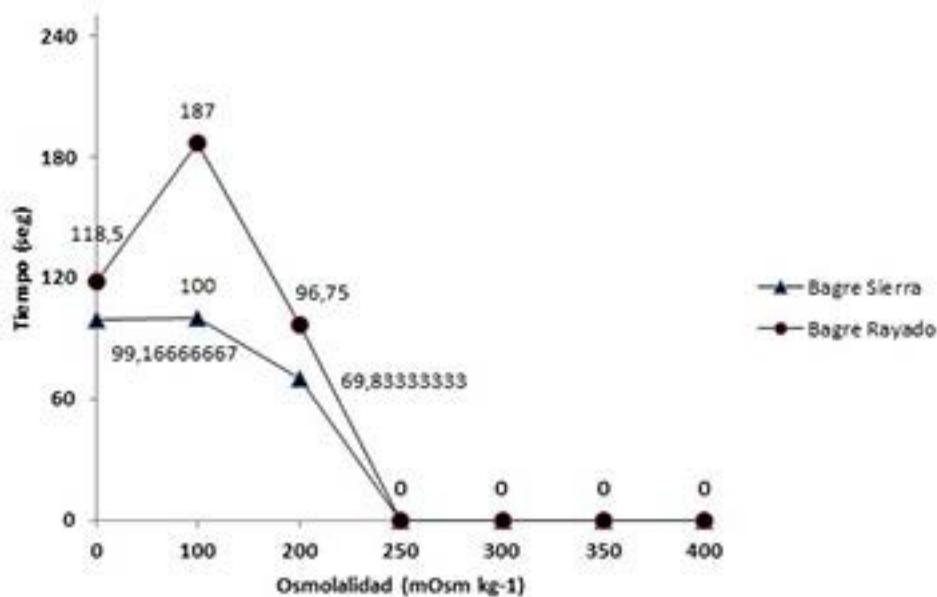


Figura 6. Efecto de la osmolalidad sobre el tiempo de movilidad espermática de bagre sierra y bagre rayado.

CONCLUSIONES

En ambas especies de cachamas (*P. brachypomus* y *C. macropomun*) la movilidad seminal se presentó entre 0 y 250 mOsm kg⁻¹, mostrando la mayor actividad a 0 mOsm (osmolalidad del agua destilada). Para las especies de bagres (*P. fasciatus* y *O. sifontesi*), la movilidad seminal se presentó en soluciones entre 0 y 200 mOsm kg⁻¹, con mayor actividad para el intervalo de 0 a 100 mOsm kg⁻¹.

El semen de cachama blanca fue activado en medios con pH ácido, mientras que para la cachama negra el intervalo fue más amplio, registrándose movilidad en soluciones con pH ligeramente ácidos, neutros y básicos.

Por su parte, el semen de bagre sierra y bagre rayado no es susceptible a la activación por acción de la variación del pH en las soluciones evaluadas.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la Estación de Piscicultura de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", por su apoyo en el manejo de los peces

reproductores. Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto Nro. 634-FAG-2014 (2013002359) del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) y por el Premio Estímulo a la Investigación "Lisandro Alvarado" (PEILA) del Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

LITERATURA CITADA

- Alavi, S. M. and J. Cosson. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*. 29(2):101-110.
- Alavi, S. M. and J. Cosson. 2006. Sperm motility in fishes. I. Effects of ion and osmolality: a review. *Cell Biology International*. 30(1):1-14.
- Cosson, J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*. 12:69-85.
- Cruz-Casallas, P. 2001. Técnicas de laboratorio para la evaluación de la calidad seminal en peces. *Orinoquia*. 5(1):1-11.

- Cruz-Casallas, P., V. Medina-Robles y Y. Velasco-Santamaría. 2006. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19(2):146-151.
- Cuvier, G. 1817. *Le règne animal distribué d'après son organization pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée. Avec figures, dessinées d'après nature. Tome II, contenant les reptiles, les poissons, les mollusques et les annélides.* París, Francia. pp. 1-532.
- Fernández-Yépez, A. 1968. Contribución al conocimiento de los peces Gymnotiformes. *Evencias*. 20:1-7.
- Fresnada, A., G. Lenis, E. Agudelo y M. Olivera. 2004. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 17(suplemento):46-52.
- Guerrero, H. Y., E. Cardillo, G. Poleo and D. Marcano. 2008. Reproductive biology of freshwater fishes from the Venezuelan floodplains. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35(1):189-196.
- Harvey, B. y W. Hoar. 1980. *Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces.* Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Ottawa, Canadá. 47 p.
- Ingermann, R. L., M. Holcomb, M. L. Robinson and J. G. Cloud. 2002. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Journal of Experimental Biology*. 205:2885-2890.
- Linné, C. 1766. *Caroli Linnaei... Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* Tomus I. 12th ed, reformata. Holmiae: Impensis direct. Laurentii Salvii. pp. 1-532.
- Marques, S. and H. P. Godinho. 2004. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47(5):799-804.
- Morisawa, M., K. Susuki, H. Shimizu, S. Morisawa and K. Yasuda. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*. 107:95-103.
- Navarro, O., Y. Velasco-Santamaría y P. Cruz-Casallas. 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 17:53-59.
- Öğretmen, F., B. E. Inanan and F. Kutluyer. 2016. Combined effects of physicochemical variables (pH and salinity) on sperm motility: characterization of sperm motility in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 49:217-222.
- Poleo, G. y A. Mora. 2008. Ensayos preliminares de preservación a corto plazo de semen de los bagres yaque (*Leiarius marmoratus*) y sierra (*Oxidoras sifontesi*). *Ciencia*. 16(4):396-401.
- Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J. Tilly and D. Clapham. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 413:603-609.
- Rincón D., Y. Méndez, J. Hernández y P. Villamediana. 2012. Evaluación de los parámetros espermáticos de semen fresco y criopreservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). 1^{er} Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación LOCTI-PEII, septiembre 2012. Caracas, Venezuela. Faltan paginas consultadas
- Tabares, C., A. Tarazona y M. Olivera. 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18(2):149-161.
- Tanimoto, S., Y. Kudo, T. Nakazawa and M. Morisawa. 1994. Implication that potassium flux and increase in intracellular calcium are necessary for the initiation of sperm motility in salmonid fishes. *Molecular Reproduction and Development*. 39:409-414.

- Takai, H. and M. Morisawa. 1995. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleost. *Journal of Cell Science*. 108:1175-1181.
- Tiersch, T. R., C. A. Goudie and G. J. Carmichael. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society*. 123:580-586.
- Tiersch T. R., W. R. Wayman and C. R. Figiel. 1997. Field collection, handling, and storage of sperm of the endangered Razorback Sucker. *North American Journal of Fisheries Management*. 17:167-173.
- Tiersch, T. R and C. C. Green. 2011. (Eds) *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd edition. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. USA. 1003 p.
- Valdebenito, I., C. Fletcher, V. Vera y J. Fernández. 2009. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 41:97-106.
- Yang, H., C. Carmichael, Z. M. Varga and T. R. Tiersch. 2007. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology*. 68:128-136.