

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ALGUNOS IONES SOBRE LA
ACTIVACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y EL POTENCIAL DE
MEMBRANA EN *Brycon henni* (EIGENMANN 1913)**

Por:

CARLOS JAVIER TABARES SERNA

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas
Énfasis en Fisiología y Biotecnología de la Reproducción Animal**

Tutora:

Martha Olivera Angel

Comite tutorial:

Tatiana Ruiz

Jaime Calle

Gustavo Del Valle

**Grupo: Fisiología y Biotecnología de la Reproducción
Corporación BIOGÉNESIS, Facultad de Ciencias Agrarias
Corporación Ciencias Básicas Biomédicas
Universidad de Antioquia
Medellín-Colombia
Agosto de 2005**

“Si en la vida la riqueza es una posesión deseable, ¿Qué cosa más rica que la sabiduría que todo lo hace? Si la inteligencia es creadora, ¿Quién sino la sabiduría es el artífice de cuanto existe?”

SABIDURÍA Cap: 8 Vers:5 y 6

Somos tierra fértil que se abona cada día por las manos de aquellos que nos apoyan y nos aman. A mis padres, hermanos y amigos, por cultivar la semilla sembrada en el pasado de la cual hoy recojo sus frutos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
ABSTRACT.....	5
RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. Fisiología de la activación espermática en peces dulceacuicolas.....	8
2. Adquisición de la capacidad para la movilidad espermática.....	8
3. Plasma seminal.....	9
4. Inhibición, canales iónicos, iones y activación.....	10
5. Modelo de activación.....	11
5.1. Choque hiposmótico.....	11
5.2. Diferencia y cambio de potencial de membrana.....	11
5.3. Regulación mitocondrial.....	11
5.4. Función flagelar.....	13
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. Animales y obtención de las muestras.....	13
2. Soluciones iónicas.....	13
3. Efecto de la incubación en soluciones iónicas sobre la movilidad y el tiempo de activación.....	14
4. Efecto de los iones sobre el potencial de membrana plasmática.....	14
5. Efecto de los bloqueadores de canales iónicos sobre la movilidad y el tiempo de activación.....	15
6. Efecto de la concentración de potasio sobre la movilidad y el tiempo de activación.....	15
7. Cambio de potencial de membrana mitocondrial.....	15
8. Análisis estadístico.....	16
III. Resultados.....	16
1. Efecto de la preincubación con iones sobre la movilidad y el tiempo de activación.....	16
2. Efecto de los iones sobre el potencial de membrana plasmática.....	17
3. Efecto de los bloqueadores de canales iónicos sobre la movilidad.....	18
4. Efecto de la concentración de potasio sobre la movilidad y el tiempo de activación.....	19
5. Cambio de potencial de membrana mitocondrial.....	20
IV. DISCUSIÓN.....	21
V. CONCLUSIONES.....	23
VI. AGRADECIMIENTOS.....	24
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	24
ANEXOS.....	29

Lista de Tablas

	Pag.
Tabla 1. Composición del plasma seminal en diferentes especies.....	9
Tabla 2. Composición de las soluciones isosmóticas.....	14

Lista de Figuras

Fig. 1. Modelo de activación espermática en peces de agua dulce.....	12
Fig. 2. Efecto del balance iónico sobre la movilidad de espermatozoides de <i>B.henni</i>	17
Fig. 3. Efecto del balance iónico sobre el tiempo de duración de la movilidad de espermatozoides de <i>B.henni</i>	17
Fig. 4. Efecto del balance iónico sobre el cambio de potencial de membrana en <i>B.henni</i>	17
Fig. 5. Efecto del tiempo sobre el cambio de potencial de membrana en espermatozoides de <i>B.henni</i>	18
Fig. 6. Efecto de los Bloqueadores de canales de Na ⁺ , de K ⁺ y de Ca ²⁺ , sobre la movilidad espermática.....	18
Fig. 7. Efecto de los Bloqueadores de canales de Na ⁺ , de K ⁺ y de Ca ²⁺ , sobre el tiempo de activación espermática.....	19
Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de K ⁺ (mM) Sobre la movilidad espermática.....	19
Fig. 9. Efecto de diferentes concentraciones de K ⁺ (mM) Sobre tiempo de activación espermática.....	20
Fig. 10. Cambio de potencial de membrana mitocondrial.....	20

Lista de Anexos

ANEXO 1: Protocolo para la toma de muestra de semen de “Sabaleta” <i>Brycon henni</i>	30
ANEXO 2: Protocolo para preparacion de soluciones isosmóticas, para evaluación de la activación de la movilidad en semen de Sabaleta (<i>Brycon henni</i>).....	32
ANEXO 3: Preparación de soluciones bloqueadoras, para evaluación de la activación de la motilidad en semen de Sabaleta.....	38
ANEXO 4: Polaridad de membrana al momento de la activación espermática.....	41
ANEXO 5: Efecto de la pluviosidad y el brillo solar sobre la producción y características del semen en <i>Brycon henni</i> (Pisces: Characidae). Artículo aceptado para publicación. Revista de Biología Tropical. Costa Rica.....	44
ANEXO 6: Modelo de activación de la movilidad espermática en peces dulceacuicolas. Artículo para someter a revista internacional.....	59

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ALGUNOS IONES SOBRE LA
ACTIVACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y EL POTENCIAL DE
MEMBRANA EN *Brycon henni* (EIGENMANN 1913)**

Tabares C. J¹, Arboleda L² y Olivera-Angel M^{1*}

¹Reproducción-Fisiología y Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Carrera 75 N° 65–87, AA: 1226. Medellín – Colombia; Tel.: +574 – 4259149. Fax: +574 – 4259149 *molivera@catios.udea.edu.co

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Politécnico Jaime Isaza Cadavid. Carrera 48 N° 7-151, AA: 4932. Medellín – Colombia. Tel: +574-2617660

ABSTRACT

Fish spermatozoa are quiescent in the seminal plasma and become active, only when they are spawned into the aqueous environment. We evaluate the ionic balance effect on inhibition and activation sperm motility procedures in *Brycon henni* (sabaleta). We prepared isosmotic solutions with all possible combination of ions Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+ and we made too a control solution with out ions but isosmotic to seminal plasma adding manitol. The sperm was diluted 1:1000 in which solution, it was incubated along one hour at 20°C and finally the spermatozoa were activated with a hiposmotic solution. The motility percentage and activation time were measured. The plasmatic membrane potential was evaluated by flow cytometry with Oxonol dye, and the fluorescence intensity was took every 15 seconds along two minutes. Furthermore we exanimate the K^+ , Ca^{2+} and Na^+ channel blockers effect on motility and activation time. The results showed that the motility percentage was highest when the sperm was incubated in all solutions which contain K^+ ($p < 0.05$), in other hand, the highest activation times were present when the spermatozoa were incubated in Na^+ and/or Mg^{2+} solutions ($p < 0.05$). With any incubation solution, it was an evident membrane potential change since 15 seconds of activation. When we blocked the K^+ , Ca^{2+} and Na^+ channels, the motility percentage was no affected, but the activation time was shorter than we did not use ion channel blockers ($p < 0.05$). The potassium trigger motility at any concentration from 1 mM until 105 mM; however, the motility was hardly affect ($p < 0.05$) when potassium concentration was higher than 140 mM. The mitochondria membrane potential change

was detected in the spermatozoa, even after they end their movement. We concluded, the interaction among ionic balance, membrane potential change and the intracellular signals is fundamental to the sperm activation in *Brycon henni*.

Key words: Ionic balance, Channel blockers, Membrane potential, Oxonol.

RESUMEN

En los peces, los espermatozoides se encuentran inmóviles en el plasma seminal y solamente se activan cuando son eyaculados al agua. En el presente estudio se evaluó el efecto del balance iónico en los procesos de inhibición y activación de la movilidad espermática en *Brycon henni* (sabaleta). Se prepararon soluciones isosmóticas teniendo en cuenta las posibles combinaciones de los iones Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+ y se elaboró una solución control sin ningún ion e isosmótica al plasma seminal a partir de manitol. El semen se diluyó 1:1000 en cada solución, se incubó por una hora a 20°C y se activó con una solución hiposmótica. Se midió el porcentaje de movilidad y el tiempo de activación. El potencial de membrana plasmática se evaluó por citometría de flujo con el fluorocromo Oxonol, y se midió la intensidad media de fluorescencia cada 15 segundos durante dos minutos. Además se examinó el efecto de los bloqueadores de canales de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ sobre la movilidad y tiempo de activación. Los resultados mostraron que el porcentaje de movilidad fue mayor cuando se incubó el semen en las soluciones que contuvieron K^+ ($p < 0.05$), pero los mayores tiempos de activación se presentaron cuando los espermatozoides se incubaron en soluciones con Na^+ y/o Mg^{2+} ($p < 0.05$). Con cualquier solución de incubación se produjo un cambio de potencial de membrana evidente desde los 15 segundos de activación. Al bloquear los canales de K^+ , Ca^{2+} y de Na^+ no se afectó el porcentaje de movilidad, pero sí disminuyó el tiempo de activación ($p < 0.05$). El potasio desencadena movilidad, a cualquier concentración hasta 105 mM; sin embargo, la movilidad se afectó drásticamente ($p < 0.05$) a concentraciones superiores a 140 mM. Se observó cambio de potencial de membrana mitocondrial que permanece en los espermatozoides que se activan, aún después de que dejaron de moverse. Nuestros resultados, llevan a la conclusión que la interacción del balance iónico con los cambios de potencial de membrana y la señalización intracelular son fundamentales para la activación de la movilidad espermática en *Brycon henni*.

Palabras clave: Balance iónico, bloqueadores de canales, potencial de membrana, Oxonol.

I. INTRODUCCIÓN

Brycon henni (Eigenmann 1913), reconocida en nombre como Sabaleta, es una especie endémica colombiana, reofílica y migratoria que habita los cuerpos de agua de zonas cafeteras comprendidos entre los 4°35'56'' latitud norte y 74°04'51'' longitud oeste, con temperaturas de agua que oscilan entre los 18 y los 28 °C. La pesca de esta especie está legalmente normatizada en espera de un estudio que determine la condición de posible riesgo (Resolución 0814 de 1962.000 Ministerio de Agricultura). *B. henni* representa importancia económica, productiva, recreativa (Dahl, 1971, Useche *et al.*, 1993) y en seguridad alimentaría. Se han realizado investigaciones en aspectos de su biología, ecología, nutrición y reproducción (Miles, 1947; Hernández, 1971; Builes y Urán, 1974; Plata, 1977; Perdomo, 1978). Sin embargo, su producción en cautiverio ha sido poco exitosa, y el conocimiento básico acerca de la fisiología de sus gametos esta aún inexplorada. Estudios que aborden aspectos como: el efecto del balance iónico, el cambio de potencial de membrana y el efecto de bloqueadores de canales iónicos durante la activación de la movilidad espermática, son fundamentales para el entendimiento de todo el complejo que enmarca la perpetuación de la especie y su conservación en las poblaciones naturales, favoreciendo además el desarrollo de técnicas adecuadas para su explotación comercial.

Respecto a los factores que influyen en la reproducción, Strüssmann *et al.*, (1996) y Blázquez *et al.*, (1998), demostraron que el fotoperiodo y la pluviosidad influyen en la maduración sexual de los peces de la familia Atherinidae; y Baroiller *et al.*, (1999) y Devlin y Nagahama (2002), demostraron que estas dos variables influyen en la diferenciación gonadal de los teleósteos en general. El brillo solar y las lluvias influyen en la función testicular, mediante la inducción de la producción de melatonina (Paniagua *et al.* 1990); por lo tanto, la manipulación de estas variables ambientales podría acelerar o retrasar el funcionamiento gonadal de los peces en cautiverio para controlar así su espermiación (Iigo y Aida 1995, Nash 1999).

Investigaciones realizadas en nuestro grupo (Tabares *et al.*, 2005), demostraron que en cautiverio, los machos de sabaleta presentan madurez gonadal durante 10 de los 12 meses del año con una tendencia a producir mayor cantidad de semen entre noviembre y marzo. Las características seminales como el color (blanco cremoso), la osmolalidad del plasma (299.9 ± 5.2 mOsm/kg) y el pH (7.5 ± 0.5) son similares durante todo el año. El rango de producción de semen oscila entre 0.8 y 5.0×10^{10} espermatozoides/ml y el volumen entre 3 y 2200 μ l, siendo los meses de mayor cantidad: noviembre, diciembre, enero, marzo y mayo. El porcentaje de espermatozoides móviles esta entre 5 y 90 %, con un tiempo de activación de 62 ± 15.8 seg. La viabilidad oscila entre el 12 y el 100%. La morfología de la cabeza es rhabdiformes en un 60 a 100% de los espermatozoides, el plasma seminal presento una composición iónica de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+ a concentraciones de 0.87, 37.3, 0.83 y 122.8 mM respectivamente.

1. Fisiología de la activación espermática en peces dulceacuicolas: Cuando los espermatozoides de peces son liberados al agua, cuentan con un breve periodo de activación, expresada en porcentaje de espermatozoides que se mueven, a un tiempo y a una velocidad de desplazamiento progresivo. En la mayoría de teleósteos los espermatozoides no poseen acrosoma, ya que entran a través del micrópilo de la ova (Andrade *et al.*, 2001; Grassiotto *et al.*, 2001). Una vez liberadas las ovas en el agua, se hidratan y cierran el micrópilo, por lo cual los espermatozoides eyaculados deben activarse y desplazarse en el agua para lograr la fertilización antes del cierre del micrópilo para lo cual los gametos masculinos tienen un tiempo promedio de 62 segundos (Cosson *et al.*, 1999).

2. Adquisición de la capacidad para la movilidad espermática: Los espermatozoides de los peces sólo son móviles cuando salen al agua siendo inmóviles en el testículo y en muchas especies también en el plasma seminal (Müller *et al.*, 1994). Mochida *et al.*, 1999, sugieren que los espermatozoides de peces dulceacuicolas, maduran y adquieren capacidad de activación durante el pasaje a través del conducto espermático cuyo fluido (plasma seminal) es de pH básico y rico en bicarbonato (HCO_3^-). Por otra parte Ohta *et al.* 2001, afirman que el movimiento transmembranal del HCO_3^- sería el responsable del aumento del pH intracelular (pHi) y podría regular la producción de adenosina

monofosfato cíclico (AMPC), lo cual favorece la activación de la dinein-ATPasa importante para iniciar la movilidad. Posiblemente las células epiteliales del conducto espermático ejercen el control sobre la capacidad de adquirir movilidad del espermatozoide, regulando el pH del semen por secreciones ácido/bases (Ingerman *et al.*, 2002). Esto se comprobó tras el intento fallido de activar espermatozoides de Ayu (*Plecoglossus altivelis*) obtenidos directamente de tejido testicular, donde los valores de HCO_3^- y por lo tanto del pH son menores que en el conducto espermático (Ohta *et al.*, 2001). Los cambios en las concentraciones extracelulares de K^+ , Na^+ , HCO_3^- , y/o iones hidrógeno entre el plasma seminal y el medio acuoso, sugieren que el balance iónico también está involucrado en la adquisición de la capacidad para la activación de la movilidad (Ohta *et al.*, 2001).

3. Plasma seminal: Las características de pH, balance iónico y osmolalidad que mantienen los espermatozoides inmóviles en el plasma seminal varían entre las especies (tabla 1)

Tabla 1. Composición del plasma seminal en diferentes especies

Especie	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Composición iónica del plasma seminal en mM				Referencia
			Na^+	K^+	Ca^{++}	Mg^{++}	
<i>Plecoglossus altivelis</i> (Ayu)			130	11,4	0,6	2,3	Ohta <i>et al.</i> , 2001
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoiris)			122,2	30,4	1,10	0,85	Glogowski <i>et al.</i> , 2000
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoiris)	8 ± 0,2						Lahnsteiner <i>et al.</i> , 1998
<i>Salvelinus fontinalis</i> (Trucha de arroyo)		300 ± 11	119 ± 13	25,1 ± 6,1			Marshall 1986
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa común)			55	82,4	2	0,8	Ohta y Tsuji 1998
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa común)	7,05 ± 0,11						Krasznai <i>et al.</i> , 1995
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa común)	8,28 ± 0,12	305	63 ± 10	87 ± 16	0,4 ± 0,09	1,2 ± 0,20	Marian Terez <i>et al.</i> , 1997
<i>Oreochromis mossambicus</i> (Tilapia)		290 ± 24	142,3 ± 21,3	50,7 ± 7	2 ± 0,77	0,18 ± 0,17	Morita <i>et al.</i> , 2003
<i>Cottus hangiongensis</i> (Pez remo)		317 ± 8,9					Ohta y Shinriki 1998
<i>Morone saxatilis</i> (Perca rayada)	7,6 ± 0,04		115 ± 7	56,1 ± 5,6	0,5 ± 0,2		He <i>et al.</i> , 2004
<i>Brycon henni</i> (Sabaleta)	7,45 ± 0,49	299,9 - 5,2	169 - 508*	22,56 - 55,8*	1,5 - 4,15*	2,42 - 7,74*	Tabares <i>et al.</i> , 2005.

* Rango de valores a lo largo de un año de estudio.

4. Inhibición, canales iónicos, iones y activación: Las principales estructuras involucradas en la movilidad espermática son: a) la membrana plasmática que regula el paso de iones entre el citosol y el medio externo (Darszon *et al.*, 1999; Cosson, 1999); b) las mitocondrias que regulan el balance de Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} intracelular (Garlid y Paucek, 2003) y producen el ATP necesario para el movimiento del complejo axonema (Lahnsteiner *et al.*, 1998; 1999) y c) el flagelo que es la estructura encargada de moverse en batido y en serpenteo (Cosson *et al.*, 2000). En el momento de la eyaculación, el semen de teleósteos es diluido en el agua donde enfrenta diferentes factores como el choque hiposmótico (Krasznai *et al.*, 1995), el cambio de balance iónico (Márián *et al.*, 1997) y el pH (Ohta *et al.*, 2001), desencadenándose una serie de eventos que conducen al cambio de potencial y la activación (Cosson *et al.*, 1999; Márián *et al.*, 1993).

Relacionados al mecanismo de activación espermática en teleósteos, se han descrito varios tipos de canales iónicos: los de poro abierto que funcionan a favor de gradiente (Felix *et al.*, 2004); los de compuerta que son canales activados mecánicamente y se abren cuando la membrana plasmática se estira por turgencia (Cosson *et al.*, 1999; Krasznai *et al.*, 2003), los canales dependientes de voltaje que se activan con el cambio en el potencial de membrana (Krasznai *et al.*, 2000; Felix *et al.*, 2004); los canales de ligando, donde proteínas específicas se unen a su receptor provocando la apertura del canal (Felix *et al.*, 2004) y los intercambiadores donde se aprovecha la energía generada por el paso de un ion a favor de gradiente para el paso de otro ion en sentido contrario (Vines *et al.*, 2002). De esta forma, el balance iónico está determinado por la funcionalidad de los canales de membrana y el flujo de iones a través de estos, se ha encontrado que el K^+ y el Ca^{2+} son los iones más importantes en el proceso de activación de la movilidad de los espermatozoides de peces de agua dulce (Cosson *et al.*, 1999). El mecanismo de regulación iónica está dado por la interacción entre osmolalidad, potencial de membrana y apertura de canales, así como por el CO_2 disuelto en equilibrio con el NaHCO_3^- (Cosson *et al.*, 1999). El pH_i cambia con el flujo de iones a través de la membrana, generando un medio adecuado para la interacción de diferentes compuestos involucrados con la activación (Sierra y Olivera, 2000).

5. Modelo de activación: Cuando los espermatozoides están inmóviles en el plasma seminal, la membrana plasmática se encuentra en reposo con un potencial de -2.6 mV, los canales de compuerta se encuentran inactivos y los iones potasio y sodio tienden a mantener un equilibrio a nivel intra y extracelular (Krasznai *et al.*, 2003).

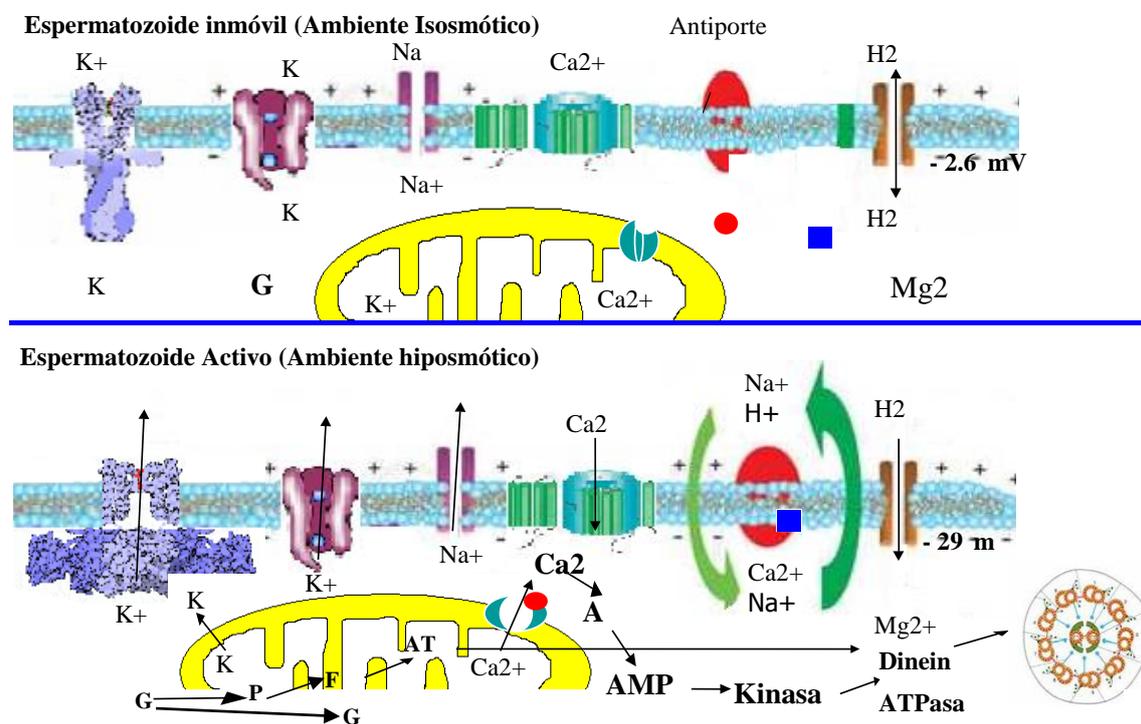
Partiendo de este estado de quiescencia del espermatozoide, el modelo de activación propuesto comprende las siguientes etapas:

a) Choque hiposmótico: Una vez, los espermatozoides salen al medio acuoso, sufren un choque hiposmótico, y sucede una cascada de eventos que conducen al inicio de la movilidad espermática (Fig.1). Así, la diferencia de osmolalidad entre el interior y exterior celular, provoca la entrada de agua al interior del espermatozoide a través de las acuaporinas (canales especializados en el transporte de agua a través de la membrana) (Yool y Stamer, 2004), esto ocasiona un cambio en la arquitectura de la membrana (turgencia) lo que activa los canales de estiramiento de K^+ (Krasznai *et al.*, 2003) y por consiguiente la salida de este al medio extracelular tratando de mantenerse en equilibrio a ambos lados de la membrana. Por otro lado, el choque hiposmótico diluye los iones extracelulares.

b) Diferencia y cambio de potencial de membrana: La membrana espermática en condiciones isosmóticas tiene un potencial de -2.6 mV (Krasznai *et al.*, 2003), cuando el semen es diluido en medio hiposmótico, los iones externos son lavados generando una diferencia de potencial lo cual activa los canales de K^+ dependientes de voltaje, conllevando a la salida de K^+ al medio extracelular y ocasionando la hiperpolarización de la membrana, hasta -29 mV (Krasznai *et al.*, 2003). La hiperpolarización de membrana activa los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, entra el Ca^{2+} a la célula, se une a proteínas como la Calmodulina la cual de esta forma se vuelve funcional, sirviendo de ligando en el receptor del antiporter Na^+/Ca^{2+} para activarlo (Vines *et al.*, 2002) y para la apertura de los canales de Ca^{2+} de las mitocondrias (Kaczmarek y Jonas, 2004).

c) Regulación mitocondrial: las mitocondrias son escasas y se encuentran en la pieza media que ocupa la parte posterior de la cabeza (Manssur *et al.*, 2002), regulan el balance iónico de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Garlid y Paucek 2003) y son las encargadas de realizar el metabolismo de glucosa para producción de ATP (Lahnsteiner *et al.*, 1999; Manssur *et al.*, 2003), el cual proporcionará la energía para el movimiento del flagelo

(Cosson *et al.*, 2000). El incremento de Ca^{2+} intracelular en los primeros segundos es del 66%, ya sea de origen externo o a partir de las reservas mitocondriales, constituyendo la señal para la iniciación de la movilidad del flagelo (Krasznai *et al.*, 2000). El factor limitante para mantener la movilidad es el ATP producido por fosforilación oxidativa (Lahnsteiner *et al.*, 1999) a partir de precursores producto de la glucólisis aeróbica y el ciclo del ácido tricarboxílico (Lahnsteiner *et al.*, 1998; 1999). La señal para el inicio de la cadena respiratoria sería dada por cofactores como Ca^{2+} y Mg^{2+}



Modelo de activación espermática en peces de agua dulce. G: glucosa, GA: glucólisis anaeróbica, FO: fosforilación oxidativa. AC: Adenil ciclasa.

Adaptado y modificado de: www.sigmaaldrich.com, www.marcobueno.net, www.chemistry.emory.edu,

(Garrid, 1994). En la mayoría de peces, la movilidad termina en un corto tiempo probablemente porque la actividad metabólica de la mitocondria genera desequilibrio en sus propias condiciones óptimas de metabolismo y funcionalidad. Esto parece ser

reversible, ya que al adicionar precursores como ATP o piruvato en soluciones iónicas la movilidad se puede prolongar (Lahnsteiner *et al.*, 1999) o reactivar (Linhart, 2002).

d) Función flagelar: El Ca^{2+} interviene en la activación de la adenil ciclasa (AC), la cual genera la producción de AMPc que activa quinazas para la fosforilación de proteínas importante en la funcionalidad del complejo axonema dentro del flagelo. El complejo axonema está constituido por nueve pares de microtúbulos periféricos (en microtúbulos A y B) y un par central, cuyo funcionamiento depende de la dineína-ATPasa, la cual hidroliza el ATP producido en la mitocondria, y éste se asocia al Mg^{2+} que actúa como cofactor; así, la energía liberada de esta reacción, favorece el deslizamiento de los brazos de dineína del microtúbulo B, sobre la tubulina del microtúbulo A del par contiguo, generándose una onda en los nueve pares de microtúbulos que provoca el movimiento en serpenteo del flagelo y a su vez el par central genera el movimiento en batido del espermatozoide (Eddy y O'Brien, 1994; Inaba *et al.*, 1998; Cosson *et al.*, 1999), procurando un desplazamiento progresivo y rectilíneo cuyo objetivo es encontrar el micrópilo.

El objetivo general de este estudio es avanzar en el conocimiento de la fisiología espermática en *B. henni*, los específicos son: estudiar el efecto del balance iónico, sobre la activación espermática, asociar el cambio de potencial de membrana espermática y mitocondrial con el balance iónico y relacionar el efecto de los bloqueadores de canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , con la movilidad y el tiempo de activación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y manejo de las muestras

A partir de peces mantenidos en cautiverio durante un año y en la época de mayor producción seminal (entre noviembre y marzo), se obtuvieron las muestras de semen por masaje craneo caudal a nivel abdominal. El semen fue colectado en tubos cónicos de 1.5 ml. y transportado y conservados a 4°C hasta su análisis en el laboratorio. En todos los ensayos, un mismo observador evaluó las muestras (Anexo 1).

2. Soluciones iónicas

A partir de la caracterización previa del plasma seminal de *Brycon henni*¹ (Tabares *et al.*, 2005), se prepararon 15 soluciones isosmóticas (Tabla 1) con combinaciones de los iones Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ y Na⁺, ajustando el pH con NaOH, y la osmolalidad con manitol. El control negativo fue una solución isosmótica de manitol dada su inocuidad para los espermatozoides y sus propiedades osmóticas no iónicas. El control positivo fue una solución con las mismas concentraciones del plasma seminal. Todas las soluciones fueron buferadas con Hepes 20 mM. (Anexo 2)

Tabla 2: Composición de las soluciones isosmóticas.

Solución	Composición
1	Ca+2, Na+, Mg+2, K+
2	Ca+2, Na+, Mg+2
3	Ca+2, Na+, K+
4	Ca+2, Mg+2, K+
5	Na+, Mg+2, K+
6	Ca+2, Na+
7	Ca+2, Mg+2
8	Ca+2, K+
9	Na+, Mg+2
10	Na+, K+
11	Mg+2, K+
12	Mg+2
13	K+
14	Na+
15	Ca+2
16	Manitol

3. Efecto de la incubación en soluciones iónicas sobre la movilidad y el tiempo de activación

Para saber cuáles son los iones que determinan el comienzo de la activación y la duración del movimiento, el semen fue diluido 1:1000 en cada una de las 16 soluciones, incubado por una hora a 20°C y activado con una solución hiposmótica (solución activadora) a 20 mOsm/kg a partir de agua destilada y Hepes 20mM. Usando un microscopio invertido de contraste de fase Nikon TMS-F 211571 a 40 aumentos, se calculó cualitativamente, el porcentaje de espermatozoides que adquirieron movilidad y cuantitativamente el tiempo que duró la misma en segundos. Para la evaluación de todas las variables se mantuvo una proporción 1:3 entre soluciones tratamiento y solución activadora (Adaptado de Ohta *et al.*, 1998; Krasznai *et al.*, 2003).

¹ 7.5 +/- 0.5 de pH, 299.9 mOsm/kg, y una composición iónica de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ y Na⁺ a concentraciones de 0.87, 37.3, 0.83 y 122.8 mM respectivamente (Tabares *et al.*, 2005).

4. Efecto de los iones sobre el potencial de membrana plasmática

Para evaluar el potencial de la membrana plasmática, se usó el fluorocromo Oxonol (bis-(ácido 1.3-dibutylbarbiturico) trimethine oxonol (DiBAC₄-3), que tiene alta afinidad por los lípidos de las membrana en reposo. Los cambios de potencial de membrana producen desprendimiento del fluorocromo y pérdida de intensidad de fluorescencia (Haugland 1996). Espermatozoides inmóviles (5×10^6 espermatozoides/ml) incubados con Oxonol a 1 μ M, por una hora a 20°C; fueron activados y se registró la intensidad media de fluorescencia (IMF) cada 15 segundos durante dos minutos en un citómetro de flujo FASC SORT (Becton Dickinson, USA), a una longitud de onda de excitación a 488 nm y entre 200-400 mW (Anexo 4).

5. Efecto de los bloqueadores de canales iónicos sobre la movilidad y tiempo de activación.

Para saber si la activación es debida a la apertura de canales iónicos, se usaron en la solución activadora (agua destilada y Hepes 20mM), bloqueadores competidores por dichos canales, a diferentes concentraciones. Como bloqueador de canal de Na⁺ se uso amiloride (100 μ M, 500 μ M y 1mM), para bloquear los canales de K⁺, 4-aminopiridina (5mM, 25mM y 50mM) y como bloqueador de canales de Ca²⁺, verapamilo (100 μ M, 500 μ M y 1mM). Los bloqueadores se evaluaron en forma individual en cada una de sus concentraciones y en conjunto a la mayor concentración usada en los ensayos independientes. El semen fue diluido 1:1000 en solución isosmótica e incubado por una hora a 20°C, luego se activaron con las soluciones individuales correspondientes al bloqueador respectivo, o con el conjunto de bloqueadores, luego, se calculó el porcentaje de movilidad y el tiempo. El control negativo fue una solución activadora (agua destilada y Hepes 20mM) sin ningún bloqueador. (Anexo 3).

6. Efecto de la concentración de potasio sobre la movilidad y el tiempo de activación

Para saber a que concentraciones el potasio puede iniciar la movilidad, se realizaron 9 soluciones isosmóticas: 1mM, 5mM, 10 mM, 15 mM, 35 mM, 70 mM, 105 mM y 140 mM, además de dos soluciones control: una sin K⁺ pero isosmolar al plasma seminal, y otra con los iones Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ y Na⁺ en iguales concentraciones a las del plasma seminal. (Anexo 2).

7. Cambio de potencial de membrana mitocondrial

Para saber si durante la activación cambia el potencial de membrana mitocondrial se realizó una evaluación cualitativa usando el fluorocromo Jc-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolcarbocyanina ioduro), carbocianina catiónica con afinidad por las cargas negativas de la membrana interna mitocondrial. En las membranas mitocondriales con bajo potencial, el Jc-1 se mantiene en forma de monómero fluoresciendo en verde, cuando el potencial aumenta el Jc-1 forma agregados con emisión de fluorescencia roja (Haugland, 1996). El semen se diluyó 5:1000 en la solución isosmótica que contenía todos los iones (solución 1, tabla 1), con 1 μ M de Jc-1, se incubó 15 minutos a 20°C. La diferencia de potencial se cualificó por el cambio de patrón de emisión verde (bajo potencial) o rojo (alto potencial), antes y después de la activación de los espermatozoides con la solución de agua destilada y Hepes 20 mM, y al excitar el fluorocromo a 590 nm usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiolab, equipado con una lámpara HBO 50/AC y una cámara Zeiss MC 80Dx.

8. Análisis estadístico:

Se llevó a cabo un ANOVA, la cual estudia la relación estocástica cuantitativa entre las variables dependientes (Movilidad, tiempo, IMF) y las independientes (balance iónico, bloqueadores de canales, concentración de potasio) utilizando el estadístico de Tukey y Kramer ($p < 0.05$). Las variables movilidad e IMF fueron transformadas por \log_{10} y $\log(100 + X)$, respectivamente. Se utilizó el programa SAS 1999. En todas las figuras se expresan los resultados como media \pm DE). El diseño experimental contempló un tamaño muestral de 5 animales con cuatro repeticiones para todos los ensayos (exceptuando los ensayos de efecto de la concentración de potasio sobre la movilidad y el tiempo de activación y Cambio de potencial de membrana mitocondrial).

III. Resultados

1. Efecto de la preincubación con iones sobre la movilidad y el tiempo de activación

El porcentaje de espermatozoides que adquirieron movilidad osciló entre 42 y 75% en todas las soluciones que contenían iones, siendo diferentes ($p < 0.05$) del control negativo (4%). Los mayores porcentajes de movilidad (57-75 %) se lograron cuando los espermatozoides fueron incubados en las soluciones que contenían K^+ , sin diferencia

estadística significativa ($p>0.05$) con el control positivo (fig 2). El tiempo que duró el movimiento espermático, osciló entre 56-94 segundos, siendo diferentes al control negativo ($p<0.05$), las soluciones con mayor tiempo de activación fueron $\text{Na}^+-\text{Mg}^{2+}-\text{Ca}^{2+}$ (94 seg.) y $\text{Na}^+-\text{Mg}^{2+}$ (79 seg.) sin diferencia significativa ($p>0.05$) al control positivo quien contenía todos los iones (fig 3).

2. Efecto de los iones sobre el potencial de membrana plasmática

El potencial de membrana cambió en el mayor número de espermatozoides incubados con las soluciones, $\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{K}^+$ siendo mayor que en los controles positivo

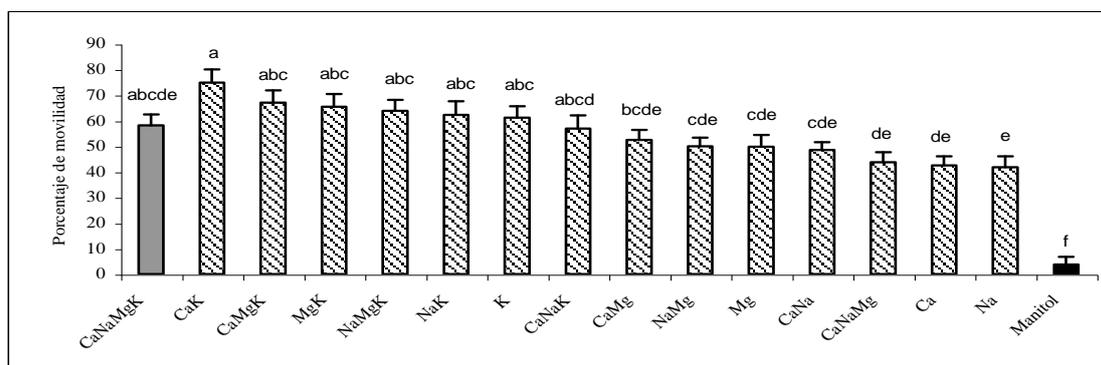


Fig. 2. Efecto del balance iónico sobre la movilidad de espermatozoides de *B.henni*. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P<0.05$)

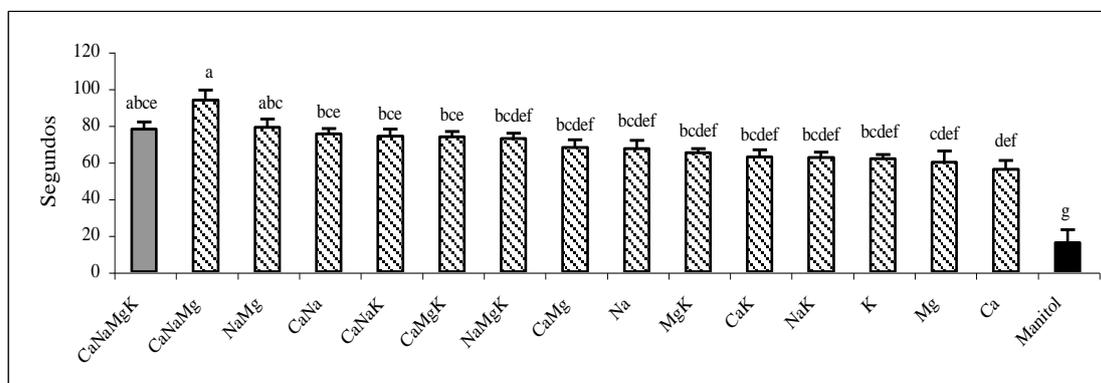


Fig. 3. Efecto del balance iónico sobre el tiempo de duración de la movilidad de espermatozoides de *B.henni*. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P<0.05$)

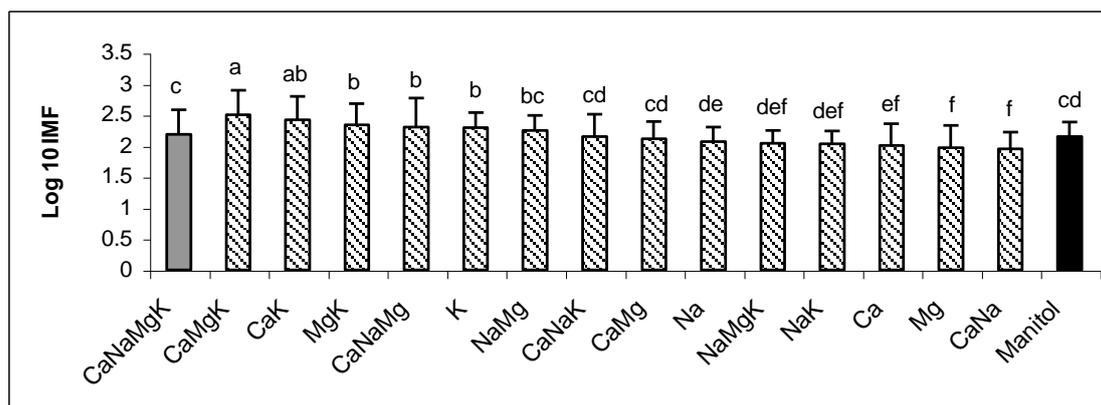


Fig. 4. Efecto del balance iónico sobre el cambio de potencial de membrana en *B.henni*.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P < 0.05$)

y negativo (fig 4). El cambio de potencial de membrana se registra desde los 15 segundos, posterior a la activación. El mayor número de espermatozoides cambian de potencial a los 30 segundos, y permanece hasta los 120 segundos ($p < 0.05$) (fig 5).

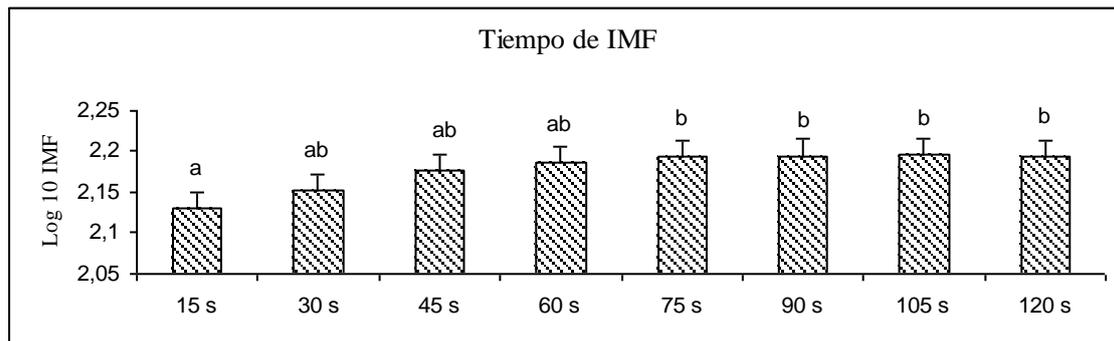


Fig. 5. Efecto del tiempo sobre el cambio de potencial de membrana en espermatozoides de *B.henni* medido mediante la intensidad media de fluorescencia. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P < 0.05$)

3. Efecto de los bloqueadores de canales iónicos sobre la movilidad

Los bloqueadores de canales de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ no afectaron el porcentaje de espermatozoides que adquieren movilidad (65-82%), a ninguna de las concentraciones utilizadas ($p > 0.05$) (fig 6), pero sí reduce el tiempo que duran activos en cualquiera de las concentraciones ($p < 0.05$), ya sea en forma individual o cuando son agregados juntos.

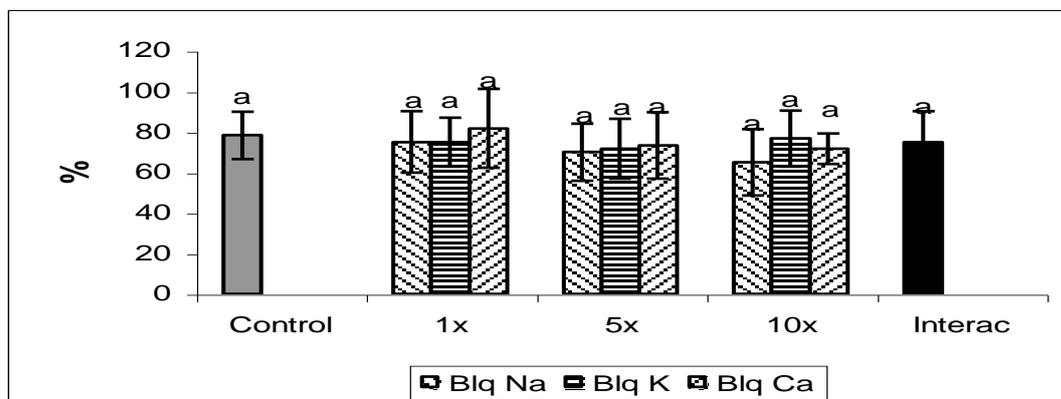
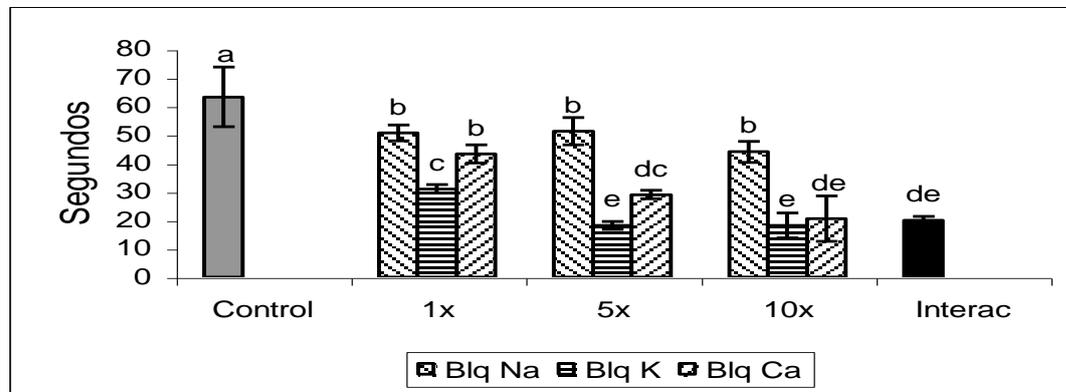


Fig. 6. Efecto de los Bloqueadores de canales de Na^+ , de K^+ y de Ca^{2+} sobre la movilidad espermática.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P < 0.05$)

Los bloqueadores de canales de calcio y potasio acortan el tiempo de movilidad, que paso de 63 segundos (control, sin bloqueador) a 18 segundos en la máxima



concentración (10x) ($p < 0.05$). El bloqueador de canal de sodio tuvo menor efecto en la reducción del tiempo de activación, el cual pasó de 63 segundos en el control a 44 segundos con dicho bloqueador ($p < 0.05$) (fig 7).

Fig. 7. Efecto de los Bloqueadores de canales de Na^+ , de K^+ y de Ca^{2+} sobre el tiempo de activación espermática. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P < 0.05$)

4. Efecto de la concentración de potasio sobre la movilidad y el tiempo de activación

La incubación con concentraciones de K^+ desde 1mM hasta 70 mM, induce un porcentaje de movilidad igual al control positivo (63-73%). El porcentaje de espermatozoides móviles se redujo a 39 % en la solución de K^+ a 105 mM y fue mínima (6%) en la solución a 140 mM ($p < 0.05$) (Fig. 8). El tiempo de activación no mostró diferencia estadística significativa entre las distintas concentraciones de K^+ y los controles positivo (solución isosmótica con los cuatro iones) y negativo (solución isosmótica con manitol y sin iones) (Fig. 9).

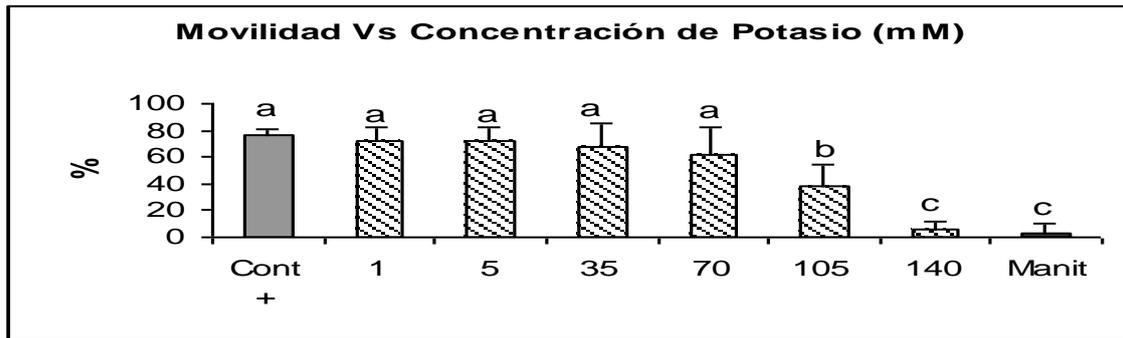


Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de K⁺ (mM) sobre la movilidad espermática. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P < 0.05$)

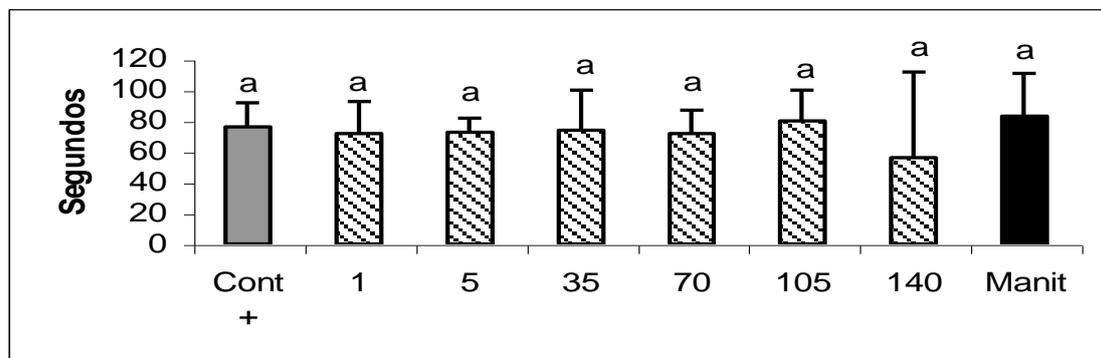


Fig. 9. Efecto de diferentes concentraciones de K⁺ (mM) sobre tiempo de activación espermática. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey - Kramer, $P < 0.05$)

5. Cambio de potencial de membrana mitocondrial

Los espermatozoides inmóviles presentaron un bajo potencial de membrana mitocondrial (Fig. 10a) una vez activados el potencial de membrana mitocondrial cambió y se mantuvo alto aun después de terminado el periodo de movilidad que fue de 62 ± 15 segundos (Fig. 10b).

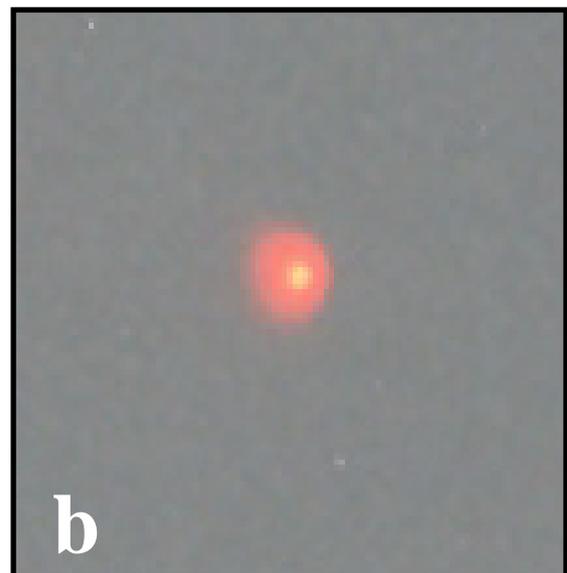


Fig. 10. Cambio de potencial de membrana mitocondrial. a. Patrón de emisión en verde (bajo potencial) en espermatozoides antes de la activación. b. Patrón de emisión en rojo (alto potencial) en espermatozoide activado con solución hiposmótica a base de agua destilada mas Hepes 20 mM.

IV. DISCUSIÓN

Cuando se induce el choque hiposmótico para activar los espermatozoides, se disminuye el potasio extracelular, que podría inducir su propio flujo desde la mitocondria hacia el citosol gracias a los intercambiadores K^+ / H^+ (Garlid *et al.*, 1994), y de éste hacia el medio externo. El aumento de la carga positiva extracelular, dada por la salida de K^+ , genera un cambio de potencial de membrana al diluirse éstas en el agua durante el choque hiposmótico (Ohta y Shinriky, 1998), produciendo consecuentemente un aumento del Ca^{2+} citosólico al entrar a través de canales de voltaje (Krasznai *et al.*, 2000) y posiblemente también por la liberación desde las reservas mitocondriales por canales de voltaje o de ligando (Carafoli 2003). De esta forma, el aumento de Ca^{2+} intracelular dispararía la ruta de señalización para el inicio de la movilidad. En el presente estudio se encontró que el K^+ y Ca^{2+} extracelulares son importantes para el inicio de la movilidad y que el Na^+ y Mg^{2+} la mantienen en el tiempo, pero no por canales dependientes de voltaje, ya que al bloquearlos no se vió afectado el inicio de la movilidad. El cambio de potencial de membrana se debe a la baja osmolalidad extracelular, sin embargo, no desencadena por sí sola la movilidad, ya que en ausencia de iones extracelulares (control negativo, Manitol) se produce cambio de potencial sin movilidad. Por lo tanto, el inicio de la movilidad en *B. henni*, podría estar regulada por el flujo de iones a través de canales de funcionamiento independiente de cambio de potencial de membrana como los activados por estiramiento, los intercambiadores o los de ligando.

El presente estudio evidencia la importancia del K^+ extracelular para adquirir la movilidad espermática, contrario a estudios en otras especies dulceacuícolas como *Onchorhynchus mykiss* (Morisawa *et al.*, 1983) y *Clarias gariepinus* (Mansour *et al.*,

2002) donde el K^+ es inhibidor la movilidad, o en anadromas como en *Morone saxatilis* donde no tiene efecto (He *et al.*, 2004), evidenciando las diferencias entre especies. Cuando se probaron las soluciones de incubación solamente con K^+ , se observó que éste es capaz de iniciar por si solo la movilidad independiente de la presencia de otros iones, o de la concentración.

La disminución del porcentaje de movilidad observada en las concentraciones de 105mM y 140mM de las soluciones de K^+ , podría ser debida a una deficiente dilución del K^+ extracelular alrededor de la membrana plasmática, ya que el volumen de solución activadora se mantuvo constante en todos los experimentos, por lo que la relación volumen: concentración, fue menor, impidiendo que se desencadene un cambio de potencial membrana para el inicio de la movilidad, como lo sugiere Krasznai *et al.*, 2000.

A diferencia de reportes previos realizados en salmónidos (Billard y Coson 1992) y *Cyprinus carpio* (carpa común) (Krasznai *et al.*, 2000) en donde la presencia Ca^{2+} extracelular fue necesaria para iniciar la movilidad espermática, nuestros resultados demuestran que no es necesario, como tampoco lo es en *Morone saxatilis* (He *et al.*, 2004). El Ca^{2+} favorece la movilidad sinérgicamente en presencia de K^+ (Fig 2), efecto propuesto previamente para *C. carpio* por Krasznai *et al.*, 2000, quienes concluyeron que la salida de K^+ genera un cambio de potencial de membrana que activa la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, contrario a lo sucedido en *B. henni*, donde se sugiere la intervención de otros tipos de canales de Ca^{2+} para su aumento intracelular y el subsiguiente inicio de la movilidad espermática. Las soluciones (Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^+ y Ca^{2+} - K^+) que originan el mayor número de espermatozoides móviles son las mismas que ocasionan el mayor número de espermatozoides con cambio de potencial de membrana (fig. 2, 4), sin embargo, no son las mismas que producen los mayores tiempos de activación (fig. 3), sugiriendo que estos dos eventos tienen mecanismos diferentes.

Los mayores tiempos de movilidad observados en los espermatozoides que fueron incubados en soluciones que contenían Na^+ y/o Mg^{2+} (fig 3), concuerdan con los

trabajos de Mansour *et al.*, en el 2002 y 2003 en *Clarias gariepinus*, estudios que se apoyan en lo reportado por Márián *et al.*, 1997, donde se sugiere que el pH intracelular varía a medida que transcurre el tiempo de movilidad y se concluye que el antiporte Na^+/H^+ está involucrado en la regulación del pH de forma dependiente de la osmolaridad y de los iones extracelulares. Sin Na^+ extracelular, el antiporte Na^+/H^+ no puede activarse, disminuyendo el tiempo que dura la movilidad. La presencia de Mg^{2+} mantiene más tiempo la movilidad, posiblemente porque activa la adenilciclase para producir AMPc, que participa en la activación de proteínas iniciadoras del movimiento mediante la hidrólisis de ATP donde el Mg^{2+} actúa como cofactor. (Inaba *et al.*, 1998; Barbiroli *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 1999). Este mecanismo de acción no está bien esclarecido, pero se cree que el Mg^{2+} modula la apertura y cierre de sus canales en la mitocondria, estando disponible para el movimiento flagelar (Shi *et al.*, 2002).

La duración de la movilidad en *Brycon henni* (fig 6), podría asociarse a regulación iónica por varios tipos de canales, contrariamente a lo que ocurre en ciprinidos donde se involucra un solo tipo (Krasznai *et al.*, 2000). El tiempo de movilidad se disminuyó significativamente pero no se bloqueó totalmente en los espermatozoides de *Brycon henni* con cualquiera de los bloqueadores, lo que sugiere: I. los canales bloqueados son importantes para la movilidad pero no son los únicos involucrados, posiblemente el flujo iónico a través de los otros canales es suficiente para iniciar la movilidad pero insuficiente para mantenerla en el tiempo, II. los bloqueadores requieren un tiempo mínimo para saturar los canales antes de ejercer su efecto, por lo cual se da inicialmente la movilidad, pero esta no se mantiene en el tiempo.

El hecho de que los espermatozoides detengan su movilidad aún cuando se mantiene el potencial de membrana mitocondrial, sugiere que el factor limitante para continuar la movilidad es el ATP y no el potencial de membrana. Un desequilibrio en las condiciones óptimas de metabolismo (deficiencia de glucosa) y funcionalidad mitocondrial conducirían al detenimiento de la movilidad espermática (Lahnsteiner *et al.*, 1998; 1999). Posiblemente la dinámica de regulación iónica mitocondrial mantiene el potencial de membrana interna (Garlid *et al.*, 1994), pero el movimiento flagelar se detendría quizás por fallas en el proceso de producción de energía.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados la activación espermática en *Brycon henni* es un proceso que depende de un conjunto de factores como: 1) El balance iónico, del cual sobresale el papel del K^+ sobre la inducción de la movilidad, del Na^+ y el Mg^{2+} sobre la duración de la misma; 2) El papel de los canales iónicos, donde los dependientes de voltaje no tienen aparente participación en el inicio de la movilidad y sí en el tiempo que dura la misma.; 3) El cambio de potencial de membrana plasmática y mitocondrial, se generará cuando se activa el espermatozoide, es importante en el inicio de la movilidad y permanece en el tiempo aún después de terminar la misma, sugiriendo que no regula su duración.

VI. AGRADECIMIENTOS: A COLCIENCIAS proyecto 1115-09-12308, al grupo de Reproducción, Fisiología y Biotecnología (Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia), al Instituto Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, a los miembros del Comité Tutorial, a la Corporación Biogénesis, a la Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, a la unidad de Citometría de flujo (Universidad de Antioquia), a mis Padres, familiares y amigos, a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la elaboración de este trabajo y por su puesto a DIOS, quien me guía y fortalece siempre.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade RF, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue & Cell*; 33 (5):524-532.
2. Barbiroli B, Iotti S, Cortelli P, Martinelli P, Lodi R, Carelli V, Montagna P. 1999. Low brain intracellular free magnesium in mitochondrial cytopathies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19 (5): 528-32.

3. Baroiller, J.F., Y. Guiguen & A. Fostier. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 910–931.
4. Billard R, Cosson M.P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J Exp Zool.* 262:122-31.
5. Blázquez, M., S. Zanuy, M. Carrillo & F. Piferrer. 1998. Effects of rearing temperatures on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp Zool.* 281: 207–216.
6. Builes J, Urán A. 1974. Estudio del ciclo sexual de la Sabaleta *Brycon henni* Eigenmann 1913, su comportamiento y fecundación artificial. *Act. Biol.* 2 (7) 1-12.
7. Carafoli E. 2003. Historical review: Mitochondria and calcium: ups and downs of and unusual relationship. *Tr Bioch Sci.* 28(4): 175-181
8. Cosson J., Linhart O. Mims S. D., Shelton W. L., Rodina M. 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J Fish Biol.* 56 : 1348-1367.
9. Cosson J., Billard R., Cibert C., Dréanno C. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm, in: *The Male Gamete*, Edited by Claude Gagnon. 161-186.
10. Dahl G. 1971. Los peces del norte de Colombia. Santa fe de Bogotá: INDERENA.
11. Darszon A., Labarca P., Nishigaki T., Espinosa F. 1999. Ion Channels in Sperm Physiology. *Phys Rev* 79 (3): 481-510.
12. Devlin R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture.* 208: 191-364.
13. Eddy E.M., O'Brien D.A. 1994. The espermatozoon, in: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition, Edited by E. Knobil and J. D. Neill, Raven Press, Ltd., New York. 29- 77.
14. Felix R., López-González I., Muñoz-Garay C y Darszon A. 2004. Ion Channels and sperm function. *Adv. Mol. Cell Biol.* 32 : 407-431.
15. Garlid KD, Paucek P. 2003. Mitochondrial potassium transport: The K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta.* 1606(1-3): 23-41.
16. Garlid KD. 1994. Mitochondrial cation transport: A progress report. *J. Bionerget. Biomembr.* 26:537-542.

17. Glogowski J., M. Kwasnik, K. Dabrowski, K. Goryczjo, S. Dobosz, H. Kuzmininski & A. Ciereszko. 2000. Characterization of Rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquac Res.* 31: 289-296.
18. Grassiotto Q, Negräu JN, Carvalho ED, Foresti F. 2001. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *J Fish Biol.* 59:1494-1502.
19. Haugland R.P. 1996. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes, Inc., Eugene.
20. He S, Jenkins-Feeran K, Curry Woods III L. 2004. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. *Theriogenology.* 61:1487-1498.
21. Hernández A. 1971. Piscicultura de la Trucha Arco Iris y la Sabaleta, Santa Fe de Bogotá: INDERENA.
22. Iigo, M. & K. Aida. 1995. Effects of season, temperature and photoperiod on plasma melatonin rhythms in the goldfish (*Carassius auratus*). *J Pineal Res.* 18: 62-68.
23. Inaba K., Morisawa S., Morisawa M. 1998. Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of AMPc-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain. *J cell Sci.* 111:1105-1115.
24. Ingerman RL, Holcomb M, Robinson ML, Cloud JG. 2002. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *J Exp Biol.* 205: 2885-2890.
25. Kaczmarek L.K y Jonas E.A. 2004. Ion channels on intracellular organelles. *Adv Mol Cell Biol.* 32 : 433-458.
26. Krasznai Z., Morisawa M., Morisawa S., Krasznai Z. T., Trón L., Gáspár R y Márián T. 2003. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquat. Living Resour.* 16 : 445-449.
27. Krasznai Z., Márián T., Izumo H., Damjanovich S., Balkay L., Trón L., Morisawa M. 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *PNAS* 97 (5) 2052- 2057.
28. Krasznai Z., Márián T., Balkay L y Gáspár R. 1995. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Aquaculture.* 129 :123-128.

29. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T. 1999. Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *J Exp Zool.* 284: 454-465.
30. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture.* 163: 163-181.
31. Linhart O., Cosson J., Mims S. D., Shelton W. L., Rodina M. 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction.* 124: 713-719.
32. Mansour N, Lahnsteiner F and Berger B. 2003. Metabolism of intratesticular spermatozoa of tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Comp Bioch Physiol Part B.* 135: 285-296.
33. Mansour N, Lahnsteiner F and Patzner R.A. 2002. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. *J Fish Biol.* 60: 545-560.
34. Márián T., Krasznai Z., Balkay L., Emri M., Trón L. 1997. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺ / H⁺ exchanger. *Cytometry.* 27: 374-382.
35. Márián T., Krasznai Z., Balkay L., Balázs M., Emri M., Bene L., Trón L. 1993. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *J Histochem Cytochem.* 41 (2): 291-297.
36. Marshall W. 1986. Sperm duct epithelium of brook trout: Na⁺ transport and seminal plasma composition. *Can J Zool.* 64 (9): 1827-1830
37. Miles C. 1947. Los peces de río Magdalena. Santa fe de Bogotá: Ministerio de la economía nacional, sección de piscicultura, pesca y caza.
38. Mochida K, Kondo T, Matsubara T, Adachi S, Yamauchi K. 1999. A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev Growth Differ.* 41:619-627.
39. Morisawa M., Suzuki K., Morisawa S. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J Exp Biol.* 107: 105-113.

40. Morita M, Takemura A, Okuno M. 2003. Requirement of Ca^{2+} on activation of sperm motility in euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. J Exp Biol. 206:913-921.
41. Müller K., Labbé C., Zachowski A. 1994. Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrane. Bioch et Bioph acta. 1192: 21-26.
42. Nash J.P. 1999. Seasonal reproduction in fish, Vol. 4, p 329-340. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds), Encyclopaedia of Reproduction. Academic, Nueva York.
43. Ohta H, Unuma T, Tsuji M, Yoshioka M, Kashiwagi M. 2001. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (osmeridae), spermatozoa. Aquac Res. 32:385-392.
44. Ohta H. & Shinriki Y. 1998. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in the river sculpin *Cottus hangiongensis*. Fish Phys Bioch. 18: 29-35.
45. Ohta H. & M. Tsuji. 1998. Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during *in vitro* storage. Fisheries Sci. 64: 547-552.
46. Paniagua, R., B. Fraiie, & J. Sáez. 1990. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. Hist Histopat. 5: 365-378.
47. Perdomo J. 1978. La Sabaleta (*Brycon henni*) observaciones bioecológicas y su importancia como especie de cultivo. Rev Divul Pesq. 11(1):1-46.
48. Plata, J. 1977. Diferenciación sexual y desarrollo de las gónadas en los alevinos de la Sabaleta *Brycon henni* Eigenmann. Trabajo de Grado para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín. 22 p.
49. Shi J, Krishnamoorthy G, Yang Y, Hu L, Chaturvedi N, Harilal D, Qin J, Cui J. 2002. Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. Nature. 418 (6900): 876-880.
50. Sierra R. A y Olivera–Angel M. 2000. Interacción entre gametos: como lo logra el espermatozoide? Rev Col Cienc Pec. 13 (2):148-155.

51. Sordahl L.A, Silver B.B. 1975. Pathological accumulation of calcium by mitochondria: modulation by magnesium. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab.* 6: 85-93.
52. Strüssmann, C.A., S. Moriyama, E.F. Hanke, J.C.C. Cota & F. Takashima. 1996. Evidence of thermo labile sex differentiation in pejerrey. *J. Fish Biol.* 48: 643–651.
53. Suarez S, Ho H. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Dom Anim.* 38: 119-124.
54. Tabares C. J, Montoya A.F, Arboleda L, Echeverri A, Restrepo L.F, Olivera-Angel M. 2005. Efecto de la pluviosidad y el brillo solar sobre la producción y características del semen en *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Rev Biol Trop* (En prensa).
55. Useche C, Cala P, Hurtado H. 1993. Sobre la ecología de *Brycon siebenthalae* y *Mylossoma duriventris* (Pisces:Characidae) en el río Cafre, Orinoquia. *Caldasia.* 17 (2): 341-352
56. Vines C.A., Yoshida K., Griffin F.J., Pillai M.C., Morisawa M., Yanagimachi R y Cherr G.N. 2002. Motility initiation in herring sperm is regulated by reverse sodium-calcium exchange. *PNAS* 99 (4): 2026-2031.
57. Yool A.J y Stamer W.D. 2004. Novel roles for aquaporins as gated ion channels. *Adv Mol Cell Biol.* 32 : 351-379.

ANEXO 1

Protocolo para la toma de muestra de semen de “Sabaleta” *Brycon henni*.

Propósito: Obtener muestras de semen de sabaleta, para la evaluación de parámetros seminales y análisis iónico del plasma seminal.

Materiales:

- Toalla absorbente pequeña
- Papel secante
- Tubos eppendorf graduados
- Conservadores de frío (Frio-paq®)
- Nevera de icopor

Reactivos:

1. Quinaldine sulfato ($\text{CH}_3\text{C}_9\text{H}_6\text{N}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$). Peso molecular: 241.28. Lab Depot, Inc. Frasco x 5 y 25 g.

Procedimiento:

1. Dejar los animales en ayuno por 24 horas antes de la toma de muestra, con el fin de evitar contaminación del semen con materia fecal y orina.
2. Capturar los animales con chinchorro del estanque de origen, transportarlos al laboratorio.
3. Colocar los animales en un tanque y aplicar el quinaldine a razón de 60-70 mg/Lt.
4. Sujetar el animal de la parte anterior, con la mano izquierda y cubierto con la toalla húmeda. La mano derecha queda libre para la extracción del semen.

5. Un ayudante debe sujetar la aleta caudal del animal y sostener el vial eppendorf justo debajo de la papila genital.
6. Secar muy bien con el papel absorbente toda la zona próxima a la papila genital.
7. Extraer el semen mediante masaje abdominal suave en dirección cráneo-caudal.
8. Colectar el semen en viales eppendorf e inmediatamente depositar la muestra en la nevera de icopor, la cual contiene los conservadores de frío. La temperatura dentro de la nevera debe estar alrededor de los 4°C.
9. Transportar la muestra al laboratorio para ser analizada en un tiempo no mayor de 24 horas, teniendo cuidado de mantenerla a 4°C hasta su análisis.

ANEXO 2

Protocolo para preparación de soluciones isosmóticas, para evaluación de la activación de la movilidad en semen de sabaleta (*Brycon henni*)

El presente protocolo describe el método para la preparación de soluciones isosmóticas que pueden usarse para estudios básicos y evaluación seminal en sabaleta (*Brycon henni*). Las soluciones se prepararan con base en los resultados previos de la evaluación del plasma seminal el cual tiene una osmolalidad de 307 mOsm/Kg y un pH entre 7.5 y 8.

Consideraciones previas: Antes de realizar el procedimiento, asegúrese de leer y comprender completamente el protocolo, así como los protocolos para uso de los diferentes equipos a utilizar. Tenga en cuenta las normas mínimas de buenas prácticas de manejo (BPM) para trabajo en laboratorio que incluyen: Aseo y desinfección, calibración y utilización de equipos, bioseguridad en manipulación de reactivos.

Definiciones:

Osmolaridad / Osmolalidad: Son la medida de la tendencia del paso de moléculas desde una solución a otra cuando están separadas por una membrana semipermeable. Están relacionadas con la concentración de la solución y se diferencian por sus unidades: osmolalidad, miliosmoles por kilogramo (mOsm/Kg) y osmolaridad, miliosmoles por litro (mOsm/l). La osmolalidad corresponde al número de osmoles de partículas (solutos) en un Kg. de solvente. La osmolaridad se refiere al número de osmoles por litro de solución

pH: se define como el potencial de Hidrógeno calculado como el logaritmo negativo de la actividad o concentración molar de los iones Hidrógeno (H^+ ó hidronio H_3O^+). $pH = -\log[H^+]$

Materiales:

- Espátula para tomar los reactivos
- Papel bond blanco para pesar los reactivos
- Tubos cónicos de 50 ml de poliestileno
- Micropipetas 10 μ l, 100 μ l y 1000 μ l
- Puntas para micropipetas

Reactivos:

- Cloruro de Sodio (NaCl) S-9625 FW 58.44, Merck
- Cloruro de Potasio (KCl) Referencia: P-5405 FW 74.55, Sigma.
- Cloruro de Calcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) Referencia: C-7902 FW 147.1
- Cloruro de Magnesio Hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Referencia: M-2393 FW 203.3, Sigma
- Hepes ($C_8H_{18}N_2O_4S$), Referencia: H-9136 FW 238.3, Sigma
- Manitol ($C_6H_{14}O_6$) , Referencia: M9546-250G, FW 182.17, Sigma
- Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0.01 y 0.1 Molar, Merck.
- Ácido clorhídrico (HCl) al 0.01 y 0.1 Molar, Merck.
- Agua destilada desionizada

Equipos:

- Balanza electrónica con precisión para 4 decimales.
- Vortex.
- Osmómetro
- pHmetro

Procedimiento:

1. Llevar a la mesa de trabajo que debe estar cerca de los equipos a utilizar, todos los materiales y reactivos necesarios para la preparación de las soluciones.

2. Pesar los reactivos cuidadosamente en la balanza electrónica (Ver tablas 1 y 2), usando la espátula para tomar los reactivos del recipiente de origen y teniendo cuidado de limpiarla cuidadosamente al cambiar de reactivo. Se debe usar papel bond blanco para pesar las cantidades deseadas, vale anotar que se debe tarar la balanza (Llevarla a ceros restando el peso del papel).
3. Depositar las cantidades necesarias ya pesadas para cada solución (Tablas 1 y 2), en un tubo cónico de 50 ml debidamente marcado (Numero de la solución, componentes, fecha y persona a cargo).
4. Disolver con agua destilada desionizada hasta completar un volumen total de 50 ml.
5. Homogenizar en un vortex, durante 1 minuto.
6. Medir osmolalidad de cada solución corroborando que se aproxime al valor deseado (307 mOsm/Kg).
7. Medir el pH de cada solución, y ajustar a un valor entre 7.5 y 8 ya que el pH promedio del semen de Sabaleta se mueve en este rango. Para dicho ajuste se usarán NaOH (para subir el pH) o HCl (para disminuir el pH), se debe empezar por pocas cantidades para evitar sobrepasarse del valor deseado, se recomienda empezar por la dilución menor (0.01 molar) de cualquiera de los dos ajustadores de pH. Las cantidades usadas de NaOH para la preparación de cada solución se enuncian en la tabla 2.
8. Medir nuevamente la osmolalidad y verificar que se aproxime al valor deseado (307 mOsm/Kg), de lo contrario se debe repetir el procedimiento.
9. Las soluciones ya preparadas, se pueden conservar en refrigeración a 4°C, durante un mes, y solo se sacarán del refrigerador para su uso.

Tabla 1: Reactivos para la preparación de soluciones isosmóticas en 50 ml de agua destilada.

Nombre del Reactivo	Símbolo Químico	Peso molecular	Cantidad deseada	Concentración mM
Cloruro de Sodio	(NaCl)	58.44	359 mg	122.8
Cloruro de Potasio	(KCl)	74.55	139.1 mg	37.3
Cloruro de Calcio Dihidratado	(CaCl ₂ ·2H ₂ O)	147.1	6.4 mg	0.87
Cloruro de Magnesio Hexahidratado	(MgCl ₂ ·6H ₂ O)	203.3	8.43 mg	0.83
Hepes	(C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	238.3	198 mg	16.6

Agua destilada	H ₂ O	18	50 ml.	-
----------------	------------------	----	--------	---

Tabla 2: Preparación de cada solución según molaridad o peso para un volumen de 50 ml

Sln	Composición (Cantidades para 50ml según tabla 1)	Manitol en mM	Manitol en mg	Osmol mOs/kg	pH inicial	NaOH en mM	NaOH (1M) en µl	pH final
1	Ca+2, Na+, Mg+2, K+, Hepes	0	0	301	5.77	1.99x10 ⁻⁶	100	7.52
2	Ca+2, Na+, Mg+2, Hepes	17.84	162.489	300	5.8	1.84x10 ⁻⁶	100	7.7
3	Ca+2, Na+, K+, Hepes	1.26	11.47	301	5.65	1.92x10 ⁻⁶	100	7.95
4	Ca+2, Mg+2, K+, Hepes	45.9	418.08	305	5.66	1.51x10 ⁻⁶	80	7.71
5	Na+, Mg+2, K+, Hepes	5.37	48.91	301	5.64	1.50x10 ⁻⁶	80	7.82
6	Ca+2, Na+, Hepes	16.26	148.10	305	5.59	1.52x10 ⁻⁶	80	7.51
7	Ca+2, Mg+2, Hepes	53.17	484.29	307	5.59	1.51x10 ⁻⁶	80	7.71
8	Ca+2, K+, Hepes	46.89	427.09	302	5.48	1.90x10 ⁻⁶	100	7.51
9	Na+, Mg+2, Hepes	15.49	141.09	307	5.6	1.71x10 ⁻⁶	90	7.81
10	Na+, K+, Hepes	5.37	48.91	307	5.63	1.60x10 ⁻⁶	85	7.67
11	Mg+2, K+, Hepes	47.55	433.10	305	5.56	1.72x10 ⁻⁶	90	7.52
12	Mg+2, Hepes	56.01	510.16	306	5.63	1.59x10 ⁻⁶	90	7.49
13	K+, Hepes	47.55	433.10	305	5.61	1.90x10 ⁻⁶	100	7.57
14	Na+, Hepes	17.03	155.11	306	5.68	1.89x10 ⁻⁶	100	7.6
15	Ca+2, Hepes	57.98	528.11	303	5.61	1.90x10 ⁻⁶	100	7.62
16	Manitol, Hepes	63.63	579.57	307	6.94	9.43x10 ⁻⁸	5	7.84
17*	Hepes	-	0.0	10	5.62	1.51x10 ⁻⁶	80	7.55

*Solución activadora: agua ultrapura bufferada con HEPES 10mM, NaOH 1M

Formulas empleadas en el cálculo de las cantidades de reactivos:

$$\text{a) Molaridad} = \frac{\text{Peso del soluto}}{\frac{\text{Peso Molecular del soluto}}{\text{Volumen de solución}}}$$

1

$$\text{b) Molaridad} = \frac{\text{Peso del soluto}}{\text{Volumen de solución}}$$

Peso Molecular del soluto x Volumen de solución

c) Peso del soluto = Molalidad x Peso Molecular del soluto x Volumen de solución

Ejemplo:

Para calcular la cantidad, osmolalidad y concentración mM de NaCl, Hepes y manitol para la solución 14.

- Molalidad final de NaCl en la solución : 122.8 mOsm = 0.1228 Osm
- Cantidad final de hepes en la solución: 198 mg
- Cantidad de manitol en la solución: 155.11 mg
- Peso molecular del NaCl: 58.44 g
- Peso molecular del hepes: 238.3
- Peso molecular del manitol: 182.17
- Volumen final de solución: 50 ml = 0.05 litros.

a) Calculo de la cantidad necesaria de NaCl para la solución:

Peso del soluto = Molalidad x Peso Molecular del soluto x Volumen de solución

Peso del soluto = 0,1228 Osm x 58.44 g x 0.05 l

Peso del soluto = 0.3588 g = 359 mg de NaCl (Ver tabla 1)

b) Calculo de la concentración final de hepes en la solución:

$$\text{Molaridad} = \frac{\frac{\text{Peso del soluto}}{\text{Peso Molecular del soluto}}}{\frac{\text{Volumen de solución}}{1}}$$

$$\underline{0.198g}$$

$$\text{Molaridad} = \frac{238.3\text{g/l}}{\frac{0.051}{1}}$$

$$\text{Molaridad} = 0.0166 \text{ M} = 16.6 \text{ mM (ver tabla 1)}$$

b) Calculo de la osmolalidad del manitol en la solución:

$$\text{Molalidad} = \frac{\text{Peso Molecular del soluto} \times \text{Volumen de solución}}{\text{Peso del soluto}}$$

$$\text{Molalidad} = \frac{182.17\text{g/l} \times 0.051}{155.11\text{mg}}$$

$$\text{Molalidad} = 58.72 \text{ mOsm}$$

La suma de las osmolalidades de los tres componentes (NaCl, Hepes y manitol) dan como resultado 50 ml de solución a 306 mOsm/Kg. (ver tabla 2)

ANEXO 3

Preparación de soluciones bloqueadoras, para evaluación de la activación de la motilidad en semen de Sabaleta.

Materiales:

- Espátula para tomar los reactivos
- Papel bond blanco para pesar los reactivos
- Tubos cónicos de 50 ml de poliestileno
- Micropipetas 10 μ l, 100 μ l y 1000 μ l
- Puntas para micropipetas

Reactivos:

- Cloruro de Sodio (NaCl) S-9625 FW 58.44, Merck.
- Cloruro de Potasio (KCl) Referencia: P-5405 FW 7455, Sigma.
- Cloruro de Calcio Dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Referencia: C-7902 FW 1471
- Cloruro de Magnesio Hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Referencia: M-2393 FW203.3, Sigma
- Hepes ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), Referencia: H-9136 FW 238.3, Sigma
- Manitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$), Referencia: M9546-250G, FW 182.17, Sigma
- Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0.01 y 0.1 Molar, Merck
- Ácido clorhídrico (HCl) al 0.01 y 0.1 Molar. Merck
- Agua destilada
- Amiloride. Biomedicals, Alemania. Biomedicals, Alemania.
- 4 Aminopiridina. Biomedicals, Alemania.
- Verapamilo. Biomedicals, Alemania.

Equipos:

- Balanza electrónica con precisión para 5 decimales.
- Vortex.
- Osmómetro
- pHmetro

Procedimiento:

1. En base al protocolo de preparación de soluciones isosmóticas (Anexo 2), preparar la solución N° 1 y solución activadora.
2. Una vez preparadas estas soluciones, se distribuirá cada solución en tres tubos cónicos de 50 ml. Ver tabla 1.
3. Pesar los bloqueadores cuidadosamente en la balanza electrónica (Ver tabla 1), usando la espátula para tomar los reactivos del recipiente de origen y teniendo cuidado de limpiarla cuidadosamente al cambiar de reactivo. Se debe usar papel bond blanco para pesar las cantidades deseadas, vale anotar que se debe tarar la balanza (Llevarla a ceros restando el peso del papel).
4. Una vez pesados los bloqueadores, se mezclan en las correspondientes soluciones activadoras ya preparadas.
5. Las soluciones así preparadas se homogenizan en un vortex a 2000 rpm, durante 1 minuto.
6. Medir osmolalidad de cada solución corroborando que se aproxime al valor deseado (307 mOsm/Kg).
7. Medir el pH de cada solución, y ajustar a un valor entre 7.5 y 8 ya que el pH promedio del semen de Sabaleta se mueve en este rango. Para dicho ajuste se usarán NaOH (para subir el pH) o HCl(para disminuir el pH), se debe empezar por pocas cantidades para evitar sobrepasarse del valor deseado, se recomienda empezar por la dilución menor (0.01 molar) de cualquiera de los dos ajustadores de pH.
8. Por último se recomienda medir nuevamente la Osmolalidad y verificar que se aproxime al valor deseado (307 mOsm/Kg), de lo contrario se debe repetir el procedimiento.

9. Las soluciones ya preparadas, se conservarán en refrigeración a 4°C y solo se sacarán del refrigerador hasta su uso.

Tabla 1: Cantidad de reactivos para la preparación de soluciones bloqueadoras en 50 ml de solución activadora.

Nombre del Reactivo	Cantidad deseada	Concentración
Amiloride	1.33 mg	100 µM
4 Aminopiridina	23.5 mg	5 mM
Verapamilo	2.5 mg	100 µM

Formulas empleadas en el cálculo de las cantidades de reactivos.

$$\text{Molaridad} = \frac{\frac{\text{Peso del soluto}}{\text{Peso Molecular del soluto}}}{\frac{\text{Volumen de solución}}{1}}$$

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{Peso del soluto}}{\text{Peso Molecular del soluto} \times \text{Volumen de solución}}$$

$$\text{Peso del soluto} = \text{Molaridad} \times \text{Peso Molecular del soluto} \times \text{Volumen de solución}$$

ANEXO 4

Polaridad de membrana al momento de la activación espermática.

Preparación de reactivos y soluciones:

Preparación de soluciones: Las soluciones iónicas isosmóticas para evaluar el efecto de los cuatro iones en la activación espermática, fueron las mismas utilizadas para el análisis en citometría de flujo.

Preparación de Oxonol:

Solución Madre:

Formula química: bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol (DiBAC₄(3))

Molecular Probes, USA.

Peso molecular: 516.64 gr/mol

Solvente requerido: Metanol

Concentración deseada: 100 mM = 0.1 Molar

Cantidad que se tiene de oxonol: 25 mgr.

Volumen de solvente que se requiere: 483.9 µl

Despejamos volumen de solvente de la fórmula:

Peso del soluto

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{Peso Molecular del soluto}}{\frac{\text{Volumen de solvente}}{1}}$$

$$\text{Volumen de solvente} = \frac{\text{Peso del soluto}}{\text{Molaridad} \times \text{peso molecular del soluto}}$$

$$\text{Volumen} = \frac{0.025 \text{ g}}{0.1 \times 516.64}$$

$$\text{Volumen de solvente} = 0.4839 \text{ ml} = 483.9 \mu\text{l}$$

Preparación:

1. Preparar todo con material estéril, en cabina de flujo laminar y en penumbra.
2. Disolver los 25 mg de Oxonol en 484 μl de metanol
3. Homogenizar
4. Alicuotar (se obtienen 20 viales de 24.2 μl de solución madre de oxonol a 100 mM)
5. Marcar debidamente (Concentración, volumen, fecha, nombre del colorante, laboratorio a quien pertenece, persona a cargo)
6. Empacar en papel aluminio para evitar que la luz dañe el fluorocromo.
7. Almacenar a -20°C bien tapado y marcado.

Solución de trabajo:

Preparación:

1. Llevar la solución madre a un concentración 100 μM , para lo cual se realiza una dilución 1:1000 de solución madre en solución isosmótica (plasma seminal artificial), esta solución se debe mantener protegida de la luz (vial ambar y cubierto con papel aluminio) bien marcada (Concentración, volumen, fecha, nombre del colorante, laboratorio a quien pertenece, persona a cargo) y refrigerada para ser usada en el momento que se requiera.

2. La concentración final de oxonol para el análisis de muestras en citometría de flujo laminar debe ser de 1 μM , por lo tanto se debe adicionar 1 μl de solución de trabajo (100 μM) a cada 99 μl de muestra a ser analizada.

Preparación de Muestras de semen para evaluar en citometría de flujo

1. Toma de muestras de semen: anexo 1 pag. 28
2. Ajuste de la concentración: Se determinó la concentración espermática a cada muestra de semen obtenida mediante conteo en cámara de Newbauer. Una vez conocido el número de espermatozoides por ml de semen se procedió a ajustar cada una de las soluciones a probar en citometría de flujo a 20 millones de células por mililitro de solución, este cálculo se hizo mediante regla de tres simple. El volumen final de cada solución ajustada fue de 500 μl .
3. Análisis de polaridad de membrana en soluciones tratamiento: Se tomaron 100 μl de cada solución ya ajustada a la concentración deseada (20 millones de espermatozoides/ml) y se le agregó 4 μl de solución de trabajo de oxonol (100 μM), inmediatamente la muestra iba a ser analizada en el citómetro se procedía a agregar 296 μl de solución activadora (Agua destilada más hepes) para activar los espermatozoides, de esta forma se obtenía una concentración final de células de 5 millones/ml y de oxonol de 1 μM . Cada muestra fue homogenizada debidamente en un vortex antes de su análisis en el citómetro y se leyó en el equipo cada 15 segundos durante 2 minutos.
4. Se obtuvieron dos controles de cada muestra, uno con oxonol pero sin activar los espermatozoides, para lo cual se mezcló 4 μl de solución de trabajo de oxonol (100 μM) con 296 μl de cada solución isosmótica a probar (sin espermatozoides) y con 100 μl de cada solución isosmótica ajustada a 20 millones de espermatozoides/ml, de esta forma la concentración celular final fue de 5 millones/ml y de oxonol de 1 μM . El otro control se hizo de igual manera que el

anterior pero sin agregar oxonol. Ambos controles solo se leyeron en el citómetro una vez.

- De esta forma se realizaron 4 muestreos con fechas de toma de muestra diferentes, se tomo semen de 5 peces cada vez y se analizaron 16 soluciones isosmóticas en cada pez y en cada fecha, cada solución tubo 11 mediciones contando 9 con los espermatozoides activados y dos de ellas como controles no activados (una con oxonol y la otra no).

ANEXO 5

Artículo aceptado para publicación. Revista de Biología Tropical. Costa Rica.

Efecto de la pluviosidad y el brillo solar sobre la producción y características del semen en *Brycon henni* (Pisces: Characidae)

Tabares C. J¹; Montoya A.F¹; Arboleda L³; Echeverri A³; Restrepo L.F²; Olivera-Angel M^{1,2}

¹Reproducción-Fisiología y Biotecnología; ²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Carrera 75 N° 65-87, AA: 1226, Medellín – Colombia; Tel.: +574 – 4259149. Fax: +574 – 4259149; cjbares@gmail.com; loki.asgard@gmail.com frestrepo@agronica.udea.edu.co, molivera@carios.udea.edu.co.

³ Escuela de Ciencias Agrarias P J I C, Carrera 48 N° 7-151, AA: 4932 Medellín-Colombia. larboleda@elpoli.edu.co, sabaleche@yahoo.es

Resumen:

Brycon henni, es una especie endémica protegida por la legislación colombiana, que habita cuerpos de agua de zonas cafeteras (700-1900 m.s.n.m), comprendidas entre los 4°35'56" norte y 74°04'51" oeste, con temperaturas que oscilan entre los 18 y los 28°C. A pesar de las características promisorias de esta especie, su reproducción en cautiverio a nivel comercial no ha sido posible por falta de conocimientos básicos de su biología y comportamiento. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la producción y la fisiología espermática de machos en cautiverio. A lo largo de un año se tomaron 20 muestras de cada uno de 10 ejemplares. El semen se obtuvo mediante masaje

abdominal cráneo-caudal y se transportó a 4°C para su análisis en el laboratorio. 3782 palabras.²

Con excepción de los meses de septiembre y octubre que fueron los más lluviosos, siempre se obtuvo semen de al menos el 50 % de los animales. El color, la osmolalidad y el pH fueron similares en todas las muestras a lo largo del año. El volumen, la concentración, la viabilidad, la movilidad y el tiempo de activación fueron variables: El efecto del brillo solar fue positivo sobre el volumen (Spearman $p < 0.05$) y sobre la concentración espermática (Spearman $p < 0.05$), mientras que la pluviosidad tuvo un efecto

negativo sobre el volumen y la viabilidad. La proporción entre los iones (Na, K, Mg, Ca) se mantuvo constante durante todo el año: el sodio fue el mayor, seguido por el potasio, y por el magnesio y el calcio, 10 y 100 veces menos, respectivamente; sin embargo la concentración absoluta de estos iones μM aumentó durante los meses de abril y julio sin una relación aparente con las otras variables analizadas.

Effect of pluviosity and sun shine on sperm production and seminal characteristics of *Brycon henni* (Pisces: Characidae)

Summary:

Brycon henni, is an endemic and protected species in Colombia, inhabiting water bodies in coffee producing areas (700-1900 m.o.s.l.), framed between 4°35'56" north and 74°04'51" west and with temperatures ranging between 18 and 28°C. In spite of the promising characteristics of this species it has not been possible to commercially culture it in captivity mainly for lack of knowledge of its basic biology and behavior. The objective of this work was to study sperm production and seminal from males kept in captivity. Along one year period 20 samples were taken from each one of 10 males. The sample was obtained by abdominal cefalo-caudal massage and transported to the lab at 4°C. Except for the months of September and October which were those of pick pluviosity semen was always obtained in at least 50% of the males. Color, osmolality and pH were similar in all the samples all the year around. Vol μMe , concentration, viability, motility and activation time were variable: sun shine had a positive effect on vol μMe (Spearman $p < 0.05$) and on sperm concentration (Spearman $p < 0.05$) while

pluviosity had a negative effect on volume and viability. The proportion of ions (Na, K, Mg, Ca) was constant along the year; Na being 10-fold higher than K and 100-fold higher than Mg and Ca; however the absolute concentration of all of them was slightly higher in April and in July with no apparent relation with the other variables analyzed.

Palabras clave: Espermiología, concentración iónica, condiciones ambientales

Key words: Spermiology, ion concentration, environmental conditions

Brycon henni (Eigenmann 1913), reconocida en nombre común de Sabaleta, es una especie endémica colombiana, que habita los cuerpos de agua de zonas cafeteras comprendidos entre los 4°35'56'' latitud norte y 74°04'51'' longitud oeste, con temperaturas de agua que oscilan entre los 18 y los 28 °C. La pesca de esta especie está legalmente prohibida en espera de un estudio que determine la condición de posible riesgo. Debido al aprecio que las poblaciones ribereñas tienen por la Sabaleta, tanto por sus calidades gastronómicas como por su comportamiento en la pesca deportiva, se justifica iniciar estudios para su producción en cautiverio.

Strüssmann *et al.* (1996) y Blázquez *et al.* (1998), demostraron que el fotoperiodo y la pluviosidad influyen en la maduración sexual de los peces de la familia Atherinidae; y Baroiller *et al.* (1999) y Devlin y Nagahama, 2002, demostraron que estas dos variables influyen en la diferenciación gonadal de los teleósteos en general. El brillo solar y las lluvias influyen en la función testicular, mediante la inducción de la producción de melatonina (Paniagua *et al.* 1990); por tanto la manipulación de estas variables ambientales podría acelerar o retrasar el funcionamiento gonadal de los peces en cautiverio para controlar así su espermiación (Iigo y Aida 1995, Nash 1999). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la producción y características del cuadro espermático de *B. henni* en cautiverio, durante un año, y asociar los resultados a las condiciones ambientales de pluviosidad y el brillo solar.

Materiales y Métodos:

Condiciones experimentales: El estudio se realizó en la estación piscícola experimental del Politécnico Jaime Isaza Cadavid (PIJC), alimentada por la quebrada

Guaracú, a 6°25' latitud norte y 75°39' longitud oeste (cuenca del río Cauca). Los animales habían sido capturados del medio natural, y mantenidos en estanques de 2 x 4 x 0.8 m, durante un periodo de por lo menos un año, antes de comenzar el muestreo. Se seleccionaron al azar 10 machos y se marcaron con un microcircuito AVID 2003 (Avid identification system). Los promedios de peso y longitud de estos ejemplares fueron, respectivamente, de 111.12 ± 20.34 g y 20.34 ± 1.15 cm. El alimento contenía un 38% de proteína según dieta diseñada para tilapia.

Toma de muestra: El proyecto se diseñó para recolectar muestras cada 15 días durante un año pero, por cuarentena de la granja, en los meses de febrero, abril, junio y noviembre sólo se pudo coleccionar una muestra. Previo ayuno de 24 horas, cada animal se colocó sobre una toalla húmeda, se le cubrió la cabeza con la misma toalla; se secó la zona ventral alrededor del poro genital y con masaje craneo caudal suave se colectó el semen en un tubo de 1.5 ml. Se midió el pH con papel indicador (Machrey-Nagel pH fix 0-14) y se determinó el volumen. La muestra se transportó a 4°C hasta el laboratorio donde se determinó el cuadro espermático. Una vez centrifugado el semen a 2500 g x 3 minutos a 4°C, se midió la osmolalidad del plasma seminal (Micro-osmometer type 5R Roebing) y luego, se juntaron los plasmas seminales de todos los individuos para asegurar un volumen suficiente para la medición de la composición iónica, por medio de electroforesis capilar. La concentración iónica se expresó en mM.

Evaluación del cuadro espermático

Reemplazo del plasma seminal: A partir de mediciones previas de la composición iónica del plasma seminal, se preparó una solución isosmótica de 307 mOsm (122.8 mM de Na Cl, 37.3 mM de KCl, 0.87 mM de CaCl₂, 0.83 mM de MgCl₂ y 16.6 mM de HEPES, NaOH 1 M), en la cual los espermatozoides permanecen inmóviles.

Movilidad y tiempo de activación: El semen diluido 1:1000 en solución isosmótica, se homogenizó con vortex por un minuto. Se depositaron 5 µl de esta suspensión sobre un portaobjetos y bajo control microscópico se activó el semen con 15 µl de solución activadora hiposmótica (agua destilada buferada con HEPES). Se determinó el

porcentaje de espermatozoides que adquirieron movilidad y el tiempo de duración de la misma (tiempo en el cual el 90% de los espermatozoides activados dejó de moverse). Esta medición fue realizada siempre por el mismo observador.

Viabilidad: Cinco μl de Eosina-Nigrosina fueron mezclados con 1 μl de semen diluido 1:1000, en solución isosmótica para determinar el porcentaje de viabilidad.

Morfología y concentración: Se diluyó el semen 1:500 en solución de Coffin y 1 μl de esta dilución se fijó en metanol por 10 minutos sobre un portaobjetos, se secó al aire, se coloreó con Giemsa durante 20 minutos, se lavó con agua y se observó al microscopio a 1000X. Con la misma dilución anterior se hizo el recuento en cámara de Newbauer

Variables medioambientales: De la base de datos del IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales) se tomó la información diaria de la precipitación (mm) y brillo solar (horas/día), durante el periodo del estudio. La suma de los valores de precipitación y de horas de brillo solar de los 15 días previos a la toma de la muestra se utilizó para el análisis de su efecto sobre el cuadro espermático, bajo el supuesto de que es el efecto acumulado de estas variables es el responsable de la variación de los datos a analizar.

Análisis estadístico: Para cada variable se efectuó un análisis exploratorio descriptivo unidimensional en el tiempo. Se usó la prueba de Spearman para determinar la relación entre variables, usando el SAS System 8V.

Resultados:

De los 10 animales iniciales, 7 sobrevivieron hasta la finalización del ensayo. Dos machos perdieron el chip transcurridos 7 meses de estudio y el otro a los 11 meses. De 200 muestras posibles se obtuvieron 80, en 96 oportunidades no hubo producción de semen y las 24 restantes correspondieron a los machos que no concluyeron el experimento. De las 80 muestras obtenidas, el 90% fue producido por 7 de los 10 machos, lo que muestra que durante 10 meses del año se encuentran machos que están produciendo semen (Fig. 1). Se observó una tendencia de todos los machos a producir

semen a final y principio de año (nov-mar). El 20% de los animales sólo produjo semen al principio del estudio, lo que correspondió con el inicio de año. Otro 20% de los machos, produjo semen sólo al principio y final del año. Un 30% produjo semen a comienzo, mediados y finales del año y el otro 30% restante produjo semen constantemente casi todo el año en mas del 70% de las fechas donde hubo producción.

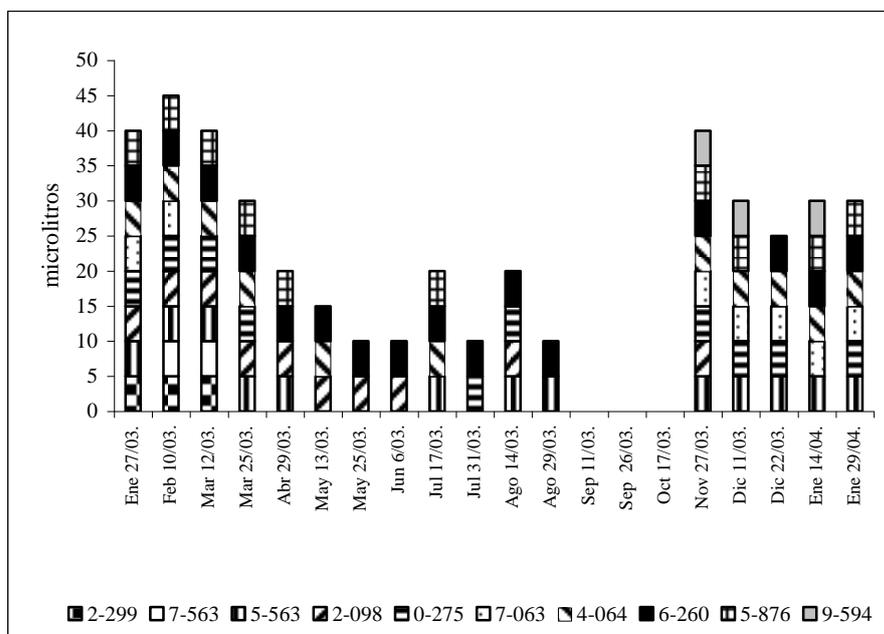


Fig. 1. Producción seminal individual en machos de *B.hemmi*.

Fig. 1. Individual seminal production from *B. hemmi* individuals

Características seminales como el color (blanco cremoso), la osmolalidad del plasma (299.9 ± 5.2 mOsm/kg) y el pH (7.5 ± 0.5) son similares durante todo el año (en el cuadro 1 se presentan las características seminales a lo largo del año de estudio). Cuando los machos produjeron semen el rango osciló entre 0.8 y 5.0×10^{10} espermatozoides/ml y el volumen entre 3 y 2200 μ l, siendo los meses en que produjeron mayor volumen: noviembre, enero, marzo, mayo y diciembre. El porcentaje de espermatozoides móviles estuvo entre 5 y 90 %, con un tiempo de activación de 62 ± 15.8 s. Se encontró una relación directa entre el volumen y el porcentaje de movilidad (Spearman $p < 0.05$) y el volumen con el tiempo de activación (Spearman $p < 0.05$). La viabilidad osciló entre el 12 y el 100 %. La morfología de la cabeza es rhabdiformes en un 60 a 100 % de los espermatozoides.

CUADRO 1Características seminales de *B. henni* a lo largo de un año de estudio.**TABLE 1**Seminal characteristics of *B. henni*, along the year of study

Fecha	Primer semestre							
	Ene	Feb	Mar	Mar	Abr	May	May	Jun
	27/03	10/03	12/03	25/03	29/03	13/03	25/03	6/03
N	8/10	9/10	5/10	6/10	4/10	3/10	2/10	2/10
T Ac. (seg.)	40-114	38-78	38-66	53-66	43-69	46-62	40-53	64-79
Movilidad (%)	30-85	10-80	30-50	10-60	10-40	50-90	60-60	5-30
Volumen (µl)	3-200	20-150	50-500	100-550	10-90	50-900	100-480	50-250
Concentración (esp X 10 ¹⁰ /ml)	1,7-2,6	1,9-3,3	1,9-35	1,8-3	1,6-2,6	1,5-2,9	2,3-3,3	1,6-2,9
Viabilidad (%)	35-95	32-85	23-98	15-98	27-84	47-58	25-62	33-78
Rabhdiform (%)	58-96	0	84-96	96-100	69-95	62-87	98-99	80-81
	Segundo semestre							
Fecha	Jul	Jul	Ago	Nov	Dic	Dic	Ene	Ene
	17/03	31/03	14/03	27/03	11/03	22/03	14/04	29/04
N	4/10	2/10	4/8	8/8	6/7	5/7	6/7	6/7
T.Ac..(seg)	52-60	60-70	45-55	55-77	56-89	50-73	48-120	58-91
Movilidad (%)	10-50	46-65	50-80	40-90	10-40	5-50	5-50	20-60
Volumen (µl)	20-50	30-110	40-250	25-2200	50-450	10-350	50-600	200-800
Concentración (esp X 10 ¹⁰ /ml)	1,8-3	2,5-2,6	0,8-2,5	1,8-4,2	1,2-1,9	0,8-2,6	0,9-2,7	2,7-5
Viabilidad (%)	26-47	58-69	38-59	78-95	80-95	77-96	12-100	65-100
Rabhdiform	79-98	72-79	89-99	93-100	97-99	94-100	96-100	84-99

(%)

El balance iónico entre los cuatro iones estudiados mostró la misma proporcionalidad a lo largo del año. El sodio es el mayor componente, seguido por el potasio 10 veces menor y magnesio y calcio 100 veces menores; con promedios de Na^+ fue de 255 ± 101 mM, K^+ 27.8 ± 18 , Ca^{++} 2.3 ± 0.9 , Mg^{++} 5.2 ± 2.1 . La concentración iónica del Na^+ presentó diferencias significativas con el K^+ (Spearman $p < 0.05$), el Ca^{++} y el Mg^{++} (Spearman $p < 0.0001$). La concentración iónica del K también presentó diferencias con el el Ca^{++} y el Mg^{++} (Spearman $p < 0.0001$), finalmente el Ca^{++} con el Mg^{++} (Spearman $p < 0.000$), las concentraciones mensuales de los diferentes iones se muestran en la figura figura 2). No se encontró relación entre el balance iónico y los parámetros seminales.

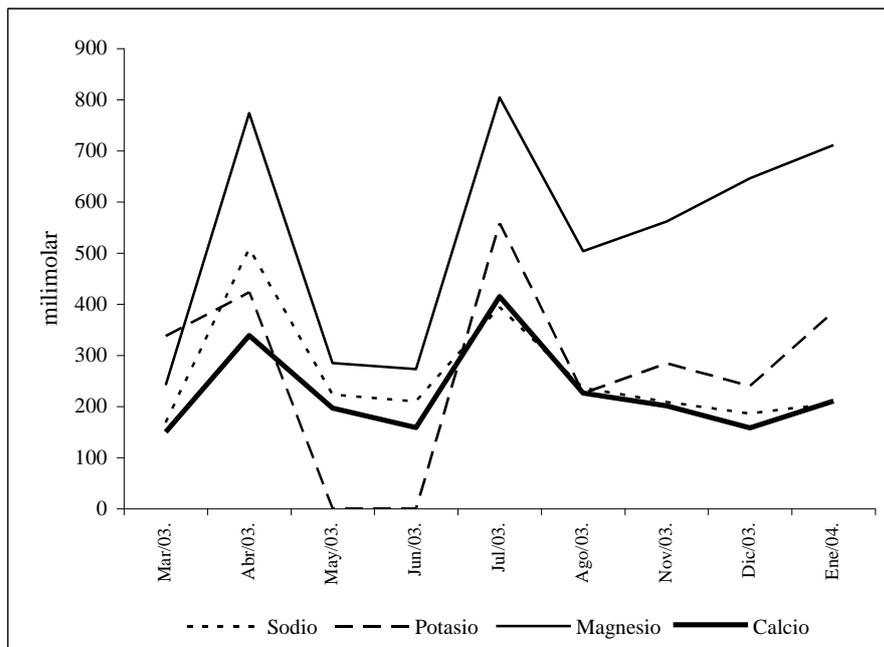


Fig. 2. Comportamiento del balance iónico a lo largo de un año. Se transformaron los datos usando factores para ajustarlos a una misma escala ($\text{K}^+ \times 10$, Ca^{++} y $\text{Mg}^{++} \times 100$)

Fig. 2. Pattern of the ionic balance in seminal plasma of *B. hemi* along the year under study. Data were transformed using factors to keep the same scale: ($\text{K}^+ \times 10$, Ca^{++} y $\text{Mg}^{++} \times 100$)

El brillo solar afectó positivamente el volumen (Spearman $p < 0.05$) (Fig. 3) y la concentración espermática (Spearman $p < 0.05$) La precipitación mostró una relación inversa con el volumen (Spearman $p < 0.0001$) (Fig. 4). y la viabilidad (Spearman $p < 0.005$).

Discusión

Los resultados del presente estudio demuestran que en cautiverio se pueden encontrar machos maduros 10 meses del año, al contrario de la *B. siebenthalae* que es estacional,

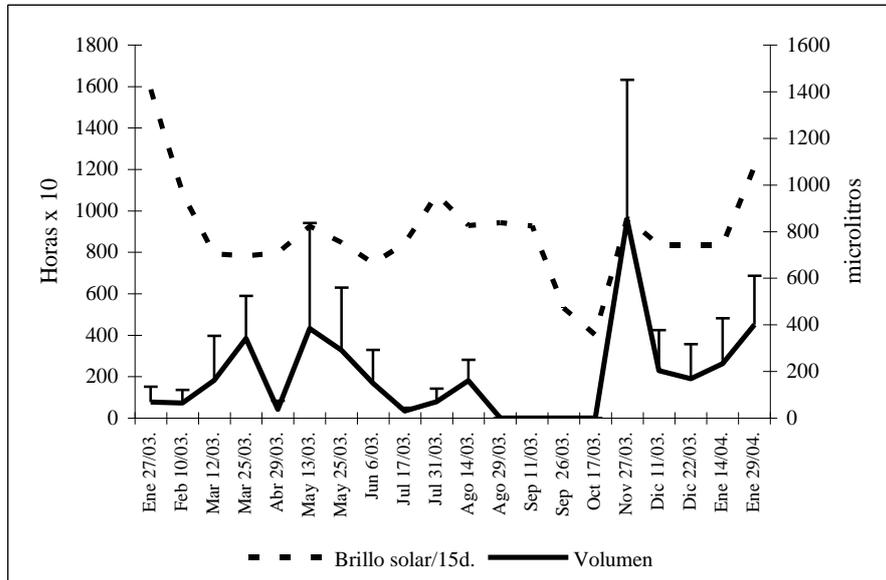


Fig. 3. Producción seminal de *B.henni* durante un periodo de un año vs brillo solar. El brillo solar se ajusto a la escala del volumen multiplicando por un factor de10.

Fig. 3. Semen production in *B. henni* along one year and association with sun shine. This last datum was adjusted to the volume scale by multiplying by 10.

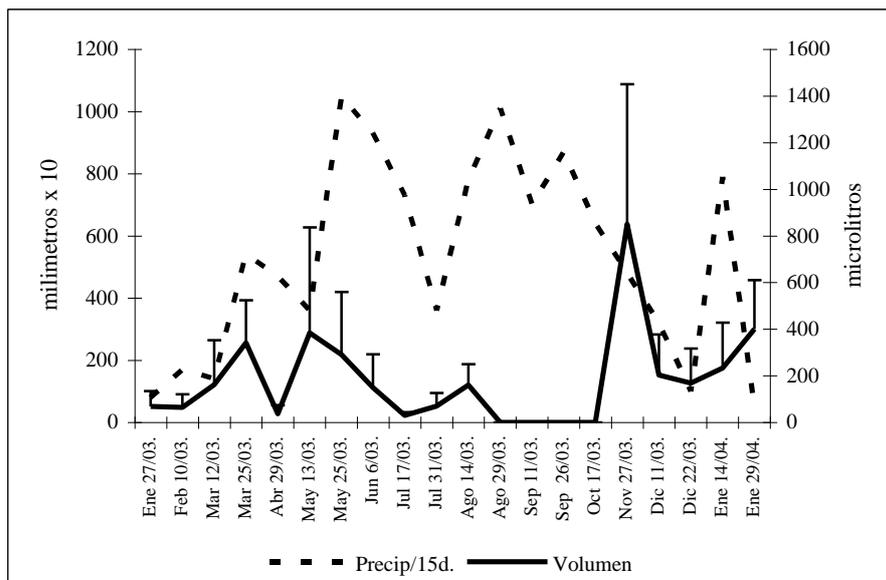


Fig. 4. Producción seminal de *B.henni* durante un periodo de un año vs precipitación. La precipitación se ajusto a la escala del volumen multiplicando por un factor de 10.

Fig.4. Semen production in *B. henni* along one year and association with pluviocity. This last datum was adjusted to the volume scale by multiplying by 10.

limitada a 4 meses (febrero- mayo). El volumen de semen de *B. henni* es similar al de *B. siebenthalae* (1.82 ± 0.25 ml) reportado por Cruz 2001. La concentración espermática de *B. henni* dobla la concentración de *B. siebenthalae* ($13.9 \pm 4 \times 10^9$ esp./ml) reportada por Cruz 2001 y es inferior a la reportada por Fresneda *et al.* 2004 en la nativa *Piaractus brachypomus* ($3.0 \pm 1.1 \times 10^{10}$ esp./ml).

El número de espermias móviles en *B. siebenthalae* es mayor y con menor desviación (82 ± 9 %) (Cruz 2001) que en *B. henni*, (40 ± 23 %); otros characidos presentan mayor movilidad: *Brycon insignis*, 90.1 a 91.7% (Andrade-Talmelli *et al.* 2001), *Oncorhynchus mykiss*, 100% (Geffen y Evans 2000) y *Plecoglossus altivelis*, 89.4+/-2.1% (Ohta *et al.* 2001). Es posible que la variación en los porcentajes de movilidad encontrados en los machos de *B. henni* en cautiverio, se deba a factores que han reportado autores como Rurangwa *et al.* (2000), como son el estado nutricional, la calidad del agua y el estrés. El tiempo de activación para *B. henni* (35-62 s) fue similar al de *B. siebenthalae* (41.4 ± 7 s) (Cruz 2001) y con un rango mas estrecho del reportado para *Piaractus brachypomus* (50-257 s) (Caleño 1995).

En el Cuadro 2 se comparan los hallazgos del presente trabajo con la concentración y proporción iónica de otros teleósteos, demostrando la diferencia en concentraciones y proporciones.. Según Kraznai *et al.* 2000 los iones juegan un papel importante en el porcentaje de espermatozoides que inician la movilidad, sin embargo no se pudo demostrar estadísticamente esta asociación, ya que no hubo efecto de ninguno de los iones, ni de su relación con el porcentaje de movilidad, ni con el tiempo que dura ésta. El cambio en la concentración iónica que se da en los meses de abril y julio no corresponde ni con cambios climáticos, ni con cambios en las características espermáticas. Se propone estudiar las características fisicoquímicas del agua durante un periodo largo de tiempo.

Cuadro 2. Comparación de la composición iónica del plasma seminal entre diferentes especies

Table 2. Comparison of ionic composition of seminal plasma among different species

Composición iónica del plasma seminal en
mM

Especie	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Referencia
<i>Plecoglossus altivelis</i>	130	11.4	0.6	2.3	Ohta <i>et al.</i> 2001
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	122,2	30,4	1,10	0,85	Glogowski <i>et al.</i> 2000
<i>Cyprinus carpio</i>	55	82.4	2	0.8	Ohta y Tsuji 1998
<i>Brycon henni</i>	255	27.8	2.03	5.1	

La osmolalidad permanece constante durante todo el tiempo en que hubo muestra, esto quiere decir que el epitelio del conducto espermático principal es capaz de regularla bajo cualquier condición ambiental. Al igual que Morisawa (1985) reportó para otros teleosteos, podemos decir que en esta especie la isosmolalidad es la responsable de que los espermias en el plasma seminal estén quiescentes, asegurando el potencial de movilidad para la fertilización del oocito.

En el trópico se han reportado especies que desovan en épocas de lluvias (*P. brachypomus*, *B. siebenthalae*, *Brycon bicolor*, *Brycon whitei* y *Brycon moorei sinuensis* (Taphorn 1992, Otero *et al.* 1986) y especies que se reproducen en épocas secas (Carrillo y Rodríguez 2001). En carácidos que se reproducen en épocas de lluvias, la producción de melatonina está inhibida por que no hay estímulos lumínicos que induzcan su síntesis, por lo tanto, no hay inhibición del funcionamiento del eje hipotálamo hipófisis (Zanuy y Carrillo 1997). En el caso de *B. henni* (Perdomo 1978) y de *B. insigni* (Andrade *et al.* 2001), especies desovadoras durante la estación seca

(diciembre y febrero) se podría pensar en dos hipótesis: la primera es que haya un efecto inverso de la melatonina sobre el eje hipotálamo hipófisis, favoreciendo la reproducción en vez de inhibirla y la segunda estaría asociada a las características físico-químicas del agua dada por la estación seca. Sin embargo en los machos de *B. henni* la luminosidad (Fig. 3) no es definitiva para la producción de semen, ya que aunque es marcado el aumento en el volumen en los meses de mayor brillo solar, se encuentra semen durante 10 meses del año. Al contrario de lo reportado por Builes y Uran 1974 y Florez 1999, las lluvias afectaron negativamente el volumen del esperma, tanto que ningún macho produjo semen en los meses de septiembre y octubre cuando la precipitación fue muy alta (Fig. 4). Es posible que la calidad del agua con un aumento de la turbidez y disminución del oxígeno sea la causa de la aspermia en dos meses y la baja viabilidad asociada con la pluviosidad.

Proponemos que en *B. henni*, el comportamiento reproductivo de los machos en cautiverio, podría obedecer más a cambios en las características físico-químicas del agua asociadas a la estación climática que, a efectos en la producción de melatonina, apoyados en que para la reproducción en el medio silvestre, esta especie requiere aguas tranquilas, claras y poco profundas (Comunicación personal, pescadores San Jerónimo).

Agradecimientos:

A Colciencias proyecto: 1115-09-12308, Universidad de Antioquia y P C J I por la cofinanciación del proyecto.

Referencias:

Andrade-Talmelli, E.F., E.T. Kavamoto & N. Fenerich-Verani. 20001. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. Bolet Inst Pesca, São Paulo, 27(2): 149 – 154.

Blázquez, M., S. Zanuy, M. Carrillo & F. Piferrer. 1998. Effects of rearing temperatures on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J. Exp. Zool. 281: 207–216.

Baroiller, J.F., Y. Guiguen & A. Fostier. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 910–931.

Builes, J & A. Uran. 1974 Estudio del ciclo sexual de la Sabaleta (*B.henni*) su comportamiento y fecundacion artificial. *Rev Act Biol.* 3: 7-7.

Caleño O. 1995. Pruebas de fertilidad con semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*, Cuvier, 1818) criopreservado mediante dos extendidos diferentes. Tesis de Biólogo Marino, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia. 131p.

Carrillo, M & J. Rodríguez. 2001. Bases fisiológicas de la reproducción de peces tropicales p. 189-216. *In* H. Rodriguez, P.V. Daza & M. Carrillo (eds.). *Fundamentos de Acuicultura Continental*. Grafimpresos Quintero, Bogotá, Colombia.

Cruz P. 2001. VIII Jornada de Acuicultura. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. 74 p.

Devlin R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208: 191-364.

Florez, P. 1999. Estudio biológico-pesquero preliminar de tres especies ícticas del Alto Río Cauca Embalse de Salvajina. *Cespedecia*. 23: 47-60.

Fresneda A., G. Lenis, E. Agudelo & M. Olivera-Angel. 2004. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev Col Cienc Pec.* Vol 17 (s): 46-52.

Geffen A.J. & J.P. Evans. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 182: 61–72.

Glogowski J., M. Kwasnik, K. Dabrowski, K. Goryczjo, S. Dobosz, H. Kuzmininski & A. Ciereszko. 2000. Characterization of Rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquac Res.* 31: 289-296.

Iigo, M. & K. Aida. 1995. Effects of season, temperature and photoperiod on plasma melatonin rhythms in the goldfish (*Carassius auratus*). *J.Pineal Res.* 18: 62-68.

Krasznai, Z., T. Marian, H. Izumi, S. Damjanovich, L. Balkay, L. Tron & M. Morisawa. 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *PNAS.* 97: 2052-2057.

Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2: 605-615.

Nash J.P. 1999. Seasonal reproduction in fish, Vol. 4, p 329-340. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds), *Encyclopaedia of Reproduction*. Academic, Nueva York.

Ohta H., T. Unuma, M. Tsuji, M. Yoshioka & M. Kashiwagi. 2001 Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. *Aquac Res.* 32. 385-392.

Ohta H. & M. Tsuji. 1998. Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during *in vitro* storage. *Fish Sci.* 64 547-552

Otero, F., J. Solano, A. Gonzalez & F. Zapata. 1986. Migraciones de peces del río Sinú, Proyecto hidroeléctrico alto Sinú. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 126p .

Paniagua, R., B. Fraiie, & J. Sáez. 1990. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Hist Histopat.* 5: 365-378.

Perdomo, J. 1978. La sabaleta (*Brycon henni*): observaciones bioecológicas y su importancia como especie de cultivo. Rev Div Pesq. 11(1) : 1-46.

Rurangwa, E., D. Kime, F. Ollevier & J. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234: 1-28.

Strüssmann, C.A., S. Moriyama, E.F. Hanke, J.C.C. Cota & F. Takashima. 1996. Evidence of thermo labile sex differentiation in pejerrey. J. Fish Biol. 48: 643–651.

Taphorn, D. 1992. The Characiforms fishes of the Apure river drainage, Venezuela. Biollania, Venezuela. 537p.

Zanuy, S. & M. Carrillo. 1997. VI Congreso Nacional de Acuicultura. Universidad de Murcia (U.M), Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (C.M.A.A.A.), Centro Oceanográfico de Murcia del Instituto Español de Oceanografía (I.E.O.), Ayuntamiento de Cartagena. Cartagena, Murcia. 1-7p.

ANEXO 6

Artículo para someter a revista *Aquatic*.

Modelo de activación de la movilidad espermática en peces dulceacuicolas.

Tabares C. J¹ y Olivera-Angel M¹

¹Reproducción-Fisiología y Biotecnología, ²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Carrera 75 N° 65–87, AA: 1226, Medellín – Colombia; Tel.: +574 – 4259149. Fax: +574 – 4259149. molivera@carios.udea.edu.co

Resumen

En los peces de agua dulce, los espermatozoides adquieren la capacidad de moverse progresivamente en un medio acuoso hiposmótico a través de su pasaje por el conducto espermático principal en el testículo; mientras eso sucede, se encuentran quiescentes en el plasma seminal, debido a factores inhibitorios de la movilidad como la isosmolalidad, el balance iónico y el pH. Varias estructuras como la membrana plasmática, la pieza media y el flagelo deben coordinar su funcionamiento para alcanzar la movilidad una vez son liberados al agua debido al choque hiposmótico, factor que ha sido considerado como el gatillo de la cascada de señalización en este evento. Se propone entonces, un modelo de activación espermática a través de canales iónicos que regulan el flujo de iones de un lado al otro. Canales como: de poro abierto y los de compuerta, que pueden ser: canales activados por estiramiento, canales dependientes de voltaje y canales de ligando. Otras estructuras como los complejos antiporte y cotrasporte, también participan en la regulación iónica. En la pieza media de los espermatozoides de teleósteos de agua dulce se encuentran pocas mitocondrias, importantes porque producen el ATP necesario para el movimiento del flagelo, y regulan iones como Ca²⁺ y K⁺. Por último tenemos el flagelo poseedor del complejo axonema, el cual está constituido por nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central responsables

del movimiento del espermatozoide. El objetivo de este Artículo es plantear un modelo fisiológico para la activación espermática en peces de agua dulce.

Introducción

Los espermatozoides de peces cuando son liberados al agua cuentan con un breve periodo de activación (limitado a pocos segundos en varias especies) expresada en porcentaje de espermatozoides que se mueven, tiempo y velocidad de desplazamiento progresivo para lograr la fertilización. Los espermatozoides de teleósteos no poseen acrosoma, ya que entran a través del micrópilo de la ova (Andrade et al, 2001; Grassiotto et al, 2001). Una vez liberadas las ovas en el agua, se hidratan y cierran el micrópilo, por lo cual los espermatozoides espermiados deben activarse y desplazarse en el agua para lograr la fertilización antes del cierre del micrópilo; es posible que esto se hayan dado evolutivamente como forma de selección de los espermatozoides con mejor competencia para la fertilización (Cosson et al 1999), de allí la importancia de comprender los procesos fisiológicos de la activación del espermatozoide en los peces.

Adquición de la capacidad para la movilidad espermática

Los espermatozoides de los peces sólo son móviles cuando salen al agua siendo inmóviles en el testículo y en muchas especies también en el plasma seminal (Müller et al, 1994). Mochida et al 1999, sugieren que los espermatozoides de peces dulceacuicolas, maduran y adquieren capacidad de activación durante el pasaje a través del conducto espermático cuyo fluido (plasma seminal) es de pH básico y rico en bicarbonato (HCO_3^-). Por otra parte Ohta et al 1998, afirma que el movimiento transmembranal del HCO_3^- sería el responsable del aumento del pH intracelular (pHi) y podría regular la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), el cual favorece la activación de la dinein-ATPasa importante para iniciar la movilidad. Posiblemente las células epiteliales del conducto espermático ejercen el control sobre la capacidad de adquirir movilidad del espermatozoide, regulando el pH del semen por secreciones ácido/bases (Ingerman et al 2002), esto se comprobó, tras el intento fallido de activar

espermatozoides de ayu (*Plecoglossus altivelis*) obtenidos directamente de tejido testicular, donde los valores de pH y HCO_3^- son menores que en el conducto espermático (Ohta et al 2001). Los cambios en las concentraciones extracelulares de K^+ , Na^+ , HCO_3^- , y/o iones hidrógeno entre el plasma seminal y el medio acuoso, sugieren que el balance iónico también está involucrado en la adquisición de la capacidad para la activación de la movilidad (Ohta et al 2001).

Plasma seminal.

Las características de pH, balance iónico y osmolaridad que mantienen los espermatozoides inmóviles en el plasma seminal varían entre las especies (tabla 1)

Tabla 1. Composición del plasma seminal en diferentes especies

Especie	pH	Osmolaridad (mOsm/kg)	Composición iónica del plasma seminal en mM				Referencia
			Na^+	K^+	Ca^{++}	Mg^{++}	
<i>Plecoglossus altivelis</i> (Ayu)			130	11,4	0,6	2,3	Ohta et al., 2001
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoiris)			122,2	30,4	1,10	0,85	Glogowski et al., 2000
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoiris)	8 ± 0,2						Lahnsteiner et al., 1998
<i>Salvelinus fontinalis</i> (Trucha de arroyo)		300 ± 11	119 ± 13	25,1 ± 6,1			Marshall 1986
<i>Cyprinus Carpio</i> (Carpa común)			55	82,4	2	0,8	Ohta y Tsuji 1998
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa común)	7,05 ± 0,11						Krasznai et al., 1995
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa común)	8,28 ± 0,12	305	63 ± 10	87 ± 16	0,4 ± 0,09	1,2 ± 0,20	Marian Terez et al., 1997
<i>Oreochromis mossambicus</i> (Tilapia)		290 ± 24	142,3 ± 21,3	50,7 ± 7	2 ± 0,77	0,18 ± 0,17	Morita et al., 2003
<i>Cottus hangiongensis</i> (Pez remo)		317 ± 8,9					Ohta y Shinriki 1998
<i>Morone saxatilis</i> (Perca rayada)	7,6 ± 0,04		115 ± 7	56,1 ± 5,6	0,5 ± 0,2		He et al., 2004
<i>Brycon henni</i> (Sabaleta)	7,45 ± 0,49	299,9 - 5,2	169 - 508*	22,56 - 55,8*	1,5 - 4,15*	2,42 - 7,74*	Tabares et al., 2005

* Rango de valores a lo largo de un año de estudio.

Inhibición, canales iónicos, iones y activación

Las principales estructuras involucradas en la movilidad espermática son: la membrana plasmática, que regula el paso de iones entre el citosol y el medio externo (Darszon et al 1999; Cosson 1999), las mitocondrias que regulan el balance de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ intracelular (Garlid y Paucek 2003) y producen el ATP necesario para el movimiento del complejo axonema (Lahnsteiner et al 1998; 1999) y el flagelo que es la estructura encargada de moverse en batido y serpenteo (Cosson et al 2000). En el momento de la espermiación, el semen de teleosteos es diluido en el agua donde enfrentan diferentes factores como el choque hiposmótico (Krasznai et al, 1995), el cambio de balance iónico (Márián et al, 1997) y el pH (Ohta et al 1998), desencadenándose una serie de eventos que conducen al cambio de potencial y la activación (Cosson et al, 1999; Márián et al, 1993). Los canales iónicos presentes en la membrana son los responsables de regular el flujo de iones de un lado al otro, dentro de estos canales encontramos los de poro abierto que funcionan a favor de gradiente (Felix et al, 2004) y los de compuerta, los cuales a su vez se clasifican en canales activados mecánicamente, que se abren cuando la membrana plasmática se estira por turgencia (Cosson et al 1999; Krasznai et al, 2003); canales dependientes de voltaje que se activan con una diferencia o cambio de potencial de membrana (Krasznai et al, 2000; Felix et al, 2004) y canales de ligando, donde proteínas como la calmodulina, se unen a su receptor y provocan la apertura del canal (Suarez y Ho 2003). Además, también están los intercambiadores ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) donde se aprovecha la energía generada por el paso de un ion a favor de gradiente para el paso de otro ion en sentido contrario (Vines et al, 2002). De esta forma, el balance iónico está determinado por la funcionalidad de los canales de membrana y el flujo de iones a través de estos, se ha encontrado que el K^+ y el Ca^{2+} son los iones más importantes en el proceso de activación de la movilidad de los espermatozoides de peces de agua dulce (Cosson et al 1999). El mecanismo de regulación iónica está dado por la interacción entre osmolaridad, potencial de membrana y apertura de canales, así como por el CO_2 disuelto en equilibrio con el NaHCO_3^- (Cosson et al 1999). El pH_i cambia con el flujo de iones a través de la membrana, generando un medio adecuado para la interacción de diferentes compuestos involucrados con la activación (Sierra y Olivera, 2000).

Modelo de activación

Cuando los espermatozoides están inmóviles en el plasma seminal, la membrana plasmática se encuentra en reposo con un potencial de -2.6 mV, los canales de compuerta se encuentran inactivos y los iones potasio y sodio tienden a mantener un equilibrio a nivel intra y extra celular. (Krasznai et al 2003).

Partiendo de este estado de quiescencia del espermatozoide, el modelo de activación propuesto comprende las siguientes etapas:

Choque hiposmótico: Una vez, los espermatozoides salen al medio acuoso, sufren un choque hiposmótico, y se sucede una cascada de eventos que conducen al inicio de la movilidad espermática (Fig.1), así, la diferencia de osmolalidad entre el interior y exterior celular, provoca la entrada de agua al interior del espermatozoide a través de las acuaporinas (canales especializados en el transporte de agua a través de la membrana) (Yool y Stamer 2004), esto ocasiona un cambio en la arquitectura de la membrana (turgencia) lo que activa los canales de estiramiento de K^+ (Krasznai et al, 2003) y por consiguiente la salida de este al medio extracelular tratando de mantenerse en equilibrio a ambos lados de la membrana. Por otro lado el choque hiposmótico diluye los iones extracelulares.

Diferencia y cambio de potencial de membrana: La membrana espermática en condiciones isosmóticas tiene un potencial de -2.6 (Krasznai et al, 2000), cuando el semen es diluido en medio hiposmótico, los iones externos son lavados generando una diferencia de potencial lo cual activa los canales de K^+ dependientes de voltaje, conllevando a la salida de K al medio extracelular y ocasionando la hiperpolarización de la membrana, hasta -29 mV (Krasznai et al, 2003). La hiperpolarización de membrana activa los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, entra el Ca^{2+} a la célula, se une a proteínas como la Calmodulina la cual se activa y sirve de ligando para la activación del antiporter Na^+/Ca^{2+} (Vines et al, 2002) y para la apertura de los canales de Ca^{2+} de las mitocondrias (Kaczmarek y Jonas 2004).

Regulación mitocondrial: las mitocondrias son escasas y se encuentran en la parte caudal de la cabeza (Manssur et al 2002), regulan el balance iónico de K, Ca y Mg (Garlid y Paucek 2003) y son las encargadas de realizar el metabolismo de glucosa para producción de ATP (Lahnsteiner et al 1999; Manssur et al 2003), el cual proporcionará la energía para el movimiento del flagelo (Cosson et al, 2000). El incremento de Ca^{2+} intracelular en los primeros segundos es de dos tercios, ya sea de origen externo o a partir de las reservas mitocondriales, constituyendo la señal para la iniciación de la movilidad del flagelo (Krasznai et al, 2000). El factor limitante para mantener la movilidad es el ATP, producido por fosforilación oxidativa (Lahnsteiner et al 1999), a partir de precursores producto de la glucólisis aeróbica y el ciclo del ácido tricarboxílico (Lahnsteiner et al 1998; 1999). La señal para el inicio de la cadena respiratoria sería dada por cofactores como Calcio y Magnesio (Garlid 1994). En la mayoría de peces la movilidad termina en un corto tiempo probablemente porque la actividad metabólica de la mitocondria genera desequilibrio en sus propias condiciones óptimas de metabolismo y funcionalidad, lo cual es reversible, ya que al adicionar precursores como ATP o piruvato en soluciones iónicas la movilidad se puede prolongar (Lahnsteiner et al 1999) o reactivar (Linhart 2002).

Función flagelar: El Ca^{2+} interviene en la activación de la adenil ciclasa (AC), la cual genera la producción de AMPc que activa quinazas para la fosforilación de proteínas importante en la funcionalidad del complejo axonema dentro del flagelo. El complejo axonema está constituido por nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central, cuyo funcionamiento depende de la dineína-ATPasa, la cual hidroliza el ATP producido en la mitocondria, y éste se asocia al Mg^{2+} que actúa como cofactor; así, la energía liberada de esta reacción, favorece el deslizamiento de los brazos de dineína del microtúbulo B, sobre la tubulina del microtúbulo A del par contiguo, generándose una onda en los nueve pares de microtúbulos que provoca el movimiento en serpiente del flagelo y a su vez el par central genera el movimiento en batido del espermatozoide (Eddy y O'Brien, 1994; Inaba et al, 1998; Cosson et al, 1999), procurando un desplazamiento progresivo y rectilíneo cuyo objetivo es encontrar el micropilo.

Conclusiones

El movimiento flagelar es el resultado final de una compleja red de interacciones y reacciones celulares ante cambios de su medio ambiente interno y externo, evidenciándose la necesidad de nuevas investigaciones que conduzcan a una comprensión mas clara del proceso, en un marco global.

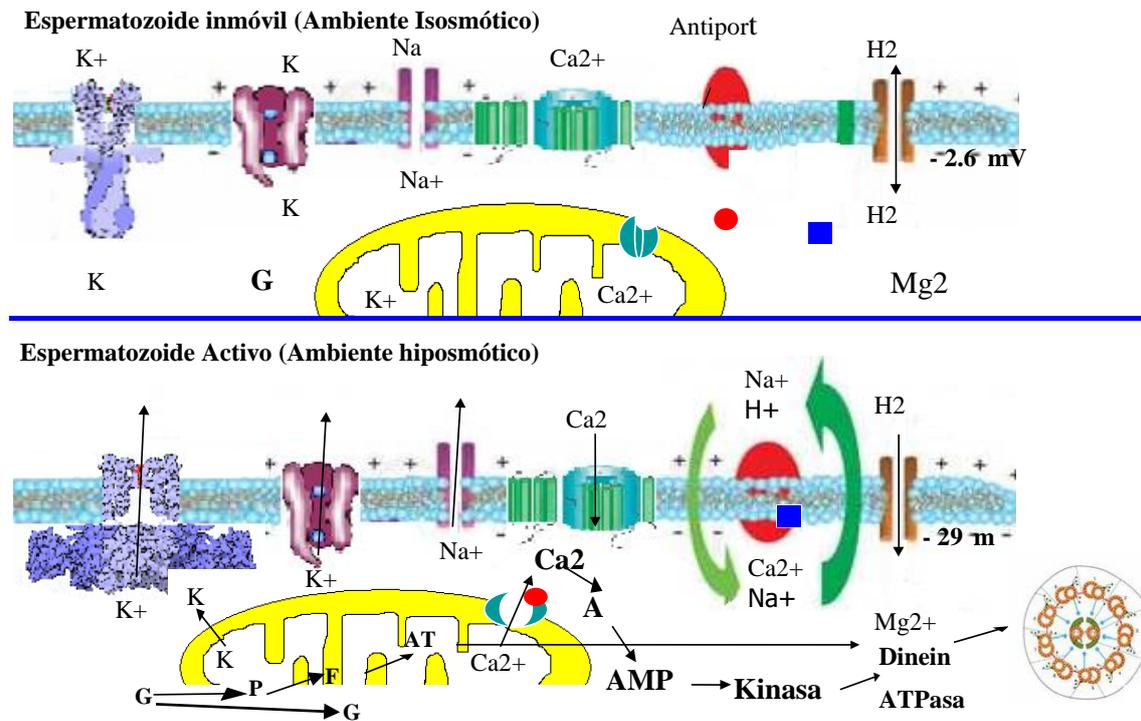


Fig. 1: Modelo de activación espermática en peces de agua dulce. G: glucosa, GA: glucólisis anaeróbica. FO: fosforilación oxidativa. AC: Adenil ciclasa.

Adaptado y modificado de: www.sigmaaldrich.com, www.marcobueno.net, www.chemistry.emory.edu,

Bibliografía

1. Andrade RF, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue & Cell*. 33(5):524-532.

2. Cosson J., Linhart O. Mims S. D., Shelton W. L., Rodina M. 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *Journal of fish biology*. 56: 1348-1367.
3. Cosson Jacky, Billard Roland, Cibert Christian, Dréanno Catherine. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm, in: *The Male Gamete*, Edited by Claude Gagnon. Pag: 161-186.
4. Darszon Alberto, Labarca Pedro, Nishigaki Takuya, Espinosa Felipe. 1999. Ion Channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews* 79 (3): 481-510.
5. Eddy E. M., O'Brien Deborah A. 1994. The espermatozoon, in: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition, Edited by E. Knobil and J. D. Neill, Raven Press, Ltd., New York. Pag: 29- 77.
6. Emri Miklós, Balkay László, Krasznai Zoltán, Trón Lajos, Márián Teréz. 1998. Wide applicability of a flow cytometric assay to measure absolute absolute membrane potentials on the millivolt scale. *Eur. Biophys J.* 28: 78-83.
7. Filix R., López-González I., Muñoz-Garay C y Darszon A. 2004. Ion Channels and sperm function. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 32: 407-431.
8. Garlid KD, Paucek P. 2003. Mitochondrial potassium transport: The K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta*. 1606(1-3): 23-41.
9. Grassiotto Q, Negräu JN, Carvalho ED, Foresti F. 2001. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) *J Fish Biol* ;59:1494-1502.
10. Glogowski J., M. Kwasnik, K. Dabrowski, K. Goryczjo, S. Dobosz, H. Kuzminski & A. Ciereszko. 2000. Characterization of Rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Research*. 31: 289-296.
11. He S, Jenkins-Feeran K, Curry Woods III L. 2004. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. *Theriogenology*. 61: 1487-1498.
12. Inaba Kazuo, Morisawa Sachiko, Morisawa Masaaki. 1998. Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of AMPc-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain. *Journal of cell science*. 111: 1105-1115.

13. Ingerman RL, Holcomb M, Robinson ML, Cloud JG. 2002. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *J Exp Biol.* 205: 2885-2890.
14. Kaczmarek L.K y Jonas E.A. Ion channels on intracellular organelles. *Advances in Molecular and Cell Biology.* 32 (2004) 433-458.
15. Krasznai Zoltán, Márián Teréz, Balkay László y Gáspár Rezsó. 1995. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Aquaculture.* 129: 123-128.
16. Krasznai Zoltán, Márián Teréz, Izumo Hiroko, Damjanovich Sándor, Balkay László, Trón Lajos, Morisawa Masaaki. 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels, leading to Ca influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *PNAS.* 97 (5): 2052- 2057.
17. Krasznai Zoltán, Masaaki Morisawa, Sachiko Morisawa, Zoárd Tíbor Krasznai, Lajos Trón, Rezsó Gáspár y Teréz Márián. 2003. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquat. Living Resour.* 16: 445-449.
18. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture.* 163: 163-181.
19. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T. 1999. Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *J Exp Zool.* 284: 454-465.
20. Mansour N, Lahnsteiner F and Patzner R.A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. *Journal Fish Biology* (2002) 60, 545-560.
21. Mansour N, Lahnsteiner F and Berger B. 2003. Metabolism of intratesticular spermatozoa of tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.* 135: 285-296.
22. Linhart O., Cosson J., Mims S. D., Shelton W. L., Rodina M. 2002. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction* 124: 713-719.

23. Marshall W. 1986. Sperm duct epithelium of brook trout: Na⁺ transport and seminal plasma composition. *Canadian Journal of Zoology*. 64 (9): 1827-1830
24. Márián Teréz, Krasznai Zoltán, Balkay László, Balázs Margit, Emri Miklós, Bene László, Trón Lajos. 1993. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 41 (2): 291-197.
25. Márián Teréz, Krasznai Zoltán, Balkay László, Emri Miklós, Trón Lajos. 1997. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺ / H⁺ exchanger. *Cytometry*. 27: 374-382.
26. Mochida K, Kondo T, Matsubara T, Adachi S, Yamauchi K. 1999. A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev Growth Differ*. 41:619-627.
27. Morita M, Takemura A, Okuno M. 2003. Requirement of Ca²⁺ on activation of sperm motility in euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. *The Journal of Experimental Biology*. 206:913-921.
28. Müller Karin, Labbé Catherine, Zachowski Alain. 1994. Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrane. *Biochimica et biophysica acta*. 1192: 21-26.
29. Ohta H., Shinriki Y. 1998. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in the river sculpin *Cottus hangiongensis*. *Fish physiology and biochemistry*. 18: 29-35.
30. Ohta H. & M. Tsuji. 1998. Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during *in vitro* storage. *Fisheries Science*. 64: 547-552.
31. Ohta H, Unuma T, Tsuji M, Yoshioka M, Kashiwagi M. 2001. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (osmeridae), spermatozoa. *Aquac Res*. 32: 385-392.
32. Sierra R. A y Olivera–Angel M. 2000. Interacción entre gametos: como lo logra el espermatozoide? *Rev Col Cienc Pec*. 13 (2): 148-155.
33. Suarez S, Ho H. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Dom Anim*. 38: 119-124.

34. Vines C.A., Yoshida K., Griffin F.J., Pillai M.C., Morisawa M., Yanagimachi R y Cherr G.N. 2002. Motility initiation in herring sperm is regulated by reverse sodium-calcium exchange. PNAS. 99 (4): 2026-2031.
35. Yool A.J y Stamer W.D. 2004. Novel roles for aquaporins as gated ion channels. Advances in Molecular and Cell Biology. 32: 351-379.