

1 **Capacidad antioxidante en semen fresco y crioconservado a largo término**
2 **en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)**

3 **Determination of antioxidant capacity in fresh semen and crioconserved**
4 **from red-bellied pacu fish (*Piaractus brachypomus*)**

5 **Determinação da capacidade antioxidante em sêmen fresco e**
6 **crioconservada em pirapitinga (*Piaractus brachypomus*)**

7
8 Andrés E Chacón-Morales¹; Nicolás F León-Roldán²; Roger O Suárez-Martínez³,
9 MV, Esp, MSc; Víctor M Medina-Robles^{4*}, MVZ, MSc

10 ^{1,3} Grupo de Investigación en Manejo y Producción de Especies con Potencial
11 Zootécnico – GRIPEPZ, Programa de Zootecnia, Facultad de Ciencias
12 Agropecuarias, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá, Colombia.

13 ^{2,3,4} Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos
14 Acuáticos - GRITOX, Instituto de Acuicultura de los Llanos – IALL, Facultad de
15 Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos,
16 Villavicencio, Colombia.

17 **RESUMEN**

18 El estrés oxidativo es generado por desequilibrios entre las especies reactivas del
19 oxígeno (EROs) y la actividad antioxidante durante la congelación seminal; afecta
20 estructuralmente las membranas celulares, las enzimas y los ácidos nucleicos del
21 espermatozoide, interrumpiendo procesos fisiológicos como la producción de
22 energía (ATP), que conllevan a una reducción de la movilidad, viabilidad y
23 capacidad fertilizante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad seminal (pH,
24 duración de la movilidad, movilidad, volumen), y capacidad antioxidante (CAntiOX)
25 en semen fresco y semen crioconservado de *Piaractus brachypomus*. Se utilizaron
26 seis machos sexualmente maduros inducidos con 4 mg/kg de extracto hipofisario
27 de carpa (EHC), de los que se colectó semen 18 horas post-inducción. La calidad
28 espermática y CAntiOX en semen fresco fueron evaluada en 4 tiempos diferentes
29 posteriores a la colecta (0, 15, 30 y 60 min.). Luego, el semen fue crioconservado
30 en nitrógeno líquido a -196°C hasta su uso. La calidad espermática y CAntiOX en
31 semen crioconservado fueron evaluadas luego de 24 horas, 1, 6 y 12 meses. La

*km 12 Vía Puerto López, vereda Barcelona. CP 500003. Villavicencio, Colombia
vmmedinarobles@unillanos.edu.co

32 CAntiOX fue cuantificada por medio del test de Capacidad Antioxidante Total,
33 Sigma-Aldrich®; mediante espectrofotometría visible (405 nm); BioRad Model 680
34 microplate reader/ California EEUU). Se evidenciaron variaciones significativas en
35 la movilidad espermática ($P < 0.00567$), duración de la movilidad ($P < 0.037$) y pH
36 ($P < 0.001$) del semen crioconservado en contraste con el control, mientras que
37 CAntiOx no mostró diferencias significativas ($P < 0.690$). Este estudio representa un
38 aporte al conocimiento básico de la crioconservación, para la estandarización de
39 protocolos en especies ícticas nativas.

40

41 **Palabras clave:** *calidad espermática, crioconservación, especies reactivas de*
42 *oxígeno (EROs).*

43

44 **ABSTRACT**

45 Oxidative stress is generated by imbalances between reactive oxygen species
46 (EROs) and antioxidant activity during seminal freezing; structurally affects the cell
47 membranes, enzymes and nucleic acids of the sperm, disrupting physiological
48 processes such as energy production (ATP), which lead to a reduction in mobility,
49 viability and fertilizing capacity. The objective of this work was to evaluate the
50 seminal quality (pH, duration of mobility, mobility, volume), and antioxidant capacity
51 (CAntiOX) in fresh semen and cryopreserved semen of *Piaractus brachypomus*. Six
52 sexually mature males induced with 4 mg/kg of pituitary carp extract (EHC), and
53 semen was collected 18 hours after induction. The sperm quality and CAntiOX in
54 fresh semen were evaluated in 4 different times after the collection (0, 15, 30 and 60
55 min.). Then, the semen was cryopreserved in liquid nitrogen at -196°C until use.
56 Sperm quality and CAntiOX in cryopreserved semen were evaluated after 24 hours,
57 1, 6 and 12 months. CAntiOX was quantified by means of the Total Antioxidant
58 Capacity test, Sigma-Aldrich®; by visible spectrophotometry (405 nm); BioRad
59 Model 680 microplate reader / California USA). Significant variations in sperm
60 motility ($P < 0.00567$), mobility duration ($P < 0.037$) and pH ($P < 0.001$) of cryopreserved
61 semen in contrast to the control were evidenced, while CAntiOx showed no
62 significant differences ($p < 0.690$). This study represents a contribution to the basic

63 knowledge of cryopreservation, for the standardization of protocols in native fish
64 species.

65

66 **Keywords:** *sperm quality, cryopreservation, reactive oxygen species (EROs).*

67

68 **RESUMO**

69 O estresse oxidativo é gerado por desequilíbrios entre espécies reativas de oxigênio
70 (EROs) e atividade antioxidante durante o congelamento seminal; afeta
71 estruturalmente as membranas celulares, enzimas e ácidos nucleicos do esperma,
72 interrompendo processos fisiológicos como a produção de energia (ATP), que levam
73 a uma redução na mobilidade, viabilidade e capacidade de fertilização. O objetivo
74 deste trabalho foi avaliar a qualidade seminal (pH, duração da mobilidade,
75 mobilidade, volume) e capacidade antioxidante (CAntiOX) em sêmen fresco e
76 sêmen criopreservado de *Piaractus brachypomus*. Foram utilizados seis machos
77 sexualmente maduros induzidos com 4 mg/kg de extrato de carpa hipofisária (EHC),
78 dos quais o sêmen foi coletado 18 horas após a indução. A qualidade espermática
79 e CAntiOX no sêmen fresco foram avaliados em 4 momentos diferentes após a
80 coleta (0, 15, 30 e 60 min.). Em seguida, o sêmen foi criopreservado em nitrogênio
81 líquido a -196 ° C até o uso. A qualidade espermática e CAntiOX no sêmen
82 criopreservado foram avaliados após 24 horas, 1, 6 e 12 meses. O CAntiOX foi
83 quantificado por meio do teste de Capacidade Antioxidante Total, Sigma-Aldrich®;
84 por espectrofotometria visível (405 nm); Leitor de microplacas BioRad Modelo 680 /
85 Califórnia EUA). Variações significativas na motilidade espermática ($P < 0.00567$),
86 duração da mobilidade ($P < 0.037$) e pH ($P < 0.001$) do sêmen criopreservado em
87 contraste com o controle foram evidenciadas, enquanto o CAntiOx não mostrou
88 diferenças significativas ($P < 0.690$). Este estudo representa uma contribuição ao
89 conhecimento básico de criopreservação, para padronização de protocolos em
90 espécies nativas de peixes.

91

92 **Palavras-chave:** *qualidade espermática, criopreservação, espécies reativas de*
93 *oxigênio (EROs).*

94 **INTRODUCCIÓN**

95 Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son responsables de causar daño a las
96 membranas de los espermatozoides y de la fragmentación del ADN afectando la
97 fertilidad (Lançon *et al.*, 2015). La capacidad antioxidante ha sido medida en otros
98 teleósteos como la *Perca fluviatilis*, *Salmo trutta* y *Oncorhynchus mykiss*, a partir de
99 los cuales se sabe que los espermatozoides de las especies de peces investigadas
100 son sensibles al ataque oxidativo y que el ácido úrico es el principal antioxidante del
101 semen (Ciereszko *et al.*, 1999; Mahfouz *et al.*, 2009; Lahnsteiner *et al.*, 2011).

102 En la trucha marrón (*Salmo trutta*), se demostró que hay varios componentes del
103 plasma seminal que dan protección antioxidante (Lahnsteiner *et al.*, 2010). Hasta
104 este estudio en trucha marrón, solo había investigaciones en mamíferos, los
105 investigadores encontraron que el plasma y los espermatozoides contienen
106 diferentes enzimas y metabolitos que pueden desempeñar un papel en la protección
107 antioxidativa. Enzimas antioxidantes fueron la catalasa, glutatión reductasa,
108 metionina sulfóxido reductasa, peroxidasa y superóxido dismutasa y los
109 antioxidantes: ácido ascórbico, glutatión, metionina, tocoferol y ácido úrico
110 (Lahnsteiner *et al.*, 2010).

111 En la actualidad se desconoce cuál es la capacidad antioxidante presente en el
112 semen de la cachama blanca, así como cuál puede ser su importancia en la
113 fertilidad, además, de si se puede mejorar, ya sea a partir de una dieta suministrada
114 al animal, o aplicando diluyentes que reduzcan la producción de especies reactivas
115 de oxígeno para evitar los daños producidos a las membranas del espermatozoide
116 y estructura del ADN. Por ende, el objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad
117 seminal (pH, duración de la movilidad, movilidad, volumen), y capacidad
118 antioxidante (CAntiOX) en semen fresco y semen crioconservado de *Piaractus*
119 *brachypomus*.

120

121 **MATERIALES Y MÉTODOS**

122 ***Ubicación***

123 El experimento se llevó a cabo en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de
124 los Llanos - IALL, localizado en la ciudad de Villavicencio – Meta, Colombia, a una

125 altura de 418 msnm, temperatura ambiental media de 27 °C, humedad relativa del
126 75% y precipitación pluvial de 4050 mm/año. El semen fue procesado y evaluado
127 en el Laboratorio de Reproducción y Crioconservación de Peces del IALL. La
128 evaluación de la capacidad antioxidante se realizó en el Laboratorio de
129 Microbiología de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - UDCA, sede
130 Bogotá (Unidad Académica El Remanso).

131

132 **Comité de ética**

133 Todos los procedimientos realizados contaron con la aprobación del Comité de
134 Bioética de la Universidad de los Llanos.

135

136 **Animales**

137 La población evaluada en este estudio fue de 6 machos reproductores de cachama
138 blanca (*Piaractus brachypomus*), los cuales fueron nacidos y criados en la estación
139 piscícola de la Universidad de los Llanos. Los reproductores fueron capturados
140 empleando una malla de arrastre, luego fueron trasladados a tanques de cemento
141 de 2.5 m de diámetro. Los animales experimentales fueron escogidos al azar, siendo
142 adultos maduros con un peso promedio de 4.08 kg, luego para efectos de
143 verificación, se marcaron con chaquiras de colores en la aleta dorsal.

144

145 **Manejo de los animales**

146 La inducción hormonal se realizó con extracto hipofisario de carpa a una dosis de 4
147 mg/kg de peso vivo, la cual se suministró mediante inyección intramuscular caudal
148 en la primera aleta dorsal. La colecta seminal se realizó a las 18 horas post-
149 inducción, para lo cual, los animales se sedaron con 2-fenoxietanol (300 ppm;
150 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), cada animal se llevó a una mesa de trabajo
151 donde se limpió y secó la papila genital. Para estimular la eyaculación se realizó un
152 masaje cráneo-caudal de la pared de la cavidad celómica, el semen obtenido se
153 recolectó en tubos aforados previamente esterilizados, llevando la muestra
154 inmediatamente para su análisis en el laboratorio.

155

156 **Diseño experimental**

157 Se evaluaron siete tiempos posteriores a la obtención del semen (cuatro en semen
158 fresco y tres en semen crioconservado), proveniente de seis individuos ($n=6$),
159 evaluándose 4 variables (pH, movilidad, duración de la motilidad y capacidad
160 antioxidante). Los tiempos en que se evaluaron fueron: 0, 15, 30, 60 minutos en
161 semen fresco y 24 horas, un (1) mes y seis (6) meses en crioconservado (7
162 momentos en total). En donde para el proceso de crioconservación se utilizó un
163 diluyente con DMSO (10%), yema de huevo (12%) y glucosa (5.5%), manteniendo
164 una relación de 1:4 (semen:diluyente), según protocolo de Ramírez *et al.*(2011).

165

166 **Calidad seminal**

167 El pH se determinó por medio de tiras indicadoras de pH universal (MColorpHastTM
168 /Merck/Germany), con rango de medida entre 0 y 14 unidades, las cuales eran
169 sumergidas en la muestra del semen fresco durante 5 segundos y leídas
170 inmediatamente, esta medida se tomó durante 4 tiempos (tiempo 0, 15, 30 y 60 min.)
171 en semen fresco y 24 horas, un (1) mes y seis (6) meses en crioconservado. La
172 movilidad masal, y la duración de la motilidad (TA); fueron determinados a través de
173 la valoración de una muestra de 20 μ L de semen fresco de cada animal, el cual fue
174 activado con 180 μ L agua destilada (1:10) sobre una lámina excavada (1.0 - 1.2 mm
175 de profundidad, Micro-Slides Premiere, China) y observada mediante un
176 microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania). Con respecto a esto se consideraron
177 óptimas para el procedimiento de crioconservación aquellas muestras que
178 presentaron una movilidad masal mayor al 80%. Se empleó una micropipeta
179 (Fisherbrand Finnpipette II –Finlandia) para tomar 250 μ L de semen y depositarlo
180 en tubos de reacción (Ependorff®), para cada uno de los cuatro tiempos (0, 15, 30,
181 60 min.), sumando así 1 ml de muestra por cada animal, luego de tener la muestra
182 en el tubo de reacción, se llevó a la centrifuga refrigerada (HERMLE Z326K /
183 Alemania) a 4°C por 5 minutos a 14000 g. Finalizado este tiempo, se extrajo el
184 plasma seminal con la micropipeta poniéndolo en otro tubo de reacción, el cual se
185 llevó a congelación (-20°C) hasta el análisis de capacidad antioxidante.

186 En el semen crioconservado se realizó la evaluación a partir de las 24 horas
 187 posteriores a crioconservación en cada animal, descongelando una pajilla por
 188 individuo para cada tiempo (n=6) a 36°C por 60 segundos en baño de agua. Se
 189 evaluó de igual modo el pH, duración de la motilidad, movilidad y se llevó una
 190 muestra de 250µL a centrifuga refrigerada (4°C) a 18000 gravedades por 5 minutos
 191 para separar el sobrenadante, el cual se extrajo con una micropipeta y se llevó a
 192 congelación en otro tubo de reacción. De igual manera, se evaluó la capacidad
 193 antioxidante de estas muestras. Este procedimiento se realizó de igual modo al mes
 194 y a los seis meses de la crioconservación de las pajillas en cada macho.
 195 Las muestras de plasma seminal obtenidas por centrifugación del semen fresco y
 196 crioconservado en cada tiempo de evaluación, se les realizó el análisis de CAntiOx
 197 en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ciencias Aplicadas y
 198 Ambientales (UDCA), sede Bogotá (Unidad Académica El Remanso). Empleando el
 199 equipo para pruebas ELISA (BioRad Model 680 microplate reader / California
 200 EEUU) y utilizando el kit para ensayo de capacidad antioxidante (Total Antioxidant
 201 Capacity Assay Kit, Sigma-Aldrich®, Catalog Number: MAK187) siguiendo el
 202 protocolo del catálogo, como indica la figura 1.

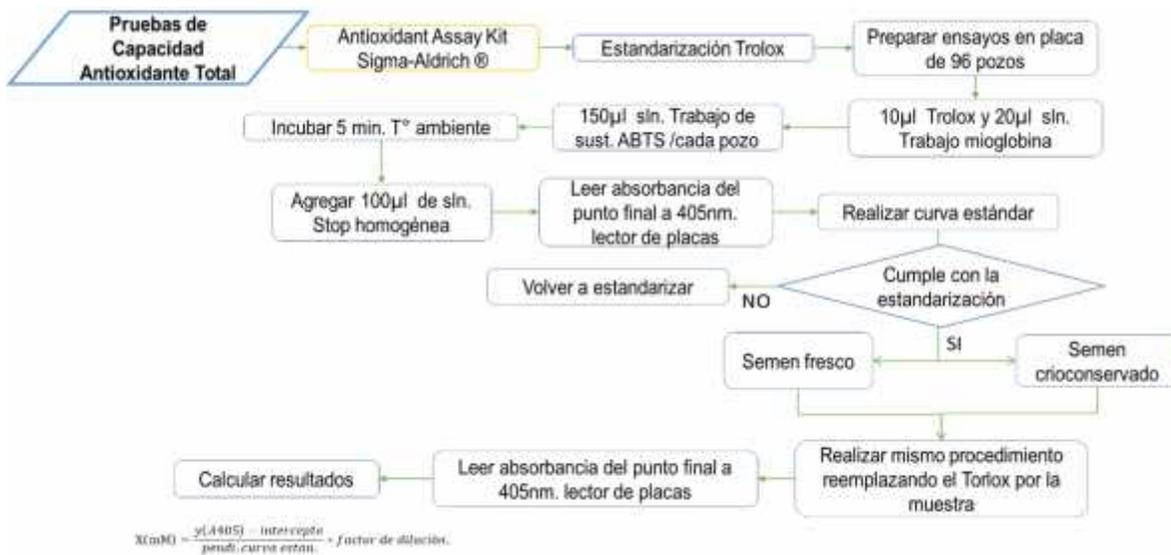


Figura 1. Flujograma del procedimiento para hallar la capacidad antioxidante total, según el protocolo de Sigma-Aldrich

206 El kit de CAntiOx Sigma® estaba compuesto por: Tampón de ensayo, solución stop
207 o de parada (Sln. S3446), mioglobina del corazón de caballo, (\pm) -6-Hidroxi-2,5,7,8-
208 tetrametilcromano- Ácido 2-carboxílico (Trolox), 2,2 ϕ -azino-bis (ácido 3-
209 etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), Tampón de fosfato y citrato, (pH 5), peróxido
210 de hidrógeno (3%). La preparación del kit consistió en diluir el tampón de ensayo 1
211 en 10; la solución madre de mioglobina de corazón de caballo se reconstituyó 2.85
212 μ l en 1 mg o lo equivalente a un vial, y posteriormente se agitó manualmente, para
213 después hacer la solución de trabajo de mioglobina, la cual se hizo diluyendo 1 μ l
214 de la solución madre de mioglobina en 99 μ l de tampón de ensayo; el Trolox se
215 reconstituyó en 2.67 μ l de tampón de ensayo preparado anteriormente y se agitó
216 hasta diluir, esto en el vial (1 mg); la solución sustrato de trabajo ABTS se preparó
217 agregando una tableta de tampón fosfato-citrato en 100 ml, se agitó hasta
218 disolverse, luego se extrajo 10 ml de la mezcla para cada 25 μ l de peróxido de
219 hidrógeno 3%, después de agregar el peróxido se debe usar dentro de los siguientes
220 20 - 30 minutos, por lo cual se agregó poco antes de hacer la mezcla en los pozos
221 de la placa; las disoluciones y reconstituciones no especificadas se realizaron con
222 agua milliQ en reemplazo del agua ultrapura que se especifica en el kit.

223 Para la evaluación en la máquina de ELISA por medio de espectrofotometría (405
224 nm), se usó una placa de 96 pozos, en las cuales se realizó primero la
225 estandarización siguiendo el protocolo (Figura 1), de la prueba para verificar que si
226 estuviese bien preparado el kit y poder comparar con las muestras de semen de los
227 especímenes; la preparación de las muestras en los pozos consistió en agregar 10
228 μ l de la muestra, 20 μ l de solución de trabajo de mioglobina, 150 μ l de solución
229 sustrato de trabajo ABTS, inmediatamente se incubó por 5 minutos y final se
230 adicionaron 100 μ l de solución stop para tener una alícuota final de 280 μ l por pozo,
231 esa misma cantidad se agregó en los pozos “blanco” pero de agua milliQ, para
232 posteriormente hacer su lectura a 405 nm y así poder realizar los cálculos de la
233 CAntiOx en unidades Trolox (mM). Este procedimiento se realizó dos veces
234 considerando que una placa tiene 96 pozos y que en cada placa se ubicaron las
235 muestras de hasta tres animales por duplicado y separados por pozos blancos para
236 evitar que la luz refractada afecte la lectura de las otras muestras.

237 **Análisis Estadístico**

238 Los datos son descritos como media \pm desviación estándar de la media (SD).
239 Posteriormente, para analizar los efectos de los tratamientos sobre las variables pH,
240 % movilidad, duración de la motilidad y capacidad antioxidante, se realizó un análisis
241 de varianza (ANOVA), de una vía verificando previamente los supuestos de
242 normalidad (Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianzas (Fligner-Killeen). Se
243 utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias entre los diferentes
244 tratamientos, como prueba a posteriori de los datos que resultaron con significancia.
245 Para los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad
246 se realizó una prueba no paramétrica análoga al ANOVA (Kruskal Wallis), para
247 todos los análisis, se asumieron niveles de significancia del 95% ($P < 0.05$). Los
248 análisis estadísticos fueron realizados con el programa de RStudio usando los
249 paquetes R (ver. 3.6.1). Las gráficas fueron realizadas usando el programa
250 GraphPad Prism 8 (ver. 8.3.0).

251

252 **RESULTADOS**

253 Se obtuvieron las medias estadísticas, como se puede apreciar en la tabla 1, junto
254 con la desviación estándar de las cuatro variables evaluadas, por la clasificación de
255 tiempo, en donde se puede decir, que el mayor porcentaje de movilidad lo tiene la
256 categoría de semen fresco en los tiempos del minuto 0 y a los 15 minutos ($95 \pm 0\%$);
257 en contra parte, se observa que el porcentaje de movilidad a los 6 meses de
258 crioconservado es el más bajo ($50.83 \pm 11.14\%$). Para la variable de duración de la
259 motilidad en esta clasificación por tiempo, la media estadística más alta se dio en el
260 semen crioconservado a 24 horas (66.67 ± 11.0 S) y la menor duración de la
261 motilidad ocurren en el minuto 60 en semen fresco (42.33 ± 5.54 S). Continuando
262 con la variable de pH, se pudo ver que los rangos de este fueron estables para
263 semen fresco en sus cuatro tiempos ($\text{pH} = 8.5 \pm 0.55$), y en el semen crioconservado
264 se observa lo mismo, pero en este se registra los niveles de pH más bajos ($\text{pH} = 7 \pm$
265 0).

266 **Tabla 1.** Calidad seminal y capacidad antioxidante (CAntiOX) en semen fresco y crioconservado de *Piaractus brachypomus*

267 Valores mostrados como media±SD. n=6

Variable	Semen Fresco				Semen Crioconservado			
	min 0	min 15	min 30	min 60	Control	24 horas	1 mes	6 meses
Movilidad (%)	95.0 ± 0.0 ^a	95.0 ± 0.0 ^a	93.33 ± 2.58 ^a	87.50 ± 6.12 ^b	95.0 ± 0.0 ^b	60.00 ± 8.94 ^a	51.67 ± 9.83 ^a	50.83 ± 11.14 ^a
Duración de la motilidad (S)	50.83 ± 5.46 ^a	51.17 ± 7.55 ^a	46.50 ± 6.44 ^a	42.33 ± 5.54 ^a	50.83 ± 5.46 ^{ab}	66.67 ± 11.0 ^b	46.00 ± 11.28 ^a	55.17 ± 10.52 ^{ab}
pH	8.50 ± 0.55 ^a	8.50 ± 0.55 ^a	8.50 ± 0.55 ^a	8.50 ± 0.55 ^a	8.50 ± 0.55 ^a	7.00 ± 0.0 ^b	7.00 ± 0.0 ^b	7.00 ± 0.0 ^b
CAntOx. (mM de Trolox)	0.3892 ± 0.17 ^a	0.3885± 0.16 ^a	0.3815± 0.14 ^a	0.4085± 0.15 ^a	0.3892 ± 0.17 ^a	1.3178 ± 0.69 ^a	1.3139 ± 0.75 ^a	1.2765 ± 0.75 ^a

268

269 Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa (p<0.05)

270

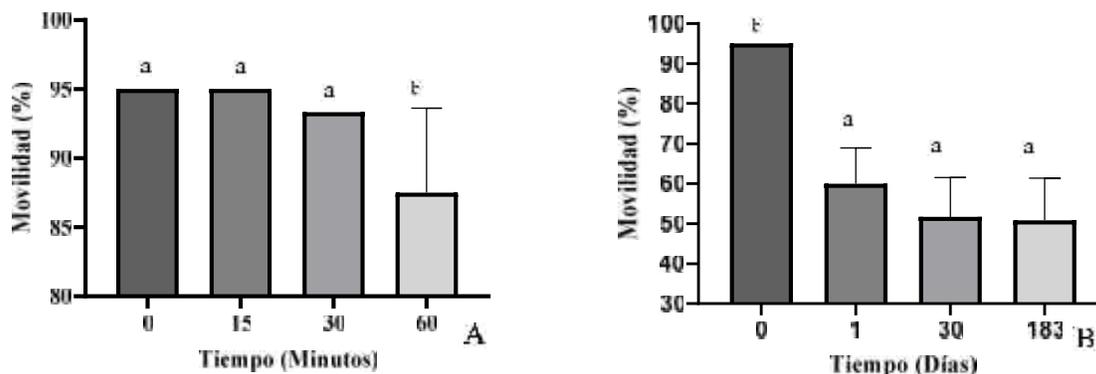
271 En la capacidad antioxidante se puede apreciar que en el semen fresco la menor
272 CAntiOx se aprecia en el minuto 30 (0.3815 ± 0.14 mM de Trolox) aunque no hubo
273 diferencias estadísticas con los otros datos en fresco, en el semen crioconservado
274 tampoco hay diferencias estadísticas, pero a las 24 horas de crioconservado se
275 observa la mayor CAntiOx (1.3178 ± 0.69 mM de Trolox).

276 A estos resultados se les realizó una prueba de normalidad por Shapiro-Wilks
277 siendo este método más sensible cuando se tratan de procesar datos menores a
278 50; esta prueba de normalidad informa que se acepta la hipótesis nula de que los
279 datos son normales, para el caso de los resultados de duración de la motilidad en
280 semen fresco ($P=0.165$) y crioconservado ($P=0.9934$), mientras que para las otras
281 tres variables en semen fresco y en crioconservado: CAntiOx ($P=0.0189$;
282 $P=0.02402$, Resp.), movilidad ($P=0.00000031$; $P=0.02632$, Resp.) y pH
283 ($P=0.0000018$; $P=0.0000000528$, Resp.), se rechaza la hipótesis nula, por lo cual
284 se debe de aceptar la hipótesis alternativa de que los datos no son normales; debido
285 a lo anterior, se realizó un análisis de homocedasticidad de las varianzas de estos
286 datos para confirmar si se puede realizar el análisis de varianza, empleando el
287 método de Fligner-Killeen, tanto en los datos de semen fresco como en los de
288 crioconservado; se observa que se acepta la hipótesis nula de que los datos si son
289 homogéneos o las varianzas son iguales y se puede proceder a realizar un ANOVA
290 de una vía, pues además los datos son independientes. Para la variable de pH no
291 se le debe de realizar una prueba paramétrica pues no cumple con los supuestos,
292 y se debe de proceder a realizar una prueba no paramétrica, en este caso una
293 prueba de Kruskal Wallis siendo análoga al ANOVA de una vía.

294 Para los datos de duración de la motilidad, los de capacidad antioxidante y
295 porcentaje de Movilidad, se les realizó un análisis paramétrico, en este caso, un
296 análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, con el fin de determinar, si existe
297 efecto del tiempo sobre estas variables, en cada una de las condiciones evaluadas.
298 En primer lugar, se realizó un ANOVA para los datos en el semen fresco, y otro para
299 los datos de semen crioconservado con respecto al control. En los datos de semen
300 fresco la movilidad presentó diferencias estadísticas ($P=0.00228$), se puede
301 observar al comparar con una prueba Tukey, que el tiempo a los 60 minutos tiene

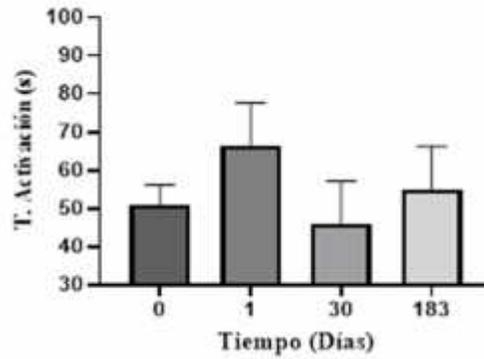
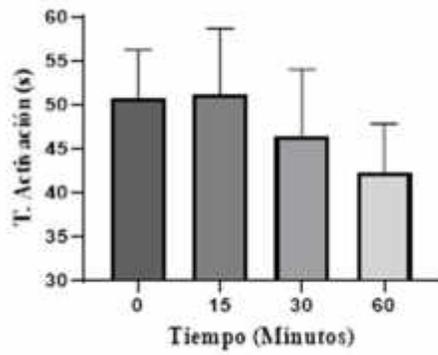
302 alta diferencia estadística con el minuto 0 y el minuto 15, y una diferencia estadística
 303 media con el minuto 30 (Figura 2); para la duración de la motilidad no hay diferencias
 304 estadísticas ($P=0.0789$), (Figura 3), y para la CAntiOx, tampoco se encontraron
 305 diferencias significativas ($P=0.991$) en las muestras (Figura 5). En el semen
 306 crioconservado la movilidad presenta diferencias medianamente significativas
 307 ($P=0.00567$), y significativas para la duración de la motilidad ($P=0.0370$), la CAntiOx
 308 no presenta diferencias significativas ($P=0.6903$). Al realizar una prueba no
 309 paramétrica (Kruskal Wallis), para pH, se encontró que se tiene que rechazar la
 310 hipótesis nula de que las muestras son iguales y aceptar que en las muestras al
 311 menos hay dos diferentes ($P<0.001$) y en este caso se presenta diferencia del
 312 control con respecto a los datos del semen crioconservado (Figura 4), en el caso
 313 del pH en el semen fresco se acepta la hipótesis de que los datos son iguales y no
 314 hay diferencias significativas ($P> 0.999$).

315 g



316

317 **Figura 2.** Comparación de las medias de Movilidad (%) en semen fresco (A) y
 318 crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) (B). Control = semen
 319 fresco. Valores expresados como media \pm SD ($n=6$). Entre barras, letras distintas
 320 indican diferencia estadística ($P<0.05$).

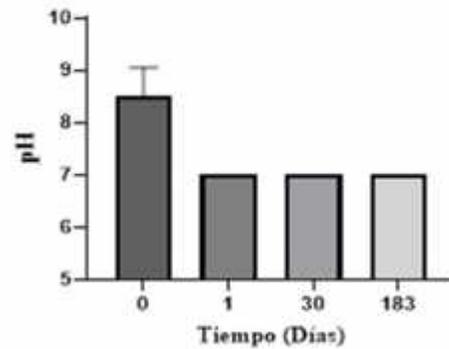
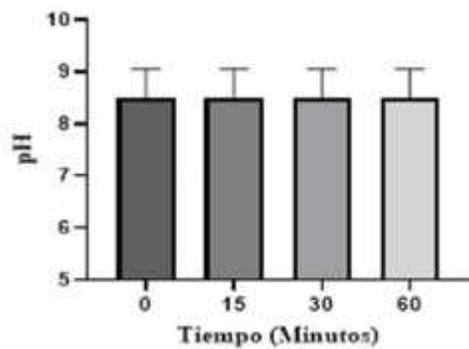


321

322 **Figura 3.** Comparación de las medias de Duración de la motilidad (S) en semen
 323 fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)
 324 (B). Control = semen fresco. Valores expresados como media \pm SD (n=6). Entre
 325 barras, letras distintas indican diferencia estadística (P<0.05).

326

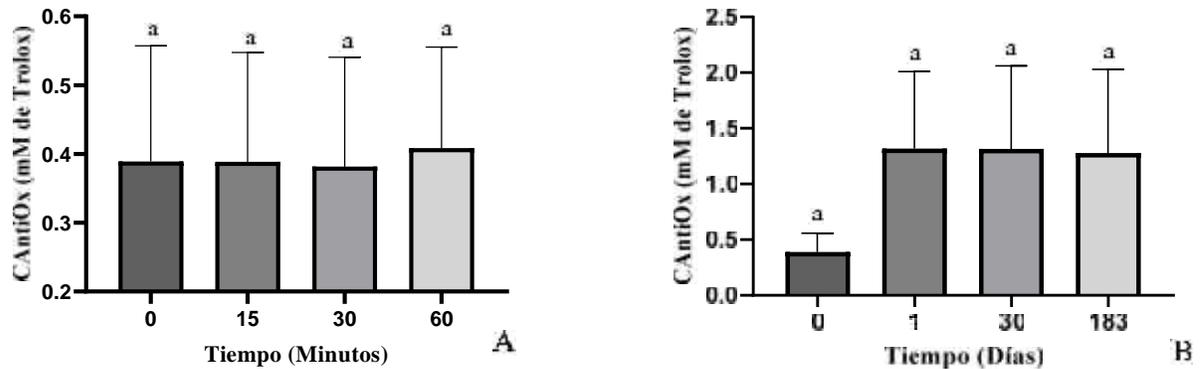
327



328

329 **Figura 41.** Comparación de las medias de pH en semen fresco (A) y semen
 330 crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (B). Control = semen
 331 fresco. Valores expresados como media \pm SD (n=6). Entre barras, letras distintas
 332 indican diferencia estadística (P<0.05).

333



334

335 **Figura 5.** Comparación de las medias de capacidad antioxidante (mM de Trolox) en
 336 semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus*
 337 *brachypomus*) (B). Control = semen fresco. Valores expresados como media \pm SD
 338 (n=6). Entre barras, letras distintas indican diferencia estadística (P<0.05).

339

340 DISCUSIÓN

341 Los resultados obtenidos de Capacidad antioxidante total (CAntiOx) se pueden
 342 comparar con los hallados por Słowi ska *et al.*, (2013), que evaluaron algunas
 343 características seminales en 13 especies distintas de peces, y la capacidad
 344 antioxidante total se midió empleando el mismo kit (Antioxidant assay kit, cat. No.
 345 CS0790; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), estos resultados permiten decir que
 346 los encontrados en el presente estudio entran en el rango reportado (para semen
 347 fresco), se puede ver que la Perca (*Perca fluviatilis*) contiene la mayor CAntiOx, le
 348 sigue la Lucioperca (*Sander lucioperca*) y en tercer lugar la cachama blanca (Tabla
 349 2). Otros resultados de CAntiOx publicados previamente, (Butts *et al.*, 2011;
 350 Flannery *et al.*, 2013) para el bacalao (*Gadus morhua*) y el salmón real
 351 (*Oncorhynchus tshawytscha*), según Słowi ska *et al.*, (2013) están dentro del rango
 352 de 11 especies.

353

354

355

356

357

Tabla 2. Resultados de capacidad antioxidante total en algunas especies de peces.

Especies	N	CAntiOx (mM de Trolox)	Autores
Lucio Europeo (<i>Esox lucius</i>)	9	0.062 ± 0.029	(Słowi ska et al., 2013)
Barbo común (<i>Barbus barbus</i>)	10	0.066 ± 0.043	(Słowi ska et al., 2013)
Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	15	0.075 ± 0.019	(Słowi ska et al., 2013)
Aspius (<i>Aspius aspius</i>)	10	0.092 ± 0.02	(Słowi ska et al., 2013)
Carpa prusiana (<i>Carassius gibelio</i>)	18	0.117 ± 0.038	(Słowi ska et al., 2013)
Brema (<i>Abramis brama</i>)	17	0.121 ± 0.047	(Słowi ska et al., 2013)
Carpa sable (<i>Pelecus cultratus</i>)	19	0.126 ± 0.085	(Słowi ska et al., 2013)
Chub (<i>Leuciscus cephalus</i>)	23	0.138 ± 0.066	(Słowi ska et al., 2013)
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	10	0.153 ± 0.063	(Słowi ska et al., 2013)
Leucisco (<i>Leuciscus leuciscus</i>)	12	0.197 ± 0.065	(Słowi ska et al., 2013)
Lucioperca (<i>Sander lucioperca</i>)	12	0.500 ± 0.130	(Słowi ska et al., 2013)
Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	12	1.909 ± 0.904	(Słowi ska et al., 2013)
Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	14	0.15 ± 0.11*	(Butts et al., 2011)
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10	0.009 ± 0.012	(Słowi ska et al., 2013)
Salmón real (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	59	0.30 ± 0.03* 0.28 ± 0.02*	(Flannery et al., 2013)
Cachama Blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>)	24	0.3892 ± 0.17	(Presente estudio)

Tabla adaptada de Słowi ska et al., (2013). Datos son expresados en media ± SD

** Datos expresados μM de Trolox

361 CAntiOx es la suma de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Mahfouz *et al.*,
362 2009), por lo cual, los resultados aquí presentados, corresponden a la sumatoria
363 de agentes que ayudan al control de especies reactivas al oxígeno, con el fin de
364 garantizar una buena movilidad y que la membrana del espermatozoide esté intacta,
365 lo que puede reflejarse en la fertilidad (Tatone *et al.*, 2010; Lançon *et al.*, 2015).
366 Con lo anterior, se deduce que estos distintos agentes antioxidantes reflejados
367 como CAntiOx en el plasma seminal, son distintos entre especies y entre los
368 individuos de las mismas, por factores como las condiciones ambientales en las que
369 se encuentran, alimentación, región geográfica, medio silvestre o cautiverio,
370 afectando también la generación de especies reactivas al oxígeno presentes
371 (Słowińska *et al.*, 2013). Por ello, sería interesante observar el comportamiento de
372 estas características en cachama blanca, mantenida en diferentes condiciones,
373 Esto permitiría evaluar no solo como afecta el tiempo a esta variable, también los
374 machos sometidos a distintos tratamientos, con el fin de observar que ambiente
375 puede ser mejor para garantizar un mejor esperma, pero no se debería de evaluar
376 solo la CAntiOx, también otras variables como la osmolaridad, ATP, y dentro de los
377 antioxidantes verificar la cantidad de ácido úrico siendo el principal en el plasma
378 seminal (Lahnsteiner *et al.*, 2011).

379 El DMSO es uno de los crioprotectores permeables de bajo peso molecular más
380 empleado en la crioconservación de semen de teleósteos tropicales, tales como
381 yamú (*Brycon siebenthalae*), cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y bocachico
382 (*Prochilodus magdalenae*) (Atencio *et al.*, 2013; Restrepo *et al.*, 2017), además
383 posee una característica interesante, el atrapar iones nocivos (radicales libres) para
384 los organismos vivos y modificar intracelularmente la estructura de las proteínas,
385 como también de los electrolitos (que disueltos en agua forman aniones y cationes)
386 (Álvarez y Larqué 2004), por ello el DMSO posee propiedades antioxidantes (López
387 *et al.*, 2013), pues es capaz de reducir la peroxidación lipídica, además, de actuar
388 como vehículo de los antioxidantes (Turán *et al.*, 2008), permitiendo mejorar el
389 medio en el que se encuentran los espermatozoides en crioconservación. Por ello
390 el DMSO puede modificar los resultados de los estudios si se usa como diluyente

391 (Turán *et al.*, 2008). Por ello sería interesante evaluar la CAntiOx de solo el DMSO
392 antes y después de su crioconservación.

393 La CAntiOx al estar expuesto a ERO's será consumida y empezará a disminuir,
394 como ocurre en la espermiación, momento en el cual el semen tiene contacto con
395 el oxígeno, pues se ve enfrentado a actuar y retener los radicales libres, pero
396 mientras el espermatozoide está en el conducto espermático, se han de encontrar con bajo
397 potencial de membrana con el fin de preservar las pocas reservas energéticas y así
398 disminuir los compuestos de oxidación endógenos, los cuales son un riesgo para la
399 integridad de la membrana (Tabares *et al.*, 2005). Lo anterior cambia al estar en un
400 medio externo con contaminantes y otros factores que pueden producir ERO's
401 (Valdebenito *et al.*, 2015). La CAntiOx varía con respecto a la cantidad de los distintos
402 antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos, en este caso, los compuestos del
403 diluyente del semen crioconservado pueden aumentar la CAntiOx o por el contrario
404 favorecer a su disminución por contribuir a la producción de ERO's, como es el caso
405 de la yema de huevo (Kumar *et al.*, 2019).

406 La yema de huevo, es la barrera más importante contra los ERO's en embriones y
407 crías permitiendo su supervivencia (Casasole *et al.*, 2016), ya que posee
408 antioxidantes importantes que pueden ayudar a la reducción de ERO's en las
409 muestras crioconservadas, no obstante, los antioxidantes pueden variar de acuerdo
410 con la dieta y otros factores a los que estén sometidos las aves de las que fueron
411 recolectados los huevos (Bernal *et al.*, 2003). Este y otros factores hacen de la yema
412 de huevo un componente importante como diluyente del semen no solo en los
413 peces, también en bovinos y otras especies, no obstante, hay que tener en cuenta,
414 que la yema de huevo tiene metales redox-activos y redox-inactivos, que pueden
415 dar como resultado un aumento en la producción de ERO's (Kumar *et al.*, 2019), y
416 que igualmente pueden variar por los distintos factores (alimentación, ambiente,
417 manejo, etc.) en los que se encuentren los animales además de su raza y genética.
418 Algunos de los metales presentes en la yema de huevo funcionan como
419 catalizadores de reacciones de radicales libres, además de algunos ser metales
420 pesados, siendo perjudiciales para los espermatozoides y al igual pudiendo
421 promover la oxidación. Por esto, el diluyente puede funcionar como un potenciador

422 de la peroxidación lipídica de las membranas del espermatozoide teniendo como
423 resultado en el proceso de crioconservación, la producción de una gran cantidad de
424 radicales libres. Con esto, se pueden llegar a probar agentes quelantes para
425 observar si hay un cambio en la concentración de los antioxidantes, pues ayudarían
426 al control de estos metales que participan en la peroxidación lipídica (Kumar *et al.*,
427 2019).

428 Por todo esto los resultados de capacidad antioxidante en semen crioconservado
429 pueden variar, pues se conoce que el DMSO tiene propiedades antioxidantes al
430 igual que el huevo, pero, este último posee algunos metales que permiten que se
431 generen las especies reactivas del oxígeno, por ello las reacciones entre diluyente
432 y esperma pueden variar por distintos factores como el tipo de huevo, especie,
433 concentración de DMSO, pero lo que se puede decir es que al tener un medio para
434 crioconservar que garantice tener mayor cantidad de antioxidantes, permitirá
435 mejorar la calidad seminal, por ello se debería de seguir indagando al respecto y
436 realizando estudios con distintos crioprotectores, para observar los cambios y
437 resultados generados en la CAntiOx.

438

439 **AGRADECIMIENTOS**

440

441 A la Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura de los Llanos, a la
442 Universidad de ciencias aplicadas (UDCA) por permitir usar sus instalaciones y
443 equipos para el desarrollo de este trabajo y a Víctor Mauricio Medina Robles por la
444 financiación del trabajo por medio de su beca de doctorado.

445

446 **REFERENCIAS**

447

448 Agarwal A. (2003) Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in
449 male infertility. In: De Vriese S. Christophe A, editors. Male fertility and lipid
450 metabolism. Champaign, IL: AOCS, p.157.
451

452 Álvarez Caro, D. M., y Larqué Saavedra, A. (2004). La supermolécula, el dimetil
453 sulfóxido: ¿un nuevo regulador del crecimiento vegetal? (Vol. 55).
454

455 Andrade, R. F., Bazzoli, N., Rizzo, E., y Sato, Y. (2001). Continuous gametogenesis
456 in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: *Characidae*). *Tissue*
457 *y Cell*, 33.
458

459 Ansaldo, Martín. (2001). Niveles de antioxidantes en peces Antárticos
460 pertenecientes a las familias *nototheniidae* y *channichthyidae*. (Tesis Doctoral.
461 Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.).
462 Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3355_Ansaldo
463

464 Aramli, M. S., Kalbassi, M. R., Nazari, R. M., y Aramli, S. (2013). Effects of short-
465 term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon
466 (*Acipenser persicus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 143(1–4), 112–117.
467

468 Argumedo, T.; y H. Rojas. (2000). Manual de piscicultura con especies nativas.
469 Asociación de Acuicultores de Caquetá (ACUICA), y Plan Nacional de Desarrollo
470 Alternativo (PNDA), pp. 51-59. Florencia, Colombia.
471

472 Arias, J., y W. Vásquez. (1988). Ampliación del conocimiento biológico de
473 *Colossoma* sp (*Cypriniformes: Characidae*), en ambientes naturales de la cuenca
474 del río Meta. En: El cultivo de la Cachama (González, R), p. 329. Fundamentos de
475 Acuicultura Continental, p. 329. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. INPA.
476 Bogotá.
477

478 Atencio García, V., Perez E, Pardo S. (2013). Evaluación de dimetilacetamida como
479 crioprotector para la criopreservación de semen de bocachico (*Prochilodus*
480 *magdalenae*). Arch Med Vet 45: 151- 158
481

482 Atencio García, V., Dorado Longas, M., Montes Petro, C., Pietro Guevara, M., y
483 Espinosa Araujo, J. (2017). Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei*
484 con dimetilsulfóxido Cryopreservation of dorada *Brycon moorei* sperm with dimethyl
485 sulfoxide.
486

487 AUNAP. (2018). *Plan Estratégico institucional 2014-2018-AUNAP*. Disponible en:
488 [https://www.aunap.gov.co/images/documentos/plan-estrategico-institucional-2014-](https://www.aunap.gov.co/images/documentos/plan-estrategico-institucional-2014-2018.pdf)
489 [2018.pdf](https://www.aunap.gov.co/images/documentos/plan-estrategico-institucional-2014-2018.pdf)
490

491 Bazzoli, N. y H.P. Godinho. 1991. Reproductive biology of the *Acestrorhynchus*
492 *lacustris* (Reinhardt, 1874) (Pisces: *Characidae*) from Tres Marias Reservoir, Brazil.
493

494 Bernal Gómez, M. E., Mendonça-Junior, C. X. de, y Mancini-Filho, J. (2003).
495 Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados
496 omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Revista Brasileira de Ciências*
497 *Farmacêuticas*, 39(4), 425–432.
498

499 Berríos, O., Valdebenito, I., Treulén, F., y Ubilla, A. (2010). Almacenamiento en frío
500 de espermatozoides de trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*): Efectos en la
501 movilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial
502 de membrana mitocondrial. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), 179–186.
503

504 Bozkurt, Y., Ö retmen, F., Kökçü, Ö., y Erçin, U. (2009). Relationships between
505 seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta*
506 *macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech J.*
507 *Anim. Sci*, 56(8), 2011–355.
508

509 Butts, I. A. E., Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M. K., Słowi ska, M., Soler, C., y
510 Trippel, E. (2011). Semen characteristics and their ability to predict sperm
511 cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Theriogenology*, *75*(7),
512 1290–1300.

513

514 Cabrera, O., Morales, D., Barragán, J., Solá, J., Bacha, F., y Fernández, A. (2015).
515 ¿Qué son las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS, según siglas en inglés)? -
516 nutriNews, la revista de nutrición animal. Retrieved June 27, 2018, from
517 [https://nutricionanimal.info/que-son-las-especies-reactivas-del-oxigeno-ros-segun-](https://nutricionanimal.info/que-son-las-especies-reactivas-del-oxigeno-ros-segun-siglas-en-ingles/)
518 [siglas-en-ingles/](https://nutricionanimal.info/que-son-las-especies-reactivas-del-oxigeno-ros-segun-siglas-en-ingles/)

519

520 Casasole, G., Costantini, D., Cicho , M., y Rutkowska, J. (2016). The effect of
521 maternal immunization on female oxidative status, yolk antioxidants and offspring
522 survival in a songbird. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular*
523 *and Integrative Physiology*, *194*, 56–61.

524

525 Chen, S.-L., Ji, X.-S., Yu, G.-C., Tian, Y.-S., y Sha, Z.-X. (2004). Cryopreservation
526 of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale
527 fertilization. *Aquaculture*, *236*(1–4), 547–556.

528

529 Ciereszko, A., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Dobosz, S., Goryczko, K., y
530 Glogowski, J. (1999). The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish
531 seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, *21*(4), 313–315.

532

533 Ciereszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K. (2000). Biochemical characteristics of
534 seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. Cryopreservation in aquatic
535 species. Edited by T.R. Tiersch and P.M. Mazik. Baton Rouge, Louisiana: World
536 Aquaculture Society. 20–48.

537

538 Cloud J.G. y S.J. Patton. (2008). Basic principles of fish spermatozoa
539 cryopreservation. In: Cabrita E., Robles V., Herráez M.P. (edit.). *Methods in*

540 reproductive aquaculture: Marine and freshwater species. London, UK: CRC Press
541 (Taylor and Francis group), p. 237-250.

542 Cosson, J., Linhart, O., Mims, S. D., Shelton, W. L., y Rodina, M. (2000). Analysis
543 of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa.
544 Journal of Fish Biology, 56(6), 1348–1367.

545

546 Cosson, J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish
547 spermatozoa. Aquaculture International, 12(1), 69–85.

548

549 Cosson, J. (2008). Methods to Analyse the Movements of Fish Spermatozoa and
550 their Flagella.

551

552 Cruz Casallas; Velasco Santamaría y Medina Robles Mauricio (2005). Manejo
553 hormonal de la función reproductiva de peces tropicales bajo condiciones de
554 cautiverio.

555

556 Cruz Casallas, Medina Robles, y Velasco Santamaría. (2006). Evaluación de
557 diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú
558 (*Brycon amazonicus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 19(2), 152–159.

559

560 Faramarzi, M. (2012). Assessment of Reproductive Parameters in Silver Carp
561 (*Hypophthalmichthys molitrix*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(3),
562 244–248.

563

564 Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V., y Menu, B. (1998). Cryopreservation
565 of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production
566 simulating conditions. Aquatic Living Resources, 11(6), 387–394.

567

568 Fauvel, C., Suquet, M., y Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. Journal
569 of Applied Ichthyology, 26(5), 636–643.

570

571 Flannery, E. W., Butts, I. A. E., Słowi ska, M., Cierieszko, A., y Pitcher, T. E. (2013).
572 Reproductive investment patterns, sperm characteristics, and seminal plasma
573 physiology in alternative reproductive tactics of Chinook salmon (*Oncorhynchus*
574 *tshawytscha*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 108(1), 99-108.
575

576 Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, R. y Zohar, Y. (1983). The gonadal
577 steroids. En: Hoar, R.S, Randall, D.J. y Donaldson, E.M. *Fish physiology*, Vol.IXA,
578 Cap 7.
579

580 Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E., y Olivera Ángel, M. (2004). Espermiación
581 inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus*
582 *brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(4), 46–52.
583

584 Grier y Lo Nostro. (2000). El epitelio germinal de teleósteo: a) concepto unificador.
585 *Actas del 6 ° Simposio Internacional sobre Fisiología Reproductiva del Pescado*.
586 González, R. 2001. El Cultivo de la Cachama. En: *Fundamentos de Acuicultura*
587 *continental*, pp. 329-346. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. INPA. Bogotá.
588

589 Grassiotto I., Q., Gameiro, M. C., Schneider, T., Malabarba, L. R., y Oliveira, C.
590 (2003). Spermogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the
591 *Curimatidae* with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the
592 *Characiformes*. *Neotropical Ichthyology*, 1(1), 35–45.
593

594 Grassiotto, Q., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D., y Foresti, F. (2001). Ultrastructure
595 of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (*Teleostei*,
596 *Characiformes*, *Erythrinidae*). *Journal of Fish Biology*, 59(6), 1494–1502.
597

598 nanan, B. E., Ö retmen, F., nanan, T., y Yılmaz, F. (2016). Total antioxidant
599 capacity, catalase activity, and lipid peroxidation changes in seminal plasma of sex-
600 reversed female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during spawning
601 season. *Theriogenology*, 86(8), 1975–1982.

602

603 Jamieson, B. G. M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from*
604 *Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, 319p

605

606 Kobelkowsky A (2007) Diversidad Morfológica del sistema de conductos excretores
607 de los peces teleósteos. *Rev Mex Biodivers* 78:105–116.

608

609 Koca Y, Ozdal OL, Celik M, Unal S, Balaban NY. Antioxidant activity of seminal
610 plasma in fertile and infertile men. *Arch Androl*. 2003;49:355-359.

611

612 Kowalski, R. K., y Cejko, B. I. (2019). Sperm quality in fish: Determinants and
613 affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94–108.

614

615 Kumar, P., Pawaria, S., Dalal, J., Ravesh, S., Bharadwaj, S., Jerome, A., ... Yadav,
616 P. S. (2019). Sodium alginate potentiates antioxidants, cryoprotection and
617 antibacterial activities of egg yolk extender during semen cryopreservation in buffalo.
618 *Animal Reproduction Science*, 209(July), 106166.

619

620 Kurland Cg, Andersson Sge. (2000) Origin And Evolution Of The Mitochondrial
621 Proteome. *Microbiol. Mol Biol Rev*. 2000;64:786-820

622

623 Kutluyer, F., Kayim, M., Ö retmen, F., Büyükleblebici, S., y Tuncer, P. B. (2014).
624 Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of
625 extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and
626 fertility. *Cryobiology*, 69(3), 462–466.

627

628 Lahnsteiner, F., Berger, B., y Weismann, T. (1999). Sperm metabolism of the telost
629 fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to
630 motility and viability. *Journal of Experimental Zoology*, 284(4), 454–465.

631

632 Lahnsteiner, F., Berger, L. B., Horvath, A., Urbanyi, B., y Weismann, T. (2000).
633 Cryopreservation Of Spermatozoa Ln Cyprinid Fishes. *Theriogenology*, 54(9),
634 1477–1498.

635

636 Lahnsteiner, F., y Mansour, N. (2010). A comparative study on antioxidant systems
637 in semen of species of *the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae* for
638 improving semen storage techniques. *Aquaculture*, 307(1–2), 130–140.

639

640 Lahnsteiner, F., Mansour, N., y Kunz, F. A. (2011). The effect of antioxidants on the
641 quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus*
642 *fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, 76(5),
643 882–890.

644

645 Lahnsteiner, F., Mansour, N., y Plaetzer, K. (2010). Antioxidant systems of brown
646 trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Animal Reproduction Science*, 119(3–4), 314–
647 321.

648

649 Lanes, C. F. C., Okamoto, M. H., Bianchini, A., Marins, L. F., y Sampaio, L. A. (2010).
650 Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the
651 reproductive season. *Aquaculture Research*, 41(9), 199–207.

652

653 Lançon R, Celeghini E, Bianchi Alves M, Santos G, Florez Rodriguez S, Leite T,
654 Arruda R. (2015). Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved
655 equine sperm. *Anim Reprod*. 12:559

656

657 Lim, H. K., y Le, M. H. (2013). Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility
658 and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm.
659 *Theriogenology*, 79(5), 867–871.

660

661 Linhart, Slechta, Slavik, T. (1991). Fish semen composition and biochemistry. *Bull.*
662 *Inst. Zool. Acad. Sin. Monogr.* 1991.16: 285-311

663 Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su
664 actividad. Disponible en:
665 <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>
666

667 López Macías, J.N., Salas Benavides, J., Gómez Cerón, A.E., Sanguíno Ortiz, W.R.
668 (2012). Estudio gonadal de la sabaleta de la cuenca del patía (*Brycon sp.*) como
669 indicador del potencial acuícola. Revista electrónica de ingeniería de producción
670 acuícola, Vol. 6, Núm 6
671

672 López Núñez, F. O., Amaya Amaya, M. P., Anaya Yosmar, M. A., y Arango Hoyos,
673 A. W. (2013). Efecto Del Dimetilsulfóxido En Un Modelo Animal De Nefrotoxicidad
674 Inducida Por Gentamicina En Conejos. *CIMEL: Ciencia e Investigación Médica*
675 *Estudiantil Latinoamericana*, 18(1), 1–15.
676

677 Macedo Márquez, A. (2012). La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno
678 (EROs) en las Mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Especializada
679 En Ciencias Químico-Biológicas, 15(2), 97–103.
680

681 Mahfouz, R., Sharma, R., Sharma, D., Sabanegh, E., y Agarwal, A. (2009).
682 Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma.
683 *Fertility and Sterility*, 91.
684

685 Martínez José Gregorio, Pardo Carrasco Sandra (2010). Crioconservación De
686 Semen En Peces: Efectos Sobre La Movilidad Espermática Y La Fertilidad.
687

688 Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M. T., Herráez, M. P., Sarasquete, C., y
689 Cabrita, E. (2012). Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender
690 media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm.
691 *Theriogenology*, 77(6), 1129–1136.
692

693 Mattei, X. (1970). Spermiogenése comparé des poisson. Pp.57- 72. in: Baccetti, B.
694 (Ed.). Comparative Spermatology. New York: Academic Press, 773p.
695

696 Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in
697 fishes. Canadian Journal of Zoology, 69: 3038-3055.
698

699 Medina Robles, V. M., Velasco Santamaría, Y., y Cruz Casallas, P. E. (2005).
700 Aspectos Generales de la Crioconservación de Semen. *Revista Colombiana de*
701 *Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34–48.
702

703 Melo, F. C. S. A., y Godinho, H. P. (2006). A protocol for cryopreservation of
704 spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction*, 3(3), 380–385.
705

706 Melorose, J., Perroy, R., y Careas, S. (2015). Avances de acuicultura y pesca en
707 Colombia. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015 (Vol. 1).
708

709 Merino M.C., J.C. Alonso, INCODER – FAO, (2011). Situación del repoblamiento de
710 cuerpos de agua continentales en Colombia. Bogotá.
711

712 Merino, M. C., Bonilla, S. P., y Bages, F. (2013). Diagnóstico del estado de la
713 Acuicultura en Colombia. Disponible en: [http://aunap.gov.co/wp-](http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/25-Diagnóstico-del-estado-de-la-acuicultura-en-Colombia.pdf)
714 [content/uploads/2016/04/25-Diagnóstico-del-estado-de-la-acuicultura-en-](http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/25-Diagnóstico-del-estado-de-la-acuicultura-en-Colombia.pdf)
715 [Colombia.pdf](http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/25-Diagnóstico-del-estado-de-la-acuicultura-en-Colombia.pdf)
716

717 Merino, M. C., Bonilla, S. P., Bages, F., Guerrero, I., Mojica, H. O., Hortúa, N., y de
718 la pava, M. L. (2014). Plan Nacional para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura
719 en Colombia AUNAP -FAO Plan Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura
720 Sostenible en Colombia -PlaNNDAS. Bogotá. Disponible en: [http://aunap.gov.co/wp-](http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-Sostenible-Colombia.pdf)
721 [content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-](http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-Sostenible-Colombia.pdf)
722 [Sostenible-Colombia.pdf](http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-Sostenible-Colombia.pdf)

723 Merino, M. C. (2018). Acuicultura en Colombia, 63. Disponible en:
724 <https://www.aunap.gov.co/images/convenio/presentacion-tecnica-acuicultura-en->
725 [colombia.pdf](https://www.aunap.gov.co/images/convenio/presentacion-tecnica-acuicultura-en-colombia.pdf)
726

727 Miller, N., Rice, C., J. Davies, M., Gopinathan, V., y Milner Anthony. (1993). A novel
728 method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the
729 antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412.
730

731 Montes Montes, Melissa (2012). Evaluación de la calidad espermática y ensayos
732 preliminares en Crioconservación de espermatozoides de Lengado *Paralichthys*
733 *Adspersus* (Steindachner, 1867). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
734 Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
735

736 Morisawa, S., y Morisawa, M. (1986). Acquisition of potential for sperm motility in
737 rainbow trout and chum salmon. *Journal of Experimental Biology*, 126, 89–96.
738

739 Muñoz Andrea, Caldas María Leonor, Hurtado Giraldo Hernán (2004). Análisis
740 Histomorfológico Del Sistema Digestivo Y Glándulas Anexas En Alevinos De
741 Cachama Blanca, *Piaractus brachypomus* (Characidae: Piaractus)
742

743 Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. En: Hoar,
744 W.S.,Randall, D.J. y Donaldson, E.M. *Fish Physio* Volume Ix Part A, Cap. 6.
745

746 Nagahama, Y. (2000). Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex
747 differentiation and gametogenesis in fish, in: Norberg, B. *et al.* (Ed.) *Proceedings of*
748 *the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Bergen,
749 Norway, July 4-9, 1999. pp. 211-222
750

751 Nascimento, A. F., Maria, A. N., Pessoa, N. O., Carvalho, M. A. M., y Viveiros, A. T.
752 M. (2010). Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian

753 freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science*,
754 118(2–4), 324–329.

755

756 Orfão, L. H., Nascimento, A. F., Corrêa, F. M., Cosson, J., y Viveiros, A. T. M. (2011).
757 Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm
758 in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (*Characiformes*). *Aquaculture*,
759 311(1–4), 241–247.

760

761 Osorio, A., Wills, A., y Muñoz A. P. (2013). Caracterización De Coproductos De La
762 Industria Del Fileteado De Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) y Trucha Arcoíris
763 (*Oncorhynchus mykiss*) En Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina*
764 *Veterinaria y de Zootecnia*, 60.

765

766 Pardo Carrasco, S., Salas Villalva, J., Reza Gaviria, L., Espinosa Araujo, J., y
767 Atencio-García, V. (2015). Cryopreservation of Trans-Andean shovelnose catfish
768 (*Sorubim cuspicaudus*) semen using dimethylacetamide. *CES Medicina Veterinaria*
769 *y Zootecnia* (Vol. 10). Universidad CES, Facultad de Medicina Veterinaria y
770 Zootecnia.

771

772 Patricio, A., Cruz, D. F., Vieira Silva, J., Padrão, A., Correia, B. R., Korrodi-Gregório,
773 L., ... Fardilha, M. (2016). Relation between seminal quality and oxidative balance
774 in sperm cells PALAVRAS-CHAVE. *Acta Urológica Portuguesa*, 33(1), 6–15.

775

776 Quagio-Grassiotto, I., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D., y Foresti, F. (2001).
777 Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus*
778 (*Teleostei, Characiformes, Erythrinidae*). *Journal of Fish Biology*, 59(6), 1494–1502.

779

780 Ramírez Merlano, J. A., Medina Robles, V. M., y Cruz-Casallas, P. E. (2010).
781 Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes.
782 *ORINOQUIA* (Vol. 14). Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana.

783 Ramírez Merlano, J. A., Medina-Robles, V. M., y Cruz-Casallas, P. E. (2011).
784 Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (*Teleostei*,
785 *Pimelodidae*), bajo diferentes protocolos de congelación. *Archivos de Medicina*
786 *Veterinaria*, 43(2), 135–144.

787

788 Restrepo-Betancur, G., Montoya Páez, J. D., y Arboleda Chacón, L. (2017).
789 Evaluación de Dos Crioprotectores y Tres Curvas de Congelación Programable en
790 la Criopreservación de Semen de *Brycon henni* (Pisces: *Characidae*). *Revista de*
791 *Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(3), 597.

792

793 Restrepo, G., Montoya, J. D., y Rojano, B. (2016). Capacidad antioxidante y calidad
794 post-descongelación de semen equino crioconservado con quercetina y
795 ergotioneina. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 63(3),
796 167–178.

797

798 Rodríguez, E., Gil-Villa, A. M., Aguirre-Acevedo, D. C., Cardona-Maya, W., y
799 Cadavid, A. P. (2011). Evaluación de parámetros seminales no convencionales en
800 individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: En
801 busca de un valor de referencia. *Biomédica*, 31(1), 100–107.

802

803 Rurangwa, E., Kime, D. ., Ollevier, F., y Nash, J. . (2004). The measurement of
804 sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*,
805 234(1–4), 1–28.

806

807 Salazar Ariza, G. (2018). FAO Fisheries yamp; Aquaculture - Visión general del
808 sector acuícola nacional – Colombia- Departamento de Pesca y Acuicultura de la
809 FAO. Retrieved May 5, 2018, from
810 http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es

811

812 Schulz, R.W. y T. MIURA. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation.
813 *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 43-56.

814 Sikka, S. C. (2004). Andrology Lab Corner*: Role of Oxidative Stress and
815 Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of*
816 *Andrology*, 25(1), 5–18.

817

818 Słowi ska, M., Nynca, J., Cejko, B. I., Dietrich, M. A., Horváth, Á., Urbányi, B., ...
819 Ciereszko, A. (2013). Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture*,
820 400–401, 101–104.

821

822 Suárez Martínez, R. O., Medina Robles, V. M., y Cruz Casallas, P. E. (2019). Efecto
823 de dos colectas de semen en una temporada reproductiva sobre la calidad seminal
824 de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista de Investigaciones*
825 *Veterinarias Del Peru*, 30(3), 1184–1195.

826

827 Tabares, C. J., Tarazona, A. M., Olivera Ángel, M., y Sci Agr, D. (2005). Fisiología
828 de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. 149 *Rev Col Cienc*
829 *Pec*, 18(2).

830

831 Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini P. (2010). Cryopreservation and
832 oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol*. 26:563-56

833

834 Tiersch, T.R. y M. Mazik. (2000). Cryopreservation of sperm of some marine fishes.
835 En: Tiersch, T.R.y M. Mazik (edit.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. The World
836 *Aquaculture Society*. Baton Rouge, Louisiana: 439 pp.

837

838 Tiersch, T. R. (2008). Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen.
839 *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(spe), 15–19.

840

841 Turan, N. N., Akar, F., Budak, B., Seren, M., Parlar, A. ., Sürücü, S., y Ulus, A. T.
842 (2008). Efecto protector del dimetil sulfóxido sobre un modelo experimental de lesión
843 medular por reperusión. *Anales de Cirugía Vascul*, 22(1), 108–116.

844

845 Tvrdá, E., K ažická, Z., Bárdos, L., Massányi, P., y Luká , N. (2011). Impact of
846 oxidative stress on male fertility - A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59(4), 465–
847 484.

848

849 Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V., y Fernández, J. (2009). Factores
850 fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: Aspectos básicos y
851 aplicados. Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41(2), 97–106.

852

853 Valdebenito, I. I., Gallegos, P. C., y Effer, B. R. (2015). Gamete quality in fish:
854 Evaluation parameters and determining factors. *Zygote*, 23(2), 177–197.

855

856 Vílchez, C. (2017). Influence of the ionic and protein environment on sperm motility
857 activation in the European eel. Universitat Politècnica de València.

858

859 Viveiros, A. T. M., y Godinho, H. P. (2009). Sperm quality and cryopreservation of
860 Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1),
861 137–150.

862

863 Watanabe W. O., Ellis E. P., Ellis S. C., Chaves J., Manfredi C., Hagood R. W.,
864 Sparsis M., Arneson S. (1998). Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus*
865 *analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. *J. World Aquaculture*
866 *Soc.* 29: 176 - 187.

867

868 Zohar Y., Mylonas C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured
869 fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99 – 136.