

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN SEMEN FRESCO Y
CRIOCONSERVADO A LARGO TÉRMINO EN CACHAMA BLANCA
(*Piaractus brachypomus*)

NICOLÁS FELIPE LEÓN ROLDÁN-UNILLANOS

ANDRÉS ESTEBAN CHACÓN MORALES-UCUNDINAMARCA.

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VILLAVICENCIO, META

2020

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN SEMEN FRESCO Y
CRIOCONSERVADO A LARGO TÉRMINO EN CACHAMA BLANCA
(*Piaractus brachypomus*)

Nicolás Felipe León Roldán

Trabajo de tesis para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista

ANDRÉS ESTEBAN CHACÓN MORALES

Trabajo de tesis para optar por el título de Zootecnista

Director: ROGER OSWALDO SUÁREZ MARTÍNEZ MV, Esp, MSc

Co-Director: VICTOR MAURICIO MEDINA ROBLES MVZ, MSc, Dr (c)

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VILLAVICENCIO, META

2020

Nota de aceptación

Firma del Director

Firma del Co-director

Firma de director centro de investigaciones

Firma Jurado 1

Firma Jurado 2

Villavicencio, febrero 6 de 2020.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y la oportunidad de desarrollarme personal y académicamente con la compañía de grandes personas que hacen más felices mis días

A la Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, donde cursé mi estudio de pregrado.

Al Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL), en el cual se desarrolló gran parte de este trabajo.

Al profesor (MSc.) Roger Oswaldo Suárez quien, como director, colaboró en el trabajo de grado orientándonos.

Al Profesor (MSc.) Mauricio Medina director del grupo de investigación: GRITOX, por la codirección del proyecto y su constante apoyo en la realización de este.

A Esteban Morales con quien ejecute este proyecto, persona con gran calidad humana y que fue de apoyo académico.

A Natalia León quien ha sido un apoyo emocional durante el final de mi pregrado.

A mi familia, que me ha acompañado en todas las fases de mi vida, brindándome su apoyo incondicional.

Al profesor José Ricardo Corredor Matus, quien ejerciendo la labor de la docencia brinda una formación integral inspirando en sus estudiantes la excelencia profesional y el crecimiento personal.

A Niña, mi mascota que aún desde el cielo me alienta a progresar en el camino de esta linda carrera.

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVOS	12
1.1 Objetivo General.....	12
1.2 Objetivos Específicos.....	12
2. INTRODUCCIÓN	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. MARCO TEÓRICO	19
5.1 Generalidades de cachama blanca	19
5.2 Anatomía reproductiva del macho y espermatogénesis	20
5.3 Los espermatozoides y composición del plasma seminal.....	22
5.4 Método de extracción de semen.....	23
5.5 Calidad seminal y su evaluación.....	24
5.6 Capacidad Antioxidante función, importancia	26
5.7 Fundamento de la Capacidad Antioxidante Total	27
5.8 Método ABTS para la medición de Capacidad Antioxidante Total.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Ubicación y Características agroclimatológicas.	30
6.2 Animales e instalaciones.	30
6.3 Tratamientos y diseño experimental.	32
6.4 Manejo de los animales	33

6.5 Parámetros de evaluación.....	35
6.6 Análisis Estadístico.....	40
7. RESULTADOS.....	41
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIÓN	58
10. RECOMENDACIONES	59
11. BIBLIOGRAFÍA	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental mono factorial, completamente al azar con medidas en el tiempo.....	41
Tabla 2. Datos generales de los animales y muestras seminales	42
Tabla 3. Calidad seminal y capacidad antioxidante (CAntiOX) en semen fresco y crioconservado de <i>P. brachypomus</i> (medias más desviación estándar).....	43
Tabla 4. Resultado de normalidad por Shapiro-Wilks	44
Tabla 5. Resumen de homogeneidad de varianzas por Fligner-Killeen.	45
Tabla 6. Resultados del ANOVA y Kruskal Wallis	46
Tabla 7. Resultados de capacidad antioxidante total en algunas especies de peces.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Selección de animales y aislamiento. A. Estanques donde se encuentran los ejemplares. B. Tanques de cemento para aislar los machos experimentales. C. primer grupo de machos aislados. D. Segundo grupo de machos aislados. E. Instalaciones del IALL	32
Figura 2. Preparación para la crioconservación del semen. A. Extracción de yema de huevo. B. vertiendo semen en diluyente. C. Tomando muestra para pajilla. D. agregando dilución en pajilla correspondiente. E. congelación de pajillas (-197°C)	33
Figura 3. Inducción hormonal. A. Preparación de la Hormona EPC. B. Alistando hormona correspondiente a cada macho. C. Captura de los ejemplares aislados. D. Aplicación de la hormona intramuscular.	34
Figura 4. Espermiación de los machos seleccionados. A. Captura de animales aislados. B. Animal sedado con fenoxietanol (300ppm). C. masaje cráneo-caudal para extracción seminal. D. Obtención y recolección del semen. E. Semen en tubo aforado para posterior análisis.	34
Figura 5. Muestreo y evaluación de calidad seminal. A. Toma de muestra seminal para su evaluación. B. Activando esperma para evaluar su calidad. C. Análisis de pH de muestra seminal. D. Preparación de muestra para centrifuga refrigerada. E. Muestra centrifugada. F. Extracción de plasma de muestra centrifugada. G. Plasma seminal para su posterior congelación y análisis de CAntiOx	35
Figura 6. Evaluación de calidad seminal en semen crioconservado. A. Selección de pajilla a descongelar. B. Descongelamiento de pajilla. C. Corte de pajilla y vertida sobre tubo aforado. D. Evaluación seminal del esperma de la pajilla. E. Extracción de plasma de muestra centrifugada. F. Congelación de muestras para análisis de CAntiOx.	36

Figura 7. Flujograma del procedimiento para hallar la capacidad antioxidante total, según el protocolo de Sigma-Aldrich.....	38
Figura 8. Lectura de las muestras de plasma seminal. A. Separación de muestras para realizar lectura. B. Reconstitución de químicos y estandarización del equipo. C. Ajustando parámetros de lectura de punto final (Abs; 405nm). D. Preparación de primera placa para realizar lectura. E. placa puesta en máquina de lectura e impresión de resultados obtenidos en absorbancia. (Fotos propias)	39
Figura 9. Comparación de las medias de Movilidad (%) en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>) (B). En la figura B el tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6.....	47
Figura 10. Comparación de las medias de Duración de la movilidad (S) en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>) (B). En la figura B el tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6	47
Figura 11. Comparación de las medias de pH en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>) (B). En la figura B el tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6.....	48
Figura 12. Comparación de las medias de capacidad antioxidante (mM de Trolox) en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>) (B). En la figura B el tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6	48

RESUMEN

El estrés oxidativo es generado por desequilibrios entre especies reactivas del oxígeno (EROs) y actividad antioxidante durante la congelación seminal, afectando estructuralmente membranas celulares, actividad enzimática y ácidos nucleicos del espermatozoide interrumpiendo procesos fisiológicos como la producción de energía (ATP), reduciendo la movilidad, viabilidad y capacidad fertilizante. Este trabajo evaluó la calidad seminal (pH, duración de la movilidad, movilidad, volumen), y capacidad antioxidante (CAntiOX) en semen fresco y semen crioconservado de *Piaractus brachypomus*. Se utilizaron seis ($n=6$), machos sexualmente maduros inducidos con 4 mg.kg^{-1} de Extracto Hipofisario de Carpa (EHC), de los que se colectó semen 18 horas pos-inducción. Calidad espermática y CAntiOX del semen fresco se evaluaron en 4 tiempos diferentes posteriores a la colecta (0, 15, 30 y 60 min.), y en semen crioconservado (24 horas, 1, 6 y 12 meses) a -196°C en nitrógeno líquido. Se evidenciaron variaciones significativas en la movilidad espermática ($p < 0,00567$), duración de la movilidad ($p < 0,037$) y pH ($p < 0,001$) del semen crioconservado, mientras que CAntiOx no mostró diferencias significativas ($p < 0,690$). En el semen fresco la movilidad espermática presentó diferencias significativas ($p < 0,00228$), a los 60 min., respecto a los demás tiempos.

Palabras clave: Capacidad antioxidante (CAntiOx), *Piaractus brachypomus*, semen crioconservado, calidad espermática, especies reactivas de oxígeno (EROs)

ABSTRACT

Oxidative stress is generated by imbalances between reactive oxygen species (ERO's) and antioxidant activity during seminal freezing, structurally affects cell membranes, enzymatic activity and nucleic acids of the sperm disrupting physiological processes such as energy production (ATP), reducing mobility, viability and fertilizing capacity. This work evaluated the seminal quality (pH, motility duration, motility, volume), and antioxidant capacity (CAntiOX) in fresh semen and cryopreserved semen of *Piaractus brachypomus*. Six (n = 6), sexually mature males induced with 4 mg.kg⁻¹ of pituitary carp extract (EHC) were used, from which semen was collected 18 hours post-induction. Sperm quality and CAntiOX of fresh semen were evaluated in 4 different times after collection (0, 15, 30 and 60 min.), And in cryopreserved semen (24 hours, 1, 6 and 12 months) at -196 ° C in liquid nitrogen. Significant variations in sperm mobility (p <0.00567), motility duration (p <0.037) and pH (p <0.001) of cryopreserved semen were evidenced, while CAntiOx showed no significant differences (p <0.690). In the fresh semen the sperm mobility presented significant differences (p <0.00228), at 60 min., Compared to the other times.

Key words: Antioxidant capacity (CAntiOx), *Piaractus brachypomus*, cryopreserved semen, sperm quality, reactive oxygen species (EROs)

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

- Aportar al conocimiento básico el efecto de la crioconservación seminal sobre la calidad espermática en cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*)

1.2 Objetivos Específicos

- Ñ Evaluar parámetros de calidad seminal (pH, duración de la movilidad y movilidad), en semen fresco y crioconservado en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)
- Ñ Determinar la capacidad antioxidante total en *semen* fresco conservado a corto termino (0, 15, 30 y 60 min.) en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)
- Ñ Medir la capacidad antioxidante en semen crioconservado (24 horas, 1 y 6 meses) en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

2. INTRODUCCIÓN

En Colombia desde hace varios años se recibe financiación pública con cerca de 7000 millones de pesos invertidos, con el fin de diversificar la acuicultura (COLCIENCIAS, 2015), siendo la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), tilapia roja y plateada (*Oreochromis spp* y *Oreochromis niloticus*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y el camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*), las especies en las que se ha realizado mayor inversión de estos recursos (Melorose, Perroy, & Careas, 2015; Salazar, 2018).

Las cachamas blanca y negra (*Piaractus brachypomus* y *Colossoma macropomum*), son especies endémicas de las cuencas de la Orinoquía y Amazonía, con las cuales se iniciaron los trabajos de reproducción inducida además de otras especies nativas, permitiendo repoblamiento en afluentes de ríos como el Magdalena, Sinú y Orinoco, fomentando su producción (Merino & Alonso, 2011; Merino et al., 2013). La cachama blanca es una de las especies más comercializadas llegando a escala industrial, contribuyendo con el 6.8% de la producción total de la acuicultura, la cual para el año 2018 fue de 155.658 millones de toneladas y se estima un incremento para el 2019 de 27,3 millones de toneladas (AUNAP, 2018), además está ocupando el segundo puesto en la acuicultura continental aportando un 21.4% (Merino et al., 2013; Osorio et al., 2013; Merino, 2018), mientras que la negra está en programas de fomento para seguridad alimentaria de pequeños productores (Salazar, 2018).

La importancia de estas especies radica en que son nativas y cultivadas en la gran mayoría del país, pues tienen un crecimiento rápido, son omnívoras, se reproducen fácilmente en cautiverio y tienen alta aceptación en el consumidor (Merino et al., 2013; Salazar, 2018).

Dada la importancia de la cachama blanca, es necesario preservar y aportar al conocimiento sobre la especie, principalmente en referencia al aspecto reproductivo pues al ser una especie reofílica y estar en estanques, inhibe su reproducción, por lo que debe ser inducido hormonalmente con extracto hipofisario

de carpa (EHC); (Merino, 2014). Los protocolos distinguen hembras de machos, siendo para los últimos una dosis única de 4 mg.kg^{-1} de peso vivo, induciendo la espermiación a las 6 o 7 horas después de la inyección (Navarro et al., 2004a; Cruz et al., 2011).

Se requiere investigación en el manejo del semen extraído con miras a una posterior fertilización óptima y para lógralo es necesario conocer las propiedades del mismo, manejo, tecnologías de almacenamiento y/o uso. Entre las características seminales a analizar que pueden impactar en la fertilidad se encuentra la capacidad antioxidante, entendiendo que la crioconservación de las células reproductivas incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) reduciendo la misma por estrés oxidativo (Tatone et al., 2010). Las EROs son responsables de causar daño a las membranas de los espermatozoides y de la fragmentación del ADN afectando la fertilidad (Lançonni et al., 2015).

La capacidad antioxidante ha sido medida en otros teleósteos como la *Perca fluviatilis*, *Salmo trutta* y *Oncorhynchus mykiss*, a partir de los cuales se sabe que los espermatozoides de las especies de peces investigadas son sensibles al ataque oxidativo y que el ácido úrico es el principal antioxidante del semen (Ciereszko et al., 1999; Mahfouz et al., 2009; Lahnsteiner et al., 2011).

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

En la actualidad se desconoce cuál es la capacidad antioxidante presente en el semen de la cachama blanca, así como cuál puede ser su importancia en la fertilidad, además, de si se puede mejorar, ya sea a partir de una dieta

suministrada al animal, o aplicando diluyentes que reduzcan la producción de especies reactivas de oxígeno para evitar los daños producidos a las membranas del espermatozoide y estructura del ADN. El objetivo de este trabajo es aportar al conocimiento básico el efecto de la crioconservación seminal sobre la calidad espermática en Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*), evaluando parámetros de calidad seminal en semen fresco y crioconservado determinando la capacidad antioxidante en esta especie.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A través de los años, se ha dado importancia a la evaluación de parámetros de calidad seminal en semen fresco y crioconservado de la cachama blanca. No obstante, los estudios relacionados con calidad del semen de teleósteos almacenado in vitro en su mayoría están orientados a evaluar algunas características como color, consistencia, densidad espermática, movilidad o composición del plasma seminal (Berríos, 2010)

Aún no se han realizado trabajos que determinen o que permitan establecer la capacidad antioxidante del semen fresco y semen crioconservado de cachama blanca, a pesar de que se conoce, que es un parámetro importante en la viabilidad del semen y por tanto, en la fertilidad, ya que debido a la peroxidación lipídica, características celulares como la permeabilidad y la fluidez de las membranas es alterada, conduciendo al mal funcionamiento de los espermatozoides, provocando reducción de la movilidad, de la resistencia al choque osmótico, del potencial de fertilización, así como de proteínas con actividad enzimática (Martínez et al., 2012).

Se debe considerar que la caracterización de la calidad del esperma en los machos durante la época reproductiva es fundamental para determinar su posible uso en reproducción o crioconservación (Martínez et al, 2012). Durante la crioconservación se pueden originar dos tipos de daños a la mitocondria que afectarían la movilidad: un daño directo sobre el ADN o su membrana, y uno indirecto provocado por la fragmentación del ADN nuclear, del cual depende la mitocondria para obtener algunas proteínas que no codifican su genoma (Kurland & Andersson, 2000). Hasta el momento no se han reportado estudios acerca de la capacidad antioxidante del semen crioconservado en *Piaractus brachypomus*, razón que motiva la realización del presente proyecto.

4. JUSTIFICACIÓN

Teniendo una ubicación privilegiada, Colombia es un país que posee gran cantidad de pisos térmicos y temperaturas trópicas estables, con una gran red fluvial por todo el país y de acuerdo con la FAO (Salazar, 2018), tiene una vasta superficie continental (1441748 Km²), con costas en dos océanos, el Pacífico y el Atlántico (1300 Km y 1600 km respectivamente). Pero lo que la hace más preciada, es su hidrografía, que le permite tener una rica diversidad de especies ícticas y de otros seres vivientes con hábitats similares, otorgándole una gran oportunidad para el desarrollo de la acuicultura. Con base en esto, investigar las especies de peces continentales como la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), es importante para seguir aportando a la economía del país, mejorar las producciones y generar mayor alimento para una sociedad que crece continuamente, además de proteger a la especie, que como consecuencia de las prácticas pesqueras actuales ve reducida su población.

La crioconservación espermática, es una de las alternativas que en el momento se evalúa como método para la conservación de especies ícticas, la cual ha sido utilizada con éxito en otros taxones como los mamíferos. Esta metodología es susceptible a evaluación, con fin de determinar los efectos de la congelación y el manejo en fresco del semen de cachama blanca en parámetros de calidad seminal tales como: pH, porcentaje movilidad, tiempo activación y la capacidad antioxidante total (CAntiOx). CAntiOx, es un nuevo aporte para ahondar más en los vacíos de investigación en crioconservación seminal de la cachama blanca, con fin de mejorar el material genético, pues ayudará a evaluar la eficacia del proceso, con miras a la optimización de esta tecnología para la producción y conservación de germoplasma como desarrollo de investigación científica.

Conociendo esta característica, se espera inferir en aspectos que relacionan la calidad seminal con el manejo o con diluyentes que mejoren el semen para la posterior crioconservación y fertilización. Al aplicar técnicas de crioconservación

seminal, se contribuye al conocimiento referente a reproducción asistida (Ramírez et al., 2011), y producción continua de cachama blanca, que como especie reofílica, no se reproduce naturalmente en cautiverio, además, se reproduce en una sola época del año. La creación un banco de esperma criopreservado, permitiría que durante el año se puedan inducir a la reproducción más hembras (aún en ausencia de machos) y con el fin de aumentar la producción mejorando la rentabilidad. Por lo anterior, se presenta este trabajo en modalidad de Tesis para aspirar al título de Médico Veterinario Zootecnista y Zootecnista, respectivamente, el cual pretende aportar al conocimiento básico del efecto de la criopreservación seminal sobre la calidad espermática en Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*).

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Generalidades de cachama blanca

La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) es un teleósteo de la familia *Characidae*, es nativa de las cuencas de los ríos Orinoco, Amazonas y sus afluentes, razón por la cual, es común encontrarla en las regiones de influencia de esas dos cuencas compartidas entre los países de Venezuela, Brasil, Perú y Colombia (Díaz & López, 1993).

Los ejemplares de cachama viven en aguas con temperaturas entre 23 y 30°C, en ambiente natural son omnívoras con predilección a frugívoras – herbívoras y buenas consumidoras de semillas (Arias & Vásquez, 1988). Tienen un crecimiento rápido, resistencia a parásitos y enfermedades, de fácil adaptación en aguas de diversas características químicas, resisten altas y bajas concentraciones de oxígeno disuelto, tienen gran potencial productivo y comercial en piscicultura extensiva y semi-intensiva (Díaz & López, 1993).

En el adulto de la cachama blanca se observa una coloración grisácea con reflejos azulosos en el dorso y en los costados; su vientre es blanquecino con ligeras manchas anaranjadas. La aleta adiposa es carnosa, los juveniles suelen tener un color más claro, con matices de rojo intenso en la parte anterior del abdomen y en las aletas anal y caudal; debido al escaso número de branquiespinas (37 en el primer arco branquial), posee una baja capacidad de filtración (Muñoz & Caldas, 2004).

Alcanza una longitud de 85 cm con un peso máximo de 20 Kg (Argumedo & Rojas, 2000). La cachama blanca consigue su madurez sexual al tercer año de vida, cuando su peso varía entre 2,5 a 3,0 Kg (Muñoz & Caldas, 2004).

En los inicios de la acuicultura para esta especie, la mayoría de los peces, sexualmente maduros, eran capturados por pescadores directamente del río Meta (Pineda Santis et al., 2004), siendo Villavicencio uno de los departamentos con

mayor producción de esta especie (Anzola et al., 2001); luego de su pesca se llevaban a estaciones piscícolas para iniciar los procesos de desove y venta de alevinos. Pero debido a varios factores como la sedimentación, deforestación, sobrepesca además de la contaminación de estas fuentes hídricas; se ha visto la reducción en la cantidad de individuos en estas fuentes de agua natural (Pineda Santis et al., 2004), por ello, se opta por tener un grupo de reproductores, surgiendo de esto la necesidad de realizar cruces para asegurar el producto (Pineda Santis et al., 2004).

5.2 Anatomía reproductiva del macho y espermatogénesis

La anatomía del aparato reproductor en los machos de cachama blanca, es la de un pez teleósteo con fertilización externa, posee un testículo lobular con lóbulos separados por tejido conjuntivo, rodeados a su vez por una membrana basal continua que divide el testículo en dos compartimentos: el interlobular y el intralobular, que se encuentran suspendidos de la cavidad celómica por el mesorquio, el cual es una continuación del peritoneo. Estas estructuras se encuentran rodeadas por una gruesa capa de tejido conectivo (túnica albugínea), que se extiende internamente y divide a la estructura en lóbulos; los espermatozoides son conducidos a través del conducto deferente o arquinéfrico que se sitúa dorsalmente y puede terminar en la vejiga urinaria, el ducto urinario o al exterior a través de la papila urogenital (Kobelkowsky A, 2007). En los peces de la orden *Characiforme*, los testículos son órganos pares, de forma sacular y color blanco, se hallan ventralmente a la vejiga hidrostática, se unen hacia la región caudal, dando origen a un conducto deferente corto que llega hasta el poro urogenital. Están unidos entre sí por una lámina de tejido pigmentado que a su vez los adhiere a la vejiga natatoria. A medida que los machos crecen, los testículos pasan de ser simétricos, transparentes, delgados y alargados (inmaduros), a un color cremoso por partes (en desarrollo), por último, de color blanco cremoso, asimétricos y al presionar en el abdomen se evidencia la salida de la esperma (maduros) (López Macías et al., 2012). En el estroma testicular, los conductos seminíferos, situados antes del conducto deferente, están formados por túbulos

seminíferos, rodeados por una membrana basal y una capa fina de tejido conectivo, su epitelio posee dos tipos de células: células de Sertoli con función de nutrición y células de Leydig, con función espermatogénica (Bazzoli y Godinho, 1991).

La espermatogénesis se desarrolla intratesticular, para ello existen dos tipos de células de gran importancia, las células de Leydig, encontradas en la periferia de los túbulos y las de Sertoli, situadas dentro de los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli actúan como soporte de las células germinales o espermatogonias, la unidad funcional de estas células se conoce como espermatocisto (Grier & Lo Nostro, 2000; Schulz & Miura, 2002).

La espermatogénesis se puede dividir en 3 fases de crecimiento; la primera es la proliferación mitótica de espermatogonias, en la cual la célula espermatogonial entra en una serie de divisiones celulares para aumentar su número (Schulz & Miura, 2002). Posteriormente va la proliferación meiótica de espermatocitos. El proceso de división celular en las espermatogonias cambia de mitosis a meiosis (Schulz & Miura, 2002); en la meiosis 1 se generan los espermatocitos. Los espermatocitos entran en meiosis 2 para la generación de las espermatidas, en esta fase de desarrollo, los espermatocitos pierden entre el 80-90% de su volumen celular. Se condensa la cromatina, el nucléoplasma se incorpora al citoplasma y el material celular es fagocitado, las mitocondrias se concentran en el cuello del espermatocito y el flagelo crece (Schulz & Miura, 2002). En los peces teleósteos no hay formación de acrosoma como se da en los mamíferos. Esta etapa de desarrollo aún está regulada principalmente por la hormona folículo estimulante (FSH), aunque los niveles de LH se incrementan después de la meiosis 2. La FSH provoca la activación de las células de Leydig y de Sertoli hasta ahora inactivas (Schulz & Miura, 2002). La FSH estimula la síntesis del esteroide 11-cetotesterona (11-KT) en los espermatocistos (Fostier et al., 1983; Nagahama, 1983). 11-KT activa a las células de Sertoli para producir la activina B que aparentemente es responsable de la activación del proceso de cambio en la división de mitosis a meiosis (Nagahama, 2000). Por último, se da la espermiogénesis, después de

completarse las divisiones celulares, las paredes del espermatocisto se rompen y liberan a los espermatozoides hacia los conductos eferentes. Este proceso es conocido como espermiación (Schulz & Miura, 2002). A su paso por los conductos, los espermatozoides pasan por un proceso de maduración (adquisición de la capacidad de movimiento), (Morisawa & Morisawa, 1986) e hidratación (producción de fluido que se mezcla con los espermatozoides para conformar el semen) (Schulz & Miura, 2002). La espermiogénesis está regulada en gran medida por la LH. Esta última, provoca un cambio en la ruta metabólica de síntesis esteroidea de 11-KT a la síntesis de 17 α - hidroxiprogesterona (17 α -HP) y su posterior conversión a 17 α , 20 β - hidroxiprogesterona (17 α 20 β -DP) (20 β -S) llevada a cabo en los espermatozoides. La 20 β -S se ha relacionado con el proceso de regulación de espermiogénesis y maduración, aunque se desconocen aún sus efectos a nivel celular (Nagahama, 2000; Schulz & Miura, 2002).

5.3 Los espermatozoides y composición del plasma seminal

Los espermatozoides de peces se han clasificado en aquaespermatozoides y en introspermatozoides, según su modo de fertilización externo o interno. Los *Cipriniformes*, *Characiformes* y *Siluriformes* tienen el tipo aquaespermatozoides (Quagio-Grassiotto et al., 2001; Tabares et al., 2005). Por lo cual, la cachama blanca siendo un teleósteo *Characiforme* ha de tener una fertilización externa, además, en los teleósteos, se pueden observar dos tipos de espermatogénesis y espermiogénesis que dan como resultado dos tipos de espermatozoides (Andrade et al., 2001; Tabares et al., 2005). Una se lleva a cabo dentro de los lóbulos siendo la de tipo cístico y la otra denominada semicístico el desarrollo ocurre parcialmente fuera de los lóbulos (Andrade et al., 2001). La principal diferencia entre los espermatozoides producidos según su tipo, está relacionada con la posición del eje flagelar, que puede ser paralela o perpendicular al núcleo (Grassiotto et al., 2001). Estas posiciones resultan de la presencia o ausencia de rotación nuclear durante la espermiogénesis (Mattei, 1970).

El aquaespermatozoide resultante, no tiene acrosoma, la cabeza puede medir de 3-4 μ m y contiene un núcleo esférico, una pieza intermedia de dimensiones

variables con o sin un canal citoplásmico y un flagelo largo (Cosson, 2008; Grassiotto et al., 2003), las especies *Characiformes* en mayor parte tienen el núcleo esférico, los espermatozoides generalmente exhiben fibras gruesas de cromatina condensada homogéneamente, hay una fosa nuclear profunda partes intermedias medianas ubicada en el extremo posterior del núcleo como en la mayor parte de los teleósteos (Jamieson, 1991; Mattei, 1991; Grassiotto et al., 2003), aunque estas características varían según las especies.

En el plasma seminal de los peces la presencia de Na^+ o K^+ es necesaria para garantizar o preservar la movilidad espermática, pero no es esencial en la activación espermática (Vílchez, 2017). Este fluido multifuncional heterogéneo y complejo rico en proteínas se compone de varios compuestos, principalmente de minerales (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}) y se caracteriza por bajas concentraciones de proteínas y otras sustancias orgánicas, como hormonas y feromonas, colesterol, glicerol, vitaminas, aminoácidos libres, azúcares, ácido cítrico y lípidos (Linhart et al., 1991; Ciereszko et al., 2000; Cosson et al., 2004, Vílchez, 2017). Además de estos componentes, se pueden encontrar triglicéridos y glucosa, la cual se puede decir que es distinta según la especie, donde la carpa plateada tiene niveles de glucosa bastante bajos y van desde 1.2-1.8 mg/dL, los triglicéridos van de 5-12 mg/dL y la movilidad es de 60-75% (Faramarzi, 2012), en carpa escamosa la glucosa es de 1.43 mg/dL, los triglicéridos 7.82 mg/dL y la movilidad de 63.18% (Bozkurt et al., 2009).

5.4 Método de extracción de semen

La gran mayoría de los peces en cautiverio presentan algún tipo de disfunción reproductiva, en el caso de los machos se disminuye el volumen de la producción de semen o la calidad espermática. Los trastornos reproductivos están asociados a cambios ambientales que suceden en el hábitat natural y como resultado no existe un estímulo para que la hipófisis libere la gonadotropina (GtH) maduracional (Zohar & Mylonas, 2001).

Para el caso de los machos la espermiación es inducida mediante la administración intramuscular de extracto de hipófisis de carpa (2.5 mg/kg), el semen se colecta mediante masaje cráneo-caudal del abdomen del pez ocho horas después de administrada la hormona. Se puede usar una jeringa para que no haya contaminación por heces (Fresneda et al., 2004), también se puede inducir la espermiación usando una dosis de 4 mg.kg⁻¹ de peso corporal de extracto de hipófisis de carpa, administrada 18 h antes de la extracción del semen (Cruz, Medina & Santamaría, 2006). Otros protocolos describen el uso de gonadotropina coriónica humana (hCG) dada su larga vida media en el plasma sanguíneo, administrada en una dosis única de 100 - 4000 UI.kg⁻¹ de peso corporal (Watanabe et al., 1998).

5.5 Calidad seminal y su evaluación

La calidad de los espermatozoides en peces de cultivo puede verse afectada por diferentes componentes de la cría de reproductores, durante la recolección y el almacenamiento antes de la fertilización o en el procedimiento de fertilización (Rurangwa et al., 2004). Las variaciones en la composición del plasma seminal pueden afectar el almacenamiento de los espermatozoides y en consecuencia conducir a una reducción en la calidad del esperma (Vílchez, 2017).

La evaluación de la calidad espermática permite incrementar no solo los índices de supervivencia larval, sino la aplicación de técnicas como la fecundación in vitro, monitoreo de las condiciones de cultivo y crioconservación, con el fin de asegurar la reproducción en cautiverio (Montes, 2012), además proporciona información necesaria para diseñar protocolos óptimos de manejo y almacenamiento para los espermatozoides utilizados en la fertilización artificial (Bozkurt et al., 2009). Al realizar la evaluación seminal, se pueden tener aproximaciones de fertilidad de la especie, la cual puede variar a causa de la crioconservación, por lo que debe realizarse antes y después de congelar el semen, para comparar y observar el efecto en la calidad y en la fertilización, junto con esto se pueden evaluar distintos diluyentes que ayuden a la conservación del esperma mejorándolo o manteniendo las propiedades óptimas sobre todo en la crioconservación donde se puede

reducir bastante la calidad por factores como las especies reactivas al oxígeno, disminución de antioxidantes, pérdida de nutrientes en el plasma seminal, presión osmótica, pH, interacción de componentes iónicos (Pardo et al., 2015).

Hoy en día, hay ciertos parámetros o marcadores biológicos de la calidad del esperma (Montes, 2012), los cuales permiten evaluar o inferir en la calidad seminal: volumen, densidad espermática, movilidad, pH, osmolaridad, viabilidad, morfología, ultraestructura, integridad de la membrana y contenido energético (Lahnsteiner et al., 1999; Fauvel et al., 2010; Lanes et al., 2010; Montes, 2012) y se espera poder añadir a estos la capacidad antioxidante total.

La crioconservación es un método que contribuye a la reproducción asistida de varias especies de animales (Ramírez et al., 2011), y consiste en un proceso de conservación de células, tejidos y organismos vivos a temperaturas bajo cero, llegando a los -196°C gracias al uso del nitrógeno líquido (Tiersch, 2008). Esta biotecnología reproductiva comprende el congelamiento, almacenamiento criogénico y descongelamiento de la materia viva (Tiersch & Mazik, 2000; Ramírez et al., 2010). Un protocolo de crioconservación tiene como objetivo preservar las células manteniendo su integridad estructural y funcional similar a los no preservados o en fresco (Montes, 2012).

El procedimiento de la crioconservación consiste en transferir exceso de agua del interior de la célula al exterior, donde puede formar hielo. Para que sea exitoso, debe existir un equilibrio en la formación de cristales de hielo dentro de las células, evitando la deshidratación excesiva que provoca daños estructurales, con lo cual se aportaron unos pasos básicos a tener en cuenta: 1) recolección y dilución de espermatozoides, 2) almacenamiento refrigerado (no congelado) y envío de muestras, 3) examen de la calidad de los espermatozoides por microscopio, 4) adición de crioprotectores, 5) embalaje de las muestras, 6) congelación, 7) procedimientos de almacenamiento congelado, 8) descongelación, 9) uso para fertilización, y 10) producción de etapas iniciales de la vida para evaluar el éxito de la crioconservación (Tiersch, 2008).

La crioconservación seminal de peces en nitrógeno líquido se ha logrado para muchas especies de peces (Chen et al., 2004; Lim & Le, 2013), pero el procedimiento varía según la especie, ya sea por la composición del diluyente, la concentración de crioprotectores (que pueden ser tóxicos en altas concentraciones) y los métodos de congelación, siendo factores clave para la crioconservación exitosa de los espermatozoides (Lim & Le, 2013, Pardo et al., 2015). De acuerdo con varios reportes (Kutluyer et al., 2014; Lim & Le, 2013), se produce daño morfológico en los espermatozoides durante la congelación-descongelación (Lahnsteiner et al., 2000; Chen et al., 2004; Martínez & pardo, 2010; Lim & Le, 2013). Afectando diferentes estructuras como: la membrana celular, la estructura de las mitocondrias, cromatina y axonema (Montes, 2012), debido a que se presentan cuatro períodos críticos que Cloud y Patton (2008), denominaron como: 1) enfriamiento de las células hasta el punto de formación de hielo, 2) la formación de hielo asociado al calor de fusión (hielo exterior), 3) el enfriamiento a través del período crítico (-10 a -40 ° C), donde el movimiento del agua fuera de las células causa un aumento en la concentración intracelular de sales, y 4) la reducción de la temperatura del nitrógeno líquido (Montes, 2012). Se puede agregar que un quinto paso crítico sería la descongelación la cual se hace a 37°C que de manera inadecuada puede afectar estructuralmente las células y disminuyendo la calidad del semen (Fauvel et al., 1998).

5.6 Capacidad Antioxidante (CAntiOx)

Una vez que las células reproductivas se encuentran en un ambiente externo se enfrentan a múltiples factores adversos para poder conservarse, entre estos las especies reactivas de oxígeno (EROs) y que llevan a la reducción de su capacidad antioxidante (la suma de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), lo cual produce una condición denominada “estrés-oxidativo” (Tatone et al., 2010; Tvrdá et al., 2011). Las EROs tienen varios orígenes, el principal, debido a la producción de energía química, es la mitocondria (procesos normales oxidativos del metabolismo) y factores exógenos (ionización, contaminación, estrés). El superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (tanto orgánico

como inorgánico), así como los oxiradicales (O_2 singular y doble), son algunos ejemplos de EROs (Macedo Márquez, 2012; Cabrera et al., 2015).

Se ha investigado y se ha llegado a observar, que las especies reactivas de oxígeno y la disminución de las defensas antioxidantes, inducen daños en los ácidos nucleicos, proteínas y los lípidos presentes en las membranas de los espermatozoides, además de causar disminución en la movilidad, viabilidad y alteraciones en la pieza intermedia, que finalmente llegan a producir cambios funcionales en las células espermáticas (Koca et al., 2003; Agarwal A. 2003; Rodríguez, E., et al., 2011)

La crioconservación incrementa la condición de estrés oxidativo celular tanto por la congelación como por la descongelación, en donde se produce la peroxidación lipídica, esto lleva a consecuencias nocivas en las membranas de los espermatozoides y fragmentación del ADN, afectando la fertilidad (Tvrdá et al., 2011; Lançonni et al., 2015). Por ello, se ha concluido que el espermatozoide es sensible al ataque oxidativo, debido a los bajos niveles de protectores oxidativos (Sikka, 2004); en estudios realizados en teleósteos como la *Perca fluviatilis*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss* entre otros, se ha encontrado que el ácido úrico es el principal antioxidante seminal (Ciereszko et al., 1999; Mahfouz et al., 2009; Lahnsteiner et al., 2011; Słowi ska et al., 2013), sin embargo, no es el único componente antioxidante, en el plasma seminal, también se pueden encontrar enzimas y metabolitos tanto del plasma como del espermatozoide tales como la catalasa, glutatión reductasa, metionina sulfóxido reductasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, que cumplen con el papel de antioxidante al igual que el ácido ascórbico, glutatión, metionina, tirosina, taurina, alfa-tocoferol carotenoides y ácido úrico (Lahnsteiner et al., 2010; Lahnsteiner et al., 2011; Tvrdá et al., 2011; Lahnsteiner et al., 2010; Słowi ska et al., 2013; Patricio et al., 2016).

5.7 Fundamento de la Capacidad Antioxidante Total

De acuerdo a Ansaldo (2001), en que el daño causado por radicales libres a un tejido, tanto como la degradación de moléculas biológicas, es proporcional a la

concentración en el estado estacionario de los radicales libres en el sitio donde se produce el evento. La concentración en el estado estacionario de los radicales libres (R_{ee}) está, generalmente, determinada por reacciones químicas o procesos de difusión, de manera tal que:

$$R_{ee}=R_p/k$$

donde R_p es la tasa de incorporación de radicales libres en el volumen considerado (tanto en procesos químicos o de difusión) y k es la constante de pseudoprimer orden en todos los procesos que comprenden la remoción del radical (Ansaldo, 2001). Lo que quiere decir que la concentración del reactante en la solución, no cambia a medida que transcurre la reacción para cinéticas de primer orden (Moreno Cárcamo, 2017), explicándolo mejor, si en una reacción hay exceso de uno de los reactantes, de forma tal que su concentración no cambia apreciablemente a medida que transcurre el tiempo, la investigación cinética no revelará dependencia alguna de rapidez respecto a la concentración de esa sustancia (Moreno Cárcamo, 2017).

Los organismos aerobios han desarrollado una serie de estrategias para lograr disminuir R_p mediante antioxidantes preventivos; o para aumentar k por medio de atrapadores de radicales libres y así controlar el daño asociado a estos ERO's (Ansaldo, 2001).

Los radicales libres cuando están en presencia de un antioxidante, dejan de actuar hasta que este es consumido totalmente, lo que implica que el valor de k en presencia del atrapador es tan alto que la concentración en el estado estacionario de los radicales libres resulta muy baja y la tasa de desarrollo de los procesos observados, mediados por estas especies, será despreciable. En presencia del atrapador, el proceso presenta un tiempo de inducción. El tiempo de inducción (t), es el tiempo requerido para consumir todos los antioxidantes. Si se asume que todos los radicales son atrapados y que un antioxidante dado (XH)_i es capaz de atrapar n_i radicales (Ansaldo, 2001), entonces:

$$t = n_i (XH)_i / R_p$$

La capacidad antioxidante total de la muestra (TRAP) es la concentración de radicales libres que pueden ser atrapados en la muestra. La relación expresada en la ecuación anterior implica:

$$TRAP = n_i (XH)_i = t_{\text{muestra}} R_p$$

y que su valor puede ser calculado a partir de la medición del tiempo de inducción si se conoce la tasa de producción del radical. Un procedimiento alternativo involucra el uso de un inhibidor de referencia cuyo comportamiento es conocido. Generalmente se utiliza como inhibidor de referencia un compuesto hidrosoluble denominado Trolox, de características estructurales similares a las de la vitamina E (Ansaldó, 2001; Londoño, 2012). El tiempo de inducción producido por la adición de Trolox está dado por:

$$t_{\text{Trolox}} = n_{\text{Trolox}} (\text{Trolox}) / R_p$$

donde n_{Trolox} es el número de radicales libres atrapados por cada molécula de Trolox consumida. Si (t') es el tiempo de inducción producto de una concentración de Trolox 1 mM, el TRAP de la muestra puede ser determinado por la medida del tiempo de inducción (t) producto de una alícuota (unos pocos microlitros) del fluido y aquel (t') obtenido empleando concentraciones conocidas del inhibidor de referencia (Ansaldó, 2001; Londoño, 2012)

$$TRAP \text{ (mM)} = f n_{\text{Trolox}} t/t'$$

Donde (f) es el factor de dilución, que es igual a la razón entre el volumen de la muestra y el volumen de la alícuota del fluido empleado para la evaluación de t .

El TRAP, así obtenido, es la medida del contenido total de antioxidantes presente en el fluido. En fluidos complejos es casi imposible medir con certeza si los resultados comprenden a todos los antioxidantes relevantes presentes (Ansaldó, 2001; Londoño, 2012).

5.8 Método ABTS para la medición de Capacidad Antioxidante Total

El Método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), fue reportado inicialmente por Miller y colaboradores (1993), y es fundamentado en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión cromógeno $ABTS^{\bullet+}$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Tvrdá et al., 2011; Londoño, 2012).

Entre las ventajas de este método está que los valores de TEAC es que puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que el $ABTS^{\bullet+}$ es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Entre las desventajas están que el $ABTS^{\bullet+}$ debe ser generado previamente, que no es un radical fisiológico y que la cinética de reacción con algunos antioxidantes suele ser bastante lenta y, por lo tanto, el punto final de medición debe fijarse de una manera arbitraria (Londoño, 2012).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación y Características agroclimatológicas.

El experimento se llevó a cabo en el Departamento del Meta, en la ciudad de Villavicencio ubicada en el piedemonte de la Cordillera Oriental, al Noroccidente del Departamento, en la margen izquierda del Río Guatiquía, específicamente en la Universidad de los Llanos que se encuentra en la Vereda Barcelona, en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción de Peces del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL). La altura promedio de esta ciudad es de 467msnm, y su temperatura varía de los 28 a los 30°C en donde tienen los machos reproductores en estanques con condiciones de temperatura promedio de 28°C, con una humedad relativa que va desde los 62 a 72%.

6.2 Animales e instalaciones.

La población evaluada en este estudio estaba conformada por 6 machos reproductores de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), los cuales son provenientes del plantel de reproductores de la estación piscícola de la universidad de los llanos, donde se capturaron empleando una malla de arrastre, para así poder sacarlos y aislarlos en dos tanques de cemento de 2.5 m de diámetro, encontrados en las instalaciones del IALL en la Universidad de los Llanos (Figura 1), estos animales fueron escogidos al azar, siendo adultos maduros con un peso promedio de 4.08kg, luego se marcaron con chaquiras de colores en la aleta dorsal y así se pudieron identificar. El manejo que se le dio al semen recolectado y evaluado fue en el Laboratorio de Reproducción y Crioconservación de Peces del IALL, donde se les realizó un análisis de calidad seminal. La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), sede Bogotá (Unidad Académica El Remanso).



Figura 1. Selección de animales y aislamiento. **A.** Estanques donde se encuentran los ejemplares. **B.** Tanques de cemento para aislar los machos experimentales. **C.** primer grupo de machos aislados. **D.** Segundo grupo de machos aislados. **E.** Instalaciones del IALL

6.3 Tratamientos y diseño experimental.

Se evaluaron siete tiempos posteriores a la obtención del semen (cuatro en semen fresco y tres en semen crioconservado), proveniente de seis individuos ($n=6$), evaluándose 4 variables (pH, movilidad, duración de la movilidad y capacidad antioxidante). Los tiempos en que se evaluaron fueron: 0, 15, 30, 60 minutos en semen fresco y 24 horas, un (1) mes y seis (6) meses en crioconservado (7 momentos en total). En donde para el proceso de crioconservación se utilizó un diluyente (Figura 2) con DMSO (10%), yema de huevo (12%) y glucosa (5.5%), manteniendo una relación de 1:4 (semen:diluyente), según protocolo de Ramírez et al.(2011).

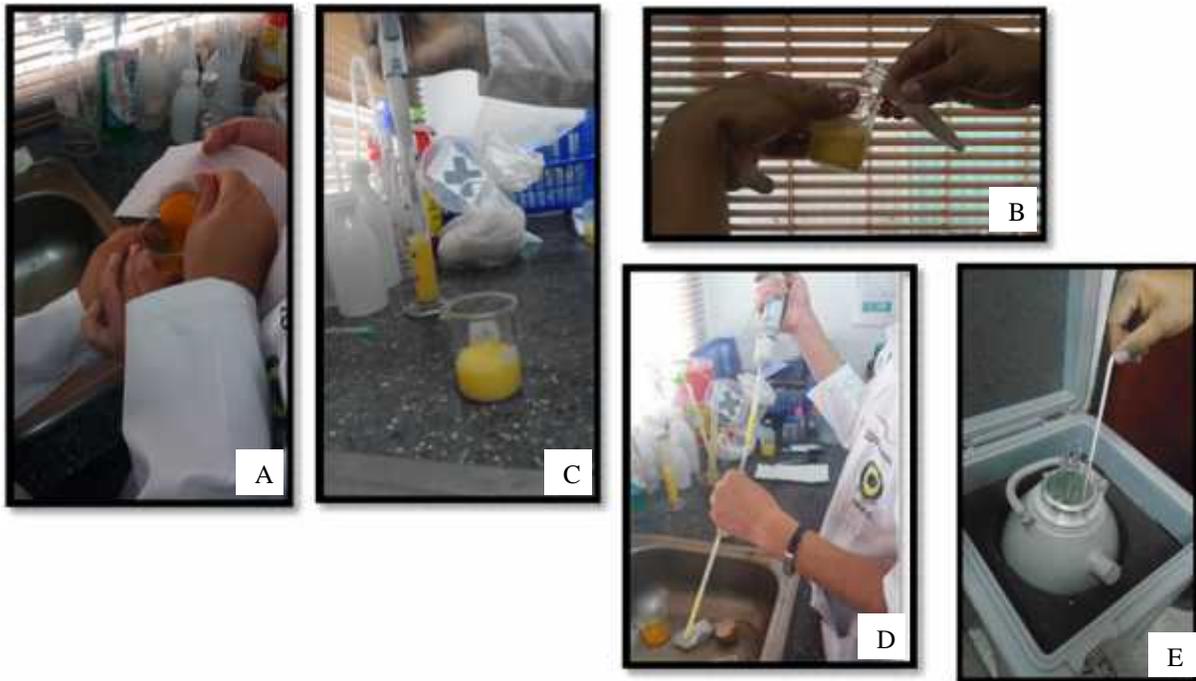


Figura 2. Preparación para la crioconservación del semen. **A.** Extracción de yema de huevo. **B.** vertiendo semen en diluyente. **C.** Tomando muestra para pajilla. **D.** agregando dilución en pajilla correspondiente. **E.** congelación de pajillas (-197°C)

6.4 Manejo de los animales

La inducción hormonal se realizó con extracto de pituitaria de carpa (EPC), a una dosis de 4 mg.kg^{-1} de peso vivo, la cual se suministró a través de inyección intramuscular caudal de la primera aleta dorsal (Figura 3). La colecta seminal se realizó a las 18 horas pos-inducción, para lo cual, los animales se tranquilizaron con 2-fenoxietanol a una concentración de 300 ppm, cada animal se llevó a una mesa de trabajo donde se limpió y secó la papila genital. Para provocar la espermiación se realizó un masaje cráneo-caudal de la pared de la cavidad celómica, el semen obtenido se recolectó en tubos aforados previamente esterilizados (Figura 4), llevando la muestra inmediatamente para su análisis en el laboratorio.



Figura 3. Inducción hormonal. **A.** Preparación de la Hormona EPC. **B.** Alistando hormona correspondiente a cada macho. **C.** Captura de los ejemplares aislados. **D.** Aplicación de la hormona intramuscular.



Figura 4. Espermiación de los machos seleccionados. **A.** Captura de animales aislados. **B.** Animal sedado con fenoxietanol (300ppm). **C.** masaje cráneo-caudal para extracción seminal. **D.** Obtención y recolección del semen. **E.** Semen en tubo aforado para posterior análisis.

6.5 Parámetros de evaluación.

En el laboratorio, el pH se determinó por medio de tiras indicadoras de pH universal (MColorpHast™ /Merck/Germany), con rango de medida entre 0 y 14 unidades, las cuales fueron sumergidas en la muestra de semen fresco durante 5 segundos y leídas inmediatamente (Figura 5).

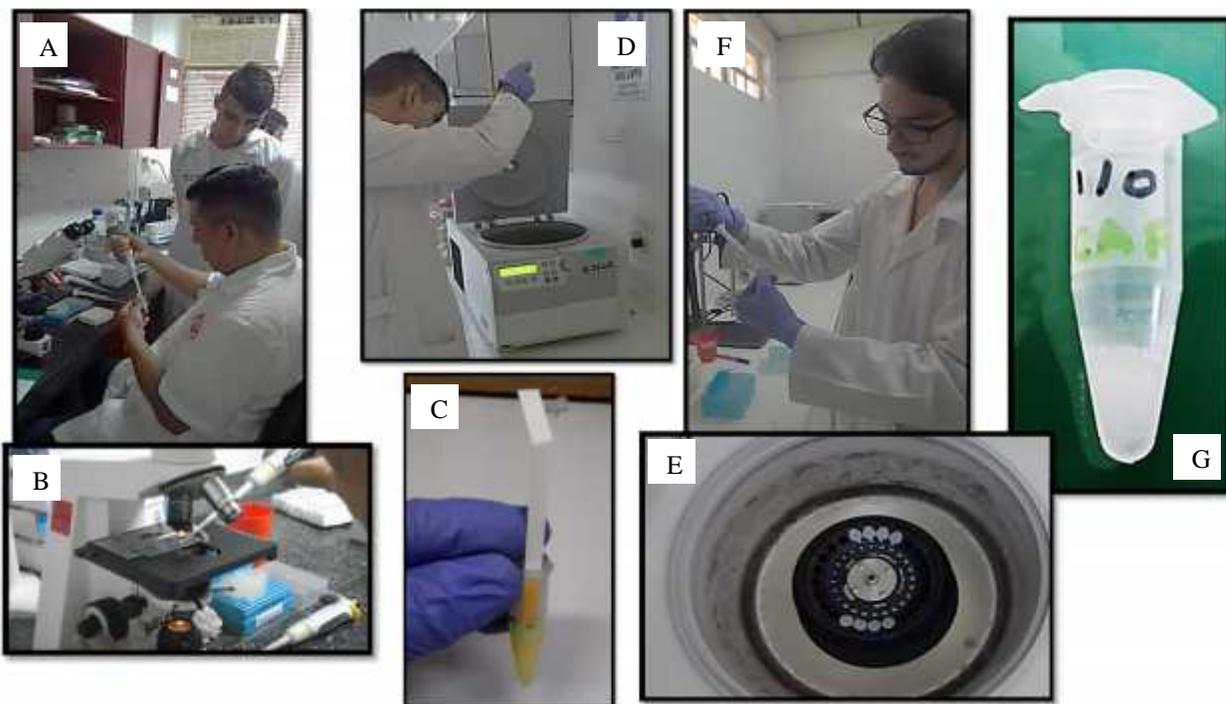


Figura 5. Muestreo y evaluación de calidad seminal. **A.** Toma de muestra seminal para su evaluación. **B.** Activando esperma para evaluar su calidad. **C.** Análisis de pH de muestra seminal. **D.** Preparación de muestra para centrifuga refrigerada. **E.** Muestra centrifugada. **F.** Extracción de plasma de muestra centrifugada. **G.** Plasma seminal para su posterior congelación y análisis de CAntiOx.

Esta medida se tomó durante 4 tiempos (tiempo 0, 15, 30 y 60 min.) en semen fresco y 24 horas, un (1) mes y seis (6) meses en crioconservado. La movilidad

masal, definida como el porcentaje de espermatozoides móviles en la muestra y la duración de la motilidad (TA), definido como el tiempo en segundos (s), transcurrido entre la adición de la solución activadora hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides deja de moverse; fueron determinados a través de la valoración de una muestra de 20 μ L de semen fresco de cada animal, el cual fue activado con 180 μ L agua destilada (1:10) sobre una lámina excavada (1,0-1,2 mm de profundidad, Micro-Slides Premiere, China) y observada mediante un microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) (Figura 5). Con respecto a esto se consideraron óptimas para el procedimiento de crioconservación aquellas muestras que presentaron una movilidad masal mayor al 80%.

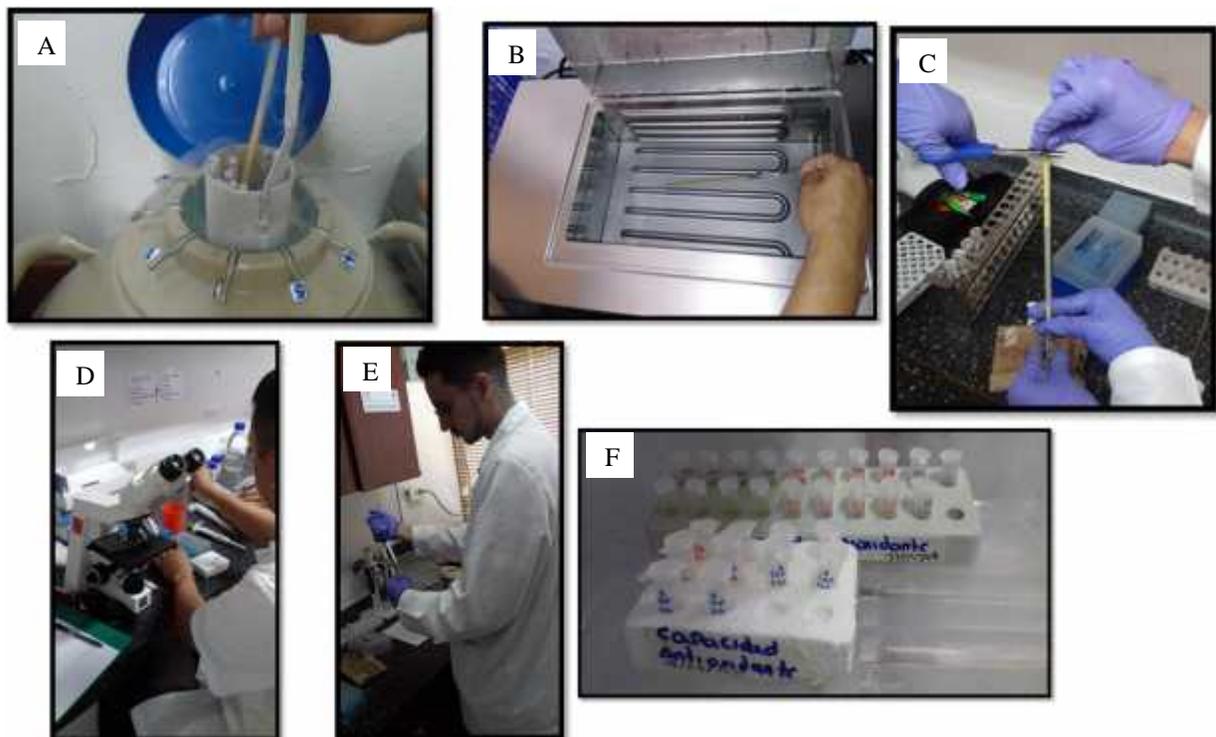


Figura 6. Evaluación de calidad seminal en semen crioconservado. **A.** Selección de pajilla a descongelar. **B.** Descongelamiento de pajilla. **C.** Corte de pajilla y vertida sobre tubo aforado. **D.** Evaluación seminal del esperma de la pajilla. **E.** Extracción de plasma de muestra centrifugada. **F.** Congelación de muestras para análisis de CAntiOx.

También en tiempo cero, se empleó una micropipeta (Fisherbrand Finnpipette II – Finlandia) para tomar 250 μ L de semen y depositarlo en tubos de reacción (Ependorff®), para cada uno de los cuatro tiempos (0, 15, 30, 60 min.), sumando

así 1 ml de muestra por cada animal, luego de tener la muestra en el tubo de reacción, se llevó a la centrifuga refrigerada (HERMLE Z326K / Alemania) a 4°C por 5 minutos a 14000 g. Finalizado este tiempo, se extrajo el plasma seminal con la micropipeta poniéndolo en otro tubo de reacción, el cual se llevó a congelación (-20°C) hasta el análisis de capacidad antioxidante (Figura 5).

Para el semen crioconservado se realizó la evaluación a partir de las 24 horas posteriores a la crioconservación en cada animal, descongelando una pajilla por individuo para cada tiempo (n=6) a 36°C por 60 segundos en baño de agua (Figura 6). Se evaluó de igual modo el pH, duración de la movilidad, movilidad y se llevó una muestra de 250µL a centrifuga refrigerada (4°C) a 18000 gravedades por 5 minutos para separar el sobrenadante, el cual se extrajo con una micropipeta y se llevó a congelación en otro tubo de reacción (Figura 6). De igual manera, se evaluó la capacidad antioxidante de estas muestras. Este procedimiento se realizó de igual modo al mes y a los seis meses de la crioconservación de las pajillas en cada macho.

Las muestras de plasma seminal obtenidas por centrifugación del semen fresco y crioconservado en cada tiempo de evaluación, se les realizó el análisis de CAntiOx en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), sede Bogotá (Unidad Académica El Remanso). Empleando el equipo para pruebas ELISA (BioRad Model 680 microplate reader / California EEUU) y utilizando el kit para ensayo de capacidad antioxidante (Total Antioxidant Capacity Assay Kit, Sigma-Aldrich®, Catalog Number: MAK187) siguiendo el protocolo del catálogo (Figura 7).



Figura 7. Flujograma del procedimiento de evaluación de la capacidad antioxidante total, según el protocolo de Sigma-Aldrich

El kit de CAntiOx Sigma® estaba compuesto por: Tampón de ensayo, solución stop o de parada (Sln. S3446), mioglobina del corazón de caballo, (±) -6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano- Ácido 2-carboxílico (Trolox), 2,2 ϕ -azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), Tampón de fosfato y citrato, (pH 5), peróxido de hidrógeno (3%). La preparación del kit consistió en diluir el tampón de ensayo 1 en 10; la solución madre de mioglobina de corazón de caballo se reconstituyó 2,85 μ l en 1 mg o lo equivalente a un vial, y posteriormente se agitó manualmente, para después hacer la solución de trabajo de mioglobina, la cual se hizo diluyendo 1 μ l de la solución madre de mioglobina en 99 μ l de tampón de ensayo; el Trolox se reconstituyó en 2,67 μ l de tampón de ensayo preparado anteriormente y se agitó hasta diluir, esto en el vial (1 mg); la solución sustrato de trabajo ABTS se preparó agregando una tableta de tampón fosfato-citrato en 100 ml, se agitó hasta disolverse, luego se extrajo 10 ml de la mezcla para cada 25 μ l de peróxido de hidrógeno 3%, después de agregar el peróxido se debe usar dentro de los siguientes 20-30 minutos, por lo cual se agregó poco antes de hacer la mezcla en los pozos de la placa; todas las disoluciones y reconstituciones no

especificadas se realizaron con agua milliQ en reemplazo del agua ultrapura que se específica en el kit.

Para la evaluación en la máquina de ELISA por medio de espectrofotometría (405nm), se usó una placa de 96 pozos, en las cuales se realizó primero la estandarización siguiendo el protocolo (Figura 7), de la prueba para verificar que si estuviese bien preparado el kit y poder comparar con las muestras de semen de los especímenes; la preparación de las muestras en los pozos consistió en agregar 10 μ l de la muestra, 20 μ l de solución de trabajo de mioglobina, 150 μ l de solución sustrato de trabajo ABTS, inmediatamente se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y final se adicionaron 100 μ l de solución stop para tener una alícuota final de 280 μ l por pozo, esa misma cantidad se agregó en los pozos “blanco” pero de agua milliQ, para posteriormente hacer su lectura a 405nm y así poder realizar los cálculos de la CAntiOx en unidades Trolox (mM). Este procedimiento se realizó dos veces considerando que una placa tiene 96 pozos y que en cada placa se ubicaron las muestras de hasta tres animales por duplicado y separados por pozos blancos para evitar que la luz refractada afecte la lectura de las otras muestras (figura 8).

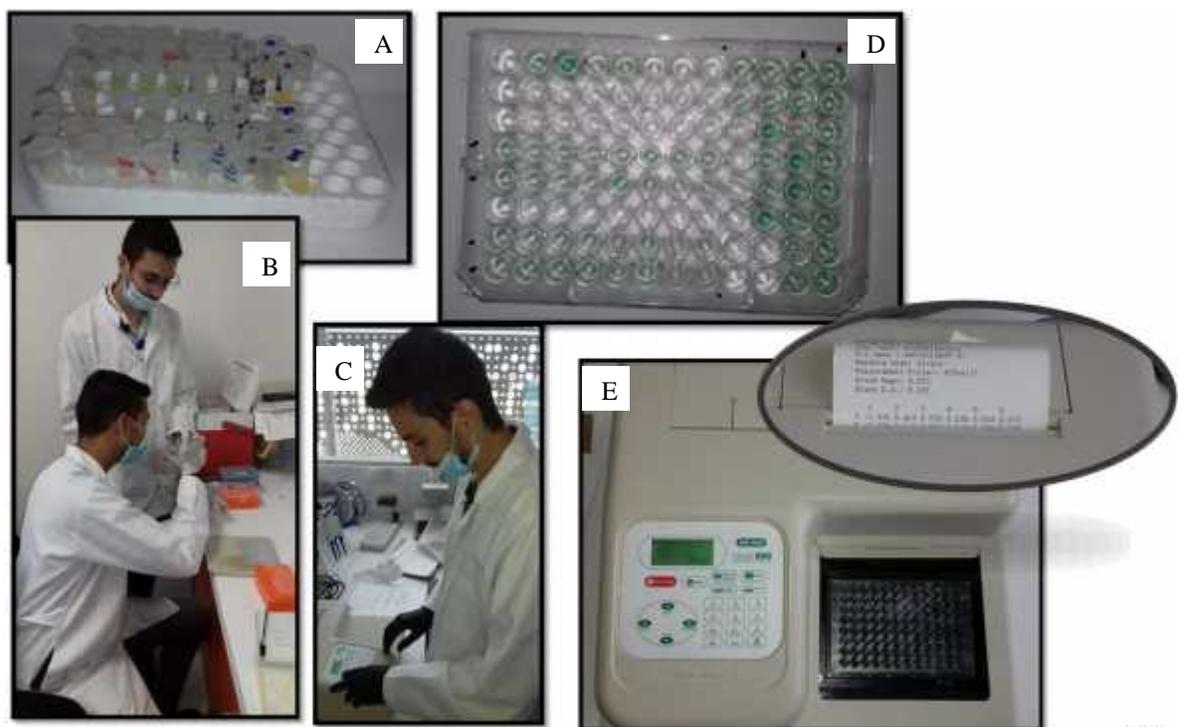


Figura 8. Lectura de las muestras de plasma seminal. **A.** Separación de muestras para realizar lectura. **B.** Reconstitución de químicos y estandarización del equipo. **C.** Ajustando parámetros de lectura de punto final (Abs; 405nm). **D.** Preparación de primera placa para realizar lectura. **E.** placa puesta en máquina de lectura e impresión de resultados obtenidos en absorbancia.

6.6 Análisis Estadístico.

Los datos son descritos como media \pm desviación estándar de la media. Posteriormente, para analizar los efectos de los tratamientos sobre las variables pH, % movilidad, duración de la motilidad y capacidad antioxidante, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), de una vía verificando previamente los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianzas (Fligner-Killeen). Se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias entre los diferentes tratamientos, como prueba a posteriori de los datos que resultaron con significancia. Para los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad se realizó una prueba no paramétrica análoga al ANOVA (Kruskal Wallis), para todos los análisis, se asumieron niveles de significancia del 95% ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa de RStudio usando los paquetes R (ver. 3.6.1). Las gráficas fueron realizadas usando el programa GraphPad Prism 8 (ver. 8.3.0)

7. RESULTADOS

El diseño experimental se puede ver en la Tabla 1, junto con el resumen de los datos obtenidos en laboratorio. Los resultados generales sobre los peces evaluados se pueden ver en la Tabla 2, donde se anotó, su peso (kg), el volumen obtenido (ml), el color del semen, movilidad (%) y duración de la movilidad (s); el peso del animal se tomó con el fin de inducir hormonalmente a los peces con la dosis exacta para cada animal.

Tabla 1. Diseño experimental mono factorial, completamente al azar con medidas en el tiempo

TIEMPO	MOMENTOS	DISEÑO EXPERIMENTAL						
		VARIABLES	SEMEN FRESCO					
			REPLICAS					
			BLANCO	VERDE	NARANJA	NEGRO	AZUL	AMARILLO
Min 0	M1	Duración movilidad (S)	57	49	51	57	48	43
		Movilidad (%)	95	95	95	95	95	95
		pH	9	9	8	8	9	8
		CAntiOx (mM de Trolox)	0,2399	0,2239	0,3050	0,5574	0,6264	0,3825
Min 15	M2	Duración movilidad (S)	60	52	44	60	48	43
		Movilidad (%)	95	95	95	95	95	95
		pH	9	9	8	8	9	8
		CAntiOx (mM de Trolox)	0,3786	0,1904	0,2395	0,5738	0,5652	0,3837
Min 30	M3	Duración movilidad (S)	53	45	43	56	41	41
		Movilidad (%)	95	95	95	90	90	90
		pH	9	9	8	8	9	8
		CAntiOx (mM de Trolox)	0,2356	0,2917	0,4008	0,5718	0,5169	0,2719

Min 60	M4	Duración movilidad (S)	43	42	40	52	35	42
		Movilidad (%)	95	90	90	80	90	80
		pH	9	9	8	8	9	8
		CAntiOx (mM de Trolox)	0,3058	0,262 1	0,2707	0,6022	0,5239	0,4861

SEMEN CRIOCONSERVADO

TIEMPO	MOMENTOS	VARIABLES	REPLICAS					
			BLANCO	VERDE	NARANJA	NEGRO	AZUL	AMARILLO
1 DÍA	M5	Duración movilidad (S)	76	83	61	53	66	61
		Movilidad (%)	60	70	50	50	60	70
		Ph	7	7	7	7	7	7
		CAntiOx (mM de Trolox)	0,81 63	1,1311	0,9160	2,1736	2,20 48	0,6651
30 DÍAS	M6	Duración movilidad (S)	48	63	49	31	36	49
		Movilidad (%)	50	60	60	40	40	60
		pH	7	7	7	7	7	7
		CAntiOx (mM de Trolox)	0,52 80	1,0485	0,5404	2,3107	2,01 46	1,4412
183 DÍAS	M7	Duración movilidad (S)	69	55	63	40	47	57
		Movilidad (%)	50	60	60	35	40	60
		pH	7	7	7	7	7	7
		CAntiOx (mM de Trolox)	0,76 02	0,7586	0,4204	2,3326	1,93 52	1,4521

Tabla 2. Datos generales de los animales y muestras seminales

ID del animal	Peso del animal (kg)	Volumen Plasma (ml)	Color	Movilidad (%)	Duración de la motilidad (s)
Blanco	4	10	Blanco lechoso	95	57

Verde	4,3	11	Blanco lechoso	95	49
Naranja	4	10	Blanco lechoso	95	51
Negro	4,2	6,5	Blanco lechoso	95	57
Azul	4,1	13,8	Blanco lechoso	95	48
Amarillo	4,3	8,4	Blanco lechoso	95	43
Promedio	4,09	9,81		95	52,4

Tabla 3. Calidad seminal y capacidad antioxidante (CAntiOX) en semen fresco y crioconservado de *P. brachypomus*. Valores mostrados como media \pm SD. n=6

Variable	Semen Fresco			
	min 0	min 15	min 30	min 60
Movilidad (%)	95,0 \pm 0,0 ^a	95,0 \pm 0,0 ^a	93,33 \pm 2,58 ^a	87,50 \pm 6,12 ^b
Duración de la movilidad (S)	50,83 \pm 5,46 ^a	51,17 \pm 7,55 ^a	46,50 \pm 6,44 ^a	42,33 \pm 5,54 ^a
pH	8,50 \pm 0,55 ^a			
CAntOx. (mM de Trolox)	0,3892 \pm 0,17 ^a	0,3885 \pm 0,16 ^a	0,3815 \pm 0,14 ^a	0,4085 \pm 0,15 ^a
Variable	Semen Crioconservado			
	Control	24 horas	1 mes	6 meses
Movilidad (%)	95,0 \pm 0,0 ^b	60,00 \pm 8,94 ^a	51,67 \pm 9,83 ^a	50,83 \pm 11,14 ^a
Duración de la movilidad (S)	50,83 \pm 5,46 ^{ab}	66,67 \pm 11,0 ^b	46,00 \pm 11,28 ^a	55,17 \pm 10,52 ^{ab}
pH	8,50 \pm 0,55 ^a	7,00 \pm 0,0 ^b	7,00 \pm 0,0 ^b	7,00 \pm 0,0 ^b
CAntOx. (mM de Trolox)	0,3892 \pm 0,17 ^a	1,3178 \pm 0,69 ^a	1,3139 \pm 0,75 ^a	1,2765 \pm 0,75 ^a

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

A estos datos antes de realizar un análisis estadístico de las varianzas, se aplicó estadística descriptiva en las cuatro variables, como se aprecia en la Tabla 3, por la clasificación de tiempo, en donde se puede decir, que el mayor porcentaje de movilidad lo tiene la categoría de semen fresco en los tiempos del minuto 0 y a los

15 minutos ($95 \pm 0,0\%$); en contra parte, se observa que el porcentaje de movilidad a los 6 meses de crioconservado es el más bajo ($50,83 \pm 11,14\%$).

Para la variable de duración de la movilidad en esta clasificación por tiempo, la media estadística más alta se dio en el semen crioconservado a 24 horas ($66,67 \pm 11,0$ S) y la menor duración de la movilidad ocurren en el minuto 60 en semen fresco ($42,33 \pm 5,54$ S). Continuando con la variable de pH, se puede ver que los rangos de este fueron similares para semen fresco en sus cuatro tiempos ($\text{pH} = 8,5 \pm 0,55$), y en el semen crioconservado se observa lo mismo, pero en este se registra los niveles de pH más bajos ($\text{pH} = 7 \pm 0,0$).

En la capacidad antioxidante se puede apreciar que en el semen fresco la menor CAntiOx se aprecia en el minuto 30 ($0,3815 \pm 0,14$ mM de Trolox) aunque no hubo diferencias estadísticas con los otros datos en fresco, en el semen crioconservado tampoco hay diferencias estadísticas, pero a las 24 horas de crioconservado se observa la mayor CAntiOx ($1,3178 \pm 0,69$ mM de Trolox).

Tabla 4. Resultado de normalidad por Shapiro-Wilks

Variable	Semen fresco		
	W	p-Valor	Significancia
Movilidad (%)	0,57276	3,11E-07	**
Duración de la movilidad (S)	0,94023	0,165	NS
pH	0,63954	1,76E-06	**
CAntiOx (mM de Trolox)	0,89739	0,01895	**
Variable	Semen Crioconservado		
	W	p-Valor	Significancia
Movilidad (%)	0,88505	0,02632	*
Duración de la movilidad (S)	0,98724	0,9934	NS
pH	0,24394	5,28E-09	**
CAntiOx (mM de Trolox)	0,88279	0,02402	*

NS. Datos no significativos o Normales.

* los datos son medianamente significativos o no son Normales.

** los datos son significativos o no son Normales.

A estos resultados se les realizó una prueba de normalidad por Shapiro-Wilks siendo este método más sensible cuando se tratan de procesar datos menores a 50; esta prueba de normalidad informa que se acepta la hipótesis nula de que los datos son normales, para el caso de los resultados de duración de la movilidad en semen fresco ($p= 0,165$) y crioconservado ($p= 0,9934$), mientras que para las otras tres variables en semen fresco y en crioconservado: CAntiOx ($p= 0,0189$; $p= 0,02402$, Resp.), movilidad ($p= 0,00000031$; $p= 0,02632$, Resp.) y pH ($p= 0,0000018$; $p= 0,0000000528$, Resp.), se rechaza la hipótesis nula, por lo cual se debe de aceptar la hipótesis alternativa de que los datos no son normales (Tabla 4).

Tabla 5. Resumen de homogeneidad de varianzas por Fligner-Killeen.

Variable	Semen fresco		
	X ²	p-Valor	Significancia
Movilidad (%)	7,0481	0,07038	NS
Duración de la movilidad (S)	2,1148	0,5489	NS
Ph	Inf.	<0,001	**
CAntiOx (mM de Trolox)	0,22144	0,9741	NS
Variable	Semen Crioconservado		
	X ²	p-Valor	Significancia
Movilidad (%)	2,0269	0,5668	NS
Duración de la movilidad (S)	2,0703	0,5579	NS
pH	Inf.	<0,001	**
CAntiOx (mM de Trolox)	2,134	0,5451	NS

NS. Significa que los datos no son significativos o son homogéneos.

** los datos son significativos o no son homogéneos

Debido a lo anterior, se realizó un análisis de homocedasticidad de las varianzas de estos datos para confirmar si se puede realizar el análisis de varianza, empleando el método de Fligner-Killeen (Tabla 5), tanto en los datos de semen fresco como en los de crioconservado; y según la Tabla 5 se observa que se acepta la hipótesis nula de que los datos si son homogéneos o las varianzas son iguales y se puede proceder a realizar un ANOVA de una vía, pues además los datos son independientes. Para la variable de pH no se le debe de realizar una prueba paramétrica pues no cumple con los supuestos, y se debe de proceder a

realizar una prueba no paramétrica, en este caso una prueba de Kruskal Wallis siendo análoga al ANOVA de una vía.

Tabla 6. Resultados del ANOVA y Kruskal Wallis

Semen Fresco				
Variable	GL	CM	P-Valor	Significancia
Movilidad (%) ²	3	76,04	0,00228	**
Duración de la movilidad (S) ²	3	104,15	0,0789	NS
pH ¹	3	--	>0,999	NS
CAntiOx (mM de Trolox) ²	3	0,000805	0,991	NS
Semen Crioconservado				
Variable	GL	CM	P-Valor	Significancia
Movilidad (%) ²	3	629,3	0,00567	**
Duración de la movilidad (S) ²	3	437,2	0,0370	*
pH ¹	3	--	<0,0001	***
CAntiOx (mM de Trolox) ²	3	0,266	0,6903	NS

* Hay diferencia significativa
Kruskal Wallis

1 Datos evaluados con

** Hay diferencias medianamente significativas

2 Datos evaluados con

ANOVA

*** Hay diferencias altamente significativas

NS No hay diferencias significativas

Para los datos de duración de la movilidad, los de capacidad antioxidante y porcentaje de Movilidad, se les realizó un análisis paramétrico, en este caso, un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía (Tabla 6), con el fin de determinar, si existe efecto del tiempo sobre estas variables, en cada una de las condiciones evaluadas. En primer lugar, se realizó un ANOVA para los datos en el semen fresco, y otro para los datos de semen crioconservado con respecto al control. En los datos de semen fresco la movilidad presentó diferencias estadísticas ($p=0,00228$), se puede observar al comparar con una prueba Tukey, que el tiempo a los 60 minutos tiene alta diferencia estadística con el minuto 0 y 15, y una diferencia estadística media con el minuto 30 (Figura 9); para la duración de la

movilidad no hay diferencias estadísticas ($p= 0,0789$), (Figura 10), y para la CAntiOx, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p= 0,991$) en las muestras (Figura 12). En el semen crioconservado la movilidad presenta diferencias medianamente significativas ($p=0,00567$), y significativas para la duración de la movilidad ($p= 0,0370$), la CAntiOx no presenta diferencias significativas ($p= 0,6903$). Al realizar una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis), para pH, se encontró que se tiene que rechazar la hipótesis nula de que las muestras son iguales y aceptar que en las muestras al menos hay dos diferentes ($<0,001$) y en este caso se presenta diferencia del control con respecto a los datos del semen crioconservado (Figura 11), en el caso del pH en el semen fresco se acepta la hipótesis de que los datos son iguales y no hay diferencias significativas ($> 0,999$).

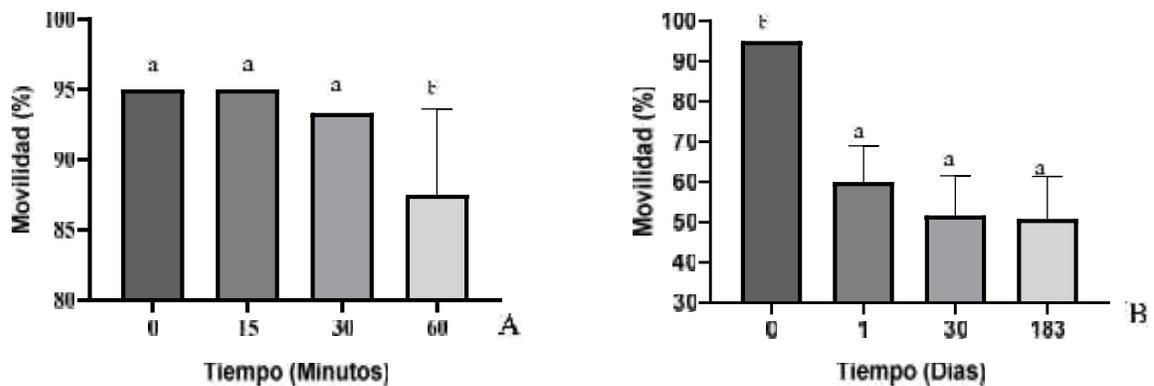


Figura 9. Comparación de las medias de Movilidad (%) en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (B). Tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6

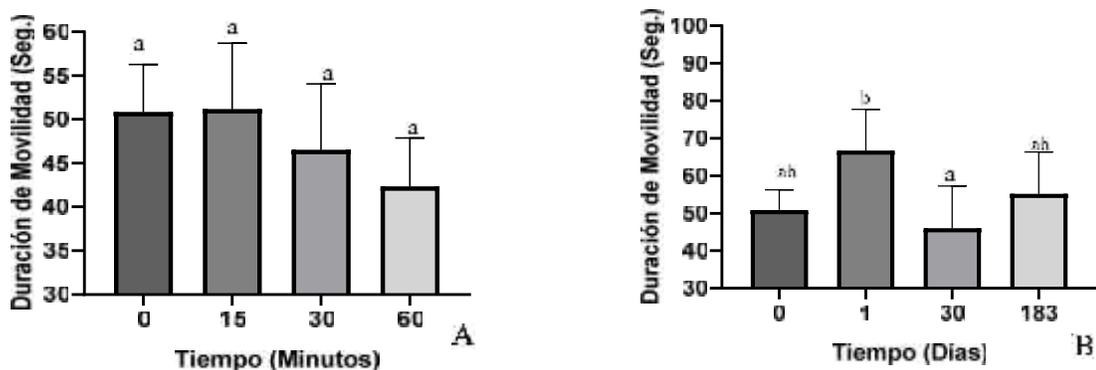


Figura 10. Comparación de las medias de Duración de la movilidad (S) en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (B). Tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6

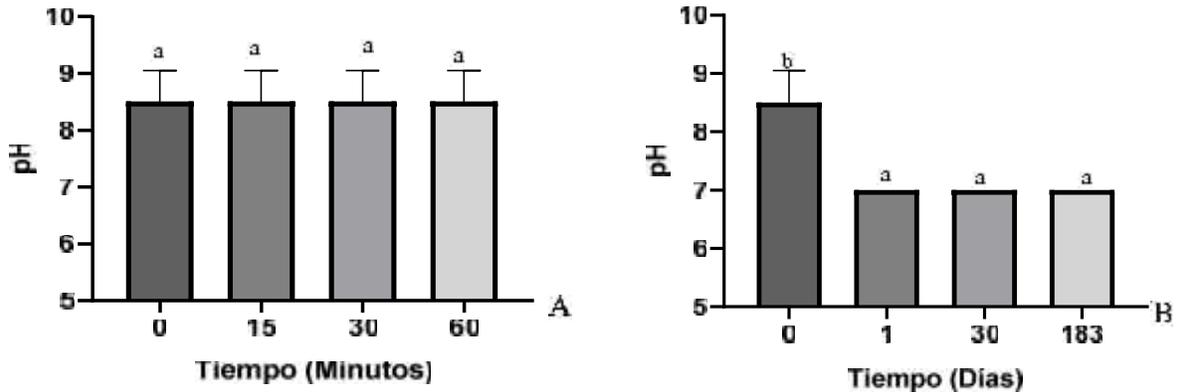


Figura 11. Comparación de las medias de pH en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (B). Tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6

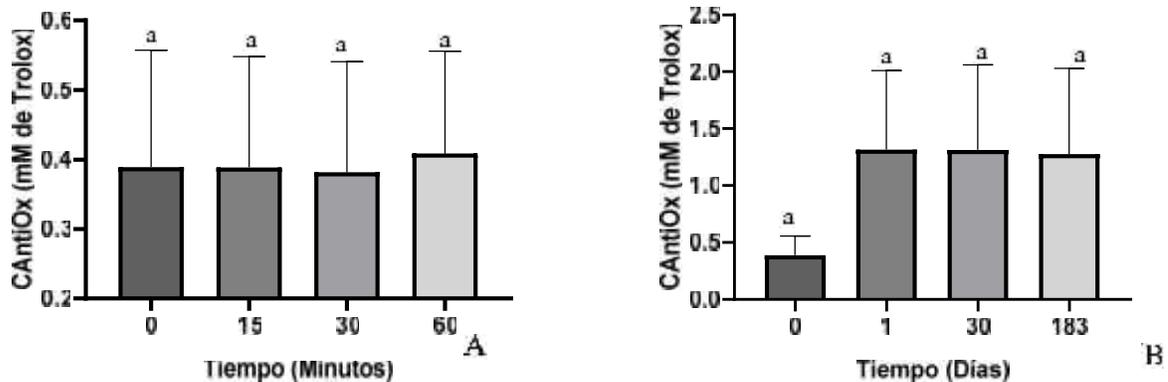


Figura 12. Comparación de las medias de capacidad antioxidante (mM de Trolox) en semen fresco (A) y semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (B). Tiempo cero corresponde a semen fresco (control). Valores expresados como media \pm SD. n=6

8. DISCUSIÓN

Conforme a los resultados, se puede observar un mayor volumen seminal en reproductores inducidos con respecto a los no inducidos hormonalmente, aunque este no afecta la calidad seminal (Fresneda et al., 2004; Nascimento et al., 2010). Los valores de pH hallados en semen fresco, en este experimento son alcalinos y son muy similares a los obtenidos por Fresneda y colaboradores (2004), reportando valores de pH de 8.83 y 8.6 (animales inducidos hormonalmente y no inducidos, respectivamente) en cachama blanca, igualmente Suárez y colaboradores (2019), reportan valores de pH de 8.0 y 8.1 en dos colectas seminales en ejemplares de cachama blanca.

Fresneda y otros (2004), reportaron una duración de la movilidad más alta que la obtenida en el presente estudio tanto en semen fresco (100.6 y 72.64s) como en crioconservado (153.2 y 158.3s con DMSO), pero éste no es un parámetro predictor de la efectividad de la fertilización, pues hay que tener en cuenta el factor de las hembras, ya que estas tienen una gran influencia en la fertilización; además, no especifican el punto final de evaluación de esta característica, lo cual también puede influir en el resultado. También se encontró que Suárez y colaboradores (2019) reportaron una fluctuación de la duración de la movilidad entre 44 y 77s en dos colectas para la cachama blanca teniendo promedios de esta variable más altos (59.1 y 60.7s). Ahora bien, según Melo y Godinho, (2006), la duración de la movilidad tiene un menor tiempo cuando se emplea DMSO al 5 y 10% (41 y 48s.) que al emplearlo al 15%, claro está que es reportado en *Brycon orthotaenia* perteneciente a la misma familia (*Characidae*) que la cachama blanca.

El porcentaje de movilidad del semen crioconservado es considerado un criterio de calidad espermática, que permite medir el éxito o fracaso del proceso de crioconservación (Atencio et al., 2017). Los datos promedio obtenidos en semen fresco en el presente estudio, resultan ser más altos que los reportados por Suárez y colaboradores (2019) en dos colectas seminales (88.6 y 87.4%), igualmente que los datos en fresco reportados por Fresneda y colaboradores

(2004) de animales inducidos hormonalmente y no inducidos (91.2 y 92.5% respectivamente), además, reportaron datos de movilidad espermática en semen crioconservado (80.0 y 80.3%) más altos que los encontrados en el presente estudio, empleando DMSO con glucosa, NaCl y yema de huevo. Aunque está claro que este resultado puede variar entre investigaciones, al hacerlo bajo microscopio óptico de manera subjetiva, en donde Nascimento y colaboradores (2010) presentan resultados medidos subjetivamente en semen crioconservado con DMSO y glucosa o DMSO y BTS, un poco más bajos, al obtenido en el presente estudio (49% y 47% respectivamente) y muy similares (52 y 51% respectivamente) utilizando un analizador de espermatozoides asistido por computadora (CASA siglas en inglés); con respecto a otras especies *Characiformes* la movilidad pos-descongelación del semen, ronda entre el 40 y 50% empleando glucosa con DMSO (Orfão et al., 2011), rango en el cual los resultados del presente estudio han de encontrarse.

Las variables de movilidad y duración de la movilidad pueden presentar cambios, entendiendo que los espermatozoides en los peces adquieren progresivamente el potencial de movilidad por el conducto espermático (Morisawa y Morisawa, 1986; Tabares et al., 2005; Valdebenito et al., 2015), permaneciendo inmóviles en un principio, pues esta actividad flagelar solo se iniciará cuando los espermatozoides entren en contacto con un medio acuoso donde ocurrirá la fertilización (Tabares et al., 2005; Valdebenito et al., 2015). Además, el tiempo de actividad flagelar es breve en la mayoría de las especies y los factores que activan este proceso son diferentes para cada especie. Sin embargo, en casi todas, factores como la osmolaridad, temperatura, pH y composición iónica tienen una función clave en activar o modelar la actividad flagelar (Valdebenito et al., 2009), estos factores han de interactuar entre ellos generando una respuesta ya sea positiva o negativa (Tabares et al., 2005) y esta interacción es muy importante para que se dé la activación fisiológica de los espermatozoides.

Siendo más específicos, al momento de la espermiación hay iones en el medio como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} que pueden neutralizar o favorecer la movilidad y

su duración de la movilidad, y se cree que hay un antagonismo entre K^+ y Ca^{2+} , en donde se ha observado que los espermatozoides de carpa disminuyen su movilidad debido a que no toleran concentraciones altas de K^+ como los salmónidos, ni pH inferior a 7.5, pero esto se puede revertir agregando Ca^{2+} (Tabares et al., 2005). Suárez y colaboradores (2019) reportaron que, entre los iones presentes en el semen de cachama blanca, el Na^+ fue el de mayor concentración en dos colectas realizadas, seguido por Cl^- , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} .

En cuanto a la activación del semen, ésta se ve influenciada de primera mano por el choque hiposmótico, lo que indica que la movilidad espermática es parcialmente controlada por la presión osmótica, por lo que se puede decir que este choque puede ser una señal inicial que conlleva a la activación, que en la mayoría de peces de agua dulce tiene un rango de duración de 34-40 segundos, pudiendo variar por las condiciones del medio donde se activan los espermatozoides, cabe resaltar que algo consecuente del choque hiposmótico es el cambio de potencial de membrana, siendo el segundo factor involucrado con la activación de los espermatozoides y que puede desencadenar respuestas celulares como la hiperpolarización de la membrana, entendiéndose a esta respuesta como la activación, que se puede producir por la combinación de éste y otros factores ambientales como pH y el balance iónico, además de la formación de complejos supramoleculares que influyen en la modificación de la fluidez lateral, despliegue enzimático y activación de canales iónicos (Cosson et al., 2000; Cosson, 2004; Tabares et al., 2005; Suárez et al., 2019). Pudiéndose mejorar esta duración de la movilidad al agregar diluyentes que mejoren las condiciones necesarias para que se dé la movilidad, lo cual se ve reflejado en los resultados evaluados en el semen crioconservado, teniendo mejores tiempos de activación que en el semen fresco.

De acuerdo con lo anterior, se puede inferir que hay una amplia interacción de reacciones celulares que ocasionan daños en el espermatozoide al exponerlo a un ambiente externo, y estas reacciones pueden provocar cambios al conservar el semen por un periodo de tiempo, como se encontró en el presente estudio, principalmente a causa de un choque hiposmótico que genera unos cambios

celulares por esta interacción, pudiendo disminuir su calidad. Al crioconservar, igualmente estas reacciones pueden seguir afectando y provocando cambios, sobretodo en la membrana plasmática del espermatozoide, tanto por la congelación como la descongelación de los mismos (Lahnsteiner et al., 2000; Chen et al., 2004; Martínez & pardo, 2010; Lim & Le, 2013).

En el semen crioconservado es muy importante tener en cuenta el diluyente a emplear y en este caso al emplear la glucosa, se hace por sus efectos estabilizadores sobre la membrana liposomal de los espermatozoides durante el almacenamiento, además de que aumenta la osmolaridad del medio; el DMSO se usa por su efecto electrostático sobre el grupo sulfóxido polar del mismo y la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática que posiblemente se da entre la molécula de colina de los grupos cabeza de la fosfatidilcolina (Medina et al., 2005). la glucosa, como el DMSO son empleados como medios para congelar esperma de muchas especies neotropicales (Viveiros y Godinho, 2009; Orfão et al., 2011); Cabe resaltar que esto es muy importante, porque la membrana celular de los espermatozoides es vulnerable al daño producido por las ERO's (Ansaldo, 2001), debido a que ésta posee un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que interactúan con metabolitos reactivos del oxígeno y provocan lipoperoxidación y desencadenan, además, sucesos que derivan en: alteraciones del retículo endoplásmico y de la mitocondria; rompimiento de las cadenas del ADN; liberación de enzimas celulares y finalmente, la terminación de una célula funcional (Rodríguez et al., 2011), reflejado en la disminución de movilidad y viabilidad espermática (Aramli et al., 2013; Kowalski et al., 2019). Por estas razones, la peroxidación lipídica de la membrana se considera el mecanismo clave por medio del cual las ERO's, provocan daños en el espermatozoide y conducen a infertilidad al provocar una muerte celular (Ansaldo, 2001; Rodríguez et al., 2011; Patricio et al., 2016).

Tabla 7. Resultados de capacidad antioxidante total en algunas especies de peces.

Especies	N	CAntiOx	Autores
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10	0,009 ± 0,012 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Lucio Europeo (<i>Esox lucius</i>)	9	0,062 ± 0,029 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Barbo común (<i>Barbus barbus</i>)	10	0,066 ± 0,043 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)	15	0,075 ± 0,019 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Aspius (<i>Aspius aspius</i>)	10	0,092 ± 0,02 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Carpa prusiana (<i>Carassius gibelio</i>)	18	0,117 ± 0,038 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Brema (<i>Abramis brama</i>)	17	0,121 ± 0,047 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Carpa sable (<i>Pelecus cultratus</i>)	19	0,126 ± 0,085 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Chub (<i>Leuciscus cephalus</i>)	23	0,138 ± 0,066 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	10	0,153 ± 0,063 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Leucisco (<i>Leuciscus leuciscus</i>)	12	0,197 ± 0,065 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Lucioperca (<i>Sander lucioperca</i>)	12	0,500 ± 0,130 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	12	1,909 ± 0,904 ^a	(Słowi ska et al., 2013)
Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	14	0,15 ± 0,11 ^b	(Butts et al., 2011)
Salmón real (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	59	0,30 ± 0,03 ^b 0,28 ± 0,02 ^b	(Flannery et al., 2013)
Cachama Blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>)	24	0,3892 ± 0,17 ^{a*}	(Presente estudio)

a Los datos son representados en media (mM de Trolox) ± desviación estándar

b Los datos son representados en media (µM de Trolox) ± error estándar

* Son datos del presente estudio

Tabla adaptada de Słowi ska y colaboradores (2013)

Los resultados obtenidos de Capacidad antioxidante total (CAntiOx) se pueden comparar con los hallados por Słowi ska y colaboradores (2013), que evaluaron algunas características seminales en 13 especies distintas de peces, y la capacidad antioxidante total se midió empleando el mismo kit (Antioxidant assay kit, cat. No. CS0790; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), estos resultados permiten decir que los encontrados en el presente estudio entran en el rango reportado (para semen fresco), se puede ver que la Perca (*Perca fluviatilis*) contiene la mayor CAntiOx, le sigue la Lucioperca (*Sander lucioperca*) y en tercer lugar la cachama blanca (Tabla 7). Otros resultados de CAntiOx publicados previamente, (Butts et al., 2011; Flannery et al., 2013) para el bacalao (*Gadus morhua*) y el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), según Słowi ska y colaboradores (2013) están dentro del rango de 11 especies.

CAntiOx es la suma de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Mahfouz et al., 2009), por lo cual, los resultados aquí presentados, corresponden a la sumatoria de agentes que ayudan al control de especies reactivas al oxígeno, con el fin de garantizar una buena movilidad y que la membrana del espermatozoide esté intacta, lo que puede reflejarse en la fertilidad (Tatone et al., 2010; Lançonni et al., 2015).

Con lo anterior, se deduce que estos distintos agentes antioxidantes reflejados como CAntiOx en el plasma seminal, son distintos entre especies y entre los individuos de las mismas, por factores como las condiciones ambientales en las que se encuentran, alimentación, región geográfica, medio silvestre o cautiverio, afectando también la generación de especies reactivas al oxígeno presentes (Słowi ska et al., 2013). Por ello, sería interesante observar el comportamiento de estas características en cachama blanca, mantenida en diferentes condiciones, Esto permitiría evaluar no solo como afecta el tiempo a esta variable, también los machos sometidos a distintos tratamientos, con el fin de observar que ambiente puede ser mejor para garantizar un mejor esperma, pero no se debería de evaluar solo la CAntiOx, también otras variables como la osmolaridad, ATP, y dentro de

los antioxidantes verificar la cantidad de ácido úrico siendo el principal en el plasma seminal (Lahnsteiner et al., 2011).

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

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

La yema de huevo, es la barrera más importante contra los ERO's en embriones y crías permitiendo su supervivencia (Casasole et al., 2016), ya que posee antioxidantes importantes que pueden ayudar a la reducción de ERO's en las muestras crioconservadas, no obstante, los antioxidantes pueden variar de acuerdo con la dieta y otros factores a los que estén sometidos las aves de las que fueron recolectados los huevos (Bernal et al., 2003). Este y otros factores hacen de la yema de huevo un componente importante como diluyente del semen no solo en los peces, también en bovinos y otras especies, no obstante, hay que tener en cuenta, que la yema de huevo tiene metales redox-activos y redox-inactivos, que pueden dar como resultado un aumento en la producción de ERO's (Kumar et al., 2019), y que igualmente pueden variar por los distintos factores (alimentación, ambiente, manejo, etc.) en los que se encuentren los animales además de su raza y genética.

Algunos de los metales presentes en la yema de huevo funcionan como catalizadores de reacciones de radicales libres, además de algunos ser metales pesados, siendo perjudiciales para los espermatozoides y al igual pudiendo promover la oxidación. Por esto, el diluyente puede funcionar como un potenciador de la peroxidación lipídica de las membranas del espermatozoide teniendo como resultado en el proceso de crioconservación, la producción de una gran cantidad de radicales libres. Con esto, se pueden llegar a probar agentes quelantes para observar si hay un cambio en la concentración de los antioxidantes, pues ayudarían al control de estos metales que participan en la peroxidación lipídica (Kumar et al., 2019).

Por todo esto los resultados de capacidad antioxidante en semen crioconservado pueden variar, pues se conoce que el DMSO tiene propiedades antioxidantes al igual que el huevo, pero, este último posee algunos metales que permiten que se generen las especies reactivas del oxígeno, por ello las reacciones entre diluyente y esperma pueden variar por distintos factores como el tipo de huevo, especie, concentración de DMSO, pero lo que se puede decir es que al tener un medio para crioconservar que garantice tener mayor cantidad de antioxidantes, permitirá

mejorar la calidad seminal, por ello se debería de seguir indagando al respecto y realizando estudios con distintos crioprotectores, para observar los cambios y resultados generados en la CAntiOx.

9. CONCLUSIÓN

La calidad del semen fresco se mantuvo sin cambios significativos hasta la hora de conservación, excepto la movilidad, la cual, si tuvo diferencias significativas a la hora, aun siendo así, está sigue en el rango aceptable para una posterior fertilización.

La capacidad antioxidante del semen fresco, en un rango de tiempo de una hora no tuvo una varianza significativa, en el semen crioconservado en un lapso de 1 día hasta los 6 meses de igual modo no hay significancia entre las muestras, indicando que esta variable no fue afectada en el tiempo.

En el semen crioconservado igualmente se aprecia una buena calidad seminal, que se diferencian estadísticamente con respecto al control, a excepción de la Capacidad antioxidante. Este trabajo permitió comprender la variación de la calidad del semen fresco y crioconservado a largo término de *Piaractus brachypomus*, una de las especies ícticas más significativa de la Orinoquia colombiana.

10. RECOMENDACIONES

Para los futuros investigadores interesados en continuar con esta investigación se les recomienda:

Tener en cuenta el protocolo de crioconservación que se vaya a emplear, ya que este puede hacer que varíe la cantidad de antioxidantes, se recomienda evaluar la capacidad antioxidante del huevo, DMSO o cualquier diluyente y crioprotector que vayan a usar, también sometiéndolo al estrés térmico de la congelación y descongelación, esto con el fin de obtener un resultado más exacto de la capacidad antioxidante del semen crioconservado como tal.

Se puede usar otro kit para medir la capacidad antioxidante y así comparar los resultados y su variación.

Poner bajo distintos tratamientos a los animales, pues a los ejemplares de este experimento fueron obtenidos de estanques en tierra e inducidos con EPC, alimentados con concentrado comercial, sin embargo, también se debería tener en cuenta la temperatura del agua y su concentración de oxígeno, haciendo su ambiente lo más similar posible al que viviría estando en una cuenca, o se pueden llevar a situaciones extremas con el fin de evaluar y comparar las diferencias de calidad del semen que origina su medio y alimentación.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A. (2003) Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility. In: De Vriese S. Christophe A, editors. Male fertility and lipid metabolism. Champaign, IL: AOCS, p.157.
- Álvarez Caro, D. M., & Larqué Saavedra, A. (2004). La supermolécula, el dimetil sulfóxido: ¿un nuevo regulador del crecimiento vegetal? (Vol. 55). México. Retrieved from https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_3/la_supermolecula.pdf
- Andrade, R. F., Bazzoli, N., Rizzo, E., & Sato, Y. (2001). Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: *Characidae*). *Tissue & Cell*, 33. <https://doi.org/10.1054/tice.2001.0206>
- Ansaldo, Martín. (2001). Niveles de antioxidantes en peces Antárticos pertenecientes a las familias *nototheniidae* y *channichthyidae*. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3355_Ansaldo
- Aramli, M. S., Kalbassi, M. R., Nazari, R. M., & Aramli, S. (2013). Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 143(1–4), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.010>
- Argumedo, T.; & H. Rojas. (2000). Manual de piscicultura con especies nativas. Asociación de Acuicultores de Caquetá (ACUICA), y Plan Nacional de Desarrollo Alternativo (PNDA), pp. 51-59. Florencia, Colombia.
- Arias, J., & W. Vásquez. (1988). Ampliación del conocimiento biológico de *Colossoma* sp (*Cypriniformes: Characidae*), en ambientes naturales de la cuenca del río Meta. En: El cultivo de la Cachama (González, R), p. 329. Fundamentos de Acuicultura Continental, p. 329. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. INPA. Bogotá.
- Atencio García, V., Perez E, Pardo S. (2013). Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la criopreservación de semen de bocachico (*Prochilodus magdalenae*). *Arch Med Vet* 45: 151- 158. doi: 10.4067/S0301-732X20130- 00200006

- Atencio García, V., Dorado Longas, M., Montes Petro, C., Pietro Guevara, M., & Espinosa Araujo, J. (2017). Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido Cryopreservation of dorada *Brycon moorei* sperm with dimethyl sulfoxide. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.59987>
- AUNAP. (2018). *Plan Estratégico institucional 2014-2018-AUNAP*. Retrieved from <https://www.aunap.gov.co/images/documentos/plan-estrategico-institucional-2014-2018.pdf>
- Bazzoli, N. & H.P. Godinho. 1991. Reproductive biology of the *Acestrorhynchus lacustris* (Reinhardt, 1874) (Pisces: *Characidae*) from Tres Marias Reservoir, Brazil.
- Bernal Gómez, M. E., Mendonça-Junior, C. X. de, & Mancini-Filho, J. (2003). Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(4), 425–432. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400010>
- Berríos, O., Valdebenito, I., Treulén, F., & Ubilla, A. (2010). Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*): Efectos en la movilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), 179–186. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2010000300009>
- Bozkurt, Y., Öretmen, F., Kökçü, Ö., & Erçin, U. (2009). Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech J. Anim. Sci*, 56(8), 2011–355. Retrieved from <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/45476.pdf>
- Butts, I. A. E., Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M. K., Słowińska, M., Soler, C., & Trippel, E. (2011). Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Theriogenology*, 75(7), 1290–1300. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.044>
- Cabrera, O., Morales, D., Barragán, J., Solá, J., Bacha, F., & Fernández, A. (2015). ¿Qué son las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS, según siglas en inglés)? - nutriNews, la revista de nutrición animal. Retrieved June 27, 2018, from <https://nutricionanimal.info/que-son-las-especies-reactivas-del-oxigeno-ros-segun-siglas-en-ingles/>
- Casasole, G., Costantini, D., Cicho, M., & Rutkowska, J. (2016). The effect of maternal immunization on female oxidative status, yolk antioxidants and

offspring survival in a songbird. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 194, 56–61.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.019>

Chen, S.-L., Ji, X.-S., Yu, G.-C., Tian, Y.-S., & Sha, Z.-X. (2004). Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, 236(1–4), 547–556.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2003.10.027>

Cierieszko, A., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Dobosz, S., Goryczko, K., & Glogowski, J. (1999). The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21(4), 313–315.
<https://doi.org/10.1023/A:1007886121663>

Cierieszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K. (2000). Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. Cryopreservation in aquatic species. Edited by T.R. Tiersch and P.M. Mazik. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society. 20–48.
<http://link.springer.com/10.1007/s10695-005-4742-8>

Cloud J.G. y S.J. Patton. (2008). Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. In: Cabrita E., Robles V., Herráez M.P. (edit.). *Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species*. London, UK: CRC Press (Taylor and Francis group), p. 237-250.

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(6), 1348–1367.
<https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1256>

Cosson, J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12(1), 69–85.
<https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>

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

Cruz Casallas; Velasco Santamaría y Medina Robles Mauricio (2005). Manejo hormonal de la función reproductiva de peces tropicales bajo condiciones de cautiverio.
<http://revistas.udenar.edu.co/index.php/reipa/article/download/1595/1936>

Cruz Casallas, Medina Robles, & Velasco Santamaría. (2006). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de

yamú (*Brycon amazonicus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 19(2), 152–159. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3240058&info=resumen&idioma=SPA>

Faramarzi, M. (2012). Assessment of Reproductive Parameters in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(3), 244–248. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2012.04.03.61325>

Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V., & Menu, B. (1998). Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. Aquatic Living Resources, 11(6), 387–394. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)80004-7](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)80004-7)

Fauvel, C., Suquet, M., & Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. Journal of Applied Ichthyology, 26(5), 636–643. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x>

Flannery, E. W., Butts, I. A. E., Słowińska, M., Cierieszko, A., & Pitcher, T. E. (2013). Reproductive investment patterns, sperm characteristics, and seminal plasma physiology in alternative reproductive tactics of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Biological Journal of the Linnean Society, 108(1), 99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01980.x>

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

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

Grier y Lo Nostro. (2000). El epitelio germinal de teleósteo: a) concepto unificador. Actas del 6 ° Simposio Internacional sobre Fisiología Reproductiva del Pescado.

González, R. 2001. El Cultivo de la Cachama. En: Fundamentos de Acuicultura continental, pp. 329-346. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. INPA. Bogotá.

Grassiotto I., Q., Gameiro, M. C., Schneider, T., Malabarba, L. R., & Oliveira, C. (2003). Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the

- Characiformes. Neotropical Ichthyology, 1(1), 35–45.
<https://doi.org/10.1590/S1679-62252003000100004>
- Grassiotto, Q., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D., & Foresti, F. (2001). Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (*Teleostei, Characiformes, Erythrinidae*). *Journal of Fish Biology*, 59(6), 1494–1502. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1797>
- nanan, B. E., Ö retmen, F., nanan, T., & Yılmaz, F. (2016). Total antioxidant capacity, catalase activity, and lipid peroxidation changes in seminal plasma of sex-reversed female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during spawning season. *Theriogenology*, 86(8), 1975–1982. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.014>
- Jamieson, B. G. M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, 319p
- Kobelkowsky A (2007) Diversidad Morfológica del sistema de conductos excretores de los peces teleósteos. *Rev Mex Biodivers* 78:105–116.
- Koca Y, Ozdal OL, Celik M, Unal S, Balaban NY. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Arch Androl*. 2003;49:355-9.
- Kowalski, R. K., & Cejko, B. I. (2019). Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009>
- Kumar, P., Pawaria, S., Dalal, J., Ravesh, S., Bharadwaj, S., Jerome, A., ... Yadav, P. S. (2019). Sodium alginate potentiates antioxidants, cryoprotection and antibacterial activities of egg yolk extender during semen cryopreservation in buffalo. *Animal Reproduction Science*, 209(July), 106166. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106166>
- Kurland Cg, Andersson Sge. (2000) Origin And Evolution Of The Mitochondrial Proteome. *Microbiol. Mol Biol Rev*. 2000;64:786-820
- Kutluyer, F., Kayim, M., Ö retmen, F., Büyükleblebici, S., & Tuncer, P. B. (2014). Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*, 69(3), 462–466. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2014.10.005>
- Lahnsteiner, F., Berger, B., & Weismann, T. (1999). Sperm metabolism of the telost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *Journal of Experimental Zoology*, 284(4), 454–

465. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990901\)284:4<454::AID-JEZ12>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990901)284:4<454::AID-JEZ12>3.0.CO;2-O)
- Lahnsteiner, F., Berger, L. B., Horvath, A., Urbanyi, B., & Weismann, T. (2000). Cryopreservation Of Spermatozoa Ln Cyprinid Fishes. *Theriogenology*, 54(9), 1477–1498. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00469-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00469-6)
- Lahnsteiner, F., & Mansour, N. (2010). A comparative study on antioxidant systems in semen of species of *the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae*, and *Lotidae* for improving semen storage techniques. *Aquaculture*, 307(1–2), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.011>
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., & Kunz, F. A. (2011). The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, 76(5), 882–890. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.04.019>
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., & Plaetzer, K. (2010). Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Animal Reproduction Science*, 119(3–4), 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.01.010>
- Lanes, C. F. C., Okamoto, M. H., Bianchini, A., Marins, L. F., & Sampaio, L. A. (2010). Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquaculture Research*, 41(9), 199–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02501.x>
- Lançon R, Celeghini E, Bianchi Alves M, Santos G, Florez Rodriguez S, Leite T, Arruda R. (2015). Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm. *Anim Reprod*. 12:559
- Lim, H. K., & Le, M. H. (2013). Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm. *Theriogenology*, 79(5), 867–871. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.004>
- Linhart, Slechta, Slavik, T. (1991). Fish semen composition and biochemistry. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. Monogr.* 1991.16: 285-311
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>

- López Macías, J.N., Salas Benavides, J., Gómez Cerón, A.E., Sanguíno Ortiz, W.R. (2012). Estudio gonadal de la sabaleta de la cuenca del patía (*Brycon sp.*) como indicador del potencial acuícola. *Revista electrónica de ingeniería de producción acuícola*, Vol. 6, Núm 6
- López Núñez, F. O., Amaya Amaya, M. P., Anaya Yosmar, M. A., & Arango Hoyos, A. W. (2013). Efecto Del Dimetilsulfóxido En Un Modelo Animal De Nefrotoxicidad Inducida Por Gentamicina En Conejos. *CIMEL: Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.23961/cimel.2013.181.382>
- Macedo Márquez, A. (2012). La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en las Mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97–103. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v15n2/v15n2a3.pdf>
- Mahfouz, R., Sharma, R., Sharma, D., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2009). Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.022>
- Martínez José Gregorio, Pardo Carrasco Sandra (2010). Crioconservación De Semen En Peces: Efectos Sobre La Movilidad Espermática Y La Fertilidad.
- Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M. T., Herráez, M. P., Sarasquete, C., & Cabrita, E. (2012). Incorporation of ascorbic acid and -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, 77(6), 1129–1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017>
- Mattei, X. (1970). Spermiogénese comparé des poisson. Pp.57- 72. in: Baccetti, B. (Ed.). *Comparative Spermatology*. New York: Academic Press, 773p.
- Mattei, X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69: 3038-3055.
- Medina Robles, V. M., Velasco Santamaría, Y., & Cruz Casallas, P. E. (2005). Aspectos Generales de la Crioconservación de Semen. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34–48.
- Melo, F. C. S. A., & Godinho, H. P. (2006). A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction*, 3(3), 380–385.

- Melrose, J., Perroy, R., & Careas, S. (2015). Avances de acuicultura y pesca en Colombia. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Merino M.C., J.C. Alonso, INCODER – FAO, (2011). Situación del repoblamiento de cuerpos de agua continentales en Colombia. Bogotá.
- Merino, M. C., Bonilla, S. P., & Bages, F. (2013). Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia. Retrieved from <http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/25-Diagnóstico-del-estado-de-la-acuicultura-en-Colombia.pdf>
- Merino, M. C., Bonilla, S. P., Bages, F., Guerrero, I., Mojica, H. O., Hortúa, N., & de la pava, M. L. (2014). Plan Nacional para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura en Colombia AUNAP -FAO Plan Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia -PlaNDAS. Bogotá. Retrieved from <http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-Sostenible-Colombia.pdf>
- Merino, M. C. (2018). Acuicultura en Colombia, 63. Retrieved from <https://www.aunap.gov.co/images/convenio/presentacion-tecnica-acuicultura-en-colombia.pdf>
- Miller, N., Rice, C., J. Davies, M., Gopinathan, V., & Milner Anthony. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Montes Montes, Melissa (2012). Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en Crioconservación de espermatozoides de Lengado *Paralichthys Adspersus* (Steindachner, 1867). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/575>
- Morisawa, S., & Morisawa, M. (1986). Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. *Journal of Experimental Biology*, 126, 89–96.
- Muñoz Andrea, Caldas María Leonor, Hurtado Giraldo Hernán (2004). Análisis Histomorfológico Del Sistema Digestivo Y Glándulas Anexas En Alevinos De Cachama Blanca, *Piaractus brachypomus* (Characidae: Piaractus)
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. En: Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M. *Fish Physio* Volume Ix Part A, Cap. 6.

- Nagahama, Y. (2000). Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish, in: Norberg, B. et al. (Ed.) Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999. pp. 211-222
- Nascimento, A. F., Maria, A. N., Pessoa, N. O., Carvalho, M. A. M., & Viveiros, A. T. M. (2010). Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 324-329. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.07.002>
- Orfão, L. H., Nascimento, A. F., Corrêa, F. M., Cosson, J., & Viveiros, A. T. M. (2011). Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (*Characiformes*). *Aquaculture*, 311(1-4), 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.041>
- Osorio, A., Wills, A., & Muñoz A. P. (2013). Caracterización De Coproductos De La Industria Del Fileteado De Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) En Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 60. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/rt/printerFriendly/42127/44066>
- Pardo Carrasco, S., Salas Villalva, J., Reza Gaviria, L., Espinosa Araujo, J., & Atencio-García, V. (2015). Cryopreservation of Trans-Andean shovelnose catfish (*Sorubim cuspicaudus*) semen using dimethylacetamide. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* (Vol. 10). Universidad CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072015000200004
- Patricio, A., Cruz, D. F., Vieira Silva, J., Padrão, A., Correia, B. R., Korrodi-Gregório, L., ... Fardilha, M. (2016). Relation between seminal quality and oxidative balance in sperm cells PALAVRAS-CHAVE. *Acta Urológica Portuguesa*, 33(1), 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.acup.2015.10.001>
- Quagio-Grassiotto, I., Negrão, J. N. C., Carvalho, E. D., & Foresti, F. (2001). Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (*Teleostei, Characiformes, Erythrinidae*). *Journal of Fish Biology*, 59(6), 1494-1502. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1797>
- Ramírez Merlano, J. A., Medina Robles, V. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2010). Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *ORINOQUIA* (Vol. 14). Instituto de Investigaciones de la Orinoquia

Colombiana. Retrieved from
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092010000100007

- Ramírez Merlano, J. A., Medina-Robles, V. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2011). Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(2), 135–144. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000200006>
- Restrepo-Betancur, G., Montoya Páez, J. D., & Arboleda Chacón, L. (2017). Evaluación de Dos Crioprotectores y Tres Curvas de Congelación Programable en la Criopreservación de Semen de Brycon henni (Pisces: Characidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(3), 597. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13349>
- Restrepo, G., Montoya, J. D., & Rojano, B. (2016). Capacidad antioxidante y calidad post-descongelación de semen equino crioconservado con quercetina y ergotioneina. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 63(3), 167–178. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n3.62747>
- Rodríguez, E., Gil-Villa, A. M., Aguirre-Acevedo, D. C., Cardona-Maya, W., & Cadavid, A. P. (2011). Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: En busca de un valor de referencia. *Biomédica*, 31(1), 100–107.
- Rurangwa, E., Kime, D. ., Ollevier, F., & Nash, J. . (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1–4), 1–28. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2003.12.006>
- Salazar Ariza, G. (2018). FAO Fisheries & Aquaculture - Visión general del sector acuícola nacional – Colombia- Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Retrieved May 5, 2018, from http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es
- Schulz, R.W. & T. MIURA. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 43-56.
- Sikka, S. C. (2004). Andrology Lab Corner*: Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of Andrology*, 25(1), 5–18. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x>

- Słowi ska, M., Nynca, J., Cejko, B. I., Dietrich, M. A., Horváth, Á., Urbányi, B., ... Ciereszko, A. (2013). Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture*, 400–401, 101–104. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.03.010>
- Suárez Martínez, R. O., Medina Robles, V. M., & Cruz Casallas, P. E. (2019). Efecto de dos colectas de semen en una temporada reproductiva sobre la calidad seminal de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(3), 1184–1195. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15515>
- Tabares, C. J., Tarazona, A. M., Olivera Ángel, M., & Sci Agr, D. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *149 Rev Col Cienc Pec*, 18(2). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v18n2/v18n2a06.pdf>
- Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini P. (2010). Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol*. 26:563-56
- Tiersch, T.R. y M. Mazik. (2000). Cryopreservation of sperm of some marine fishes. En: Tiersch, T.R.y M. Mazik (edit.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana: 439 pp.
- Tiersch, T. R. (2008). Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(spe), 15–19. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300003>
- Turan, N. N., Akar, F., Budak, B., Seren, M., Parlar, A. ., Sürücü, S., & Ulus, A. T. (2008). Efecto protector del dimetil sulfóxido sobre un modelo experimental de lesión medular por reperusión. *Anales de Cirugía Vascul*, 22(1), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.acvsp.2008.04.005>
- Tvrda, E., K ažická, Z., Bárdos, L., Massányi, P., & Luká , N. (2011). Impact of oxidative stress on male fertility - A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59(4), 465–484. <https://doi.org/10.1556/AVet.2011.034>
- Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V., & Fernández, J. (2009). Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: Aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41(2), 97–106. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2009000200002>
- Valdebenito, I. I., Gallegos, P. C., & Effer, B. R. (2015). Gamete quality in fish: Evaluation parameters and determining factors. *Zygote*, 23(2), 177–197. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000506>

- Vílchez, C. (2017). Influence of the ionic and protein environment on sperm motility activation in the European eel. Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/90408>
- Viveiros, A. T. M., & Godinho, H. P. (2009). Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 137–150. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9240-3>
- Watanabe W. O., Ellis E. P., Ellis S. C., Chaves J., Manfredi C., Hagood R. W., Sparsis M., Arneson S. (1998). Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. *J. World Aquaculture Soc.* 29: 176 - 187.
- Zohar Y., Mylonas C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99 - 136.