

## Crioconservación de semen de dorada (*Brycon sinuensis*) con diferentes crioprotectores a dos porcentajes de inclusión

### Cryopreservation of dorada semen (*Brycon sinuensis*) with different cryoprotectants at two percentages of inclusion

### Criopreservação de sêmen dorada (*Brycon sinuensis*) com diferentes crioprotetores a dois porcentagens de inclusão

Recibido: 08 de Julio de 2021


Aceptado: 11 de noviembre de 2021

**Jorge Carmona-Calderón<sup>1</sup>,**

Prof. en Acuicultura, MSc;

 <https://orcid.org/0000-0003-3168-1315>**José Espinosa-Araújo<sup>2</sup>,**

Prof. en Acuicultura, MSc;

 <https://orcid.org/0000-0001-9737-1163>**Víctor Atencio-García<sup>3</sup>,**

Ing. Pesquero, MSc;

 <https://orcid.org/0000-0002-2533-1995>**Omar Díaz-Hernández<sup>4</sup>,**

Mat., MSc;

 <https://orcid.org/0000-0002-4472-2422>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Acuícolas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CINPIC, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. Email: jcarmonacalderon@correo.unicordoba.edu.co

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Acuícolas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CINPIC, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. Email: jaespinosaaraujo@correo.unicordoba.edu.co

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Acuícolas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CINPIC, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. Email: vatencio@correo.unicordoba.edu.co

<sup>4</sup> Centro de Ciencias Básicas, Universidad Pontificia Bolivariana, Montería, Colombia. Email: Omar.diazh@upb.edu.co



Este artículo se encuentra bajo  
licencia: Creative Commons  
Atribución-NoComercial-  
SinDerivadas 4.0 Internacional

Orinoquia,  
Julio-Diciembre 2021;25(2): 15-24  
ISSN electrónico: 2011-2629  
ISSN impreso: 0121-3709  
[https://doi.org/  
10.22579/20112629.705](https://doi.org/10.22579/20112629.705)

### Resumen

La criopreservación permite la conservación de recursos genéticos de peces en peligro de extinción y mejora procesos reproductivos en cautiverio. El objetivo del estudio fue evaluar semen de dorada con tres crioprotectores internos a dos porcentajes de inclusión. Se utilizaron reproductores en fase espermiación (n=12), inducidos con 5 mg de extracto hipofisario de carpa/Kg. Seis horas después el semen fresco (SF) fue colectado y diluido en soluciones crioprotectores compuesta por glucosa 6%, yema de huevo 12% y los crioprotectores dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (EG) a porcentajes de inclusión de 5 y 10%; luego empacado en pajillas de 0.5 mL y congelado con vapores de nitrógeno. El semen fue descongelado quince días después en baño serológico. La calidad del SF, precongelado (SP) y descongelado (SD) fue evaluada con el software SCA® (*Sperm Class Analyzer*). Fue evaluada la movilidad total (Mt), tipos de movilidad, velocidades, progresividad total y concentración espermática. En SD se estimaron los daños en membrana espermática (D-Mem), mitocondria (D-Mit) y fragmentación de DNA (F-DNA) mediante citometría de flujo. La Mt del SF fue de 97.0±7.0%, en SP fue de 82.5±17.9% y en SD de 45.4±13.6%; siendo mayor cuando fue tratado con DMSO10% (p<0.05). En SD los D-Mem oscilaron de 62.1±18.8% (DMA 5%) y 49.89.8% (DMSO 5%); los D-Mit de 59.4±14.8% (DMA5%) a 83.4±4.2% (DMSO10%) y F-DNA entre 9.5±14.0% (EG10%) y 1.6±0.2% (DMA10%) (p>0.05). Los resultados obtenidos permiten inferir que los crioprotectores evaluados incluidos a 5 y 10%, son una alternativa viable para la crioconservación de semen de dorada.

**Palabras claves:** Dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, etilenglicol, peces reofílicos, reproducción.

### Abstract

Cryopreservation allows the conservation of genetic resources of fish in danger of extinction and improves reproductive processes in captivity. This research aimed to evaluate semen from dorada with three cryoprotectants at two inclusion percentages. Spermation phase breeding males (n=12) were used, induced with 5 mg of carp pituitary extract/Kg. Six hours later, fresh semen (SF) was collected and diluted in cryoprotectant solutions composed of glucose 6%, egg yolk 12% and the cryoprotectants dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA) and ethylene glycol (EG) at inclusion percentages of 5 and 10%; then packed in 0.5 mL straws and frozen with nitrogen vapors. The semen was thawed fifteen days later in a serological bath. The quality of the FS, pre-frozen (PS) and thawed (TS) was evaluated with the support of the SCA® software (*Sperm Class Analyzer*). Total motility (Mt), types

#### Como Citar (Norma Vancouver):

Carmona-Calderón J, Espinosa-Araújo J, Atencio-García V, Díaz-Hernández O, Crioconservación de semen de dorada (*Brycon sinuensis*) con diferentes crioprotectores a dos porcentajes de inclusión. Orinoquia, 2021;25(2): 15-24. <http://orcid.org/10.22579/20112629.705>

of motility, velocities, total progressivity and sperm concentration were evaluated. Damage to the sperm membrane (D-Mem), mitochondria (D-Mit) and DNA fragmentation (F-DNA) were measured by flow cytometry in TS. The Mt of SF was  $97.0 \pm 7.0\%$ , in SP it was  $82.5 \pm 17.9\%$  and in SD it was  $45.4 \pm 13.6\%$ , being higher when treated with DMSO 10% ( $p < 0.05$ ). In TS, the D-Mem ranged from  $62.1 \pm 18.8\%$  (DMA 5%) to  $49.89 \pm 8.8\%$  (DMSO 5%), the D-Mit from  $59.4 \pm 14.8\%$  (DMA 5%) to  $83.4 \pm 4.2\%$  (DMSO 10%) and F-DNA between  $9.5 \pm 14.0\%$  (EG10%) and  $1.6 \pm 0.2\%$  (DMA10%) ( $p > 0.05$ ). The results allow us to infer that the evaluated cryoprotectants, including 5 and 10%, are a viable alternative for the cryopreservation of dorada sperm.

**Keywords:** Dimethylacetamide, dimethylsulfoxide, ethyleneglycol, rheophilic fish, reproduction.

## Resumo

A criopreservação permite a conservação dos recursos genéticos de peixes em perigo de extinção e melhora os processos reprodutivos em cativeiro. O objetivo do estudo foi avaliar o sêmen de dorada com três crioprotetores internos em duas porcentagens de inclusão. Doze machos foram usados na fase espermática e foram induzidos com 5 mg de extrato de hipófise de carpa/Kg. Seis horas depois, o sêmen fresco SF foi coletado e diluído em solução crioprotetora composta por 6% de glicose, 12% de gema de ovo e crioprotetores internos dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) e etilenoglicol (EG) nas porcentagens de inclusão de 5 e 10%; em seguida, embalado palhetas de 0,5 mL e congelado com vapores de nitrogênio. O sêmen foi descongelado quinze dias depois em banho sorológico. A qualidade do SF, pré-congelado (SP) e descongelado (SD) foi avaliada com o software SCA\* (*Sperm Class Analyzer*). Foram avaliados a mobilidade total (Mt), tipos de mobilidade, velocidades, progressividade total e concentração espermática. Em SD, danos à membrana espermática (D-Mem), mitocôndrias (D-Mit) e fragmentação de DNA (F-DNA) foram estimados por citometria de fluxo. O SF apresentou Mt de  $97,0 \pm 7,0\%$ ; enquanto SP de  $82,5 \pm 17,9\%$  e DP de  $45,4 \pm 13,6\%$  foram maiores quando tratados com DMSO 10% ( $p < 0,05$ ). Em SD, o D-Mem variou de  $62,1 \pm 18,8\%$  (DMA 5%) a  $49,89,8\%$  (DMSO 5%), o D-Mit de  $59,4 \pm 14,8\%$  (DMA 5%) a  $83,4 \pm 4,2\%$  (DMSO 10%) e F-DNA entre  $9,5 \pm 14,0\%$  (EG10%) e  $1,6 \pm 0,2\%$  (DMA10%) ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos permitiram inferir que os crioprotetores avaliados, incluído a 5 e 10% é uma alternativa viável para a criopreservação de sêmen de dorada.

**Palavras-chaves:** Dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, etilenoglicol, peixes reofílicos, reprodução.

## Introducción

La dorada *Brycon sinuensis* es un pez reofílico, endémico de la cuenca del río Sinú, con importancia piscícola (Morales y Lasso, 2011); en razón a su rápido crecimiento, fácil adaptación a dietas comerciales y al cautiverio. La construcción de la hidroeléctrica Urrá, fragmentó el río Sinú a la altura de Angostura de Urrá, lo cual afectó su migración aguas arriba y generó disminución de sus áreas de desoves (Atencio-García, 2000). Además, la construcción de un dique de represamiento en el caño de Betancí, impide el ingreso de las larvas a la ciénaga para continuar con su ciclo biológico durante la temporada reproductiva; lo cual anuló a la ciénaga de Betancí, como lugar de cría y alimentación de la dorada y de las demás especies de peces migradores (Atencio-García, 2000). Estas alteraciones ha llevado a que la dorada sea categorizada como especie casi amenazada en el Libro Rojo de Peces de Agua Dulce de Colombia (Mojica et al., 2012).

La criopreservación es una herramienta biotecnológica que permite la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Bobe y Labbé, 2010), ya que permite un manejo simplificado de los reproductores, disminuyendo su número y posibilitando tener semen durante y fuera del periodo de reproducción de la especie (Cabrita et al., 2010), contribuyendo a

disminuir la presión sobre las poblaciones silvestres ejercida por los piscicultores para la obtención de nuevos sementales. Además, ofrece ventajas porque optimiza los procesos reproductivos en cautiverio de especies con maduración gonadal asincrónica y ciclos reproductivos estacionales (Espinosa, 2013), así como un uso eficiente del semen durante los procesos de reproducción artificial (Lahnsteiner et al., 2004).

Los diluyentes o agentes crioprotectores tienen como función proteger la integridad del espermatozoide de la acción tóxica de los productos generados por su propio metabolismo durante el proceso de crioconservación y reducir la temperatura de congelación del medio en el que se encuentran suspendidas las células para disminuir o contrarrestar la formación de cristales de hielo (Cabrita et al., 2001). La determinación del porcentaje de inclusión del crioprotector es importante porque define la capacidad de protección a la célula espermática y reduce la toxicidad sobre la misma.

Sin embargo, al tratar de utilizar protocolos de crioconservación exitosos en algunas especies de peces en otras especies los resultados no han sido los mejores, debido a que se considera un proceso especie-específico (Cabrita 2014). Para que un protocolo de crioconservación de semen de una especie de pez sea exitoso es

necesario ajustar cada uno de los factores considerados críticos en este proceso; entre los cuales se destacan la recolección del semen, la composición del diluyente, la concentración del crioprotector y las curvas de congelación y descongelación (Tiersch, 2008).

El proceso de crioconservación ocasiona daños a las células espermáticas producidos por los choques térmicos, la formación de hielo, el estrés tóxico y osmótico en las fases de pre congelación, congelación y descongelación (Dietrich *et al.*, 2015). Se ha sugerido que la mayoría de los criodaños ocurren en el rango de temperatura entre 0 y -40°C, ocasionados principalmente por la remoción de calor y la aplicación de los crioprotectores (Muchlisin y Siti, 2009). Además, se han reportados daños a nivel de membrana plasmática, mitocondrias, DNA y morfología celular del semen crioconservado que afectan la viabilidad espermática y en últimas su capacidad fertilizante (Dietrich *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2020).

En el proceso de crioconservación la membrana plasmática es la primera estructura en ser afectada por los cambios en la composición química o choques térmicos y se sugiere que la resistencia del espermatozoide a la congelación y toxicidad del medio es influenciada por la composición química de lípidos y proteínas que constituyen la membrana (Muchlisin y Siti, 2009); siendo la membrana plasmática una estructura importante en la activación de la movilidad (Bobe y Labbé, 2010). La morfología e integridad de las mitocondrias también se consideran factores clave en la funcionalidad del espermatozoide y su daño disminuye la movilidad de las células, así como los niveles de ATP después de la congelación y descongelación (Figueroa *et al.*, 2017); considerándose el estrés oxidativo como una de las principales causas del daño mitocondrial (Cabrita *et al.*, 2010). La integridad del DNA espermático está asociado al éxito de la fertilización, desarrollo normal de los embriones o su descendencia (Cordelli *et al.*, 2005); convirtiéndose la fragmentación del DNA en una variable de importancia para predecir el fracaso o éxito de la fertilización (Li *et al.*, 2008) y por tanto del proceso de crioconservación. El estrés oxidativo ha sido señalado como uno de los mecanismos responsables de la fragmentación del DNA como consecuencia de la oxidación de bases específicas que podrían ocurrir durante el proceso de crioconservación (Aitken *et al.*, 2012).

El desarrollo de programas de mejoramiento de la productividad en la piscicultura ha llamado la atención durante los últimos años, razón por la cual, la elabo-

ración de un protocolo para la crioconservación de semen de dorada sería una herramienta importante para la reproducción en cautiverio y una estrategia para la conservación de esta especie, por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar la criopreservación de semen con tres crioprotectores internos: dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (EG), incluidos a dos porcentajes (5 y 10%) para contribuir a los programas de fomento piscícola y conservación de esta especie.

## Materiales y métodos

### *Sitio de estudio y material biológico*

El estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones Piscícolas de la Universidad de Córdoba (CINPIC), municipio de Montería, ubicado en el norte de Colombia (Latitud: 8°47.5' N; Longitud: 75°51.8' W). Se utilizaron machos (n=12) con edad de dos a tres años en fase de espermiación, los cuales fueron trasladados a piletas circulares (4 m<sup>3</sup>), con flujo de agua constante (5 L/min), donde permanecieron durante 48 horas, para adaptarlos a las condiciones experimentales y reducir el estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente. Los reproductores se indujeron hormonalmente con extracto pituitario de carpa (Argent, USA) en dosificación de 4 mg/Kg de peso vivo en aplicación única (Atencio *et al.*, 2017).

Para la extracción del semen los animales fueron tranquilizados con Eugenol (Proquident, Col) a razón de 100 ppm, para reducir el estrés por manipulación. El semen se obtuvo seis horas después de la inducción hormonal, por medio de masajes abdominales en sentido cráneo-caudal. Los peces fueron envueltos en toallas húmedas, secados suavemente en la región de la papila urogenital con papel toalla y luego de expulsada la orina y heces para evitar contaminación, se realizó suave presión en la región ventral para la recolección del semen. El semen fue recolectado en tubos Eppendorf graduados de 2 mL y fue descartado el que registró contaminación con orina, sangre o heces. Las muestras obtenidas, fueron mantenidas bajo condiciones de laboratorio (26±1°C), para las evaluaciones de calidad del semen fresco, la cual sirvió como referencia para evaluar el semen pre congelado y descongelado.

### *Evaluación seminal*

La movilidad del semen fresco, pre congelado y descongelado, se estimó con ayuda de un microscopio

óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa asistido por computadora para análisis de semen *Sperm Class Analyzer SCA*® (Microptic SL, SCA VET 01, España); para lo cual una muestra de 0.25 µL de semen y 75 µL de agua bidestilada (dilución 1:300) fueron depositados en una cámara de conteo Makler (Sefi Medical Instruments, Israel). Las muestras fueron analizadas en un periodo de cuatro segundos por el SCA®, obteniéndose la movilidad total y tipos de movilidad (rápidos, medios y lentos) y porcentaje de espermatozoides inmóviles. Los porcentajes de espermatozoides rápidos fueron aquellos con velocidades mayores a 100 µm/seg, los medios con velocidades entre 45 y 100 µm/seg y lentos entre 10 y 45 µm/seg (Atencio-García *et al.*, 2017; Cruz-Casallas *et al.*, 2006). El SCA® también estimó las velocidades curvilínea (VCL) y lineal (VSL); así como la progresividad total (Cruz-Casallas *et al.*, 2006). El semen precongelado se evaluó a los cinco minutos de exposición del semen fresco en la solución crioprotectora (tiempo de equilibrio).

La concentración espermática se estimó tomando una muestra de 1 µL de semen la cual fue mezclada con 699 µL de glucosa 6% en un Eppendorf de 2 mL (dilución 1:700), la mezcla fue homogenizada durante cinco segundos en un vórtex a 1200 rpm (Velp Scientific, Zxclasic, China) (Cruz-Casallas *et al.*, 2006); luego 10 µL del semen diluido fue colocado en una cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Israel) y con ayuda de un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el programa SCA® fue estimada la concentración espermática. Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener un valor promedio de la concentración espermática, y no se permitió una diferencia mayor al 10% entre las lecturas; en tal caso se repitió el proceso.

El tiempo de activación se determinó solo en semen fresco desde el instante en que se adicionó la solución activadora (agua bidestilada) hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides dejaron de moverse.

### **Tratamientos y diluyentes**

Se utilizó como diluyente una solución de glucosa 6% (p:v 0.33 M) (Protokimica, Col), yema de huevo 12% (p:v) y DMSO (Merck, Alemania), o DMA (Sigma Chemical, USA) o EG (GmbH, Alemania) a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%, v:v). De este modo se obtuvieron seis tratamientos (DMSO5%, DMSO10%, DMA5%,

DMA10%, EG5% y EG10%) y semen fresco (SF) como control. Se realizaron tres ensayos y cada tratamiento se evaluó por triplicado para un total de nueve repeticiones. Para el empaque se utilizó un pool (mezcla) de semen de por lo menos tres machos por tratamiento, el cual debió tener una movilidad total mínima de 90%, el semen fue diluido en proporción 1:4 (Velasco-Santamaría *et al.*, 2006) a temperatura de 26±1°C. Las muestras de semen permanecieron durante cinco minutos expuestas (tiempo de equilibrio) a la solución crioprotectora (semen precongelado, SP), luego se tomó una alícuota de 1 mL, a la cual se le realizaron las pruebas de movilidad y velocidades espermáticas (VSL, VCL) para tener un patrón de comparación con el semen descongelado (SD) y analizar los posibles efectos provocados por la concentración del crioprotector y/o el proceso de crioconservación. Posteriormente la mezcla fue empacada en pajillas de 0.5 mL (Gmbh, Alemania) selladas con polivinilo e introducidas en un termo (*dry shipper*) de vapores de nitrógeno líquido de 4 L (MVE, SC 4/2v, USA) por 30 minutos; inmediatamente después, las pajillas fueron trasladadas a un termo de almacenamiento 34 L (MVE, XC 34/18, USA) y sumergidas directamente en nitrógeno líquido (Cruz-Casallas *et al.*, 2006b) hasta el momento de la descongelación.

### **Descongelación del semen**

El semen fue descongelado 15 días después del proceso de congelación, por inmersión directa en un baño serológico (Mermert, WNB 7, Alemania) mediante una curva de descongelación de 35°C durante 60 segundos (Cruz-Casallas *et al.*, 2006b), seguidamente se evaluó movilidad y velocidad espermática, fragmentación del DNA y daño de la membrana y las mitocondrias.

### **Evaluación de daños**

#### **Daños en la membrana espermática y mitocondrias.**

Se evaluó en semen descongelado, para lo cual se tomaron alícuotas de 10 µL, esta muestra se tiñó con 1 mL de solución compuesta por yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina DiOC<sub>6</sub>(3) (70 nM) y Ioduro de Propidio (IP) (Sigma Chemical, USA) a razón de 2 µg/mL y se incubó por 20 minutos en completa oscuridad, posteriormente se analizó mediante citometría de flujo. La tinción con DiOC<sub>6</sub>(3) permitió distinguir las células con alta captación de DiOC<sub>6</sub>(3) (viables), baja captación (con daño en mitocondria y sin daño en la membrana espermática) y la tinción con IP indicó las



alteraciones de la membrana espermática. Se utilizó un citómetro FACS CANTO II (BD Biosciences, USA) mediante la excitación de láser de 488 nm y la detección de la fluorescencia a 530/30 nm y 670 nm, para el DIOC<sub>6</sub>(3) y el IP, respectivamente. Los resultados se expresaron en porcentajes de espermatozoides con daños en mitocondria y espermatozoides con daño en membrana (Padilla 2014).

**Fragmentación del DNA.** Se evaluó en semen descongelado, tomando alícuotas de 100 µL, las cual se fijó con 300 µL de etanol 70% (Sigma Chemical, USA), posteriormente se incubó por 4 horas a 4°C, luego se lavó con PBS ultrafiltrado BD libre de calcio con agitación mecánica en vórtex, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 300 µL de IP + RNasa A (20 u) por cada millón de células; se mezcló en vórtex y se incubaron en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se analizaron por citometría de flujo. Se utilizó un citómetro LSR 2 FORTRESSA (BD Biosciences, USA) para el análisis de las muestras, se excitaron con un láser de fase sólida a 355 nm y se analizaron la fluorescencia a 450/50 nm. Los resultados se expresaron en porcentajes células haploides con DNA fragmentado (Padilla 2014).

### Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como promedio ± desviación estándar. Se utilizó un diseño completamente

aleatorizado con arreglo factorial 3x2. Fue establecido el factor A como la solución crioprotectora, la cual estaba compuesta por tres niveles (DMSO, DMA, EG) y el factor B como el porcentaje de inclusión del crioprotector (5, 10%). A todas las variables analizadas se les realizó pruebas de normalidad (Prueba Kolmogórov-Smirnov) y de homogeneidad de varianza (prueba Barlett). Una vez fueron cumplidos los supuestos de normalidad y homocedasticidad fue evaluado el efecto de cada factor y su interacción en cada parámetro analizado mediante análisis de varianza (ANOVA) y cuando se encontró diferencia significativa se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey. En todos los casos  $p < 0.05$  fue utilizado como criterio estadístico para revelar diferencia significante. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R versión 3.3.2 (2017) para Windows.

### Resultados

El semen fresco de dorada ( $n=12$ ) presentó color en el rango de amarillo a amarillo pardo, volumen seminal promedio de  $1.2 \pm 0.3$  mL, movilidad superior a 90%, tiempo de activación de  $37.1 \pm 1.5$  s y una concentración espermática de  $17524.0 \times 10^6 \pm 3542.4$  espermatozoides/mL.

La tabla 1, registra los valores promedios de algunas características del semen fresco y precongelado con DMSO, DMA y EG a dos porcentajes de inclusión (5 y 10%). Los valores de movilidad total ( $97.0 \pm 7.0\%$ ),

**Tabla 1.** Características seminales del semen fresco (control) y precongelado de dorada *Brycon sinuensis* con tres crioprotectores a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%). DMSO, dimetilsulfóxido; DMA, dimetilacetamida; EG, etilenglicol. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) ( $n=12$ ).

Parámetro	Semen fresco	Semen precongelado					
		DMSO5%	DMSO10%	DMA5%	DMA10%	EG5%	EG10%
Mt (%)	97.0±7.0 <sup>a</sup>	73.7±17.2 <sup>bc</sup>	82.5±17.9 <sup>ab</sup>	31.7±5.1 <sup>e</sup>	33.1±1.4 <sup>e</sup>	59.9±11.8 <sup>cd</sup>	43.5±6.8 <sup>de</sup>
Rápidos (%)	53.1±27.1 <sup>a</sup>	6.6±4.8 <sup>b</sup>	9.3±6.8 <sup>b</sup>	0.2±0.1 <sup>b</sup>	0.1±0.2 <sup>b</sup>	1.4±0.8 <sup>b</sup>	0.9±0.5 <sup>b</sup>
Medios (%)	32.3±19.1 <sup>a</sup>	26.8±12.9 <sup>abc</sup>	28.6±15.5 <sup>ab</sup>	1.4±0.4 <sup>d</sup>	2.4±1.1 <sup>d</sup>	11.2±5.7 <sup>bcd</sup>	5.2±2.8 <sup>cd</sup>
Lentos (%)	11.6±11.8 <sup>d</sup>	40.3±1.6 <sup>abc</sup>	44.7±13.2 <sup>ab</sup>	30.0±4.7 <sup>c</sup>	30.6±0.2 <sup>bc</sup>	47.3±5.3 <sup>a</sup>	37.4±3.9 <sup>abc</sup>
Inmóviles (%)	3.0±7.0 <sup>e</sup>	26.3±17.2 <sup>cd</sup>	17.5±17.9 <sup>de</sup>	68.3±5.1 <sup>a</sup>	66.9±1.4 <sup>a</sup>	40.1±11.8 <sup>bc</sup>	56.5±6.8 <sup>ab</sup>
VCL (µm/s)	92.0±23.0 <sup>a</sup>	48.1±11.2 <sup>b</sup>	48.6±14.0 <sup>b</sup>	20.0±1.7 <sup>c</sup>	21.2±2.4 <sup>c</sup>	32.2±4.1 <sup>bc</sup>	27.2±4.3 <sup>bc</sup>
VSL (µm/s)	42.0±11.2 <sup>a</sup>	20.9±2.6 <sup>b</sup>	24.3±6.2 <sup>b</sup>	4.4±1.2 <sup>c</sup>	5.6±1.1 <sup>c</sup>	9.3±1.8 <sup>c</sup>	7.7±1.0 <sup>c</sup>
Pt (%)	60.6±23.7 <sup>a</sup>	15.6±5.5 <sup>b</sup>	20.6±8.7 <sup>b</sup>	0.5±0.4 <sup>b</sup>	1.0±0.8 <sup>b</sup>	4.3±2.0 <sup>b</sup>	2.7±0.4 <sup>b</sup>

Mt, movilidad total; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal; Pt, progresividad total.

progresividad total (60.6±23.7%); así como las velocidades curvilíneas (92.0±23.0 µm/s) y lineal (42.0±11.2 µm/s) fueron mayores en semen fresco, observándose diferencia significativa con los valores que registró el semen precongelado en los diferentes tratamientos (p<0.05). Del semen precongelado la mayor movilidad total fue registrada con DMSO 5 y 10% (73.7±17.2 y 82.5±17.9%), así como los menores porcentajes de espermatozoides estáticos respectivamente (26.3±17.2 y 17.5±17.9%) (p<0.05).

La tabla 2, registra los valores promedios de algunas características del semen descongelado con DMSO,

DMA y EG a dos porcentajes de inclusión (5 y 10%) y su comparación con semen fresco. El semen fresco, fue estadísticamente diferente al semen descongelado en todos los tratamientos (p<0.05). En el semen descongelado la mayor movilidad total fue registrada con DMSO 5 y 10% (40.5±8.7 y 45.4±13.6%), así como el menor valor de espermatozoides estáticos respectivamente (59.5±8.7 y 54.6±13.6%) (p<0.05). La movilidad total, porcentaje de espermatozoides lentos, inmóviles y velocidades espermáticas (VCL, VSL) del semen descongelado con DMA, bien sea al 5 o 10%, mostró valores similares a los registros del semen precongelación.

**Tabla 2.** Características seminales del semen fresco (control) y descongelado de dorada *Brycon sinuensis* con tres crioprotectores a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%). DMSO, dimetilsulfóxido; DMA, dimetilacetamida; EG, etilenglicol. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p<0.05) (n=12).

Parámetro	Semen fresco	Semen descongelado					
		DMSO5%	DMSO10%	DMA5%	DMA10%	EG5%	EG10%
Mt (%)	97.0±7.0 <sup>a</sup>	40.5±8.7 <sup>bc</sup>	45.4±13.6 <sup>b</sup>	34.8±5.8 <sup>cd</sup>	32.1±7.6 <sup>d</sup>	33.9±7.4 <sup>d</sup>	32.7±5.3 <sup>d</sup>
Rápidos (%)	53.1±27.1 <sup>a</sup>	2.5±2.4 <sup>b</sup>	2.2±1.9 <sup>b</sup>	2.1±2.9 <sup>b</sup>	2.1±2.2 <sup>b</sup>	2.6±3.5 <sup>b</sup>	2.0±2.1 <sup>b</sup>
Medios (%)	32.3±19.1 <sup>a</sup>	6.2±2.8 <sup>b</sup>	8.0±4.0 <sup>b</sup>	4.1±3.2 <sup>b</sup>	4.0±3.3 <sup>b</sup>	5.1±4.1 <sup>b</sup>	4.7±2.8 <sup>b</sup>
Lentos (%)	11.6±11.8 <sup>c</sup>	31.7±9.2 <sup>ab</sup>	35.2±11.8 <sup>b</sup>	28.6±6.6 <sup>b</sup>	25.9±6.2 <sup>b</sup>	26.2±5.2 <sup>b</sup>	26.0±5.7 <sup>b</sup>
Inmóviles (%)	3.0±7.0 <sup>d</sup>	59.5±8.7 <sup>bc</sup>	54.6±13.6 <sup>c</sup>	65.2±5.8 <sup>ab</sup>	68.0±7.6 <sup>a</sup>	66.1±7.4 <sup>a</sup>	67.3±5.3 <sup>a</sup>
VCL (µm/s)	92.0±23.0 <sup>a</sup>	27.6±3.7 <sup>b</sup>	28.2±3.9 <sup>b</sup>	24.1±5.7 <sup>b</sup>	25.3±5.3 <sup>b</sup>	26.3±5.9 <sup>b</sup>	26.4±3.2 <sup>b</sup>
VSL(µm/s)	42.0±11.2 <sup>a</sup>	10.0±2.4 <sup>b</sup>	10.1±2.2 <sup>b</sup>	6.7±3.0 <sup>c</sup>	6.9±2.7 <sup>c</sup>	8.0±3.5 <sup>bc</sup>	7.9±2.3 <sup>bc</sup>
Pt (%)	60.6±23.7 <sup>a</sup>	4.8±3.7 <sup>b</sup>	5.4±3.6 <sup>b</sup>	4.0±5.0 <sup>b</sup>	3.9±4.0 <sup>b</sup>	4.9±5.9 <sup>b</sup>	4.0±3.9 <sup>b</sup>

Mt, movilidad total; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal; Pt, progresividad total.

Los porcentajes de daños en mitocondrias (D-Mit), en membrana espermática (D-Mem) y la fragmentación de DNA (F-DNA) del semen descongelado de dorada se muestra en la tabla 3. Los D-Mit oscilaron entre 83.4±4.2% (DMSO10%) y 59.4±14.8% (DMA5%), sin observarse diferencia estadística entre estos valores (p>0.05). Los daños en membrana espermática (D-Mem) oscilaron entre 62.1±18.8% (DMA5%) y 49.8±9.8% (DMSO5%), sin observarse diferencia estadística entre estos valores (p>0.05); mientras que F-DNA osciló entre 9.5±14.0% (EG10%) y 1.6±0.2% (DMA10%), sin observarse diferencia estadística entre estos valores (p>0.05).

Los efectos de los factores evaluados (crioprotector y porcentaje de inclusión) en la calidad del semen criopreservado de dorada se presentan en la tabla 4. El factor crioprotector afectó altamente las variables de calidad seminal, caso contrario pasó con el factor

**Tabla 3.** Daños en membrana espermática (D-Mem), mitocondrias (D-Mit) y fragmentación del DNA (F-DNA) en semen criopreservado de dorada *Brycon sinuensis* con tres crioprotectores a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%). DMSO, dimetilsulfóxido; DMA, dimetilacetamida; EG, etilenglicol. Letras diferentes indica diferencia significativa (p<0.05).

Tratamiento	D-Mem (%)	D-Mit (%)	F-DNA (%)
DMSO5%	49.8±9.8 <sup>a</sup>	78.9±3.2 <sup>a</sup>	7.9±10.9 <sup>a</sup>
DMSO10%	55.5±1.6 <sup>a</sup>	83.4±4.2 <sup>a</sup>	6.6±9.7 <sup>a</sup>
DMA5%	62.1±18.8 <sup>a</sup>	59.4±14.8 <sup>a</sup>	3.2±2.9 <sup>a</sup>
DMA10%	58.5±11.9 <sup>a</sup>	76.0±3.7 <sup>a</sup>	1.6±0.2 <sup>a</sup>
EG5%	59.8±1.0 <sup>a</sup>	63.1±22.0 <sup>a</sup>	8.1±11.7 <sup>a</sup>
EG10%	55.8±1.6 <sup>a</sup>	62.4±35.1 <sup>a</sup>	9.5±14.0 <sup>a</sup>

porcentaje de inclusión e interacción de las variables, los cuales no tuvieron efecto, en los porcentajes de inclusión evaluados (5 o 10%) sobre las variables analizadas.

**Tabla 4.** Efectos factores y su interacción sobre la calidad del semen criopreservado-descongelado de dorada.  
\*\*\* altamente significativa ( $p < 0.001$ ).

Parámetros	Factor A Crioprotector	Factor B Porcentaje inclusión	Interacción AxB
Movilidad total (%)	***	-	-
Rápidos (%)	***	-	-
Medios (%)	***	-	-
Lentos (%)	***	-	-
Estáticos (%)	***	-	-
Progresividad Total (%)	***	-	-
Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	***	-	-
Velocidad lineal ( $\mu\text{m/s}$ )	***	-	-
Daños en membrana	-	-	-
Daños en mitocondria	-	-	-
Fragmentación del DNA	-	-	-

## Discusión

El semen fresco dorada utilizado en el presente estudio, fue colectado en el inicio de la temporada reproductiva (marzo-abril) y registró alta movilidad total (>95%); lo cual sugiere un semen de buena calidad. Estudios previos con espermatozoides de dorada registraron tiempo de activación (33.7 s) y concentración espermática ( $12393.1 \times 10^6$  espermatozoides/ml) (Atencio *et al.*, 2017) similares a los reportados en el presente estudio.

En semen congelado la movilidad total, tipos de movilidad y velocidad espermática disminuyeron con relación a SF ( $p < 0.05$ ); pero cuando fue utilizado DMA, a 5 o 10%, la movilidad total y las velocidades espermáticas (VCL, VSL) se redujeron a menos de la tercera parte y el porcentaje de espermatozoides estáticos se incrementó alrededor de veinte veces con relación a semen fresco. Mientras que el semen tratado con

DMSO 10% fue el que registró la mejor cinemática espermática en la fase de precongelación. En esta fase los efectos sobre la movilidad, tipos de movilidad y velocidad espermática se sugieren como consecuencia del choque hiperosmótico y la toxicidad del crioprotector. Según Maulida *et al.* (2021) cada solución crioprotectora presenta ventajas y desventajas particulares debido a que cada especie de pez requiere un crioprotector específico a una concentración óptima.

En el presente estudio todas las soluciones crioprotectoras fueron altamente hiperosmóticas (>1500 mOsmol/Kg). Cuevas-Urbe *et al.* (2011) atribuyeron la disminución de la movilidad a las altas presiones osmóticas provocadas por las altas concentraciones del crioprotector así como a los efectos tóxicos de los crioprotectores. Padilla (2014) señaló que desde el mismo momento en que el semen entra en contacto con la solución crioprotectora se produce daños en las mitocondrias y membrana espermática como consecuencia del choque hiperosmótico y la toxicidad del crioprotector y que estos daños se incrementan durante los procesos de congelación y descongelación y la magnitud de los daños criogénicos puede resultar en la disminución de la movilidad en asociación con reducción de la velocidad y la fertilidad. Martínez y Pardo (2010) sugirieron que disminución de la movilidad total y velocidad espermática en la precongelación, está relacionada con la alteración de la síntesis de las proteínas implicadas en la producción energética celular y las reservas de ATP. He y Woods (2004) reportaron que el nivel de ATP del semen congelado de *Morone saxatilis* disminuyó considerablemente cuando el crioprotector entró en contacto con las células espermáticas. Golpour *et al.* (2016, 2017) afirman que los compartimentos subcelulares de los espermatozoides de peces, incluidos el acrosoma (caso esturiones), núcleo (cabeza), pieza intermedia, flagelo, citosol y membrana plasmática, son vulnerables a los daños criogénicos que conducen a la discapacidad de la función celular (Nynca *et al.*, 2015).

En semen descongelado los resultados de movilidad total, tipos de movilidad y velocidad indican que los espermatozoides fueron afectados por los procesos de congelación y descongelación. Después de la descongelación se observó menos del 5% de espermatozoides rápidos, los medios se redujeron a menos del 10%, aumentaron los espermatozoides lentos y estáticos y disminuyeron las velocidades espermáticas (VCL, VSL). El semen tratado con DMA a los dos porcentajes de inclusión (5 y 10%), luego de descongelado man-

tuvieron estables sus valores de cinemática espermática en comparación con el semen precongelado. Sin embargo, DMSO a los dos porcentajes de inclusión registró una marcada reducción de la cinemática espermática de casi el 50% de los valores obtenidos en la precongelación. Este comportamiento permite sugerir que, para el semen de dorada, DMSO tiene un efecto menos tóxico como crioprotector, pero ofrece menos protección contra los choques térmicos durante los procesos de congelación y descongelación; comportamiento inverso al observado para DMA quien posiblemente tenga un efecto más tóxico como agente crioprotector en la fase de precongelación, pero ejerce una mejor protección sobre el espermatozoide en los procesos de congelación y descongelación.

En semen descongelado el daño a nivel de membrana osciló entre  $62.1 \pm 18.8\%$  (DMA5%) y  $49.8 \pm 9.8\%$  (DMSO5%). Se ha sugerido que los cambios que ocurren en la membrana plasmática durante la crioconservación están fuertemente asociados con el tipo de crioprotector, el nivel de inclusión y el diluyente que podrían ocasionar apoptosis celular, que junto con los daños en mitocondrias ocasionan la disminución de la movilidad y velocidad espermática (Marco-Jiménez *et al.*, 2006). Cabrita *et al.* (2001) señalaron que durante el proceso de congelación y descongelación la sensibilidad de la membrana produce cambios en la estabilidad y aumento de la fragilidad de la misma, lo que resulta en un incremento de su permeabilidad al agua y a cationes, que provoca un estrés osmótico; además durante la descongelación, se produce un flujo de agua al interior de la célula, lo cual puede causar la ruptura de la membrana (Drokin, 1998). Igualmente, los procesos de deshidratación o hidratación provocan fricción excesiva del agua superando la capacidad de difusión de la membrana del esperma (Muldrew y McGann, 1990). La velocidad de difusión del crioprotector a través de la membrana plasmática puede verse afectada también por el aumento en la proporción de colesterol en la membrana durante el descenso de temperatura, ya que, al aumentarlo para proporcionarle una mayor estabilidad mecánica, la permeabilidad de la membrana a pequeñas moléculas disminuye, afectando así la penetración del crioprotector a la célula (Spinel, 2002). El daño a la membrana plasmática produce la pérdida de componentes intracelulares como proteínas y enzimas, así como otros componentes que coeluyen en la reducción de la actividad metabólica y, en consecuencia, a una disminución en la calidad espermática (Li *et al.*, 2010). Dietrich *et al.* (2015) mediante análisis proteómico del líquido seminal después de la criocon-

servación encontraron alteración en varias proteínas implicadas en múltiples funciones asociadas principalmente con el metabolismo, así como la repuesta al estrés, señal de transducción, apoptosis, transcripción, translación, plegamiento de proteínas y reparación del DNA; estas alteraciones de las proteínas comprometen funciones fisiológicas como movilidad, capacidad fertilizante y eventos iniciales después de la fertilización.

En semen descongelado tampoco se evidenció que la intensidad del daño en mitocondria estuviera asociada al crioprotector, así como a su nivel de inclusión. El estrés oxidativo se considera como una de las principales causas del daño mitocondrial (Cabrita *et al.*, 2010), debido a que promueve la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales afectan la eficiencia respiratoria mitocondrial (Ferramosca *et al.*, 2013); también se sugiere como posible causa del daño mitocondrial los cambios morfológicos ocurridos en la pieza media del espermatozoide que afectan la pérdida de la envoltura densa de las mitocondrias (Yao *et al.*, 2000). La pérdida de la funcionalidad mitocondrial reduce el potencial de la membrana mitocondrial ocasionando pérdida de la movilidad y velocidad espermática.

Un comportamiento similar fue observado en la fragmentación del DNA, donde sin importar el crioprotector o su nivel de inclusión, no fueron observadas asociaciones entre los distintos niveles de los factores evaluados. La fragmentación de DNA ocasionada por la crioconservación afecta el desarrollo del embrión e incrementa la mortalidad de los embriones tempranos (Zribi 2008). Se ha sugerido que el DNA nuclear sufre fragmentación debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cabrita *et al.*, 2014), por lo que el estrés oxidativo además de modificar las histonas presentes en el DNA nuclear, podría causar efectos sobre la expresión de los genes (Chervona y Costa 2012). Según Cabrita *et al.* (2014), las bases nitrogenadas en el DNA, en particular guanina, son el principal objetivo de ataque de las ROS, generando 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina (8OHdG); esta reacción debilita el enlace entre la guanina y la unidad de ribosa adyacente, produciendo la pérdida de la base oxidada, desestabilizando la estructura del DNA y resultando en la fragmentación de las hebras localizadas. Labbé *et al.* (2001) encontraron que el daño del DNA del espermatozoide crioconservado de trucha arco iris se relacionó negativamente con la fertilización, no obstante, no atribuyeron totalmente la baja capacidad fecundante a la alteración del DNA. Se ha sugerido que daños en



la cromatina tiene efectos importantes en el desarrollo embrionario inicial más que en la fertilización, en virtud de su papel en el control de la expresión génica en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Delbès *et al.*, 2010).

Los resultados del presente estudio permiten concluir que las mitocondrias, membrana plasmática e integridad del DNA del espermatozoide de dorada sufren daños importantes en la fase de congelación/descongelación cuando es crioconservado con DMSO, DMA y ETG en inclusiones del 5 y 10%; que afecta su cinemática espermática. En la congelación/descongelación el nivel de inclusión del crioprotector (5 o 10%) es independiente de los daños que ocasiona en membranas, mitocondrias y DNA; por lo cual se sugiere que una solución crioprotectora que incluya los crioprotectores evaluados (DMSO, DMA, ETG), a los porcentajes de inclusión (5 o 10%), en combinación con glucosa 6 % y yema de huevo 12%, utilizando una curva de descongelación a 35°C durante 90 segundos es una alternativa para la crioconservación de semen de dorada.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vice-rectoría de Investigación y Extensión de la Universidad de Córdoba por su financiación (proyecto FMV-02-17) y al Instituto de Investigaciones Piscícolas CINPIC por proporcionar infraestructura y personal.

## Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés respecto al trabajo aquí presentado.

## Referencias

- Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *Journal Andrology*, 2012;33:1096–1106.
- Atencio-García V. Impactos de la Hidroeléctrica Urrá en los peces migratorios del río Sinú. *Revista Temas Agrarios*, 2000;5(9):29-40.
- Atencio-García V, Prieto M, Espinosa J, Pertuz V, Montes C, Dorado M, Navarro E. Crioconservación del semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido. *Revista colombiana de biotecnología*, 2017;19(2):87-94.
- Bobé J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinology*; 2010;165(3):535-548.
- Cabrera E, Martínez-Páramo S, Gavaia PJ, Riesco MF, Valcarlos DG, Sarasquete C, Herráez MP, Robles V. Factors enhan-

cing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 2014;432:389-401. DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.04.034.

- Cabrera E, Sarasquete C, Martínez S, Robles V, Beirão J, Pérez S, Herráez M. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010;26:623-635.
- Cabrera E, Anel L, Herráez MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*; 2001;56:623-635.
- Chervona Y, Costa M. The control of histone methylation and gene expression by oxidative stress, hypoxia, and metals. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012;53: 1041-1047.
- Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spano M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, 2005;72:273-279.
- Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú *Brycon amazonicus*. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*, 2006b;19(2):153-159.
- Cruz-Casallas P, Medina-Robles V, Velasco-Santamaría Y. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2006;19(2):146-151.
- Cuevas-Urbe R, Leibo S, Daly J, Tiersch T. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology*, 2011;63:186- 197.
- Delbès C, Hales BF, Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Molecular Human Reproduction*, 2010;16(1):14-22.
- Dietrich M, Arnold G, Frohlich T, Otte K, Dietrich G, Ciereszko A. Proteomic analysis of extracellular medium of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2015;15:49-57.
- Drokin S, Stein H, Bartscherer H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta*). *Cryobiology*, 1998;37:263-270.
- Espinosa J. (2013). Crioconservación de semen de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus*. 2013. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Básicas. Maestría en Biotecnología, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Ferramosca A, Pinto Provenzano S, Montagna DD, Coppola L, Zara V. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology*, 2013;82: 78-83.
- Figuerola E, Valdebenito I, Zepeda A, Figuerola C, Dumorné K, Castillo R. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Aquaculture*, 2017;9:76-87.
- Golpour A, Psenicka M, Niksirat H. Ultrastructural localization of intracellular calcium during spermatogenesis of sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Microscopy and Microanalysis*, 2016;22:1155-1161.

- Golpour A, Psenicka M, Niksirat H. Subcellular distribution of calcium during spermatogenesis of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Morphology*, 2017;278:1149-1159.
- He S, Woods L. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 2004;48:254-262.
- Labbé C, Martoriati A, Devaux A, Maise G. Effects of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction Development*, 2001;60:397-404.
- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the aspiring young actor, *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture Research*, 2004;35:519-528.
- Li P, Hulak M, Koubek P, Sulc M, Dzyuba B, Boryshpolets S, Rodina M, et al. Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Theriogenology*, 2010;74:413-423.
- Li P, Wei Q, Liu L. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 2008;24:121-125.
- Marco-Jiménez F, Pérez L, Viudes-de-Castro M, Garzón D, Peñaranda D, Vicente J, Jover M, Asturiano J. Morphometry characterization of European eel spermatozoa with computer assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology*, 2006;65:1302-1310.
- Martínez J, Pardo S. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana*, 2010;15(2):3-23.
- Maulida S; Eriani K; Muhammad FN; Fadli N; Setia AB; Adan AM; et al. Effect of cryoprotectant on the motility, viability, fertilization, and DNA integrity of nalah fish *Barbonymus sp.* (Cyprinidae) sperm. *Brazilian journal of veterinary research and animal science*, 2021;58: e168702.
- Mojica J, Álvarez R, Usma J, Lasso C. (2012). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La Serie Libros Rojo de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p. 205-208.
- Morales M, Lasso C. (2011). *Brycon sinuensis* (Characiformes, Characidae), Capítulo 7. En: Lasso, C. A., E. Agudelo Córdoba, L. F. Jiménez-Segura, H. Ramírez-Gil, M. Morales-Betancourt, R. E. Ajiaco, F. de P. Gutiérrez, J. S. Usma Oviedo, S. E. Muñoz Torres, A. I. Sanabria Ochoa (Eds.) I. Catálogo de los Recursos Pesqueros Continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia, p. 211-213.
- Muchlisin ZA, Siti Azizah MN. Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. *Cryobiology*; 2009;58:166-169.
- Muldrew K, MCGann L. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophysical Journal*, 1990;57:525-532.
- Nynca J, Arnold G, Frohlich T, Ciereszko A. Cryopreservation induced alterations in protein composition of rainbow trout semen. *Proteomics*, 2015;15:2643-2654.
- Padilla D. (2014). Evaluación de daños en el espermatozoide de bagre blanco *Sorubim cuspicaudus* durante la crioconservación con etilenglicol (Tesis de maestría). Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba, Montería.
- Spinel C. (2002). Biología molecular de la célula eucariótica animal. 1 ed. Medellín (Colombia): Fondo editorial Biogenesis, Pp.31-68.
- Tiersch T. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2008;37(supl):15-19.
- Velasco-Santamaría Y, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Criopreservación of yamú *Brycon amazonicus* sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*, 2006;256:264-271.
- Xin M, Niksirat H, Shaliutina-Kolešová A, Siddique M, Sterba J, Boryshpolets S, Linhart O. Molecular and subcellular cryoinjury of fish spermatozoa and approaches to improve cryopreservation. *Reviews in Aquaculture*, 2020;12(2):909-924. Doi: 10.1111/raq.12355.
- Yao Z, Crim L, Richardson G, Emerson C. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*; 2000;181:361-375.
- Zribi N, Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility*, 2008;93:159-166.