

## Parámetros de calidad espermática en semen crioconservado de peces dulceacuícolas

### Sperm quality parameters in freshwater fish cryopreserved semen

### *Parâmetros de qualidade espermática em sêmen crio preservado de peixes de água doce*

Owens J. Barros-Barrios<sup>1</sup>  Víctor M. Medina-Robles<sup>2</sup> 

## RESUMEN

La acuicultura a escala mundial cada vez toma más relevancia y se ha convertido en una fuente de alimento e ingresos económicos de muchas comunidades alrededor del mundo. Sin embargo, actividades como la sobreexplotación del recurso hídrico y pesquero, el aumento de la población humana, la contaminación ambiental, el cambio climático, entre otros factores, están poniendo en riesgo no solo la seguridad alimentaria del planeta, sino también la biodiversidad de organismos, entre ellos los peces. Una de las herramientas para salvaguardar los recursos biológicos acuáticos, es la crioconservación, que en peces se enfoca principalmente en la conservación de semen en nitrógeno líquido y esta, pesar de ser una técnica muy útil, es susceptible a mejoramiento, ya que se ha reportado que las bajas temperaturas usadas en la crioconservación pueden causar efectos negativos en las células espermáticas, debido a esto es necesario establecer protocolos especie específicos para sacarle todo el potencial a esta forma de conservación. Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es recopilar información sobre los principales parámetros de calidad espermática que se ven afectados en el momento de crioconservar el semen, haciendo énfasis en las especies dulceacuícolas.

**Palabras clave:** acuicultura, conservación, recursos genéticos

#### Artículo de revisión

Recibido: 10 de noviembre de 2022

Aceptado: 14 de diciembre de 2022

Publicado: 16 de Diciembre de 2022

- 1 MVZ, MSc (c); Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos - GRITOX, Instituto de Acuicultura y Pesca de Los Llanos-IALL, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Email: [owens.barros@unillanos.edu.co](mailto:owens.barros@unillanos.edu.co) <https://orcid.org/0000-0001-8900-7062>
- 2 MVZ, MSc, Dr; Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos - GRITOX, Instituto de Acuicultura y Pesca de Los Llanos-IALL, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Email: [vmmedinarobles@unillanos.edu.co](mailto:vmmedinarobles@unillanos.edu.co) <https://orcid.org/0000-0002-4871-2715>

**Como Citar (Norma Vancouver):** Barros-Barrios OJ, Medina-Robles VM. Parámetros de calidad espermática en semen crioconservado de peces dulceacuícolas. *Orinoquia*, 2022;26(2):e-764 <https://doi.org/10.22579/20112629.764>

La Revista Orinoquia es una revista de acceso abierto revisada por pares. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Internacional Creative Commons Attribution 4.0 (CC-BY 4.0), que permite el uso, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor y la fuente originales.

Consulte <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

OPEN ACCESS



## ABSTRACT

Aquaculture on a global scale is becoming more and more relevant and has become a source of food and economic income for many communities around the world. However, activities such as the overexploitation of water and fishing resources, the increase in human population, environmental pollution, climate change, among other factors, are putting at risk not only the food security of the planet, but also the biodiversity of organisms, including fish. One of the tools to safeguard aquatic biological resources is cryopreservation, which in fish focuses mainly on the preservation of semen in liquid nitrogen and this, despite being a very useful technique, is susceptible to improvement, since it has been reported that the low temperatures used in cryopreservation can cause negative effects on sperm cells, due to this it is necessary to establish species-specific protocols to get the full potential of this form of conservation. Therefore, the objective of this review is to compile information on the main sperm quality parameters that are affected when cryopreserving semen, with emphasis on freshwater species.

**Keywords:** aquaculture, conservation, genetic resources

## RESUMO

A aquicultura à escala global está a tornar-se cada vez mais relevante e tornou-se uma fonte de alimento e rendimento económico para muitas comunidades em todo o mundo. No entanto, atividades como a sobreexploração dos recursos hídricos e pesqueiros, o aumento da população humana, a poluição ambiental, as alterações climáticas, entre outros fatores, estão a colocar em risco não só a segurança alimentar do planeta, mas também a biodiversidade dos organismos. Incluindo peixes. Uma das ferramentas para salvaguardar os recursos biológicos aquáticos é a criopreservação, que nos peixes centra-se principalmente na preservação do sêmen em azoto líquido e está, apesar de ser uma técnica muito útil, é susceptível de melhoria, uma vez que foi relatado que as baixas temperaturas utilizadas na criopreservação pode causar efeitos negativos nos espermatozoides, por isso é necessário estabelecer protocolos espécie-específicos para aproveitar todo o potencial desta forma de conservação. Portanto, o objetivo desta revisão é compilar informações sobre os principais parâmetros de qualidade espermática que são afetados na criopreservação do sêmen, com ênfase nas espécies de água doce.

**Palavras chave:** aquicultura, conservação, recursos genéticos

## INTRODUCCIÓN

Globalmente, los peces han constituido una fuente importante de alimento, además un recurso económico imprescindible para muchas comunidades humanas. Constituyen la mitad de las especies de vertebrados en el planeta, y se han reportado aproximadamente 34500 de ellas, de estas, el 43% corresponde a peces dulceacuícolas (Nelson et al., 2016). Esto indica que esta enorme diversidad biológica está concentrada en solo el 0,01% de toda el agua disponible en la Tierra (Lundberg et al., 2000). En América, la biodiversidad es tan alta, que se considera que existan por lo menos cinco mil especies de peces dulceacuícolas, esto representa alrededor de un tercio de lo estimado a nivel mundial (Reis et al., 2016). Para Colombia, se han descrito 1610 especies de peces dulceacuícolas, 775 de ellas, en la región hidrográfica del Amazonas, 728 en la del Orinoco, 233 en la de los ríos Magdalena y Cauca, 231 para la del Caribe y 128 en la del Pacífico, además 401 especies son endémicas. Así mismo y debido a que el inventario de estos organismos acuáticos en el país dista de estar completo, se espera a que el número de especies reportadas incrementen en los próximos años (DoNascimento et al., 2020, 2016). Debido a esta riqueza biológica, Colombia junto con otros 14 países, ha sido catalogado como un país megadiverso, con uno de los índices de biodiversidad más alto en la Tierra (Andrade-Correa, 2011). No obstante, el crecimiento exponencial y acelerado de la población, la falta de planeación con respecto al uso de los suelos y a una visión de continuo desarrollo, ha traído como consecuencia una sobreexplotación de los recursos naturales, impactos negativos en los ecosistemas y pérdida de la biodiversidad (Paniagua-Chávez et al., 2011). Con respecto a los ecosistemas dulceacuícolas, actividades como la minería, construcción de hidroeléctricas, sobreexplotación pesquera, la deforestación debido a la urbanización y el avance de la frontera agrícola, la contaminación industrial y doméstica, el cambio climático e introducción de especies exóticas, además de las pocas e inexistentes políticas sobre el uso sostenible del recurso hídrico, han

disminuido las poblaciones de estos ecosistemas hasta en un 83% desde el año 1970 (Jimenez-Segura et al., 2016; Lasso et al., 2016). Debido a que los peces de agua dulce han sido subvalorados y pasados por alto, muchas especies van en camino hacia la extinción (Carvajal-Quintero et al., 2017). La biodiversidad de agua dulce está disminuyendo al doble de la tasa de nuestros océanos o bosques. 80 especies de peces dulceacuícolas ya han sido declaradas "extintas" por la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN, donde solo 16 de ellas se reportaron en el 2020 (WWF, 2021). Para el caso de Suramérica, por lo menos el 10% de las especies de peces presentan algún grado de amenaza (Reis et al., 2016) y para Colombia, se han identificado 83 especies con algún tipo de riesgo, una se encuentra ya Extinta, una En peligro Crítico, cuatro especies En Peligro, 48 especies Vulnerables, 24 especies Casi Amenazadas (Mójica, 2012).

Con el fin de aumentar la expectativa de vida y salud de los seres humanos la Organización Mundial de la Salud, recomendó el consumo de pescado (WHO, 2003). Debido a esto, ha aumentado el interés en los productos provenientes de la acuicultura, y esto se ve reflejado en las cifras de producción acuícola mundial reportada para peces comestibles (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos, 2015). La producción acuícola mundial se triplicó en volumen de peso vivo de 34 millones de toneladas (Mt) en 1997 a 112 Mt en 2017, donde los peces de agua dulce representan aproximadamente el 38% (42 Mt) de la producción total, siendo Asia el mayor productor, aportando el 92% de peso vivo de los animales cultivados (Rosamond et al., 2021). Para Colombia, la producción piscícola ha tenido un crecimiento importante en los últimos años, pasando de producir 82.622 Toneladas (t) en el 2011 a 179.351 t en el 2020, las principales especies cultivadas fueron la tilapia, trucha, cachama y camarón. Y los principales núcleos de producción en el país, fueron en los departamentos del Huila y Meta, con el 39% y 11% respectivamente (MADR, 2021).

Con base en lo anterior, los recursos genéticos animales (RGAn) son fundamentales, no solo para

la seguridad alimentaria, sino también para salvaguardar la diversidad biológica del planeta (FAO, 2007). La crioconservación y almacenamiento de germoplasma en Bancos de Recursos Genéticos (BRG) usando nitrógeno líquido, es la alternativa más común para preservar RGA, estas instituciones tienen el potencial de desacelerar la pérdida de la biodiversidad y promover el desarrollo sostenible preservando material genético (Paniagua-Chávez et al., 2011; Martínez-Páramo et al., 2017; Medina-Robles et al., 2020). A pesar de que la crioconservación se puede usar para preservar células somáticas, espermatogonias, células germinales primordiales, ovocitos, embriones de peces, entre otros, los espermatozoides han sido los más usados para conservar germoplasma de especies acuáticas, ya que, si se comparan con otros tipos de células, estos son más pequeños y relativamente más resistentes a procesos de enfriamiento (Martínez-Páramo et al., 2017). La crioconservación de gametos evita la dependencia de reproductores a la hora de realizar programas de biotecnologías como la inseminación artificial, incluso por fuera de temporadas reproductivas, además, facilita el transporte del germoplasma a sitios muy alejados o de difícil acceso, con el fin de realizar programas de mejoramiento genético con interés comercial o de conservación (Paniagua-Chávez et al., 2011; Streit et al., 2015).

Pero a pesar de sus beneficios, la crioconservación ocasiona daño en las células espermáticas, debido al estrés tóxico y osmótico causado por la exposición a los crioprotectores y por los choques térmicos que sufren los espermatozoides durante la congelación y posterior descongelación, estos daños se pueden ver reflejados en la disminución de la movilidad, velocidad espermática y capacidad fertilizante del semen crioconservado (Atencio-García, 2016). Además, la mayoría de los estudios sobre crioconservación seminal, se han llevado a cabo en salmónidos, ciprínidos y esturiones, por su alto interés comercial a nivel mundial, pero recientemente se ha volcado la mirada a especies tropicales y subtropicales (Viveiros y Godinho, 2009; Duarte-Trujillo et al., 2021). Por con-

siguiente, el objetivo de esta revisión es explicar los principales daños celulares y moleculares que causa la crioconservación en los espermatozoides de los peces dulceacuícolas, teniendo en cuenta algunos parámetros de calidad espermática y los principios que los generan, tanto físicos como bioquímicos.

## PARÁMETROS DE CALIDAD ESPERMÁTICA

La calidad espermática se define, desde un punto de vista biológico, como la capacidad que tiene un espermatozoide para fertilizar exitosamente un ovocito, y posteriormente desarrollar un embrión normal y funcional, esta capacidad está determinada por parámetros que permiten pronosticar el grado de calidad del gameto (Bobe y Labbé, 2010). Las variables o parámetros que nos permiten inferir sobre la calidad de los espermatozoides son: movilidad, integridad de membrana espermática, concentración de nucleótidos como el adenosín trifosfato (ATP), capacidad antioxidante, integridad de ADN, morfología, tasa de fertilización, entre otros (Cabrita et al., 2014). También se ha reportado que los daños causados por la crioconservación a los espermatozoides influyen directamente en el desarrollo embrionario, malformaciones y sobrevivencia larval (Figuroa et al., 2018)

### *Movilidad espermática*

Se conoce como movilidad, a la capacidad que tiene la célula espermática para encontrar y entrar en el ovocito, con el fin de lograr una fertilización exitosa. Este parámetro es una de las principales variables de calidad espermática en peces, y debido a que combina diversos componentes celulares, es conocida como una variable de calidad integradora (Tabares et al., 2005; Bobe y Labbé, 2010). La activación de la movilidad espermática en peces dulceacuícolas ocurre cuando el semen entra en contacto con una solución de menor osmolaridad a la del plasma seminal (Martínez et al., 2011). Esta activación parece ser dependiente de la presencia

extracelular de iones como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{K}^+$ , aunque en este proceso también se ven involucradas variables como el pH y la temperatura. Aún no están completamente dilucidados los mecanismos celulares que llevan a la activación espermática, sin embargo, existe un modelo que ha servido de base para comprender este proceso, y es la disminución de la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular. Este choque hiposmótico causa una salida de iones de  $\text{K}^+$  intracelulares, lo que da origen a una hiperpolarización de la membrana, y un subsecuente incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, lo que desencadena la síntesis y liberación de ATP y de cAMP, lo que finalmente lleva a la activación de la dineína que da inicio la movilidad espermática (Martínez y Pardo-Carrasco, 2010; Kholodnyy et al., 2020).

Se ha reportado que técnicas como la crioconservación seminal pueden estar asociadas con disfunción mitocondrial, dando como resultado a una baja movilidad y disminución en la capacidad de fertilización (Liu et al., 2007). Durante la crioconservación, los daños en las mitocondrias de los espermatozoides que pueden afectar su movilidad son de dos tipos: Uno directo al ADN mitocondrial o alteraciones en su membrana, ya sea interna o externa, y otro daño indirecto provocado al ADN nuclear, del que depende la mitocondria para producir proteínas que no codifica su genoma (Figueroa et al., 2017). Durante la crioconservación de semen del *Polydon spathula*, se reportaron daños en el ADN nuclear, lo que produjo una marcada reducción de la motilidad espermática luego de su posdescongelación (Li et al., 2008). Así mismo, Kommisrud et al. (2020) reportaron que los espermatozoides de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) redujeron significativamente su motilidad total y progresiva después de su descongelación. En cuanto a peces neotropicales, Ramírez-Merlano et al. (2011) reportaron que la crioconservación disminuyó de manera importante, en variables como la Movilidad Progresiva Lineal Rápida y Lenta, Movilidad Circular y Movilidad Total Espermática Individual del semen descongelado de bagre rayado (*Pseudoplatystoma metaense*). Para *Colossoma macropomum*, se reportó que la movilidad posdes-

congelación de este semen se vio negativamente afectada si se comparaba con el semen fresco, disminuyendo, en el mejor de los casos, en un 12% esta variable, y en el peor, hasta un 91%, esto teniendo en cuenta los crioprotectores usados para su crioconservación (Medina-Robles et al., 2019). En *Prochilodus magdalenae* se encontró que la motilidad del semen disminuyó un 39% cuando este fue sometido a una congelación lenta ( $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), además, este parámetro se inhibió completamente (movilidad=0%) cuando la congelación se realizó de forma rápida ( $-28^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) (Martínez and Pardo-Carrasco, 2013). Así mismo, Medina-Robles et al. (2021), también reportaron una disminución significativa de la movilidad espermática de semen crioconservado de *Pseudoplatystoma orinocoense* en comparación al semen fresco.

Sin embargo, algunas especies de peces dulcea-cuícolas, poseen glicoproteínas en los ovocitos, especialmente en la zona del micropilo, que guían al espermatozoide a entrar al ovulo. Esto podría explicar por qué a pesar de su pobre movilidad, el semen crioconservado posee buenas tasas de fertilidad (Kholodnyy et al., 2020).

### *Integridad de membrana espermática*

La membrana plasmática desempeña una función fundamental en la respuesta del espermatozoide ante su entorno, las características de esta le confieren a la célula espermática capacidad dinámica para regular diversas actividades celulares, entre ellas, el inicio de la movilidad espermática. Por esta razón, la integridad de membrana es un requisito indispensable para las funciones que cumple el gameto, y su pérdida resultará en la muerte celular. La membrana plasmática controla la permeabilidad de solutos hidrofílicos y dirige los eventos de fusión con el ovocito y la señalización celular. La membrana espermática está compuesta por una bicapa lipídica anfipática (fosfolípidos, colesterol y glicolípidos) y es muy delgada, en su estructura se encuentran las proteínas transmembranales que ayudan en el intercambio celular (Márián et al., 1993; Flesch y Gadella, 2000; Cartón-García

et al., 2013; Figueroa et al., 2016). En los procesos de crioconservación, la membrana plasmática se ve expuesta a cambios osmóticos, mecánicos u oxidativos, que conllevan a alteraciones fisicoquímicas como la reestructuración, desintegración, rompimiento, y deshidratación en los fosfolípidos que la componen, además de alteraciones en las interacciones lípido-proteína y peroxidación lipídica, que comprometen su integridad (Holt, 2001; Figueroa et al., 2016).

La resistencia de la membrana plasmática ante el estrés térmico y osmótico al que son sometidas las células durante la crioconservación puede ser mejorada mediante el uso de sustancias que alteren las propiedades de transición de fase en la membrana espermática, como las ciclodextrinas cargadas con lípidos o liposomas unilamelares, estas modifican la membrana celular de tal forma que se aumenta la relación colesterol-fosfolípido (cerca a 1:1). Esto permite una reestructuración de la membrana, lo que modifica los procesos fisiológicos y permite una mayor supervivencia celular a las bajas temperaturas (Purdy y Graham, 2015).

La integridad de la membrana de células espermáticas se puede medir a través de la citometría de fluorescencia, esta técnica por medio de la emisión de luz puede discriminar células en diferentes estadios o condiciones fisiológicas, por ejemplo: vivas, muertas y en apoptosis. La membrana plasmática de los espermatozoides posee diferencias en la permeabilidad según su condición fisiológica, lo que permite a los tintes empleados teñir el ADN. Entre los colorantes usados se encuentran el yoduro de propidio, que penetra en las células necróticas o muertas, intercalándose con el ADN causando una fluorescencia roja. Otro tinte es la Anexina V, está presenta una fuerte y específica interacción con la fosfatidilserina en presencia de  $Ca^{2+}$  que se da cuando una pérdida de simetría en la membrana plasmática, generando una fluorescencia verde o azul tenue, este método es útil para detectar células en apoptosis. Particularmente las células espermáticas vivas no se tiñen y se pueden apreciar como objetos transparentes durante los

análisis (Vermes et al., 2000; López-Hernández et al., 2018).

Para semen descongelado de *Colossoma macropomum* se han reportado porcentajes de Integridad de Membrana Plasmática (IMP) del 46% y del 54% cuando fueron sometidos a tiempos de descongelación de 70 y 90 s, respectivamente, usando metilglicol como crioprotector (Maria et al., 2015). Medina-Robles et al. (2019), encontraron porcentajes de IMP del 83% en la misma especie, pero usando metanol como crioprotector. Dietrich et al. (2014) evaluaron el efecto preservador de la glucosa y el metanol en la crioconservación de semen de *Oncorhynchus mykiss*, reportando un porcentaje de IMP del 50%. Viveiros et al. (2015) encontraron que el metilglicol al 10% mostraron porcentajes de IMP del 57% y de un 78% si se suplementaba con glucosa, al crioconservar semen de *Brycon orbignyanus* y *Prochilodus lineatus*. Según sea el caso, una muestra de buena calidad de semen descongelado es aquella que presenta una IMP superior al 50% (Maria et al., 2011).

### Concentración de ATP

El ATP es un nucleótido libre, normalmente se encuentra dentro de la célula en forma ionizada y para generar energía, este se divide en ADP y fosfato inorgánico (Pi) por medio de una reacción exergónica, proceso que se conoce como fosforilación oxidativa y ocurre casi exclusivamente en la mitocondria (Gómez y Trejo, 2015). La energía para el movimiento flagelar de los espermatozoides es suplida por la hidrólisis del ATP por la enzima Dineína ATPasa, por lo que la cantidad y disponibilidad de ATP es el principal factor limitante para que se mantenga la movilidad espermática en el tiempo (Cosson, 2010) y su concentración puede ser usada como indicador de calidad seminal en semen crioconservado (Figueroa et al., 2016). Se ha comprobado que la congelación y posterior descongelación que sufren los espermatozoides crioconservados provoca una depleción en la producción y almacenamiento de ATP, esto debido a una afectación en el funcionamiento normal de

la dinámica mitocondrial (Figuroa et al., 2019), causada principalmente por la peroxidación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) a las membranas plasmáticas y mitocondriales (Koppers et al., 2010). Así mismo, Boryshpolets et al. (2009) reportaron que cuando se activa la motilidad en espermatozoides criopreservados de *Perca fluviatilis*, se disminuye rápidamente la concentración de ATP, porque la síntesis de este en la mitocondria es insuficiente para mantener la tasa de hidrólisis de la dineína ATPasa.

### Integridad de ADN

El propósito principal del espermatozoide es el de transmitir la información genética del macho a la siguiente generación, por lo que preservar la integridad del genoma debe ser una prioridad al momento de establecer protocolos de criopreservación seminal, debido a que se ha demostrado que esta técnica genera daños en el ADN de los peces (Figuroa et al., 2018). No está del todo comprendido como la criopreservación produce daños en el genoma de los espermatozoides, pero se cree que es debido a las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), puntualmente al ion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Figuroa et al., 2018). Estos generan sitios abásicos, entrecruzamiento y lesiones estructurales en la doble hélice, que cambian la ubicación de las bases nitrogenadas y provocan fragmentación de ADN (Aitken y De Iuliis, 2007). Estos efectos negativos no siempre disminuyen la funcionalidad y la capacidad de fertilización de los espermatozoides, sin embargo, pueden repercutir en los procesos celulares y moleculares posfertilización, y generar defectos en los embriones (Fernández-Díez et al., 2018). También, estudios en peces han indicado que la criopreservación causa alteraciones en ciertas regiones del ADN nuclear (ADNn) y mitocondrial (ADNm) (Cartón-García et al., 2013), y aunque algunos de estos daños pueden ser reparados durante el crecimiento y desarrollo embrionario, cualquier pérdida de la integridad del ADN y cambios en la expresión de genes causados por

la criopreservación, puede estar relacionado con alteraciones en la morfogénesis y diferenciación celular en órganos como el cerebro, ojos y riñones (González-Rojo et al., 2014). Así mismo, Pérez-Cerezales et al. (2011), demostraron que la criopreservación acorta los telómeros, una región de ADN no codificante que se encuentra en los extremos de los cromosomas, lo que posiblemente podría afectar el desarrollo embrionario y causar teratogenicidad en la descendencia, además, reportaron que los genes que codifican Factores de Crecimiento Similares a la Insulina (*Igf*), factores de crecimiento (*Gh*) e insulina (*Ins*) se ven seriamente afectados por las bajas temperaturas, causando abortos durante el desarrollo embrionario temprano. La aparición de malformaciones embrionarias o larvarias pueden ser una herramienta para caracterizar el potencial de los gametos fertilizados *in vitro*, se ha reportado que reproductores que producen gametos de baja calidad, ocasionan malformaciones a la descendencia, y este fenómeno aumenta cuando se usan espermatozoides criopreservados (Bonnet et al., 2007). Resultados similares encontraron Horváth y Urbányi, (2000) en *Clarias gariepinus*, pero no todas las especies se afectan por igual, como es el caso para *O. mykiss* reportado por Labbe et al. (2001), esto podría deberse a que algunas especies tienen el ADN más resistente que otras (Cabrita et al., 2014; Figuroa et al., 2017). Sin embargo, los ovocitos de los peces poseen una alta capacidad para reparar el ADN dañado, son capaces de reponer en procesos de fertilización y desarrollo embrionario, hasta el 10% de la cromatina espermática fragmentada y se han reportado valores de un 60% de supervivencia larval usando semen criopreservado (Pérez-Cerezales et al., 2011; Fernández-Díez et al., 2018).

### Morfología y ultraestructura espermática

Se conoce como ultraestructura espermática a la morfología estructural de los espermatozoides, que es obtenida a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y de Transmisión (TEM) (Rodao et al., 2015; Medina-Robles, 2020). Además, el análisis por MEB y TEM provee infor-

mación detallada de la ultraestructura externa y subcelular espermática, lo que permite dilucidar la morfología normal de los gametos, esta información es de mucho valor para desarrollar protocolos de crioconservación y para hacer seguimiento y evaluación del potencial daño celular, causados por la exposición a algún agente nocivo, previo a procesos de fertilización (Xin et al., 2014). Los espermatozoides de los peces se clasifican según su forma de fertilización: en aquaespermatozoides, cuando la fertilización es externa y en introespermatozoides si este proceso se da internamente. Los Cipriniformes, Characiformes y Siluriformes tienen del tipo aquaespermatozoides (Quagio-Grassiotto et al., 2001). Los peces con fertilización externa poseen espermatozoides de estructura simple de tipo primitivo, la cabeza mide entre 2-4 micras y es casi esférica con un collar que forma la pieza media, en la cual se encuentran los centriolos y las mitocondrias (entre 2-9), el flagelo está compuesto por el axonema con arreglo de nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central, pero existen grupos taxonómicos como lo son los anguiliformes y elopiformes, que solo presentan nueve pares periféricos. El flagelo mide entre 20 y 100 micras dependiendo de la especie y la membrana plasmática de este, forma una aleta en el plano horizontal que le otorga una forma de cinta, es posible que esta sea una adaptación evolutiva que le confiere movilidad al gameto en condiciones acuosas (Andrade et al., 2001; Cosson, 2004). El espermatozoide de los peces teleosteos difiere de los demás vertebrados ya que carece de acrosoma, la ausencia de esta estructura se debe a la presencia de un micrópilo en el ovocito que permite la entrada de la célula espermática al ovulo (Křišťan et al., 2014). Miliorini et al. (2011) propusieron una clasificación de anomalías espermáticas asociadas a la crioconservación para *Prochilodus lineatus*, donde a la macrocefalia, microcefalia, degeneración de cabeza, degeneración de la pieza media, cola fracturada, muñón de cola y cola fuertemente enrollada, fueron clasificadas como anomalías primarias, y a la cabeza normal libre, cola doblada simple, gota proximal y gota distal, la catalogaron como anomalías

secundarias. da Costa et al., (2020) reportaron un aumento del 59% en las anomalías morfológicas tras procesos de crioconservación seminal. Duarte-Trujillo et al. (2021) también encontraron un aumento significativo de anomalías espermáticas en semen crioconservado de *P. mariae*, en comparación al semen fresco. En cuanto a daños a la ultraestructura espermática causado por la crioconservación, Medina-Robles et al. (2023a), reportó para *P. orinoquensis*, anomalías como: aumento en el espesor de la membrana plasmática y ruptura de la misma, así como una disminución en el número de mitocondrias y en las remanentes presentaron daños en sus crestas, el núcleo también se vio afectado, ya que se mostró una cromatina menos densa, igualmente se identificaron desarreglos en las piezas medias, desacoplamiento o pérdida del flagelo también fueron observados. Estos defectos están relacionados al entorno físico-químico al que son expuestos los gametos en procesos de crioconservación (Ozkavukcu et al., 2008).

### Capacidad antioxidante

El estrés oxidativo (OS) es un factor importante en la fisiopatología del semen (Bennetts y Aitken, 2005), esté ocurre como el resultado de una producción excesiva de ROS, que sobrepasa las defensas del sistema antioxidante, lo que puede dar origen a daños celulares (Agarwal y Prabakaran, 2005). Las ROS como se mencionó anteriormente, son producidas por el metabolismo aeróbico celular. La estructura única de los espermatozoides los hace más vulnerables al OS, debido al bajo volumen de citoplasma que poseen, que es una fuente de enzimas antioxidantes (Słowińska et al., 2013). El OS lleva a una serie de cambios patológicos, como el daño a la membrana plasmática y al ADN. Las membranas plasmáticas son más susceptibles debido a que estas contienen lípidos en forma de ácidos grasos insaturados, que son vulnerables al ataque de las ROS (Wathes et al., 2007), aunque las proteínas también se ven afectadas (Tvrdá et al., 2011). Sin embargo, no parece existir una relación sólida entre la defensa antioxidante del semen, la

suplementación con medios de crioconservación y la protección contra el daño causado por la crioconservación. Esto podría sugerir que las ROS no son las principales fuentes de deterioro celular durante la crioconservación de semen de peces, o que los antioxidantes suplementados no tienen un efecto sinérgico y protector suficiente (Sandoval-Vargas et al., 2021). Con base en lo anterior, los niveles bajos de antioxidantes están relacionados con una baja calidad seminal (Abd-Elmoaty et al., 2010).

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos están diseñados para contrarrestar el daño celular causado por una producción excesiva de ROS (Kerfer et al., 2009). Las principales enzimas antioxidantes son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y los tioles (Luberda, 2005). Entre los antioxidantes no enzimáticos podemos encontrar: la albúmina y otras proteínas, el ácido ascórbico, alfa-tocoferol, carotenoides, ácido úrico, tirosina, taurina, hipotaurina (Tvrdá et al., 2011). Las enzimas, en especial la SOD, son la principal defensa de los espermatozoides contra las ROS a nivel intracelular, mientras que extracelularmente están protegidos por los componentes del plasma seminal y los antioxidantes no enzimáticos, principalmente el ácido úrico (van Overveld et al., 2000; Lahnsteiner et al., 2010).

La crioconservación aumenta la condición OS, incrementando las ROS, por lo que calcular la Capacidad Antioxidante Total del semen es fundamental para desarrollar protocolos de conservación (Tvrdá et al., 2011). Uno de los métodos comúnmente utilizados para medir la TAC, se basa en el principio de que el radical ferril mioglobina, oxida el ácido 2,2'-azinobis- (3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) para producir un catión radical, ABTS+, esta reacción produce un verde soluble cromógeno que puede medirse espectrofotométricamente. Los antioxidantes en la muestra suprimen la producción de este catión radical de una manera dependiente de su concentración (Słowińska et al., 2013).

### Fertilidad

La fertilización es el proceso donde un gameto haploide (n) masculino interactúa con uno femenino

con el fin de formar un cigoto diploide (2n). En este evento, el espermatozoide tiene dos funciones indispensables para la fertilización: la primera es proporcionar material genético paterno al huevo y, por último, iniciar la señalización intracelular que activa el ovocito y el posterior desarrollo del embrión. La capacidad fertilizante del espermatozoide depende, principalmente, de la activación de su movilidad, que es originada por el proceso de transducción de señales, donde es de vital importancia las proteínas (canales iónicos y enzimas) y de su síntesis a nivel celular. Las proteínas son codificadas a partir del ADN, el cual puede ser de tipo nuclear o mitocondrial y de la estabilidad de este, dependerá la expresión o no de dichas proteínas, esto podría afectar la capacidad que tiene el espermatozoide de fertilizar (Martínez y Pardo-Carrasco, 2010).

Se ha reportado que la crioconservación puede afectar el ADN espermático de varias especies de peces, y aunque el daño lo pueden causar varios factores como la radiación ultravioleta, el principal es el OS debido a la producción de ROS como se explicó anteriormente (Martínez y Pardo-Carrasco, 2010; Słowińska et al., 2013; Figueroa et al., 2018). Para *Salmo salar*, Kommisrud et al. (2020) reportaron una disminución en el porcentaje de fertilidad para semen crioconservado del 73,9% en comparación con semen fresco (81,1%). Para la misma especie, Figueroa et al. (2019) encontraron una reducción del 13%. Sandoval-Vargas et al. (2021), también hallaron una disminución de la capacidad fertilizante del semen crioconservado de *Oncorhynchus kisutch* de por lo menos de un 86%. Resultados similares fueron obtenidos por Medina-Robles et al. (2019) para *Colossoma macropomum*, donde se evidenció una reducción significativa en la fertilidad del semen crioconservado, en especial, aquellos protocolos que usaron yema de huevo como crioprotector con valores del 49,7%, si se comparaban con el semen fresco (96,7%). Así mismo, Ramírez-Merlano et al. (2011) en *Piaractus brachypomus*, obtuvieron resultados del 71% de fertilidad cuando se usó DMSO como crioprotector, en contraste al 9% logrado usando metanol, en comparación al semen fresco (89%).

## EFFECTOS DE LA CRIOCONSERVACIÓN A LARGO TÉRMINO

Como se ha mencionado anteriormente, la crioconservación y posterior almacenamiento de semen en BGR, es una alternativa viable no solo para proteger la biodiversidad íctica del planeta, sino también para establecer programas de mejoramiento genético de peces dulceacuícolas, además, evitar la dependencia de reproductores, aún por fuera de temporadas reproductivas (Paniagua-Chávez et al., 2011; Martínez-Páramo et al., 2017b; Medina-Robles et al., 2020). Sin embargo y a pesar de que se sabe que la crioconservación puede afectar negativamente los parámetros de calidad espermática (Atencio-García, 2016), hay pocos estudios que indiquen cuanto tiempo se puede almacenar un semen sin que se vea afectada significativamente la calidad espermática de este (Aramli y Nazari, 2014). Medina-Robles et al. 2023b, reportó una reducción significativa de la motilidad espermática de semen crioconservado de *P. orninoquensis*, relacionada al tiempo de almacenamiento posdescongelación (TAP) de  $80 \pm 0,0$ ;  $58 \pm 2,5$ ;  $44 \pm 3,8$  y  $25 \pm 1,9$  % para 0, 15, 30 y 60 min de TAP respectivamente, también encontró disminución significativa en el porcentaje de integridad de membrana plasmática a partir de los 60 min de TAP ( $76 \pm 1,3\%$ ) cuando se comparó con el tiempo de 0 min ( $82 \pm 1,2\%$ ), y con respecto a la fertilidad, esta disminuyó significativamente entre el tiempo 0 y 60 min de TAP, siendo igual al semen fresco, al tiempo 0 y 15 min activado con bicarbonato de sodio ( $93 \pm 1,3$  y  $90 \pm 3,1\%$ , respectivamente), sin embargo, el semen crioconservado de 7 años, mantiene su capacidad de fertilización con valores similares a los obtenidos con semen fresco. Otro estudio realizado por Ding et al. (2009) en crioconservación de semen a largo término de *Siniperca chuatsi*, reportaron que la tasa de fertilización y eclosión fueron similares tanto, para semen crioconservado una semana ( $66,01 \pm 5,14\%$  y  $54,76 \pm 4,40\%$ , respectivamente) como al almacenado por un año ( $62,97 \pm 14,28\%$  de tasa de fertilización y  $52,58 \pm 11,17\%$  de tasa de eclosión),

en comparación al semen fresco ( $69,42 \pm 8,11\%$  de tasa de fertilización y  $59,82 \pm 5,27\%$  de tasa de eclosión). En contraste, Aramli y Nazari, (2014) reportaron descensos de hasta el 47% en la motilidad espermática de semen crioconservado de *Acipenser persicus* luego de 60 min de TAP.

## PERSPECTIVAS

Debido al crecimiento acelerado de la acuicultura a nivel mundial como respuesta a la necesidad de alimentar a la humanidad y ante la inminente pérdida de biodiversidad, como consecuencia del calentamiento global y demás acciones antrópicas, es imperativo diseñar e implementar estrategias que ofrezcan soluciones a estas problemáticas.

La crioconservación se muestra ante nosotros como una alternativa para enfrentar estas complicaciones, en especial la crioconservación seminal de peces dulceacuícolas, la importancia de salvaguardar estos recursos genéticos animales radica en el gran potencial que tienen para la seguridad alimentaria, gracias a la gran variedad de especies que existen. Debido a esta gran diversidad, aún la crioconservación no puede ser usada con total seguridad, ya que los protocolos de conservación deben ser estudiados y estandarizados para cada una de las especies en las que puede ser implementada.

Bajo esta premisa, es necesario formar unidades encargadas de la conservación, como lo son los BRG, en especial de especies dulceacuícolas nativas, donde por medio de la investigación se diseñen protocolos de conservación que causen la menor cantidad de daños celulares y moleculares en las celular espermáticas, no solo para asegurar la biodiversidad, si no también, para el desarrollo de paquetes tecnológicos que aseguren semilla viable para los productores acuícolas regionales, a partir de material crioconservado.

## REFERENCIAS

Abd-Elmoaty M, Ramadan S, Rakesh S, Ashok A. Increased levels of oxidants and reduced

- antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril*, 2010;94(4): 1531-1534. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.039>
- Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J. Exp. Biol*, 2005;43:963-974.
- Aitken R, De Lullis G. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. Biomed. Online*, 2007;14:727-733. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60676-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60676-1)
- Andrade Correa M. Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Rev. la Acad. Colomb. ciencias exactas, físicas y Nat*, 2011;35:491-508.
- Andrade R, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:Characidae). *Tissue Cell*, 2001;33:524-532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1054/tice.2001.0206>
- Aramli MS, Nazari RM. Motility and fertility of cryopreserved semen in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, stored for 30-60min after thawing. *Cryobiology*, 2014;69:500-502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.006>
- Atencio-García V. (2016). Daños en el espermatozoide durante el proceso de crioconservación, in: Memorias Del VII Congreso Colombiano de Acuicultura. Revista de Investigación Pecuaria, San Juan de Pasto, Colombia, p. 8p.
- Bennetts L, Aitken R. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev*, 2005;71:77-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.20285>
- Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol*, 2010;165:535-548. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
- Bonnet E, Fostier A, Bobe J. Characterization of rainbow trout egg quality: a case study using four different breeding protocols, with emphasis on the incidence of embryonic malformations. *Theriogenology*, 2007;67:786-94. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.008>
- Boryshpolets S, Dzyuba B, Stejskal V, Linhart O. Dynamics of ATP and movement in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) sperm in conditions of decreasing osmolality. *Theriogenology*, 2009;72:851-859. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.005>
- Cabrera E, Martínez-Páramo S, Gavaia PJ, Riesco MF, Valcarce DG, Sarasquete C, Herráez MP, Robles V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 2014;432:389-401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>
- Cartón-García F, Riesco M, Cabrera E, Herráez M, Robles V. Quantification of lesions in nuclear and mitochondrial genes of *Sparus aurata* cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 2013;402-403:106-112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.034>
- Carvajal-Quintero JD, Januchowski-Hartley SR, Maldonado-Ocampo JA, Jézéquele C, Delgado J, Tedesco P. Damming fragments species' ranges and heightens extinction risk. *Conserv. Lett*, 2017;10:708-716. <https://doi.org/10.1111/conl.12336>
- Collazos-Lasso L, Arias-Castellanos J. Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Una alternativa para la piscicultura en Colombia. Una revisión. *Rev. ORINOQUIA*, 2015;19(1):77-86.
- Cosson J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J. Fish Biol*,

- 2010;76:240-79. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02504.x>.
- Cosson J. The Ionic and Osmotic Factors Controlling Motility of Fish Spermatozoa. *Aquac. Int.* 2004;12:69-85. <https://doi.org/10.1023/B:AQU1.0000017189.44263.bc>
- da Costa B, de Oliveira D, Rodrigues R, Gomes I, Streit D. Morphological abnormalities in zebrafish cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 2020;97:235-237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.003>
- Dietrich GJ, Nynca J, Dobosz S, Zalewski T, Ciereszko A. Application of glucose-methanol extender to cryopreservation of semen of sex-reversed females rainbow trout results in high post-thaw sperm motility and fertilizing ability. *Aquaculture*, 2014;434:27-32. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.015>
- Ding S, Ge J, Hao C, Zhang M, Yan W, Xu Z, Pan J, Chen S, Tian Y, Huang Y. Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Anim. Reprod. Sci.* 2009;113:229-235. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.003>
- DoNascimento C, Herrera-Collazos E, Herrera-R G, Ortega-Lara A, Villa-Navarro F, Usma-Oviedo J, Maldonado-Ocampo J. Checklist of the freshwater fishes of Colombia: a Darwin Core alternative to the updating problem. *Zookeys*, 2016;708:25-138.
- DoNascimento C, Herrera-Collazos E, Maldonado-Ocampo J, Herrera-Collazos E. (2020). Lista de especies de peces de agua dulce de Colombia / Checklist of the freshwater fishes of Colombia. <https://doi.org/https://doi.org/10.15472/numrso> accessed via GBIF.org on 2021-06-27
- Duarte-Trujillo A, Ardila-Artunduaga M, Guaje-Ramírez D, Medina-Robles V. Efecto crio-protector de la yema de huevo en semen de *Prochilodus mariae* (Characiformes: Prochilodontidae). *Biotechnol. en el Sect. Agro-pecu. y Agroindustrial*, 2021;19:191-205. [https://doi.org/https://doi.org/10.18684/bsaa\(19\)191-205](https://doi.org/https://doi.org/10.18684/bsaa(19)191-205)
- FAO, 2007. State of art in the management of animal genetic resource. Method for conservation, in: Nations, C. on G.R. for F. and A.F.y A.O. on the U. (Ed.), *The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome, pp. 443-475.
- Fernández-Díez C, González-Rojo S, Lombó M, Herráez MP. Impact of sperm DNA damage and oocyte-repairing capacity on trout development. *Reproduction*, 2018;152: 57-67. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0077>
- Figueroa E, Lee-Estévez M, Valdebenito I, Farías J, Romero J. Potential biomarkers of DNA quality in cryopreserved fish sperm: impact on gene expression and embryonic development. *Rev. Aquac.* 2018;1-10. <https://doi.org/10.1111/raq.12323>
- Figueroa E, Lee-Estévez M, Valdebenito I, Watanabe I, Oliveira RPS, Romero J, Castillo RL, Farías JG. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. *Aquaculture*, 2019;511:634190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.004>
- Figueroa E, Valdebenito I, Farias J. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquac. Res.* 2016;47:1691-1705. <https://doi.org/10.1111/are.12630>
- Figueroa E, Valdebenito I, Zepeda A, Figueroa C, Dumorné K, Castillo R, Farias J. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Rev. Aquac.* 2017;9:76-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12105>
- Flesch F, Gadella M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 2000;1469:197-235. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)

- Gómez M, Trejo J. La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa. *Rev. Digit. Univ.* [en línea] 2015;16:1-15.
- González-Rojo S, Fernández-Díez C, Guerra S, Robles V, Herraes M. Differential Gene Susceptibility to Sperm DNA Damage: Analysis of Developmental Key Genes in Trout. *PLoS One*, 2014;9:e114161.
- Holt WV. (2001). Aims of genetic resource bank progemes, in: Watson, P., Holt, W. (Eds.), *Cryobanking the Genetic Resources: Wildlife Conservation for the Future?* Taylor y Francis, pp. 15-17.
- Horváth Á, Urbányi B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquac. Res*, 2000;31:317-324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00444.x>
- Jimenez-Segura L, Galvis-Vergara G, Cala-Cala P, García-Alzate C, López-Casas S, Ríos-Pulgarín M, Arango G, Mancera-Rodríguez N, Gutiérrez F, Álvarez-León R. Freshwater fish faunas, habitats and conservation challenges in the Caribbean river basins of north-western South America: FRESHWATER FISHES OF NORTH-WEST SOUTH AMERICA. *J. Fish Biol*, 2016;89:65-101. <https://doi.org/10.1111/jfb.13018>.
- Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int. J. Urol*, 2009;16:449-457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02280.x>
- Kholodnyy V, Gadêlha H, Cosson, J., Boryshpolets, S. (2020). How do freshwater fish sperm find the egg? The physicochemical factors guiding the gamete encounters of externally fertilizing freshwater fish. *Rev. Aquac*, 12, 1165-1192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12378>
- Kommisrud E, Myromslien F, Stenseth E, Zeremichael T, Hofman N, Grevle I, Sunde J. Viability, motility, ATP content and fertilizing potential of sperm from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in milt stored before cryopreservation. *Theriogenology*, 2020;151:58-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.008>
- Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med*, 2010;48:112-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.033>
- Křišťan J, Hatef A, Alavi S, Policar T. Sperm morphology, ultrastructure, and motility in pikeperch *Sander lucioperca* (Percidae, Teleostei) associated with various activation media. *Czech J. Anim. Sci*, 2014;59:1-10.
- Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev*, 2001;60:397-404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.1102>
- Lahnsteiner F, Mansour N, Plaetzer K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta* f. fario) semen. *Anim. Reprod. Sci*, 2010;119:314-321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.01.010>
- Lasso C, Machado-Allison A, Taphorn D. Fishes and aquatic habitats of the Orinoco River Basin: Diversity and conservation. *J. Fish Biol*, 2016;89:1-18. <https://doi.org/10.1111/jfb.13010>
- Li P, Wei Q, Liu L. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *J. Appl. Ichthyol*, 2008;24:121-125.
- Liu Q, Li J, Zhang S, Xiao Z, Ding F, Yu D, Xu X. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology*, 2007;67:1168-1174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.013>

- López-Hernández J, Pérez A, Jiménez-Félix S, Paramo S, Márquez-Couturier G, Yasui G, Arias-Rodríguez L. La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Rev. Ciencias Mar. y Costeras*, 2018;10:67. <https://doi.org/10.15359/revmar10-1.5>
- Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol*, 2005;5:5-17.
- Lundberg J, Kottelat M, Smith G, Stiassny M, Gill A. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Ann. Missouri Bot. Gard*, 2000;87:26-62.
- MADR. (2021). Acuicultura en Colombia.
- Maria A, Azevedo H, Carneiro P. (2011). Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*).
- Maria A, Carvalho A, Araújo R, Santos J, Carneiro P, Azevedo H. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). *Cryobiology*, 2015;70:109-114.
- Márián T, Krasznai Z, Balkay L, Balázs M, Emri M, Bene L, Trón L. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *J Histochem Cytochem*, 1993;41:291-7. <https://doi.org/10.1177/41.2.8419464>
- Martínez-Páramo S, Horváth Á, Labbé C, Zhang T, Robles V, Herráez P, Suquet M, Adams S, Viveiros A, Tiersch TR, Cabrita E. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 2017a;472:156-177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>
- Martínez-Páramo S, Horváth Á, Labbé C, Zhang T, Robles V, Herráez P, Suquet M, Adams S, Viveiros A, Tiersch TR, Cabrita E. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 2017b;472:156-177. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.05.042>
- Martínez G, Atencio-García V, Pardo-Carrasco S. Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico (*Prochilodus magdalenae*). *Rev. MVZ Córdoba*, 2011;16:2554-2563.
- Martínez J, Pardo-Carrasco S. Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in bocachico *Prochilodus magdalenae* (pisces, characiformes). *Rev. MVZ Córdoba*, 2013;8:3295-3303.
- Martínez J, Pardo-Carrasco S. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EN PECES: EFECTOS SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y LA FERTILIDAD. *Acta Biológica Colomb*, 2010;15:3-24.
- Medina-Robles V. (2020). Evaluación de protocolos de crioconservación seminal en especies ícticas nativas como línea base para la conformación de un banco de semen de peces nativos con fines comerciales y de conservación. Universidad de Los Llanos.
- Medina-Robles V, Duarte-Trujillo A, Cruz-Casallas P. Crioconservación seminal en peces de agua dulce: aspectos biotecnológicos, celulares y bioquímicos. *Orinoquia*, 2020;24(2):51-78. <https://doi.org/https://doi.org/10.22579/20112629.630>
- Medina-Robles V, Guaje-Ramírez D, Marin-Cossio L, Sandoval-Vargas L, Cruz-Casallas P. Crioconservación seminal de *Colossoma macropomum* como estrategia de producción y conservación en la Orinoquia Colombiana. *Orinoquia*, 2019;23:16-24.
- Medina-Robles VM, Sandoval-Vargas LY, Suárez-Martínez RO, Gómez-Ramírez E, Guaje-Ramírez DN, Cruz-Casallas PE. Cryostorage of white cachama (*Piaractus orinoquensis*) sperm: Effects on cellular, biochemical and ultrastructural parameters. *Aquac. Reports*, 2023a;29:101477. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101477>
- Medina-Robles VM, Suárez-Martínez RO, Baldisserotto B, Cruz-Casallas PE. CRYOPRESERVED

- SEMEN OF *Piaractus orinoquensis* (SERRA-SALMIDAE): POST-THAW STORAGE TIMES AND ACTIVATING SOLUTIONS. *Acta Biológica Colomb*, 2023b;28:86-94. <https://doi.org/10.15446/abc.v28n1.95701>
- Medina-Robles VM, Pahí-Rosero AM, Sandoval-Vargas LY, Cruz-Casallas PE. Effect of Cryopreservation and Packaging System on Sperm Motility and Fertility of Striped Catfish. *N. Am. J. Aquac*, 2021;83:105-113. <https://doi.org/10.1002/naaq.10177>
- Miliorini AB, Murgas-Solis LD, Rosa PV, Oberlender G, Pereira GJM, da Costa DV. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquac. Res*, 2011;42:177-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02575.x>
- Mójica J. (2012). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia, 1 ed. ed. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia.
- Nelson J, Grande T, Wilson M. (2016). *Fishes of the world*, Quinta Edi. ed. Hoboken, EUA.
- Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet*, 2008;25:403-411. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3>
- Paniagua-Chávez CG, Ortiz-Gallarza SM, Aguilar-Juárez M. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: Uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México. *Hidrobiológica*, 2011;21:415-429.
- Pérez-Cerezales S, Gutiérrez-Adán A, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez M. Altered gene transcription and telomere length in trout embryo and larvae obtained with DNA cryodamaged sperm. *Theriogenology*, 2011;76:1234-45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.028>
- Purdy P, Graham J. (2015). Membrane Modification Strategies for Cryopreservation, in: Wolkers, W., Oldenhof, H. (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, Hertfordshire, UK, pp. 352-357.
- Quagio-Grassiotto I, Negrão J, Carvalho E, Foresti F. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). *J. Fish Biol*, 2001;59:1494-1502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00214.x>
- Ramírez-Merlano J, Velasco-Santamaría Y, Medina-Robles V, Cruz-Casallas P. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). *Aquac. Res*, 2011;42: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02835.x>
- Ramírez-Merlano JA, Medina-Robles VM, Cruz-Casallas PE. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Arch. Med. Vet*, 2011;43:135-144
- Reis R, Albert J, Di Dario F, Mincarone M, Petry P, Rocha L. Fish biodiversity and conservation in South America. *J. Fish Biol*. 2016;89(1):12-47.
- Rodao M, Montagne J, Clivio G, Papa N, Larrosa G. (2015). Sperm and Egg Envelope Ultrastructure and Some Considerations on Its Evolutionary Meaning, in: Berois, N., García, G., De Sá, R. (Eds.). *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity and Evolution*. CRC Press, Boca Ratón, USA, pp. 47-62. <https://doi.org/10.1201/b19016-5>
- Rosamond L, Ronald W, Buschmann A, Bush S, Cao L, Klinger D, Little D, Lubchenko J, Shumway S, Troell M. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 2021;591:551-563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Sandoval-Vargas L, Dumorné K, Contreras P, Farías JG, Figueroa E, Risopatrón J, Valdebenito

- I. Cryopreservation of coho salmon sperm (*Oncorhynchus kisutch*): Effect on sperm function, oxidative stress and fertilizing capacity. *Aquaculture*, 2021;533: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736151>
- Sandoval-Vargas LY, Silva-Jiménez M, Risopatrón-González J, Villalobos EF, Cabrita E, Valdebenito-Isler I. Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Rev. Aquac*, 2021;13:365-387. <https://doi.org/10.1111/raq.12479>
- Słowińska M, Nynca J, Cejko B, Dietrich M, Horváth Á, Urbányi B, Kotrik L, Ciereszko A. Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture*, 2013;400-401:101-104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.010>
- Słowińska M, Nynca J, Cejko BI, Dietrich MA, Horváth Á, Urbányi B, Kotrik L, Ciereszko A. Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. *Aquaculture*, 2013;400-401:101-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.010>
- Streit DP, Fornari DC, Povh JA, Godoy LC, De Mello F, Oliveira CAL, Kawakami E, Ribeiro RP. Germplasm banking and its role in the development of the fish genetic improvement programme in Brazil. *Cryo-Letters*, 2015;36:399-404.
- Tabares C, Tarazona A, Olivera M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu*, 2005;18:149-161.
- Tognelli M. (2016). Estado de conservación y distribución de la biodiversidad de agua dulce en los Andes Tropicales. UICN, Gland, Suiza, Cambridge, UK y Arlington, USA. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.CH.2016.02.es>
- Tvrda E, Kňažická Z, Bárdos L, Massányi P, Lukáč N. Impact of oxidative stress on male fertility - A review. *Acta Vet. Hung*, 2011;59(4):465-484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1556/AVet.2011.034>
- van Overveld F, Haenen GR, Rhemrev J, Vermeiden J, Bast A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem. Biol. Interact*, 2000;127:151-161. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00179-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00179-4)
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*, 2000;243:167-190. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7)
- Viveiros A, Godinho H. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem*, 2009;35:137-150.
- Viveiros A, Nascimento A, Leal M, Antônio-Gonçalves C, Orfão L, Cosson J. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of Brycon orbignyanus and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Fish Physiol Biochem*, 2015;41:193-201. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-0016-7>
- Volpedo A, Thompson G. Environmental changes on freshwater fish communities in South America in the last five decades: a case study in northeast Argentina. *Sustain. Agri, Food Environ. Res*, 2017;4(3):47-61.
- Wathes C, Abayasekara R, Aitken R. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod*, 2007;77(2):190-201. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060558>
- WHO, 2003. World Health Organization technical report.
- WWF. (2021). Los peces de agua dulce son vitales para cientos de millones de personas, pero un tercio de ellos se enfrenta a la extinción [WWW Document]. *WORLD'S Forgotten. FISHES*. URL <https://www.wwf.org.co/?uNewsID=365976> (accessed 6.28.21).

Xin N, Liu T, Zhao H, Wang Z, Liu J, Zhang Q, Qi J. The impact of exogenous DNA on the structure of sperm of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Anim. Reprod. Sci, 2014;149:305-310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.029>

