

## Antioxidantes en la crioconservación de semen de peces: una revisión con énfasis en especies de agua dulce de Sur América

### Antioxidants in the cryopreservation of fish semen: a review with emphasis on freshwater species from south America

### *Antioxidantes na criopreservação de sêmen de peixes: uma revisão com ênfase em espécies de água doce da América do Sul*

Diana N Guaje-Ramírez<sup>1</sup>  Víctor M Medina-Robles<sup>2</sup> 

#### Artículo de revisión

Recibido: 08 de mayo de 2023

Aceptado: 27 de septiembre de 2023

Publicado: 16 de Diciembre de 2023

**Palabras clave:** Amenaza, bancos de germoplasma, calidad seminal, estrés oxidativo

- 1 MVZ, MSc (c), Estudiante de Maestría en Acuicultura, Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos – GRITOX, Instituto de Acuicultura – IALL, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia, Email: [diana.guaje@unillanos.edu.co](mailto:diana.guaje@unillanos.edu.co)  
<https://orcid.org/0000-0001-6519-6372>
- 2 MVZ, MSc, PhD, Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos – GRITOX, Instituto de Acuicultura – 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>

## RESUMEN

El rápido crecimiento de la población mundial ha conducido a una sobreexplotación de los recursos naturales y, los recursos hídricos no son la excepción; afectando las poblaciones de peces en todo el mundo. Además, la poca variabilidad en las especies de interés comercial y los pocos avances en el desarrollo de paquetes tecnológicos y productivos conllevan a que esta problemática se acentúe. La crioconservación seminal es una técnica que permite el resguardo del material genético durante tiempo indefinido, permitiendo su disponibilidad constante. Sin embargo, puede causar algunos efectos negativos sobre la integridad celular y sus funciones. Dentro de esto, la formación de cristales de hielo, el estrés osmótico y con gran relevancia el estrés oxidativo son los de mayor incidencia. De acuerdo a lo anterior, el uso de sustancias con capacidad de reducir los efectos del estrés oxidativo como lo son los antioxidantes pueden constituirse como una alternativa de mejora de estos procesos conllevando a la estandarización de protocolos mejorados para su aplicación en bancos de germoplasma. El objetivo de esta revisión es hacer una breve descripción de la crioconservación seminal como biotecnología reproductiva, sus usos e implicaciones y de algunos de los trabajos desarrollados en especies nativas de Sur América con el uso de sustancias antioxidantes.

**Como Citar (Norma Vancouver):** Guaje-Ramírez DN, Medina-Robles VM. Antioxidantes en la crioconservación de semen de peces: una revisión con énfasis en especies de agua dulce de Sur América. *Orinoquia*, 2023;27(2): e-765 <https://doi.org/10.22579/20112629.765>

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

The rapid growth of the world population has led to an overexploitation of natural resources and water resources are no exception; affecting fish populations around the world. Furthermore, the little variability in the species of commercial interest and the few advances in the development of technological and productive packages lead to this problem being accentuated. Seminal cryopreservation is a technique that allows the protection of genetic material for an indefinite period of time, allowing its constant availability. However, it can cause some negative effects on cellular integrity and functions. Within this, the formation of ice crystals, osmotic stress and, with great relevance, oxidative stress are those with the greatest incidence. According to the above, the use of substances with the capacity to reduce the effects of oxidative stress such as antioxidants can be constituted as an alternative to improve these processes, leading to the standardization of improved protocols for their application in germplasm banks. The aim of this review is to make a brief description of seminal cryopreservation as a reproductive biotechnology, its uses and implications and some of the work developed in native South American species with the use of antioxidant substances.

**Keywords:** Threat, germplasm banks, semen quality, oxidative stress

## RESUMO

O rápido crescimento da população mundial levou a uma sobreexploração dos recursos naturais e os recursos hídricos não são exceção; afetando populações de peixes no mundo todo. Além disso, a pouca variabilidade nas espécies de interesse comercial e os poucos avanços no desenvolvimento de pacotes tecnológicos e produtivos fazem com que este problema seja acentuado. A criopreservação seminal é uma técnica que permite a proteção do material genético por tempo indeterminado, permitindo sua disponibilidade constante. No entanto, pode causar alguns efeitos negativos na integridade e funções celulares. Dentro destes, a formação de cristais de gelo, o estresse osmótico e, com grande relevância, o estresse oxidativo são os que apresentam maior incidência. De acordo com o exposto, a utilização de substâncias com capacidade de reduzir os efeitos do estresse oxidativo como os antioxidantes podem se constituir como uma alternativa para melhorar esses processos, levando à padronização de protocolos aprimorados para sua aplicação em bancos genéticos. O objetivo desta revisão é fazer uma breve descrição da criopreservação seminal como biotecnologia reprodutiva, seus usos e implicações e alguns dos trabalhos desenvolvidos em espécies nativas da América do Sul com o uso de substâncias antioxidantes.

**Palavras chave:** Ameaça, bancos de germoplasma, qualidade do sêmen, estresse oxidativo.

## INTRODUCCIÓN

En el siglo XXI, el reconocimiento de los sectores de la pesca y la acuicultura por su contribución esencial a la seguridad alimentaria y la nutrición mundial ha ido en aumento. Dentro de esto, la producción total mundial de animales acuáticos en 2020 fue de 178 millones de toneladas, de las cuales la pesca de captura contribuyó con el 51 % y la acuicultura con el 49 %. En cuanto a esto; de la producción total, más de 157 millones de toneladas se emplearon para consumo humano y los 20 millones de toneladas restantes se destinaron a usos no alimentarios, principalmente para la producción de harina y aceite de pescado (Food and Agriculture Organization - FAO, 2022).

En las Américas entre 2011 y 2020, la acuicultura de aguas continentales y la acuicultura de aguas marinas en primer y segundo lugar respectivamente, fueron las que contribuyeron en mayor medida a la producción mundial (22 millones apróx. c/u), siendo la pesca de captura en aguas continentales y la pesca de captura en aguas marinas las de menor contribución (18 millones apróx c/u). Por otra parte, se ha evidenciado que en general la tendencia a largo plazo de la pesca de captura mundial es a mantenerse relativamente estable; desde finales de la década de 1980 las capturas han fluctuado entre los 86 y los 93 millones de toneladas/año. Por su parte, la Acuicultura aumenta su producción año tras año (Food and Agriculture Organization - FAO, 2022), aspectos que podrían influenciar en la diversidad íctica mundial.

Sur América posee una gran riqueza de especies de peces dulceacuícolas. De estos, Colombia ocupa el segundo lugar con 1435 especies registradas hasta el momento (Maldonado-Ocampo et al., 2008). Es importante mencionar que varios de estos países han dado un tratamiento regional a la vulnerabilidad de sus especies, incluyendo los peces en algunos casos, definiendo prioridades de conservación. Esta gran diversidad de peces contrasta con el ritmo lento de avance de las políticas de conservación, uso no controlado del recurso

íctico y la escasa visualización de su megadiversidad; ya que en la mayoría de los casos no existen áreas protegidas dedicadas específicamente al resguardo de las especies y su aprovechamiento sostenible (Mojica et al., 2012).

Especies nativas Suramericanas como la *Colosoma macropomum* de gran importancia por ser la especie más cultivada en Brasil, *Prochilodus lineatus* y *Prochilodus brevis* en el sureste y noeste de Brasil respectivamente o *Rhamdia quelen* con una amplia distribución geográfica desde el suroeste de México hasta el centro de Argentina (Hernández et al., 2015); tienen un importante papel no solo biológico sino también social en el caso de la pesca de subsistencia y productivo para las granjas comerciales debido a su valor económico y desempeño (Pereira Pereira y Martinez, 2008) (Calcagnotto y De Almeida Toledo-Filho, 2000) (Marchioro y Baldisserotto, 1999) (Dourado, 1981). A pesar de su importancia, algunas de estas especies se enfrentan problemáticas como el declive de sus poblaciones y la disminución de la variabilidad genética en los cultivos en cautiverio, razones que pueden conllevar a la amenaza o desaparición de algunas de ellas (Reis et al., 2016). a sobrepesca, la deforestación, la contaminación, los cambios hidrobiológicos, la introducción de especies exóticas y la fragmentación ambiental, son algunas de las causas de este declive (Fidalgo-Guerreiro y Ferreira, 2011). Adicionalmente, la creación de barreras físicas permanentes como las represas bloquean los movimientos de especies migratorias hacia las partes altas de las cuencas interrumpiendo su desarrollo y reproducción (Chapman et al., 2012; Palhares et al., 2020). Para disminuir estos efectos, se requieren diferentes estrategias de conservación que mitiguen el declive de las poblaciones de estas especies (Galo et al., 2011). Es por esto que el objetivo de esta revisión es hacer una breve descripción de la crioconservación seminal como biotecnología reproductiva, sus usos e implicaciones y recopilar trabajos que adicionen sustancias antioxidantes en los protocolos de congelación desarrollados para estas especies nativas de Sur América.



## ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS

Dentro de las estrategias de conservación, las *in situ*, tienen como objetivo la protección de áreas de gran relevancia ecológica como sitios de desove y reproducción. Allí se deben aplicar grandes esfuerzos de conservación que minimicen el peligro de estas especies (Reynalte-Tataje et al., 2020).

Por otro lado, otras estrategias que permitan la flexibilización de los períodos reproductivos y optimicen los programas de reproducción asistida como la crioconservación seminal y mediante ésta la creación de bancos de germoplasma, son igualmente de gran importancia. Los bancos de germoplasma son un ejemplo de conservación *ex situ*, allí se almacenan recursos genéticos y se mantienen disponibles para realizar procedimientos reproductivos dentro o fuera del laboratorio (Cabrita et al., 2014) y (Cabrita et al., 2010).

Generalmente, las especies criadas en cautiverio, tras sucesivos cruces, aumentan los niveles de consanguinidad y se va disminuyendo la variabilidad genética. Como consecuencia de esto, hay pérdida de producción por reducción de peso y aumento de enfermedades y anomalías morfológicas (Migaud, 2013). Para minimizar los cruces con individuos emparentados, profesionales y productores por medio de bancos de germoplasma pueden tener acceso a recursos genéticos, como espermatozoides y ovocitos de otras granjas o incluso de poblaciones silvestres y así contribuir a la recuperación de especies en peligro de extinción, evitar la disminución de la variabilidad genética y hasta asegurar la reintroducción en el medio natural de algunas especies (Cabrita, 2022) promoviendo beneficios económicos al proporcionar gametos de buena calidad para la reproducción asistida en programas de cría de animales. Para esto es necesario conocer la biología reproductiva de las especies y desarrollar de protocolos de congelación específicos con el fin de obtener gametos de buena calidad para la reproducción artificial (Medina-Robles et al., 2005).

## LA CRIOCONSERVACIÓN SEMINAL Y SUS IMPLICACIONES

La crioconservación es una técnica ampliamente utilizada en el mundo (Alves Pereira, 2015) que puede conservar indefinidamente células, tejidos o embriones a través de congelación a temperaturas criogénicas generalmente en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Betsy y Kumar, 2020). Esta tiene gran importancia para la acuicultura comercial por sus múltiples ventajas pues garantiza el almacenamiento del material en bancos de germoplasma, permite el intercambio genético entre diferentes instituciones de investigación y piscícolas, facilita el transporte, aumenta la producción y elimina los problemas causados por la madurez gonadal asincrónica entre machos y hembras (Suquet et al., 2000) (Maria et al., 2011). No obstante, según (Cabrita et al., 2014) ésta es una técnica que puede causar alrededor de 50% de daño celular debido principalmente a: formación de cristales de hielo, toxicidad de los crioprotectores y sensibilidad de los espermatozoides al estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno (ROS), reduciendo la integridad estructural y funcional de los espermatozoides (Da Silva y Guerra, 2012).

En cuanto a la formación de cristales de hielo, estos se forman intra y extracelularmente posterior a la congelación y son tensiones resultantes de la interacción agua-soluto que generan daños mecánicos irreversibles en organelos como la mitocondria y la membrana plasmática (Cabrita et al., 2005). También los cambios de temperatura fisiológica hasta temperatura por debajo del punto de congelación modifican la configuración de la membrana plasmática y sus proteínas, afectando el intercambio iónico (Holt, 2000a). Por otra parte, en el proceso inverso (descongelación) ocurren daños debido a la entrada de agua en la célula (rehidratación), por lo cual, este proceso debe ser rápido, evitando la reagrupación de cristales de hielo (Mazur, 1984).

Especies reactivas de oxígeno (ROS) es el término generalmente utilizado para describir los pro

oxidantes derivados del oxígeno y pueden desempeñar un papel beneficioso o perjudicial según su naturaleza, concentración, ubicación y tiempo de exposición (Sandoval-Vargas et al., 2021). Las ROS se pueden dividir en radicales y no radicales. Las especies radicales incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo (OH), el radical peroxilo (ROO) y el óxido nítrico (NO). Los compuestos no radicales incluyen moléculas como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el ácido hipocloroso (HOCL) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). De estos, el OH se considera el más dañino porque puede reaccionar rápidamente con la mayoría de las moléculas orgánicas e inorgánicas de la célula, incluidos el ADN, las proteínas, los lípidos, los aminoácidos, los azúcares y los metales (Kohen y Nyska, 2002).

En condiciones biológicas normales, el organismo que es aeróbico, produce constantemente ROS en funciones metabólicas tales como la producción de energía en la cadena de transporte de electrones y la eliminación de agentes agresivos a través de la fagocitosis. Una alta producción de ROS provoca lesiones y daños irreversibles en células y tejidos (Agarwal et al., 2005), a lo que se le conoce como estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se produce entonces debido al desequilibrio entre la producción de ROS y el sistema antioxidante natural de las células. En los espermatozoides esto conlleva a la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana, la oxidación de proteínas, daño del ADN, afectando la motilidad, la viabilidad, la integridad acrosomal y el potencial de fertilización (Ball, 2008), entre otros.

Adicional a esto, los espermatozoides se someten fácilmente al estrés oxidativo debido a la falta de citoplasma, el cual es una rica fuente de enzimas antioxidantes naturales (Zini y Libman, 2014). Esto sucede debido a que en las etapas finales de la espermatogénesis, los espermatozoides pierden la mayor parte de su citoplasma, siendo privados de una fracción de antioxidantes endógenos (Carvalho et al., 2002). Como resultado de la presencia de dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática con átomos de

hidrógeno altamente reactivos de los espermatozoides, hacen que ésta sea susceptible al ataque de ROS, los cuales modifican la estructura química, afectan la permeabilidad selectiva y generan peroxidación lipídica (Bansal y Bilaspuri, 2011)

En la congelación, la producción excesiva de ROS altera el equilibrio celular de óxido-reducción (Redox) interrumpe sus funciones biológicas normales (Sikka, 2001) y provoca estrés oxidativo que es uno de los principales factores en la disminución de la calidad del esperma (Palhares et al., 2021). De igual forma, en la descongelación el choque térmico y la exposición al oxígeno atmosférico hace que las células sean susceptibles a la formación excesiva de ROS (Olfati Karaji et al., 2014).

## EVALUACIÓN DE CALIDAD SEMINAL Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Por lo anterior, determinar los aspectos cualitativos del semen fresco previo a la congelación es imprescindible en la aplicación de la biotecnología de la crioconservación seminal, porque puede predecir el éxito del material almacenado después de la descongelación (Palhares et al., 2020).

La motilidad espermática es el parámetro responsable del potencial de fertilización de los espermatozoides, junto con la motilidad total, la duración de la motilidad y la motilidad progresiva y muestran la capacidad del espermatozoide para moverse en busca del ovocito (Palhares et al., 2021). Por su parte, la duración de la motilidad es una compensación entre el nivel de reservas de energía que posee una célula y el proceso de daño osmótico experimentado (Cosson, 2019), ésta determina el tiempo requerido por los espermatozoides para penetrar en el micropilo del ovocito para que ocurra la fertilización (Ricardo et al., 1996).

La morfología y la integridad de membrana plasmática (IMP) del espermatozoide están correlacionadas con el potencial fertilizante del esperma, pues la integridad de sus estructuras es esencial para mejorar su potencial fertilizante y, en algunos



casos, su alteración puede explicar la reducción de la motilidad y hasta pérdida de la capacidad de fertilización (Streit et al., 2008) (Palhares et al., 2020). Según Miliorini et al., (2011), el semen con hasta un 50% de células anormales se considera adecuado para su uso en procesos de fertilización, considerando que se deben usar volúmenes de semen mayores en estas condiciones en comparación con la fertilización con semen fresco.

Igualmente, la evaluación de la integridad mitocondrial es de suma importancia porque son las responsables del suministro de ATP, molécula responsable del mantenimiento de la motilidad de la célula (Cabrita et al., 2005). De igual manera, la integridad del DNA de los espermatozoides es un factor a evaluar porque determina la probabilidad de transmisión de información genética a la siguiente generación, que es una de las principales finalidades de la técnica de crioconservación seminal (Cabrita et al., 2010).

Es de gran importancia cuantificar el estrés oxidativo, mediante la actividad enzimática de algunas enzimas como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), óxido nítrico (NO) ó glutatión reducido (GR), entre otras; que son antioxidantes naturales. SOD es una enzima que actúa en la eliminación del radical superóxido  $O_2^-$  y lo convierte en oxígeno y  $H_2O_2$  (Lasso et al., 1994). CAT es responsable de la conversión de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . El  $H_2O_2$  puede ser altamente tóxico para la célula porque atraviesa fácilmente la membrana celular y forma  $OH^-$ , lo que puede causar daños graves en el ADN y la pérdida del potencial fertilizante de los espermatozoides (Horizonte et al., 2011). Por su parte el NO en grandes concentraciones, puede causar daño oxidativo a las membranas lipídicas y proteínas transmembrana, lo que puede dañar los ácidos nucleicos (Carvalho et al., 2002). El GR participa en los mecanismos antioxidantes naturales, siendo parte del sustrato de la enzima glutatión peroxidasa, la cual es importante durante los procesos antioxidantes en las células (Dickinson y Forman, 2002). De acuerdo a esta información, la medición de estas enzimas es importante en la crioconservación, porque puede causar una disminución en los niveles de la actividad de estas

enzimas al debilitar las barreras antioxidantes de la célula (Lasso et al., 1994).

Cuantificar estos aspectos de la calidad seminal pos descongelación es de gran importancia, pues puede determinar si la calidad de los espermatozoides congelados es menor en comparación con los espermatozoides frescos; y, especialmente si disminuyó el contenido de antioxidantes naturales y aumentó el de ROS (Gadea et al., 2011), permitiendo tomar decisiones en cuanto al mejoramiento de los protocolos de congelación.

## MECANISMOS DE DEFENSA Y SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

En los organismos, el mecanismo de defensa antioxidante se divide en tres etapas: la primera, la prevención; allí es donde se inhibe la producción de ROS. La segunda, la interceptación; que es donde se interrumpe la reacción en cadena de oxidación, impidiendo la acción de ROS; y la tercera, la remediación, en la que se corrige el daño causado por ROS (Saleh y Agarwal, 2002).

En el semen se encuentran presentes antioxidantes intra y extracelulares que constituyen un sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático natural, responsable de eliminar los radicales libres que se producen en los diferentes procesos celulares (Sanocka y Kurpysz, 2004). No obstante, cabe señalar que la biodisponibilidad de estos antioxidantes, sus efectos sinérgicos y su variabilidad entre especies e intraespecies deben estudiarse para comprender el efecto, en este caso sobre los espermatozoides de peces contra el daño oxidativo (Félix et al., 2021).

Se han establecido diferentes clasificaciones de antioxidantes alrededor del mundo (Félix et al., 2021). La clasificación más simple y ampliamente aceptada es la división de dos grandes grupos de antioxidantes según su mecanismo de acción: enzimáticos y no enzimáticos (Bunaciu et al., 2012). Estos son macromoléculas y micromoléculas respectivamente, provenientes del propio organismo, cuya función es protegerlo de las acciones

deletéreas de los ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), pudiendo actuar directamente sobre estos agentes o reparar los daños causados por ellos (Barreiros et al., 2006). Tanto los enzimáticos como los no enzimáticos reducen las concentraciones de agentes oxidantes en el semen a niveles fisiológicos y mantienen una fertilidad natural y asistida más adecuada (Saleh y Agarwal, 2002).

Félix et al., (2021) trató de identificar y clasificar todas las sustancias antioxidantes utilizadas para mejorar la calidad de los espermatozoides de peces y como resultado divide los antioxidantes enzimáticos en primarios y secundarios. Por su parte, postula que dentro de los antioxidantes no enzimáticos se pueden encontrar las vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos (omega 3 y 6), carotenoides, carnitinas, componentes polifenólicos y antioxidantes de bajo peso molecular.

Está claro que en la crioconservación seminal estos mecanismos naturales no son suficientes para la protección celular (Sanches et al., 2013) por lo que los antioxidantes pueden ser utilizados como suplementos en los diluyentes de congelación del semen de peces (Figueroa et al., 2018) o en las soluciones activadoras (Lahnsteiner y Caberlotto, 2012) actuando como moduladores de la osmolaridad o proporcionando energía a las células para el movimiento de los espermatozoides así como lo hacen los azúcares adicionados en las soluciones de activación (Adames et al., 2015).

Algunos estudios en peces de agua salada han demostrado que la adición de antioxidantes en los medios de congelación de semen puede tener efectos positivos en diferentes parámetros celulares como la motilidad (Martínez-Páramo et al., 2012) y su efecto puede depender del tipo y la concentración usada (Cao y Cutler, 1993).

## ANTIOXIDANTES EN LA CRIOCONSERVACIÓN SEMINAL DE ESPECIES NATIVAS DE SUR AMÉRICA

Para conocer las sustancias antioxidantes que se han utilizado en la conservación de semen de

peces nativos de Sur América y sus efectos, a continuación, se presenta una revisión de los trabajos en los que evaluaron la adición de estas sustancias en el medio de activación o en el medio de congelación de semen, incluyendo una tabla resumen con los principales resultados obtenidos por diferentes autores (Tabla 1).

### Antioxidantes enzimáticos

Paula et al., (2012) evaluaron la adición de GR a dosis de 0,5; 1,0 y 1,5 mM en el medio de congelación, sobre la motilidad (%) y duración de la motilidad postdescongelación de semen de *P. lineatus*. Allí, los autores no evidenciaron influencia en la tasa y duración de la motilidad mediante la adición de GR con respecto al control sin ningún tipo de antioxidante y le atribuyen estos resultados posiblemente a las bajas concentraciones utilizadas.

Por su parte, Alves Pereira (2015) evaluó el efecto de la adición de diferentes concentraciones de GR y ATP en los medios de congelación de *Collossoma macropomum* y encontraron que todas las concentraciones de GR y ATP tuvieron una reducción gradual (mayor a 50%) comparados con el control en la producción de ROS, principalmente ATP a 15; 22,5 y 30 mM. La fluidez de membrana fue mejor que el control con GR a 4 y 6 mM y con 2 y 4 mM se mantuvo más eficiente el período de motilidad, motilidad total y progresiva. Ninguna concentración de GR o ATP cambió la fragmentación del ADN ni la peroxidación lipídica. Por lo que los autores recomiendan la adición de GR a 4 Mm en la congelación de *C. macropomum*.

### Antioxidantes no enzimáticos

#### • Vitaminas y aminoácidos

Las vitaminas C y E son sustancias que se pueden utilizar para reducir el daño causado por altas concentraciones de radicales libres, brindando protección al ADN del semen y las membranas celulares contra la peroxidación (Nordberg y Arnér, 2001).



De esta manera, Paula et al., (2012) encontraron que el uso de vitamina E a dosis de 50, 100 o 250  $\mu\text{M}$  no presentó efecto en la tasa y duración de la motilidad postdescongelación del semen de *P. lineatus* comparado con el control sin el uso de sustancias antioxidantes y atribuyen este resultado a las concentraciones de vitamina E utilizadas.

Resultados similares presentan Navarro et al., (2014), en su estudio el porcentaje de espermatozoides móviles no presentó ninguna diferencia significativa adicionando vitamina C o vitamina E (0.0001 mg) en el medio de congelación de *P. lineatus*, comparado con el control sin antioxidante. En cuanto a la duración de la motilidad la vitamina C fue superior a la vitamina E ( $p < 0,05$ ) pero sin diferencia significativa con el control.

En otro estudio, De Almeida-Monteiro et al., (2017) encontraron que la vitamina E redujo las tasas de motilidad de los espermatozoides con respecto al control. La tasa de espermatozoides normales fue diferente significativamente entre los tratamientos con y sin adición de antioxidantes, siendo superior en los tratamientos con la adición de estas sustancias. En cuanto a las concentraciones de las vitaminas, la motilidad más alta se obtuvo con la adición de 0,01 y 0,0001 mg de cualquiera de las vitaminas y la concentración más alta de tuvo un efecto negativo sobre la morfología de los espermatozoides. De acuerdo a esto, los autores recomendaron el uso de 0,01 mg de Vit C asociado con DMSO para la congelación de semen de *P. brevis*.

Por su parte, Xavier et al., (2021) evaluaron los efectos de la adición de vitaminas C y E en el diluyente para la crioconservación de esperma de *Rhamdia quelen* y observaron que la vitamina C influyó su motilidad, pero no las velocidades. Además, al usar la vitamina C a concentraciones mayores de 4,0 mg/mL, la motilidad iba disminuyendo. Por su parte la vitamina E no influyó la motilidad. La combinación de vitamina C y E disminuyó la velocidad curvilínea y los demás parámetros de movimiento no fueron afectados, por lo que recomiendan la adición de 4,0 mg/mL de vitamina C en el medio de congelación de *R. quelen* para mejorar

la motilidad espermática posdescongelación y no recomiendan la adición de vitamina C y E combinadas en el medio de congelación.

La cisteína es un aminoácido con propiedades antioxidantes debido a que es un precursor importante en la producción de glutatión que penetra fácilmente en la membrana celular y actúa en la eliminación de ROS manteniendo los niveles de glutatión intracelular y aumentando los niveles de GR (Bilodeau et al., 2001). El glutatión es un tripéptido tiol no proteico (ácido glutámico cisteína-glicina), capaz de actuar directamente sobre muchas ROS, siendo el grupo tiol de la cisteína el sitio activo responsable de sus propiedades bioquímicas (Luberda, 2005).

Lopes et al., (2018) evaluaron la adición de 1mM de Vitamina C, Vitamina E, Cisteína y Taurina en diferentes combinaciones a la solución crioprotectora de semen de *C. macropomum* y no encontraron un aumento significativo en la calidad seminal en ninguno de los parámetros evaluados (cinética espermática, viabilidad y morfología) comparados con el control sin la adición de estas sustancias. La adición de 1mM de taurina y 1mM de vitamina E, aunque no fueron significativamente diferentes al control, presentaron una tendencia a aumentar la cinética de los espermatozoides. Efecto que atribuyen hipotéticamente a la acción de la taurina como regulador de los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , necesarios para desencadenar la activación de los espermatozoides, y a la capacidad de la vitamina E para eliminar ROS por la peroxidación lipídica. Al mismo tiempo postulan que la reducción de la calidad del esperma utilizando 1mM de vitamina C puede relacionarse con toxicidad debido a la dosis utilizada.

La glutamina es un aminoácido no esencial que puede ser sintetizado por el organismo a partir de otros aminoácidos también con propiedades antioxidantes. Su función antioxidante la lleva a cabo el glutatión y esta molécula, al igual que la cisteína, es precursora del glutatión (Cruzat et al., 2009).

En otro estudio Da Costa et al., (2019), evaluaron la adición de 2.5; 5; 10 y 20 mM de cisteína en el medio



de congelación de semen de *R. quelen* y encontraron que, en cuanto a los parámetros de motilidad, viabilidad, anormalidades espermáticas no hubo diferencias entre la mayoría de los tratamientos frente al control. En cuanto a la integridad de DNA y peroxidación lipídica fue mayor en la mayoría de los tratamientos con cisteína. En cuanto a la concentración de grupos carbonilo todos los tratamientos fueron significativamente mayores al control, contrario a lo que sucedió con la concentración de grupos sulfhidrilo que fue significativamente mayor en el control. En cuanto a la actividad SOD, CAT, GST y GPx observaron una tendencia marcada a aumentar su actividad a medida que se aumenta la concentración del antioxidante, por lo que los autores no recomiendan el uso de estas concentraciones de cisteína en medios de congelación de *R. quelen*.

Igualmente, Da Costa et al., (2020) realizaron dos diferentes experimentos con la adición de glutamina y cisteína en el medio de congelación de *R. quelen*. El primero con glutamina a 2.5 y 5.0 mM y, el segundo combinando la glutamina y cisteína a las mismas dosis (2,5 and 5 mM). En el primer experimento no encontraron diferencia significativa en los tratamientos en cuanto a la motilidad e integridad de membrana comparados con el control y aumentó la fragmentación del DNA; la peroxidación lipídica y la concentración de grupos carbonilo. Por el contrario, los grupos sulfhidrilo disminuyeron con la suplementación de esta molécula. La actividad de SOD, CAT, GST y GPx fue mayor al control. En segundo experimento no se presentó diferencia con el control para los parámetros de motilidad e integridad de membrana. Existió una tendencia a aumentar el daño en el DNA, peroxidación lipídica y grupos carbonilo y sulfhidrilo con respecto al control. Debido a estos resultados, los autores postulan que la glutamina y la cisteína, en las concentraciones evaluadas, no presentan resultados satisfactorios sino efectos perjudiciales en la calidad espermática de *R. quelen*.

La L-carnitina juega un papel fundamental en el metabolismo de los vertebrados en la generación

de energía celular (Steiber et al., 2004), tiene capacidad quelante de los iones ferrosos libres y puede neutralizar o minimizar los efectos dañinos de las ROS o RNS sobre las células porque compite con los iones superóxido (Gülçin, 2006).

De Oliveira Pedreira et al., (2022) utilizaron la L-carnitina como una solución activadora del semen descongelado de *R. quelen*, y encontraron que su inclusión mejoró e indujo diferentes patrones de movimiento en los espermatozoides. Mediante el uso de 144,5 mM de L-carnitina obtuvieron la mayor motilidad espermática y % de larvas normales. Las mayores velocidades las obtuvieron con soluciones de 96,2; 144,5 y 192,3 mM. Por su parte, la motilidad se suprimió con el aumento de las concentraciones (mayor a 144,5 mM). La motilidad, la velocidad y la linealidad de los espermatozoides tuvieron un efecto de interacción grupo (solución) × tiempo. Igualmente encontraron que la fertilización y la eclosión no fueron influenciadas por las soluciones activadoras por lo que concluyen que L-carnitina en el medio de activación puede ser eficaz y permitir el uso a gran escala de espermatozoides crioconservados de *R. quelen*.

#### • Carbohidratos

La búsqueda de alternativas para el mejoramiento de la crioconservación de semen de peces ha sido muy estudiada y dentro de estas, el estudio de sustancias como los carbohidratos que pueden actuar como agentes crioprotectores dependiendo su peso molecular no son la excepción (Holt, 2000b). Dentro de esto, la trehalosa es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa que por su hiperosmolaridad contribuye a la deshidratación celular, ayuda a reducir la formación de cristales de hielo intracelulares (Aisen et al., 2005) y tiene capacidad antioxidante, protegiendo la membrana plasmática de los efectos de ROS (Bucak et al., 2007)

En el estudio reportado por Gheller et al., (2019), usaron diferentes concentraciones de trehalosa (50 mM, 100 mM, 150 mM, and 200 mM) en el me-



dio de congelación de semen del bagre amazónico *Leiarius marmoratus*. No obstante, no notaron diferencias significativas para la función mitocondrial, integridad del ADN y membrana plasmática. Por su parte, los tratamientos con concentraciones de trehalosa superiores a 50 mM tuvieron parámetros de velocidad significativamente superiores. Con el uso de trehalosa a 200 mM obtuvieron movilidad total y progresiva superiora los demás tratamientos. En cuanto a la duración de la motilidad, el tratamiento con trehalosa 200 mM mostró el mejor resultado y concluyen que el uso de trehalosa a 100 o 200 mM causa un efecto positivo en la calidad del esperma descongelado de *L. marmoratus*.

### Polisacáridos sulfatados

Para refinar los protocolos existentes de congelación, los sustratos con propiedades antioxidantes que neutralicen la producción de ROS como los polisacáridos sulfatados (PS) pueden ser otra alternativa (Costa et al., 2010). Pereira et al., (2020) evaluaron la suplementación de los medios de congelación seminal de *C. macropomum* con polisacáridos sulfatados extraídos de algas marinas y piel de *O. niloticus* en diferentes concentraciones (100, 250, 500 o 1000 µg/mL) sobre la cinética, morfología e IMP. Allí no encontraron interacciones entre los suplementos y las concentraciones para ningún parámetro de cinética espermática a excepción de velocidad promedio de viaje (VAP). El semen con adición de PS de piel de tilapia mostró mejores resultados para IMP, pero sin diferencia con el control. En cuanto a la morfología, los mejores resultados se obtuvieron con PS de las algas *C. cupressoides* y *S. filiformis*. *A. muscoides* y piel de tilapia produjo el menor número de espermatozoides normales a 100 µg/mL. Por tanto, sugieren el uso de PS de piel de *O. niloticus* y *S. filiformis*, pues promueven el mantenimiento de IMP y la morfología, respectivamente y recomiendan realizar más estudios con estas moléculas.

Los glucosaminoglicanos (GAGs) sulfatados son disacáridos repetidos, en los que uno de los azú-

cares es un aminoazúcar y uno de ellos tiene un radical sulfato. Tienen un importante papel biológico y están presentes en las vísceras y la piel de varias especies animales (Medeiros et al., 2000), dentro de ellos la piel de tilapia que es un producto de desecho en muchas producciones (FAO, 2018) y podría ser utilizada en otros estudios.

Nascimento, (2021) evaluó y determinó la acción antioxidante de los glicosaminoglicanos (GAGs) de la piel de *O. niloticus* y la concentración apropiada para el medio de congelación de esperma de *P. brevis*. Allí observaron una relación negativa entre los parámetros de la cinética espermática y el aumento de las concentraciones de GAGs, obteniendo motilidades cercanas al control con 0,5 y 1,0 mg mL<sup>-1</sup> y disminuyó entre las concentraciones de 3,0 a 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. No encontraron relación entre los parámetros de IMP, integridad del ADN y morfología de los espermatozoides con el aumento de la concentración de GAGs, por lo que concluyen que el uso de GAGs extraídos de la piel de *O. niloticus* a 0,5 mg mL<sup>-1</sup> pueden ser usados en el medio de congelación de semen de *P. brevis* para mejorar la cinética espermática.

### Otros antioxidantes

- **Melatonina**

La melatonina es un antioxidante directo e indirecto muy eficaz, pues desintoxica el radical hidroxilo altamente reactivo y neutraliza otras especies tóxicas, como el <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el NO, el anión peroxinitrito y estimula varias enzimas antioxidantes (Reiter, 2000). Tiene mayor eficacia que el glutatión reducido (antioxidante endógeno) o el manitol (antioxidante que se encuentra en las plantas) (Klaiwattana et al., 2016) (Lopes et al., 2016). Zhu et al., 2019, indicaron que la melatonina protege a los espermatozoides del daño criogénico inducido por ROS mediante la activación de la fosforilación de AMPK para mejorar las defensas antioxidantes y su capacidad antioxidante directa.

Palhares et al., (2020) evaluaron la suplementación del medio de crioconservación de semen de

*Brycon orbignyana* con 1mM y 2mM de Melatonina con diferentes tiempos de congelación (15 min, 12 h y 24 h) y encontraron que no hubo interacción significativa entre ninguno de los parámetros evaluados con los tiempos de congelación. Por su parte, la viabilidad con el uso de 2 mM de melatonina fue superior al de 1 mM e igual al semen fresco y control. De igual forma este mismo tratamiento (2 mM) fue superior al control y 1 mM en cuanto a motilidad y duración de la motilidad e igual a 1 mM en motilidad progresiva. Por su parte, los tratamientos con melatonina presentaron los valores más altos de anomalías espermáticas. En cuanto a la fertilidad, obtuvieron en general tasas menores al 8.4% (2 mM) de ovocitos fertilizados, siendo los tratamientos con melatonina superiores al control en los tres tiempos. A lo que los autores atribuyen el resultado a los daños morfológicos y el estrés oxidativo durante la congelación. Finalizan recomendando la adición de 2 mM de melatonina en la solución de congelación de semen de *B. orbignyana* para su uso en programas de conservación.

Lo que contrasta con lo encontrado por Lima et al. (2019) evaluando el uso de melatonina a diferentes dosis (1, 2 y 3 mM) en el medio de congelación de semen de *P. lineatus*; pues no encontraron diferencia estadística en ninguno de los parámetros de calidad seminal evaluados (tasas de motilidad, morfología y capacidad de fertilización), por lo que no recomiendan el uso de melatonina a estas dosis en los medios de congelación de *P. lineatus*.

Por su parte Palhares et al., (2021) estudiaron la adición de dos concentraciones de melatonina (1 mM y 2 mM) y dos curvas de congelación (lenta y rápida) sobre parámetros de calidad seminal de *B. orbignyana* y encontraron interacción entre las soluciones y curvas en cuanto a vitalidad (integridad de membrana), siendo la solución con 2 mM la que mejor resultado mostró y similar al semen fresco. La cinética espermática fue mejor en soluciones con melatonina, siendo 2 mM mayor al control. Esta misma solución en la curva lenta presentó la menor cantidad de defectos ( $p < 0,05$ ) e igual al semen fresco. El control en la curva rápida

presentó el mayor número de defectos. Adicionalmente no hubo interacción entre las soluciones y las curvas de congelación para la actividad de CAT, SOD, NO y peroxidación lipídica. La muestra que contenía 2 mM mostró menor actividad de SOD que el control. Los valores más bajos de peroxidación lipídica los obtuvo 2 mM en la curva rápida. Las soluciones con 2 mM produjeron índices más altos de fertilidad y eclosión siendo la eclosión similar a la del semen fresco. Por último, los autores concluyeron que 2 mM de melatonina y la congelación lenta (congelador programable) pueden usarse en función de mejorar la calidad del semen de *B. orbignyana* en programas de conservación de germoplasma.

Motta et al., (2022) evaluaron la tasa de motilidad, la IMP, la morfología espermática, el estrés oxidativo (peroxidación lipídica y actividad enzimática) y la capacidad de fertilización con 2,00; 2,75; 3,5 y 4,25 mM de melatonina en *P. lineatus* y demostraron que 2 mM tuvieron mayor tasa de motilidad, VAP y velocidad curvilínea (VCL) que los otros tratamientos ( $p < 0,05$ ). La velocidad rectilínea (VSL) también fue mayor con 2 mM y similar al control. Evidenciaron que el control y 2,00 mM tuvieron del mayor % de integridad de membrana y normalidad morfológica. En cuanto al estrés oxidativo, se presentó una menor peroxidación lipídica (LPO) con 2,75 y 3,50 mM y solo diferentes al control que fue mayor. El control tuvo una mayor actividad enzimática de catalasa (CAT) que los tratamientos y no encontraron diferencias en la actividad de la SOD. Se produjeron las tasas más altas de fertilización y eclosión con 2,75 mM siendo solo diferente a 4,25 mM, por lo que sugieren realizar más estudios con concentraciones más bajas de 2mM de melatonina para determinar su efectividad como antioxidante en el esperma de esta especie.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo a la información anteriormente expuesta y los resultados de los trabajos realizados



en las principales especies de peces nativos de Sur América surgen otros interrogantes como: ¿que otro tipo de antioxidantes y con cuales dosis podrían usarse? ¿pueden otras dosis mostrar mejores resultados que los expuestos? De igual forma, teniendo en cuenta los ensayos mencionados, ¿podría existir una relación entre el tiempo de almacenamiento y el efecto de estas sustancias? Y frente a esto ¿podrían evidenciarse mejores resultados en el almacenamiento a mediano o largo plazo?, todo esto con perspectivas a mejorar los protocolos y paquetes de congelación seminal de especies nativas de Sur América.

## REFERENCIAS

- Adames, M. S., de Toledo, C. P. R., Neumann, G., Buzzi, A. H., Buratto, C. N., Piana, P. A., y Bombardelli, R. A. (2015). Optimization of the sperm: Oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Reproduction Science*, 161, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014>
- Agarwal, A. y Prabakaran, S. A. (2005). Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *Iranian Journal of Reproductive Medicine Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 3(1), 1-8. <http://ssu.ac.ir/ijrm/index.php/ijrm/article/view/392>
- Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., y Venturino, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50(3), 239-249. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.02.002>
- Alves Pereira, F. (2015). *Glutathione Reduzida e Adenosina trifosfato (ATP) na Criopreservação seminal de Tambaqui, Colossoma macropomum*. Tese de Mestre. Brasil, Universidade Federal do Rio Grande.
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- Bansal, A. K., y Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
- Cabrera, E., Horváth, Á., Marinović, Z., & Asturiano, J. F. (2022). Technologies and strategies for ex situ conservation of aquatic organisms: the role of cryopreservation in long-term management. In *Cellular and Molecular Approaches in Fish Biology* (pp. 1-48). Academic Press. Barreiros, A. L. B. S.,
- David, J. M., y David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29(1), 113-123. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>
- Betsy, J., y Kumar, S. (2020). *Cryopreservation of Fish Gametes*. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_3)
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., y Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3)
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varişli, Ö., Yüce, A., Tekin, N., y Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060-1067. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.004>
- Bunaciu, A. A., Aboul-Enein, H. Y., y Fleschin, S. (2012). FTIR spectrophotometric methods used for antioxidant activity assay in medicinal plants. *Applied Spectroscopy Reviews*,

- 47(4), 245–255. <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.645260>
- Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P. J., Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Sarasquete, C., Herráez, M. P., y Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432, 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>
- Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J. C., Sarasquete, C., y Herráez, M. P. (2005). Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology*, 50(3), 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.02.005>
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., y Herráez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
- Calcagnotto, D., y De Almeida Toledo-Filho, S. (2000). Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), 127–130. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000100023>
- Cao, G., y Cutler, R. G. (1993). High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 17(3), 189–201. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(93\)90050-R](https://doi.org/10.1016/0167-4943(93)90050-R)
- Carvalho, O. F. de, Ferreira, J. D. de J., Silveira, N. de A., y Freneau, G. E. (2002). Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38(1), 33–38. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442002000100007>
- Chapman, B. B., Hulthén, K., Brodersen, J., Nilsson, P. A., Skov, C., Hansson, L. A., y Brönmark, C. (2012). Partial migration in fishes: Causes and consequences. *Journal of Fish Biology*, 81(2), 456–478. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03342.x>
- Cosson, J. (2019). Fish Sperm Physiology: Structure, Factors Regulating Motility, and Motility Evaluation. In *Biological Research in Aquatic Science*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85139>
- Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, et al. (2010) Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed Pharmacother*, 64(1), 21–28. doi:10.1016/j.biopha.2009.03.005
- Cruzat, V. F., Petry, É. R., y Tirapegui, J. (2009). Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 15(5), 392–397. <https://doi.org/10.1590/s1517-86922009000600015>
- Da Costa, B. B., Marques, L. S., Lassen, P. G., Rodrigues, R. B., Da Rosa-Silva, H. T., Moreira, J. C. F., de Oliveira, D. L., y Streit, D. P. (2020). Effect of glutamine and cysteine supplementation on quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. *Aquaculture Research*, 52(5), 2173–2181. <https://doi.org/10.1111/are.15070>
- Da Costa, B. B., Marques, L. S., Lassen, P. G., Rodrigues, R. B., Tais Da Rosa Silva, H., Moreira, J. C. F., y Streit, D. P. (2019). Effects of cysteine supplementation on the quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish. *Aquaculture Research*, 51(2), 455–464. <https://doi.org/10.1111/are.14389>
- Da Silva, E. C. B., y Guerra, M. M. P. (2012). Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 111, 143–149.
- De Almeida-Monteiro, P. S., Oliveira-Araújo, M. S., Pinheiro, R. R. R., Lopes, J. T., Ferreira, Y. M., Montenegro, A. R., Melo-Maciel, M. A. P., y Salmito-Vanderley, C. S. B. (2017).



- Influence of vitamins C and e on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). *Semina: Ciências Agrárias*, 38(4), 2669–2680. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4Supl1p2669>
- de Oliveira Pedreira, A. C., Malacarne, A. M., Dalmaso, A. C. S., Carvalho, K. I. F. S., Chagas, T. V., da Silva Gambetta, M. I. R., Chiella, R. J., y Bombardelli, R. A. (2022). L-carnitine solution used on *Rhamdia quelen* thawed sperm activation boosts sperm movement, maintains larval quality, and permits to optimize the sperm use. *Animal Reproduction Science*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107054>
- Dickinson, D. A., y Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019–1026. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3)
- Dourado, O. F. (1981). Principais peixes e crustáceos dos açudes controlados pelo DNOCS. Convênio SUDENE/DNOCS.
- Félix, F., Oliveira, C. C. V., y Cabrita, E. (2021). Antioxidants in fish sperm and the potential role of melatonin. *Antioxidants*, 10(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/antiox10010036>
- Fidalgo-Guerreiro, V. H., y FERREIRA, G. (2011). Mitigação de impactos à ictiofauna após barramentos de corpos d'água através de medidas socioeducativas e educação ambiental. In 1 CONGRESSO BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE IMPACTO (Vol. 1, p. 2011).
- Figuerola, E., Farias, J. G., Lee-Estevez, M., Valdebenito, I., Risopatrón, J., Magnotti, C., Romero, J., Watanabe, I., y Oliveira, R. P. S. (2018). Sperm cryopreservation with supplementation of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 493, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.046>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. In *Fao*. <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/cc0461>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
- Galo, J. M., Streit-Junior, D. P., Sirol, R. N., Ribeiro, R. P., Digmayer, M., Andrade, V. X. L., y Ebert, A. R. (2011). Anormalidades espermiáticas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) após a criopreservação. *Brazilian Journal of Biology*, 71(3), 693–699. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000400014>
- Gheller, S. M. M., Corcini, C. D., de Brito, C. R. C., Acosta, I. B., Tavares, G. C., Soares, S. L., Silva, A. C., Pires, D. M., y Varela Junior, A. S. (2019). Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian catfish *Leiaricus marmoratus*. *Cryobiology*, 87(June 2018), 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.001>
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sciences*, 78(8), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.103>
- Hernández, C. L., Ortega-Lara, A., Sánchez-Garcés, G. C., y Alford, M. H. (2015). Genetic and Morphometric Evidence for the Recognition of Several Recently Synonymized Species of Trans-Andean *Rhamdia* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia*, 103(3), 563–579. <https://doi.org/10.1643/C1-14-145>
- Holt, W. V. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Holt, W. V. (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenol-*

- ogy, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Horizonte, B., Borges, J. C., Silva, M. R., Esper, C. R., y Franceschini, P. H. (2011). Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(3), 303–314.
- Klaiwattana, P., Srisook, K., Srisook, E., Vuthiphandchai, V., y Neumvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(1), 157–169. [http://www.jifro.ir/browse.php?a\\_id=940&sid=1&slc\\_lang=en%0Ahttps://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163044938](http://www.jifro.ir/browse.php?a_id=940&sid=1&slc_lang=en%0Ahttps://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163044938)
- Kohen, R., y Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. <https://doi.org/10.1080/0192623029016672>
- Lahnsteiner, F., y Caberlotto, S. (2012). Motility of gilthead seabream *Sparus aurata* spermatozoa and its relation to temperature, energy metabolism and oxidative stress. *Aquaculture*, 370–371, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.034>
- Lasso, L., Alvarez, G., y June, M. (1994). *of Superoxide Cells during Cryopreservation*. 15(3).
- Lima Assis, I. D., Palhares, P. C., Machado, G. J., Souza, J. G. D. S., Souza França, T. D., Oliveira Felizardo, V. D., y Murgas, L. D. S. (2019). Effect of melatonin on cryopreserved sperm of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Cryo-Letters*, 40(3), 152–158.
- Lopes, J.T., Salmito-Vanderley, C.S.B., Almeida-Monteiro, P. S. (2016). Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelação seminal. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 40(1), 29–34.
- Lopes, J. T., Oliveira-Araújo, M. S., Nascimento, R. V. do, Montenegro, Y. M. F. A. R., y Salmito-Vanderley, C. S. B. (2018). Efeito de vitaminas e aminoácidos como suplementação da solução crioprotetora para a criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). In *Acta Scientiae Veterinariae* (Vol. 46, Issue August, pp. 1–8).
- Luberda, Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*, 5(1), 5–17.
- Maldonado-Ocampo, J., Vari, R., y Usma Oviedo, J. S. (2008). Checklist of the freshwater fishes of Colombia. *Biota Colombiana*, 9(2), 312.
- Marchioro, M. I., y Baldisserotto, B. (1999). Sobre-vivência de alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Ciência Rural*, 29(2), 315–318. <https://doi.org/10.1590/s0103-84781999000200021>
- Maria, A. N., Azevedo, H. C., & Carneiro, P. C. F. (2011). Protocolo para criopreservação do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Comunicado Técnico*, 112, 8.
- Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M. T., Herráez, M. P., Sarasquete, C., y Cabrita, E. (2012). Incorporation of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, 77(6), 1129–1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 1), 0–4. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Medeiros, G. F., Mendes, A., Castro, R. A. B., Baú, E. C., Nader, H. B., y Dietrich, C. P. (2000). Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: Widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta*

General Subjects, 1475(3), 287–294. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00079-9)

Medina-Robles, V. M., Velasco-Santamaría, Y. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34–48. [file:///C:/Users/Cris/Desktop/REFER?NCIAS/Robles, Santamaría, Casallas - Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos - 2005.pdf](file:///C:/Users/Cris/Desktop/REFER?NCIAS/Robles,Santamar%20a,Casallas-Aspectos%20generales%20de%20la%20crioconservaci%20n%20esperm%20tica%20en%20peces%20tele%20steos-2005.pdf)

Migaud, H., Bell, G., Cabrita, E., McAndrew, B., Davie, A., Bobe, J., ... & Carrillo, M. (2013). Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Reviews in Aquaculture*, 5, S194–S223.

Miliorini, A. B., Murgas, L. D. S., Rosa, P. V., Oberlender, G., Pereira, G. J. M., y Da Costa, D. V. (2011). A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*, 42(2), 177–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02575.x>

Mojica, J. I., Usma Oviedo, J. S., Álvarez León, R., y Lasso, C. A. (2012). *Libro rojo de peces dulceacuícolas*.

Motta, N. C., Egger, R. C., Monteiro, K. S., Vogel de Oliveira, A., y Solis Murgas, L. D. (2022). Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Theriogenology*, 179, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.012>

Nascimento, R. V. do. (2021). *Suplementação do meio de congelamento seminal de Prochilodus brevis com polissacarídeos sulfatados extraídos de pele de tilápia e de algas marinhas*. Tese de Doutorado. Brasil, Universidade estadual do ceará, 2021. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-221996>

Navarro, R. D., Navarro, F. K. S. P., Felizardo, V. de O., Murgas, L. D. S., y Andrade, E. de S. (2014).

Qualidade de sêmen de Curimba (*Prochilodus lineatus*) criopreservados com vitaminas. *Acta Scientiarum - Technology*, 36(1), 55–60. <https://doi.org/10.4025/actasci-technol.v36i1.19586>

Nordberg, J., y Arnér, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287–1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9)

Olfati Karaji, R., Daghigh Kia, H., y Ashrafi, I. (2014). Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. *Cell and Tissue Banking*, 15(3), 461–470. <https://doi.org/10.1007/s10561-013-9412-y>

Palhares, P. C., Assis, I. de L., Machado, G. J., de Freitas, R. M. P., de Freitas, M. B. D., Paula, D. A. J., Carneiro, W. F., Motta, N. C., y Murgas, L. D. S. (2021). Sperm characteristics, peroxidation lipid and antioxidant enzyme activity changes in milt of *Brycon orbignyanus* cryopreserved with melatonin in different freezing curves. *Theriogenology*, 176, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.013>

Palhares, P. C., Assis, I. de L., Souza, J. G. da S., França, T. de S., Egger, R. C., Paula, D. A. de J., y Murgas, L. D. S. (2020). Effect of melatonin supplementation to a cytoprotective medium on post-thawed *Brycon orbignyanus* sperm quality preserved during different freezing times. *Cryobiology*, 96, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.07.002>

Paula, D. A. J., Andrade, E. S., Murgas, L. D. S., Felizardo, V. O., Winkler, E. U., Zeviani, W., y Freitas, R. T. F. (2012). Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*, 10(3), 661–665. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252012005000016>

Pereira Maduenho, L., y Martinez, C. B. R. (2008). Acute effects of diflubenzuron on the fresh-

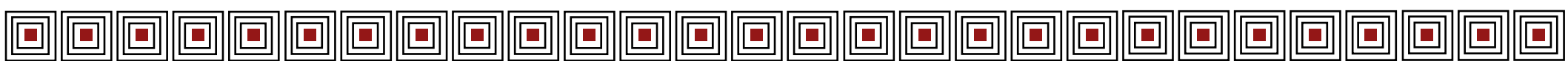


- water fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 148(3), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.010>
- Pereira, V. A., de Alencar, D. B., Araújo, I. W. F. de, Rodrigues, J. A. G., Lopes, J. T., Nunes, L. T., Ferreira, Y. M., Lobato, J. S., Montenegro, A. R., y Salmito Vanderley, C. S. B. (2020). Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) semen. *Aquaculture*, 528. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735553>
- Reiter, R. J. (2000). Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News in Physiological Sciences*, 15(5), 246–250. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.5.246>
- Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. A., Câmara, R. B. G., Nobre, L. T. D. B., Costa, M. S. S. P., Almeida-Lima, J., Farias, E. H. C., Leite, E. L., & Rocha, H. A. O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 64(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.005>
- Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M. A., Garcia-Vazquez, F. A., & Gardon, J. C. (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, 62(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.12.001>
- Medina-Robles, V. M., Velasco-Santamaría, Y. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34–48. [file:///C:/Users/Cris/Desktop/REFERENCIAS/Robles, Santamaría, Casallas - Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos - 2005.pdf](file:///C:/Users/Cris/Desktop/REFERENCIAS/Robles,%20Santamaría,%20Casallas%20-%20Aspectos%20generales%20de%20la%20crioconservación%20espermática%20en%20peces%20teleosteos%20-%202005.pdf)
- Reis, R. E., Albert, J. S., Di Dario, F., Mincarone, M. M., Petry, P., & Rocha, L. A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology*, 89(1), 12–47. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>
- Reynalte-Tataje, D. A., Soares, M. da L., Massaro, M. V., Bastian, R., y Pelicice, F. M. (2020). First evidence of a spawning site of the endangered fish *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (characiformes, bryconidae) in the middle Uruguay River, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 32(3 m), 1–5. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2220>
- Ricardo, M. C., Aguiar, C. A., Rizzo, E., y Bazzoli, N. (1996). Morfologia da micropila e da células micropilar em teleósteos neotropicais de água doce. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 17–24.
- Saleh, R. A., y Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 23(6), 737–752.
- Sanches, E. G., Tosta, G. A. M., y Souza-Filho, J. J. (2013). Economic feasibility of cobia juvenile production (*Rachycentron canadum*). *Boletim Do Instituto de Pesca*, 39(1), 15–26.
- Sandoval-Vargas, L., Dumorné, K., Contreras, P., Fariás, J. G., Figueroa, E., Risopatrón, J., y Valdebenito, I. (2021). Cryopreservation of coho salmon sperm (*Oncorhynchus kisutch*): Effect on sperm function, oxidative stress and fertilizing capacity. *Aquaculture*, 533(September). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736151>
- Sanocka, D., y Kurpysz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(Table 2), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12>
- Sikka, S. (2001). Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 851–862. <https://doi.org/10.2174/0929867013373039>

- Steiber, A., Kerner, J., y Hoppel, C. L. (2004). Carnitine: A nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(5-6), 455-473. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.006>
- Streit, D. P., Sirol, R. N., Ribeiro, R. P., Moraes, G. V., Vargas, L. D. M., y Watanabe, A. L. (2008). Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus Valenciennes*, 1850). *Brazilian Journal of Biology*, 68(2), 373-377. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000200019>
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., y Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31(3), 231-243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x>
- Xavier, A. M. M., Neumann, G., Sanches, E. A., Cardoso, S. U., y Bombardelli, R. A. (2021). Extenders with vitamins C and E applied to *Rhamdia quelen* sperm cryopreservation / Extensores com vitaminas C e aplicados à criopreservação de esperma de *Rhamdia quelen*. *Brazilian Journal of Development*, 7(12), 119898-119912. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n12-653>
- Zhu, Z., Li, R., Lv, Y., y Zeng, W. (2019). Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology*, 88(22), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.04.009>
- Zini, A., y Libman, J. (2014). Oxidative Stress and Male Infertility. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, 9783642300, 1-4178. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9>

**Tabla 1.** Tabla resumen de antioxidantes utilizados en los medios de activación y congelación de semen de peces nativos de Sur América y sus principales resultados.

Autor	Especie	Tratamientos	Tiempo	Parámetros	Resultados	Conclusiones y recomendaciones
<b>Antioxidantes enzimáticos</b>						
(Alves Pereira, 2015)	<i>Colossoma macropomum</i> (Cachama negra)	- GR: 2, 4 y 6 mM - ATP: 7,5; 15; 22,5 y 30 mM - Control sin antioxidante	30 días	Cinética, IMP, fluidez de membrana, integridad de DNA y mitocondria, LPO y ROS	- ↓ ROS con GR y ATP (50%) - ↑ Cinética: 2 y 4 mM - ↑ Fluidez de membrana: GR 4 y 6 mM - Integridad de DNA y ROS sin cambios	Recomiendan la adición de GR a 4mM en <i>C. macropomum</i> .
<b>Antioxidantes no enzimáticos</b>						
<b>Vitaminas y aminoácidos</b>						
(de Oliveira Pedreira et al., 2022)	<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	- L-carnitina: 47,8; 96,2; 144,5; 192,3 y 240,7 mM - Control (+) D-fructosa 79,9 mM - Control (-) agua destilada	30 días	Cinética, morfología, fertilidad, eclosión y normalidad larvaria.	- ↑ cinética con L- Carnitina - ↑ cinética y larvas normales con 144,5 mM - ↓ Mot con [ ] 's > a 144,5 mM - Fertilización y eclosión sin influencia	L-carnitina en la s/n activadora puede ser eficaz y permitir el uso a gran escala de semen criopreservado de <i>R. quelen</i> .
(Xavier et al., 2021)	<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	- Vit C: 4; 6,5; 9 y 11,5 mg/mL - Vit E: 2; 4; 6 y 8 mg/mL - Vit C+E: 4,0+2,0; 6,5+4,0; 9,0+6,0 y 11,5+8,0 mg/mL respectivamente. - Control sin antioxidante	24 horas	Mot, VCL, VSL y VAP	- Mayor motilidad con 4,0 mg/mL de Vit C - Velocidades no influenciadas con Vit C - Vit E no afectó la Mot - ↓ VCL con Vit C + E	Recomiendan la adición de 4,0 mg/mL de Vit C en el medio de congelación de <i>R. quelen</i> para mejorar la motilidad.
(Da Costa et al., 2020)	<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	- Exp 1: Gln: 2,5 y 5 mM - Exp 2: Gln + Cys: 2,5 + 2,5; 5 + 2,5; 2,5 + 5; 5 + 5 - Control sin antioxidante	NR	Mot, integridad de DNA, LPO, grupos carbonilo y sulfhidrilo, SOD, CAT, GPx y GST	Exp 1: Mot e IMP sin influencia - ↑ fragmentación DNA, LPO, grupos carbonilo, SOD, CAT, GST y GPx - ↓ grupos sulfhidrilo Exp 2: ↑ Integridad DNA, LPO, grupos carbonilo y sulfhidrilo	Gln y Cys en las concentraciones evaluadas no presentaron resultados satisfactorios sino perjudiciales en semen de <i>R. quelen</i> .
(Da Costa et al., 2019)	<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	- Cys: 2,5; 5; 10 y 20 mM - Control sin antioxidante	NR	Mot, IMP, integridad de DNA, LPO, concentración de grupos carbonilo y sulfhidrilo, SOD, CAT, GST y GPx.	- Mot, viab y morfología sin diferencias significativas - ↑ grupos carbonilo y ↓ grupos sulfhidrilo con cys - ↓ Integridad DNA, IMP y ↑ SOD, CAT, GST y GPx con cys	Las [ ] 's de cys ensayadas no son recomendables para la suplementación del crioprotector de semen de <i>R. quelen</i>
(Lopes et al., 2018)	<i>Colossoma macropomum</i> (Cachama negra)	- 6 tratamientos: Vit C; Vit E; Vit C + Vit E; Cys; Taur; Taur + Cys (1Mm c/u) - Control sin antioxidante	15 días	Cinética, IMP y morfología	No hubo un aumento significativo en los parámetros evaluados vs control	Taur y Vit E tienen tendencia a aumentar la cinética espermiática de <i>C. macropomum</i>
(De Almeida-Monteiro et al., 2017)	<i>Prochilodus brevis</i> (Curimata)	- Vit C: 0,01; 0,001 y 0,0001 mg - Vit E: 0,01; 0,001 y 0,0001 mg - Control sin antioxidante	15 días	Cinética, IMP y morfología	- ↓ Mot con Vitamina E - ↓ Anormalidades con Vit C y E - ↑ motilidad con 0,01 y 0,0001 mg - ↑ Anormalidades con 0,01 mg	Los autores recomiendan el uso de 0,0001mg de Vit C asociado con DMSO para <i>P. brevis</i>



Autor	Especie	Tratamientos	Tiempo	Parámetros	Resultados	Conclusiones y recomendaciones
(Navarro et al., 2014)	<i>Prochilodus lineatus</i> (Curimba)	- Vit C: 0.0001 mg - Vit E: 0.0001 mg - Control sin antioxidante	3 días	Mot y duración de Mot	- Motilidad sin diferencias significativas - Duración de la motilidad con Vit C = control - ↓ Duración de la motilidad con Vit E	Si bien ninguna mejoró los parámetros los autores recomiendan Vit C en semen de Curimba.
(Paula et al., 2012)	<i>Prochilodus lineatus</i> (Curimba)	- Vit E: 50, 100 y 250 µM - GR: 0,5; 1 y 1,5 µM - Control sin antioxidante	4 días	Mot y duración de mot	Sin diferencias significativas con el control	Atribuyen los resultados a las bajas concentraciones usadas
<b>Carbohidratos</b>						
(Nascimento, 2021)	<i>Prochilodus brevis</i> (Curimata)	- GAGs de piel <i>O. niloticus</i> (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 o 5,0 mg/mL <sup>-1</sup> ) - Control sin antioxidante	15 días	Cinética, IMP, integridad del ADN y morfología	- A mayor [ ] menor cinética espermática - IMP, integridad del ADN y morfología sin interacción con el aumento de GAGs	Recomiendan los GAGs de piel <i>O. niloticus</i> a 0,5 mg/mL <sup>-1</sup> para mejorar cinética seminal
(Pereira et al., 2020)	<i>Colossoma macropomum</i> (Cachama negra)	- PS de algas y de piel de <i>O. niloticus</i> (100, 250, 500, o 1000 µg/mL) - Control sin antioxidante	45 días	Cinética, IMP y morfología	- Cinética sin diferencias - ↑ IMP con PS de piel de tilapia, sin diferencia con el control - ↑ Spz normales con 100 µg/mL PS de las algas ( <i>C. cupressoides</i> y <i>S. filiformis</i> )	Sugieren estudiar los PS de piel de <i>O. niloticus</i> y <i>S. filiformis</i> por promover la IMP y morfología, respectivamente.
(Gheller et al., 2019)	<i>Leiarius marmoratus</i> (Yaqué)	- Trehalosa: 50 mM, 100 mM, 150 mM y 200 mM - Control sin antioxidante	NR	Cinética, IMP, integridad DNA, funcionalidad mitocondrial	- ↑ Cinética con el uso de Trehalosa - ↑ Mot total, progresiva y duración de la mot con 200 mM - Función mitocondrial, integridad del ADN e IMP sin cambios	Dosis de 100 o 200 mM de Trehalosa causa un efecto positivo en la calidad del esperma descongelado de <i>L. marmoratus</i> .
<b>Melatonina</b>						
(Motta et al., 2022)	<i>Prochilodus lineatus</i> (Curimba)	- Mlt: 2,00; 2,75; 3,5 y 4,25 mM - Control sin antioxidante	NR	Cinética, IMP, morfología, LPO, CAT, SOD, fertilidad y eclosión.	- ↑ Cinética, IMP y normalidad con 2 mM - ↓ LPO con 2,75 y 3,50 mM - ↑ CAT en el control - ↑ Fertilidad y eclosión con 2,75mM	Sugieren realizar más estudios con concentraciones menores de 2 mM
(Palhares et al., 2021)	<i>Brycon orbignyanus</i> (Piracánjuba)	- Mlt a 1 y 2 mM - Curva lenta y rápida - Control sin antioxidante	2 meses	Cinética, IMP, morfología, LPO, CAT, SOD y NO, fertilidad y eclosión	- Solo IMP tuvo interacción solución/curva - ↑ Cinética, IMP, fertilidad y eclosión con 2 mM - ↓ Defectos, SOD y LPO con 2 mM	2 mM y congelación lenta pueden mejorar la calidad del semen de <i>B. orbignyanus</i> para programas de conservación.
(Palhares et al., 2020)	<i>Brycon orbignyanus</i> (Piracánjuba)	- Mlt a 1 y 2 mM - 3 tiempos de congelación (15 min, 12 h y 24 h) - Control sin antioxidante	NR	Cinética, IMP, morfología y fertilidad	- Parámetros sin influencia/tiempo - ↑ Cinética e IMP con 2 mM - ↑ Anormalidades y fertilidad con 1 y 2 mM	2 mM puede mejorar la calidad seminal de <i>B. orbignyanus</i> para uso en programas de conservación
(Lima et al 2019)	<i>Prochilodus lineatus</i> (Curimba)	- Mlt a 1, 2, 3 mM - Control sin antioxidante	NR	Cinética, morfología y fertilidad	Ningún parámetro fue influenciado	No recomiendan la melatonina a estas dosis en los medios de congelación <i>P. lineatus</i>

Mot: motilidad; DAP: distancia promedio recorrida, DCL: distancia curvilínea, DSL: distancia rectilínea, VAP: velocidad promedio de viaje, VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad rectilínea, STR: rectitud, LIN: linealidad, WOB: oscilación, ALH: desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de latido cruzado, SF: semen fresco, GR: Glutión reductasa, ATP: Adenosin trifosfato, Spz: espermatozoides, LPO: peroxidación de lípidos, ROS: especies reactivas de oxígeno, NO: óxido nítrico, IMP: integridad de membrana plasmática, PS: polisacáridos sulfatados, GAGs: glucosaminoglicanos, Vit: vitamina, Gln: glutamina, Cys: cisteína, Mlt: melatonina.