

## Efecto de la yema de huevo sobre la calidad de semen descongelado de paco (*Piaractus brachypomus*)

Effect of egg yolk on thawed semen quality of paco (*Piaractus brachypomus*)

Yan Manrique Quispe<sup>1</sup>, Jorge Babilonia Medina<sup>2</sup>, Edwin Orna Rivas<sup>3</sup>, Uri Perez Guerra<sup>4\*</sup>, Manuel Pérez Durand<sup>4</sup>, Marcelino Aranibar Aranibar<sup>5</sup>

### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del tipo de yema de huevo (codorniz-YC vs gallina-YG) sobre la calidad del semen de paco (*Piaractus brachypomus*) (volumen, color, concentración, motilidad, vitalidad y fertilidad) congelado. Se utilizaron 18 reproductores (15 machos y 3 hembras) cuya espermiación y ovulación, respectivamente, fue inducida con extracto de hipófisis de carpa. El semen fue colectado mediante masaje del abdomen del pez. El semen fresco fue evaluado y luego diluido con una solución crioprotectora que incluyó YC o YG. El semen diluido fue congelado y descongelado a los 30 días para la evaluación pos-descongelación y prueba de fertilidad. Se

<sup>1</sup> Departamento Académico de Medicina Veterinaria - Zootecnia, Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Madre de Dios, Perú

<sup>2</sup> Programa de Investigación en Ecosistemas Acuáticos Amazónicos, Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana, Madre de Dios, Perú

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano Puno, Puno, Perú

<sup>4</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

<sup>5</sup> Laboratorio de Nutrición y Alimentación Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

\* Email: [uperez@unap.edu.pe](mailto:uperez@unap.edu.pe)

La investigación fue financiada por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios mediante el proyecto «Efecto de la yema de huevo sobre los parámetros macroscópicos, microscópicos y fertilidad del semen congelado de Paco (*Piaractus brachypomus*). Resolución N.º143-2020-UNAMAD-VR.

Recibido: 14 de marzo de 2022

Aceptado para publicación: 6 de diciembre de 2022

Publicado: 27 de febrero de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

encontró una notoria disminución de los parámetros seminales por efecto de la congelación. La motilidad fue menor para la YC comparado a la YG (14.8 vs. 18.8%;  $p < 0.05$ ), mientras que la vitalidad (31 vs. 28.8%), tiempo de activación (1.4 vs. 1.3 min) y la fertilidad (18.4 vs. 20.4%) fueron similares entre grupos. En conclusión, la motilidad fue mejorada con la adición de yema de huevo de gallina, mientras que la vitalidad, tiempo de activación y fertilidad no fueron influenciados por el tipo de yema.

**Palabras clave:** criopreservación, espermatozoide, fertilidad, peces, semen

## ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of the type of egg yolk (quail-YC vs hen-YG) on the quality of frozen paco (*Piaractus brachypomus*) semen (volume, colour, concentration, motility, vitality and fertility). Eighteen breeders (15 males and 3 females) were used, whose spermiation and ovulation, respectively, were induced with carp pituitary extract. Semen was collected by massaging the abdomen of the fish. Fresh semen was evaluated and then diluted with a cryoprotective solution that included YC or YG. Diluted semen was frozen and thawed at 30 days for post-thaw evaluation and fertility testing. A notable decrease in seminal parameters was found due to the effect of freezing. Motility was lower for YC compared to YG (14.8 vs. 18.8%;  $p < 0.05$ ), while vitality (31 vs. 28.8%), activation time (1.4 vs. 1.3 min) and fertility (18.4 vs. 20.4%) were similar between groups. In conclusion, the motility was improved with the addition of chicken egg yolk, while the vitality, activation time and fertility were not influenced by the type of yolk.

**Key words:** cryopreservation, fertility, fish, semen, spermatozoa

## INTRODUCCIÓN

El pez «Paco» (*Piaractus brachypomus*) es una especie rústica de crecimiento rápido, buena calidad de carne y aceptada en el mercado, por lo que es considerada una especie potencialmente productiva (Mesa-Grande y Botero-Aguirre, 2007). La diversidad genética en las granjas acuícolas destinadas a la producción de alevinos ha disminuido, obligando a establecer protocolos de criopreservación de semen para intercambio y aprovechamiento de material genético entre productores (Fresneda *et al.*, 2004; Suarez *et al.*, 2019). En este sentido, la caracterización de los parámetros seminales (López-Hernández *et al.*, 2018) permite seleccionar donadores de gametos para la criopreservación y reproducción fuera de su estación reproductiva (Cruz Casallas *et al.*, 2006b).

Se tiene el interés de aumentar la producción del pez paco; sin embargo, su reproducción estacional impide disponer alevinos durante todo el año (Criscuolo-Urbinati *et al.*, 2012). Su reproducción en cautiverio es difícil, siendo necesario utilizar hormonas para el desove de las hembras y la obtención de esperma en machos (Chaves-Moreno *et al.*, 2011) a fin de obtener embriones en incubadoras hasta la fase de alevinos.

La criopreservación de semen en peces es importante en la acuicultura para la conservación genética de especies productivas en vías de extinción, para la reserva seminal en épocas no reproductivas y para el intercambio genético (Carolsfeld *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2010; Ramírez-Merlano *et al.*, 2010; Pineda-Santis *et al.*, 2015; Restrepo-Betancur *et al.*, 2017). Por otro lado, la fertilidad pos-descongelación es baja

con respecto al semen fresco, siendo necesario el desarrollo de protocolos de congelación-descongelación (Navarro *et al.*, 2004; Cruz-Casallas *et al.*, 2006a) que eviten el daño a nivel celular por la formación de cristales intra y extracelulares, mediante el uso de aditivos como los antioxidantes (Rodríguez y Nivia, 2017).

La yema de huevo ha sido utilizada como diluyente de semen en la criopreservación de semen (Trimeche *et al.*, 1997; Bathgate *et al.*, 2006; Kulaksýz *et al.*, 2010; Belala *et al.*, 2016; Anzar *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2022) por su acción protectora no permeable, al formar una película protectora en la superficie de la membrana del espermatozoide (Quinn *et al.*, 1980) por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Bergeron y Puttaswamy, 2006; Qiao-Xiang *et al.*, 2011), así como por el contenido de colesterol (Müller *et al.*, 2008) que estabilizan o previenen el daño en la membrana espermática (Cabrita *et al.*, 1998). Es decir, la yema de huevo es indispensable en la congelación de semen en peces (Rusco *et al.*, 2019), pero con efectos variables en semen dependiendo de la especie (Babiak *et al.*, 2001; Chauhan y Anand, 1990; Lahnsteiner *et al.*, 2000; Maria *et al.*, 2006; Jodun *et al.*, 2007; Ramirez-Merlano *et al.*, 2011; Yildiz *et al.*, 2013). Con estos antecedentes, el objetivo del estudio fue determinar el efecto de la yema de los huevos de gallina y codorniz como diluyente sobre la calidad de semen de paco (*Piaractus brachypomus*) pos-descongelación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales Experimentales

El estudio se realizó en el Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP), localizado en el distrito de Tambopata, provincia de Tambopata, Región de Madre de Dios, a una altitud de 139 msnm. Se utilizaron 15 pacos (*Piaractus brachypomus*)

machos distribuidos en tres grupos (control, yema de huevo de gallina y yema de huevo de codorniz, cada grupo con cinco peces). Los peces tenían un peso de  $3.7 \pm 0.51$  kg, se encontraban sexualmente maduros y con liberación seminal de la papila urogenital al masaje de la región ventral. Además, se tuvo tres hembras donadoras de ovocitos. El experimento tuvo una duración de 30 días y los peces fueron mantenidos en piletas de cemento durante 24 horas y en ayunas, antes de la aplicación de la hormona. Se hizo recambio de agua diariamente y en ayunas.

### Colecta de Gametos

Se administró 2.5 mg/kg de extracto de hipófisis de carpa (EHC) (Chemical Laboratories, USA) diluido con suero fisiológico divididos en dos fracciones de 50% y aplicadas a nivel de la aleta pectoral de los machos con un intervalo de 12 horas. Previo a la colecta, se cubrió la cabeza de los peces con una toalla húmeda y se retiró el exceso de agua de la zona ventral alrededor del poro genital y con un masaje ventro-craneal se procedió a la colecta de semen en tubos Falcon de 15 ml.

Las hembras fueron inducidas con EHC a una dosis de 5 mg/kg peso vivo. En la primera dosis se aplicó el 10% y luego de 12 horas el 90% restante a nivel de la aleta pectoral. El desove se realizó entre 6 a 8 horas de la segunda dosis a través de un masaje ventro-craneal (Fresneda *et al.*, 2004).

### Calidad Seminal

El semen colectado se mantuvo a la temperatura del agua del estanque (28 °C) durante la evaluación, sin exceder los 30 minutos. Se determinó el volumen y color de manera subjetiva, descartando las muestras contaminadas con heces o activadas con orina o agua del estanque.

Las características microscópicas evaluadas (Fresneda *et al.*, 2004; Cruz-Casallas *et al.*, 2006a) fueron:

- Motilidad masal, estimada subjetivamente con un microscopio a 10X previa activación seminal con la solución activadora (agua destilada con bicarbonato de sodio al 1%) en una proporción de 20 µl de semen con 180 µl de solución activadora.
- Tiempo de activación. Fue calculado inmediatamente al contacto con la solución activadora en una proporción de 20 µl de semen con 180 µl de solución activadora. Fue expresado en minutos hasta el cese del 100% de movimiento.
- Concentración espermática. Fue calculada en la cámara de Neubauer con una dilución de 1:200 con NaCl 0.9%, expresado en 10<sup>9</sup>/ml.
- Vitalidad. Fue realizada mediante la tinción Eosina-Nigrosina, considerándose los espermatozoides coloreados como muertos y los no coloreados como vivos. Se expresó en porcentaje.

### Crioprotectores y Congelación

En la solución crioprotectora con yema de huevo de gallina se utilizó 5% de Dimetilsulfoxido (DMSO), 5.5% de glucosa y 15% de yema de huevo de gallina llevado a 100 ml de agua destilada (Fresneda *et al.*, 2004). La yema de huevo de gallina fue reemplazada por yema de huevo de codorniz en la segunda solución. El semen fue diluido en 1:4 (semen: dilutor). Para el semen fresco se usó solamente la solución activadora en el momento de la fertilización.

La temperatura del semen colectado fue bajada desde 28 °C hasta 4 °C, momento en que se mezcló con las soluciones crioprotectoras con un tiempo de equilibrio de 30 minutos. El semen diluido fue envasado en pajillas de 0.5 ml y selladas con ácido polivinílico. La congelación se realizó con vapores de nitrógeno a 5 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido por 15 minutos e inmersión directa de las pajillas en el nitrógeno líquido (Navarro *et al.*, 2004). Se tomó en consideración las muestras de semen con motilidades mayores a 80%.

### Fertilidad

Las pajillas fueron descongeladas a 37 °C por 30 s. La pajilla de 0.5 ml fue colocado sobre 4 g de ovocitos por repetición. Los ovocitos estuvieron secos para evitar la activación seminal antes de la aplicación de la solución activadora. Como medio de fertilización se usó la solución activadora (5 ml) por un periodo de 3 min por cada repetición. Las muestras fertilizadas fueron llevadas a incubadoras con ingreso de agua ascendente donde se lavó el semen sobrante a una temperatura de 28 °C (Verdi Olivares *et al.*, 2014; Mesa-Grande y Botero-Aguirre, 2007). Se realizaron 15 repeticiones de fertilidad por cada tratamiento (15 repeticiones para yema de huevo de gallina, 15 para yema de codorniz y 15 para el semen fresco [control]). La fertilidad se evaluó a las 6 h de ser colocadas en la incubadora con una muestra al azar de huevos y fue expresada en porcentaje (Navarro *et al.*, 2004). Todos los insumos usados fueron de Sigma Chemical (USA).

### Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados en promedio ± desviación estándar. Las características microscópicas fueron transformadas a valores angulares (arcoseno de la raíz de p) y luego los promedios de las variables fueron comparados mediante la prueba t Student ( $p < 0.05$ ) prueba paramétrica pues los datos transformados cumplieron los supuestos de normalidad (Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianzas (de Levene). Los datos de fertilidad fueron sometidos a la prueba de Chi cuadrado. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico de R con el paquete *RCmdr* (RCore Team, 2020).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros macro y microscópicos del semen fresco se describen en el Cuadro 1. El volumen varió entre 2.5 y 6.0 ml, mientras que la concentración espermática varió entre  $28.0 \times 10^9$  y  $37.6 \times 10^9$ /ml

Cuadro 1. Parámetros espermáticos macro y microscópicos de semen fresco de paco (*Piaractus brachypomus*) en Tambopata, Madre de Dios, Perú

	Media ± DE
Color	Blanco lechoso
Volumen (ml)	4.1 ± 1.0
Concentración (10 <sup>9</sup> /ml)	33.2 ± 2.9
Motilidad (%)	87.5 ± 5.4
Vitalidad (%)	70.1 ± 2.2
Tiempo de activación (min)	5.8 ± 0.8

El volumen promedio obtenido (4.1 ml) probablemente haya sido influenciado por el uso de la EHC (Viveiros *et al.*, 2002; Fresneda *et al.*, 2004) y representa un valor intermedio a lo reportado por otros investigadores. Navarro *et al.* (2004) y Suarez *et al.* (2019) reportaron volúmenes mayores, mientras que Nascimento *et al.* (2010) y Fresneda *et al.* (2004) obtuvieron volúmenes de semen menores a lo encontrado en el presente estudio. Asimismo, la concentración espermática fue menor a lo reportado por Nascimento *et al.* (2010) pero similar a lo mencionado por Fresneda *et al.* (2004). Otros factores que podrían causar la variabilidad entre los resultados del estudio y los reportados por otros investigadores se encuentran relacionados a la alimentación, la edad, tipo y

dosis de hormona, método de colección seminal y época del año (Navarro *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2010; Alcántara *et al.*, 2016).

Los parámetros microscópicos pos-descongelación por efecto de la yema de huevo de codorniz o gallina se muestran en el Cuadro 2. La motilidad es el único parámetro que fue afectado por el tipo de yema en el dilutor ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, los parámetros seminales tuvieron mayor variabilidad por efecto de la yema de huevo de gallina respecto a la yema de huevo de codorniz, probablemente debido a diferencias en la composición de ambas yemas, aunque estos resultados son concordantes a los reportados por Bozkurt *et al.* (2014) para la carpa.

Los valores pos-descongelación fueron menores a lo esperado, posiblemente debido al empleo de 5% de DMSO, considerando que Carolsfeld *et al.* (2003) recomienda 10%, pudiendo generar una menor protección disminuyendo la motilidad, tiempo de activación y fertilidad (Cruz-Casallas *et al.*, 2006a). La baja vitalidad en el semen pos-descongelación fue similar a la reportada por Navarro *et al.* (2004), la cual se debería a daños que ocurren en la membrana espermática durante la congelación (Lahnsteiner *et al.*, 1996), alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Figuerola *et al.*, 2016) y daño del ADN (Ekici *et al.*, 2022).

Cuadro 2. Parámetros espermáticos microscópicos de semen de paco (*Piaractus brachypomus*) pos-descongelación por efecto de la yema de huevo en el diluyente (Tambopata, Madre de Dios, Perú)

	Dilutor con yema de huevo de codorniz (Media ± DE)	Dilutor con yema de huevo de gallina (Media ± DE)	Valor p
Motilidad (%)	14.8 <sup>b</sup> ± 0.66	18.8 <sup>a</sup> ± 1.11	0.015
Vitalidad (%)	31.0 ± 2.07	28.8 ± 4.13	0.647
Tiempo de activación (min)	1.4 ± 0.06	1.3 ± 0.10	0.570

<sup>a,b</sup> Medias con letras diferentes en la misma fila son estadísticamente diferentes a la prueba t ( $p < 0.05$ )

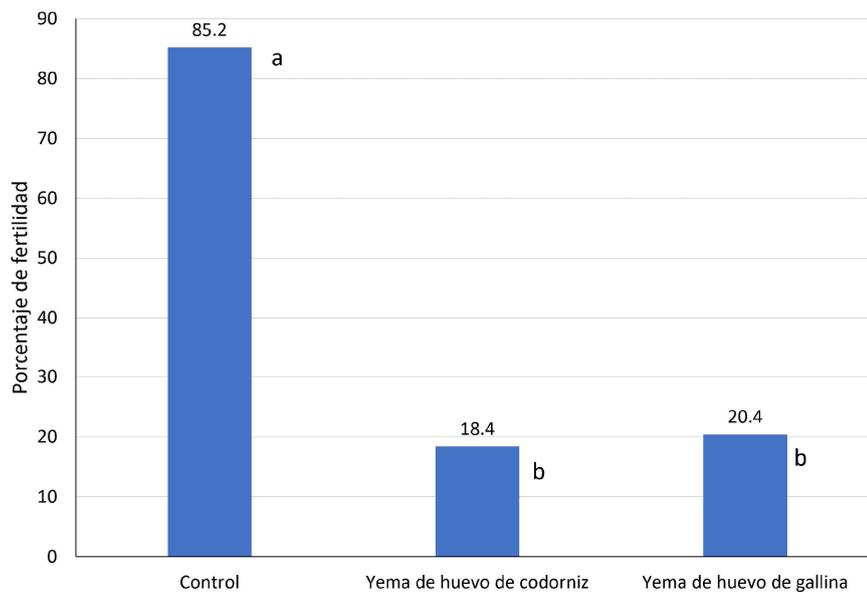


Figura 1. Porcentaje de fertilidad en semen fresco (control) y congelado de semen de Paco (*Piaractus brachyomus*) con yema de huevo de codorniz y gallina.

El tiempo de activación en semen fresco fue superior a lo reportado por Fresneda *et al.* (2004) y Suarez *et al.* (2019) disminuyendo de 5.8 minutos en semen fresco a 1.4-1.3 minutos por efecto de yema de huevo de codorniz y gallina, respectivamente. En general, los resultados pos-descongelación tuvieron cierta variación con otros reportados en la literatura (Fresneda *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004; Ramírez-Merlano *et al.*, 2011), pero sin que hayan influenciado los resultados de fertilidad.

La motilidad en semen fresco fue similar a otros reportes (Fresneda *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004; Suarez *et al.*, 2019), pero la motilidad pos-descongelación fue menor a lo reportado por Fresneda *et al.* (2004), Nascimento *et al.* (2010) y Ramírez-Merlano *et al.* (2011), aunque similar al valor obtenido por Galo *et al.* (2019) en *Piaractus mesopotamicus*. La motilidad pos-descongelación fue mejor con el dilutor con yema de huevo de gallina (18.8%) que con el de yema de codorniz (14.8%) ( $p < 0.05$ ), aunque la di-

ferencia con el semen fresco fue notoria. La yema de huevo puede haber afectado los niveles de glucosa (Babiak *et al.*, 2001), así como por su contenido de lipoproteínas de alta densidad y minerales que reducen la motilidad (Moussa *et al.*, 2002). No obstante, se observan reportes donde la yema de huevo afecta significativamente y otros donde no la afecta, dependiendo en ciertos casos de la especie animal (Maria *et al.*, 2006; Jodun *et al.*, 2007; Yildiz *et al.*, 2013; Anzar *et al.*, 2019).

De hecho, Lahnsteiner *et al.* (1996) demostraron que la adición de yema de huevo (0 vs. 7%) y sacarosa al diluyente junto con agentes crioprotectores con propiedades penetrantes en la célula mejoraban significativamente la calidad del esperma, incrementando la motilidad. Más recientemente, Torres *et al.* (2022) adicionando 5, 10 y 12% de yema de huevo, demostraron que era suficiente un 5% para proteger la membrana plasmática de los espermatozoides criopreservados de semen del pez *Prochilodus brevis*.

La mejor motilidad obtenida con el uso de yema de huevo de gallina en comparación con la yema de huevo de codorniz (Cuadro 2) fue semejante al estudio de Kulaksýz *et al.* (2010) en semen de ovinos. Las diferencias en motilidad obtenidas con la yema de huevo pueden estar relacionadas a las diferencias en la membrana plasmática de los espermatozoides y a la composición del plasma seminal de cada especie (Sun *et al.*, 2019). Por otro lado, también podría deberse a que la yema de gallina tiene mayor porcentaje de colesterol (Bathgate *et al.*, 2006) y sus LDL (lipoproteínas de baja densidad) podrían mejorar las tasas de motilidad (Bergeron y Puttaswamy, 2006).

No se encontraron diferencias significativas en la prueba de fertilidad (Figura 1) de semen descongelado de paco al emplear la yema de huevo de codorniz o de gallina; sin embargo, las fertilidades fueron significativamente menores que la fertilidad obtenida con el grupo control ( $p < 0.05$ ). La fertilidad pos-descongelación fue inferior a lo mencionado por otros autores (Fresneda *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004; Ramírez-Merlano *et al.*, 2011). Según Babiak *et al.* (2001) el uso de yema de huevo no necesariamente tiene una influencia significativa en la fecundación, aunque se menciona la posibilidad de que la yema de huevo podría disminuir la fertilidad en algunas especies por la interacción de sus componentes con el plasma seminal (Chauhan y Anand, 1990), y esto podría haber ocurrido en el presente estudio.

El movimiento de los espermatozoides depende de la energía liberada por el ATP proporcionado por las mitocondrias (Cosson *et al.*, 1995). Cualquier daño a las mitocondrias, como sucede en la criopreservación, tiene un efecto negativo sobre la motilidad (Figueroa *et al.*, 2016) y como consecuencia sobre el potencial de fertilización de los espermatozoides (Gallego *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

- La motilidad fue el único parámetro del semen crioconservado de paco (*Piaractus brachypomus*) que mejoró con la adición de yema de huevo de gallina, mientras que la vitalidad y el tiempo de activación no fueron afectados por el tipo de yema.
- La crioconservación redujo drásticamente los parámetros seminales respecto al semen fresco.
- Se requieren más estudios para demostrar las bondades de la yema de huevo frente a otros dilutores sobre la motilidad y fertilidad de los espermatozoides crioconservados de paco.

## Agradecimientos

Al Gerente del IIAP Ing. Ronald Corvera Gomringer, al Especialista Ing. Willian Guerrero García y al personal técnico del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana por su apoyo incondicional en la ejecución de la parte experimental.

## LITERATURA CITADA

1. Alcántara F, Verdi L, Murrieta G, Rodríguez L, Chu F, Tello S, Del Águila M. 2016. Evaluación de dos inductores hormonales en la ovulación y desove de tres especies ícticas amazónicas. *Ciencia Amazónica* 6: 103-108. doi: 10.22386/ca.v6i1.113
2. Anzar M, Rajapaksha K, Boswall L. 2019. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PLoS One* 14: e0223977. doi: 10.1371/journal.pone.0223977
3. Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H, Strzezek J, Demianowicz W. 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 56: 177-192. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00553-2

4. **Bathgate R, Maxwell WM, Evans G. 2006.** Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on *in vitro* post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* 41: 68-73. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x
5. **Belala R, Delay J, Amirat L, Ropers MH, Guillou JL, Anton M, Schmitt E, et al. 2016.** The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 °C. *Anim Reprod Sci* 168: 100-109. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.032
6. **Bergeron A, Puttaswamy M. 2006.** New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 73: 1338-1344. doi: 10.1002/mrd.20565
7. **Bozkurt Y, Yavaş Y, Yıldıız C. 2014.** Effect of different avian egg yolk types on fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Aquacult Int* 22: 131-139. doi: 10.1007/s10499-013-9728-4
8. **Cabrera E, Alvarez R, Anel L, Rana KJ, Herraes MP. 1998.** Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 37: 245-253. doi: 10.1006/cryo.1998.2121
9. **Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni E, Harvey BJ. 2003.** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol* 63: 472-489. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x
10. **Chauhan MS, Anand S. 1990.** Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34: 1003-1013. doi: 10.1016/0093-691X(90)90568-E
11. **Chaves-Moreno LC, Chacon-Rodriguez L, Lozada-Morales J. 2011.** Evaluación de la reproducción inducida de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) con acetato de buse-relina. *Vet Zootec* 6: 47-55.
12. **Cosson MP, Cosson J, André F, Billard R. 1995.** cAMP/ATP relationship in the activation of trout sperm motility: their interaction in membrane-deprived models and in live spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 31: 159-176. doi: 10.1002/cm.970310208
13. **Criscuolo-Urbini E, Kuradomi RY, Urbini EC, Batlouni SR. 2012.** The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Theriogenology* 78: 2087-2094. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.08.001
14. **Cruz-Casallas PE, Mauricio V, Robles M. 2006a.** Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Rev Colomb Cienc Pec* 19: 146-151.
15. **Cruz-Casallas P, Medina V, Velasco Y. 2006b.** Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev Colomb Cienc Pec* 19: 152-159.
16. **Ekici A, Yamaner G, Didem DM. 2022.** Cryopreservation studies in aquaculture from past to present: Scientific techniques and quality controls for commercial applications. In: M Quain (ed). *Cryopreservation - Applications and challenges*. doi: 10.5772/intechopen.108566
17. **Figueroa E, Valdebenito I, Merino O, Ubilla A, Risopatrón J, Farias JG. 2016.** Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *J Fish Biol* 89: 1537-1550. doi: 10.1111/jfb.13052
18. **Fresneda LG, Agudelo E, Olivera M. 2004.** Espermiación inducida y crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*). *Rev Colomb Cienc Pec* 17: 46-52.
19. **Galo JM, Streit-Junior DP, Oliveira CA, Povh JP, Fornari DC, Digmayer M, Ribeiro RP. 2019.** Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. *Braz J Biol* 79: 438-445. doi: 10.1590/1519-6984.182391

20. **Gallego V, Pérez L, Asturianoa JF, Yoshida M. 2013.** Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture* 416: 238-243. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.035
21. **Jodun WA, King K, Farrell P, Wayman W. 2007.** Methanol and egg yolk as cryoprotectants for atlantic salmon spermatozoa. *N Am J Aquacult* 69: 36-40. doi: 10.1577/a05-052.1
22. **Kulaksýz R, Cebi C, Akcay E, Daskin A. 2010.** The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Res* 88: 12-15. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.11.014
23. **Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. 2000.** Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 54: 1477-1498. doi: 10.1016/s0093-691x(00)-00469-6
24. **Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R. 1996.** The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *J Appl Ichthyol* 12: 99-106. doi: 10.1111/j.1439-0426.1996.tb00070.x
25. **López-Hernández JC, Osorio A, Jiménez-Félix SA, Páramo-Delgado S, Márquez-Couturier G, Yasui GS, Arias-Rodríguez L. 2018.** La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Rev Cienc Marinas Costeras* 10: 67-96. doi: 10.15359/revmar10-1.5
26. **Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. 2006.** Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260: 298-306. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.011
27. **Mesa-Grande M, Botero-Aguirre M. 2007.** La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. *Rev Colomb Cienc Pec* 20: 79-86.
28. **Moussa M, Marinnet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00682-9
29. **Müller K, Müller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C. 2008.** Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biol Reprod* 78: 390-399. doi: 10.1095/biolreprod.107.064253
30. **Nascimento AF, Maria AN, Pessoa NO, Carvalho MA, Viveiros AT. 2010.** Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Anim Reprod Sci* 118: 324-329. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2009.07.002
31. **Navarro, O., Velasco Santamaría, Y., & Cruz Casallas, P. (2004).** Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev Colomb Cienc Pec* 17: 53-59.
32. **Pineda-Santís H, Gómez-Oquendo J, Montoya-Páez J, Toro-Rendón V, Acevedo-Villa O, Restrepo-Betancur G. 2015.** Semen cryoconservation and sperm quality regarding the Neotropical fish *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Orinoquia* 19: 166-173.
33. **Qiao-Xiang D, Rodenburg SE, Hill D, Vandervoort CA. 2011.** The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian J Androl* 13: 459-464. doi: 10.1038/aja.2010.145
34. **Quinn P, Chow PY, White I. 1980.** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fert* 60: 403-407. doi: 10.1530/jrf.0.0600403

35. **Ramirez-Merlano JA, Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles VM, Cruz-Casallas PE. 2011.** Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachyomus* (Cuvier 1818). *Aquac Res* 42: 738-745. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02835.x
36. **Ramírez-Merlano J, Medina V, Cruz P. 2010.** Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *Orinoquía* 14: 59-71. doi: 10.22579/20112629.128
37. **R Core Team. 2020.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
38. **Restrepo-Betancur G, Páez JDM, Chacón LA. 2017.** Evaluación de dos crioprotectores y tres curvas de congelación programable en la criopreservación de semen de *Brycon henni* (Pisces: Characidae). *Rev Inv Vet Perú* 28: 597-605. doi: 10.15381/rivep.v28i3.13349
39. **Rodríguez M, Nivia A. 2017.** Efecto de la adición de antioxidantes sobre la motilidad espermática post-criopreservación y fertilidad del semen de peces. *Rev Vet* 28: 157-164. doi: 10.30972/vet.2822544
40. **Rusco G, Di Iorio M, Gibertoni PP, Esposito S, Penserini M, Roncarati A, Cerolini S, et al. 2019.** Optimization of sperm cryopreservation protocol for Mediterranean brown trout: a comparative study of non-permeating cryoprotectants and thawing rates *in vitro* and *in vivo*. *Animals (Basel)* 9: 304. doi: 10.3390/ani9060304
41. **Suarez RO, Robles VM, Casallas PE. 2019.** Effect of two semen collection in a breeding season on the seminal quality of red-bellied pacu (*Piaractus brachyomus*). *Rev Inv Vet Perú* 30: 1184-1195. doi: 10.15381/rivep.v30i3.-15515
42. **Sun L, Fan W, Wu C, Zhang S, Dai J, Zhang D. 2020.** Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology* 92: 146-150. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.12.004
43. **Torres TM, Almeida-Monteiro PS, Nascimento RV, Pereira VA, Ferreira YM, Lobato JS, Pinheiro RRR, et al. 2022.** Sperm cryopreservation of *Prochilodus brevis* using different concentrations of non-permeable cryoprotectants. *Anim Reprod* 19: e2021-0083. doi: 10.1590/1984-3143-AR2021-0083
44. **Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. 1997.** Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology* 34: 385-393. doi: 10.1006/cryo.1997.2009
45. **Verdi Olivares L, Alcántara Bocanegra F, Rodríguez Chu L, Chu Koo F, Ramírez Arrarte P, Tello Martín S. 2014.** Validación del protocolo de reproducción de *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachyomus* y *Prochilodus nigricans* en condiciones controladas. *Ciencia Amazónica* 4: 54. doi: 10.22386/ca.v4i1.68
46. **Viveiros ATM, Fessehaye Y, ter Veld M, Schulz RW, Komen J. 2002.** Handstripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 213: 373-386. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00036-4
47. **Yıldız C, Bozkurt Y, Yavas I. 2013.** An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology* 67: 91-94. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.05.008