

**Research Article**

**Efecto del suplemento de astaxantina sobre la calidad seminal en  
*Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei: Characidae)**

**Omar Domínguez-Castanedo<sup>1</sup>, Ángel Toledano-Olivares<sup>2</sup> & Alejandro Ávalos-Rodríguez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso N°1100, Col. Villa Quietud, 04906, Coyoacán, México, D.F.

<sup>2</sup>Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Departamento Producción Agrícola y Animal Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso N°1100 Col. Villa Quietud, 04906, Coyoacán, México, D.F.

Corresponding author: Omar Domínguez (dominguezcastanedo@gmail.com)

**RESUMEN.** Se caracterizó la morfometría de los espermatozoides del teleosteo *Moenkhausia sanctaefilomenae*, y se evaluó el efecto de la suplementación del carotenoide astaxantina en la dieta sobre la calidad de semen. La morfometría de los espermatozoides se realizó con microscopía óptica con la tinción de eosina-nigrosina vista en fluorescencia. La calidad de semen de 360 peces se evaluó con espermogramas clásicos (concentración, volumen, motilidad y viabilidad). La longitud total del espermatozoide fue de  $16,83 \pm 2,33 \mu\text{m}$ , diámetro de la cabeza sin acrosoma de  $1,93 \pm 0,21 \mu\text{m}$ , diámetro de la pieza media de  $0,91 \pm 0,23 \mu\text{m}$  y longitud del flagelo de  $13,18 \pm 1,76 \mu\text{m}$ . En los peces del grupo control, el volumen seminal y la concentración espermática fue de  $2,14 \pm 1,55 \mu\text{L}$  y  $6,8 \times 10^8 \pm 292,82$  respectivamente. La adición de astaxantina incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) estos parámetros a  $3,87 \pm 1,06 \mu\text{L}$  y  $13 \times 10^8 \pm 265,56$  respectivamente. La motilidad no varió significativamente entre el grupo control ( $3,14 \pm 1,46$ ) y astaxantina ( $3,50 \pm 0,92$ ). Los resultados indicaron una tendencia hacia el incremento de la calidad seminal en el grupo tratado con astaxantina. Este incremento se puede atribuir a sus propiedades antioxidantes que protegen a las células testiculares contra el estrés oxidativo, con lo cual, se mejora el potencial reproductor de esta especie en condiciones de cultivo.

**Palabras clave:** *Moenkhausia sanctaefilomenae*, astaxantina, calidad de semen, espermatozoide, carotenoides, acuicultura.

**Effect of astaxanthin supplementation on semen quality in  
*Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei: Characidae)**

**ABSTRACT.** This study was set out to: i) characterize the morphometry of spermatozoa of *M. sanctaefilomenae*; and ii) evaluate the effect on the quality of semen by astaxanthin supplementation in the diet. The morphometry of the sperm was analyzed by optical microscopy (nigrosin-eosin staining). Semen quality of 360 fish was evaluated by spermograms (volume, total number, motility and viability). The length of the sperms was  $16.83 \pm 2.33 \mu\text{m}$ , the head diameter was  $1.93 \pm 0.21 \mu\text{m}$  without acrosome, the midpiece diameter was  $0.91 \pm 0.23 \mu\text{m}$  and the length of the flagellum was  $13.18 \pm 1.76 \mu\text{m}$ . In fish unexposed to astaxanthin (control group) the seminal volume and the total number of sperms was  $2.14 \pm 1.55 \mu\text{L}$  and  $6.8 \times 10^8 \pm 29$ , respectively. The addition of astaxanthin in the diet significantly increased ( $P < 0.05$ ) these parameters to  $3.87 \pm 1.06 \mu\text{L}$  and  $13 \times 10^8 \pm 26$ , respectively. The motility of the sperms and the sperm viability did not differ between both groups ( $P > 0.05$ ). The results suggest that astaxanthin improves some parameters of the semen quality (volume and total number). This improvement may be attributable to the antioxidant properties (*i.e.*, protection against oxidative stress in testicular cell structures) of astaxanthin.

**Keywords:** *Moenkhausia sanctaefilomenae*, astaxanthin, semen quality, sperm, carotenoids, aquaculture.

## INTRODUCCIÓN

La nutrición es un factor determinante en la acuicultura y su efecto es poco conocido durante el proceso reproductor de los teleósteos. La madurez gonadal, fecundidad y desarrollo embrionario están influenciados por la presencia de nutrientes esenciales en la dieta natural de los peces, que varía según la especie y su distribución geográfica. Esto se manifiesta en la reducción del éxito reproductor en los peces cultivados en granja (Luquet & Watanabe, 1986; Earle, 1995; Izquierdo *et al.*, 2001).

Los lípidos y ácidos grasos son agentes que intervienen en los procesos reproductores, mejorando la calidad de los gametos y embriones (Sargent *et al.*, 2002). En este sentido, los carotenoides poseen propiedades químicas y biológicas en la nutrición de los peces, que se relacionan con procesos metabólicos, inmunidad, pigmentación y reproducción. Además, los carotenoides protegen ante los efectos de compuestos oxidantes y peroxidantes (Luquet & Watanabe, 1986; Burton, 1989; Kurshize *et al.*, 1990; Krinsky, 1993; Nishigaki *et al.*, 1994).

Los peces son incapaces de sintetizar carotenoides, a diferencia de las plantas y algunos microorganismos, como algas y cianobacterias (Schewender *et al.*, 1996; Disch *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 1999). Por lo que, los teleósteos dependen del suplemento de carotenoides en la dieta para cubrir sus requerimientos nutricionales (Meyers, 2000), situación crítica en organismos confinados en las unidades productivas, ya que no cuentan con aportes de su dieta natural (Izquierdo *et al.*, 2001).

La eficacia de los carotenoides, como la astaxantina, en el mejoramiento de la calidad de los ovocitos en teleósteos ha sido demostrada previamente en *Salmo salar* (Christiansen & Torrissen, 1997), *Oncorhynchus mykiss* (Choubert *et al.*, 1998), *Gadus morhua* (Sawanboonchun *et al.*, 2008) y *Lytechinus variegatus* (George *et al.*, 2001).

También Czczuga (1979) documentó la presencia de pequeñas cantidades de carotenoides en el semen de *Oncorhynchus mykiss*, lo que sugiere que estos pigmentos poseen alguna actividad biológica. La única evaluación del efecto de los carotenoides sobre los gametos masculinos fue realizada en *Salvelinus alpinus* (Mansour *et al.*, 2006), donde se determinó la importancia de estas moléculas en la prevención del estrés oxidativo de los espermatozoides. A pesar de los resultados obtenidos, y de la importancia de los espermatozoides en el proceso reproductor, por su contribución genética en la producción de embriones y larvas viables, mediante la integridad y calidad de su

ADN (Coward *et al.*, 2002; Rurangwa *et al.*, 2004), no se cuenta con mayor información en este contexto.

La calidad seminal de los teleósteos depende de interacciones complejas entre factores genéticos, fisiológicos y ambientales (Billard *et al.*, 1995; Coward *et al.*, 2002). En los peces mantenidos en cautiverio, la calidad del semen está afectada por el fotoperiodo, calidad de agua y nutrición (Blaxter, 1969; Rurangwa *et al.*, 2004).

El tetra de ojos rojos, *Moenkhausia sanctaefilomenae* es un carácido tropical de la región amazónica con gran importancia comercial ornamental en México (Gallardo *et al.*, 2009; Martínez-Espinosa *et al.*, 2009) y es un buen modelo de investigación por su fácil reproducción y tamaño pequeño (Dawes, 2005). Existe información acerca de su embriología (Walter, 2012), nutrición larval (Gallardo *et al.*, 2009) y ciclo reproductivo (Lourenço *et al.*, 2008). Sin embargo, aún quedan algunos aspectos de su biología reproductora y de su cultivo comercial por conocer. En consecuencia los objetivos de este trabajo son: i) caracterizar la morfometría de los espermatozoides de *M. sanctaefilomenae*, y ii) evaluar el efecto de la adición del carotenoide astaxantina en la dieta de los peces sobre la calidad de semen.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco. Se utilizaron 360 ejemplares de *M. sanctaefilomenae* de cinco meses de vida adquiridos a un productor local de reproducción probada. Se distribuyeron al azar en seis unidades experimentales de 40 L con filtración biológica y mecánica constante con filtros de caja Azul<sup>®</sup>. La temperatura se mantuvo a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  con termostatos de 50 w Elite<sup>®</sup> y el fotoperiodo fue de 14 h de luz por 10 h de oscuridad.

Se evaluaron dos grupos experimentales por triplicado: Grupo 1: alimento balanceado para trucha El Pedregal<sup>®</sup> (Silver-Cup<sup>®</sup>) y Grupo 2: alimento balanceado para trucha El Pedregal<sup>®</sup> (Silver-Cup<sup>®</sup>) impregnado con el carotenoide astaxantina Natu Rose<sup>®</sup> al 2%. Se agregaron 10 g de astaxantina a cada kg de alimento mediante la técnica de evaporación de alcohol (Guerrero, 1975). El alimento proporcionado fue equivalente al 3% de su biomasa, distribuida en tres raciones diarias durante 90 días previos a la evaluación de la calidad del semen.

Las muestras de semen se colectaron con tubos capilares sin heparina de 75 mm Propper<sup>®</sup> (uno por individuo), posterior a un masaje abdominal en direc-

ción opercular-caudal. La caracterización morfo-métrica de los espermatozoides se realizó con el programa Image-Pro Plus 5.1<sup>®</sup>, con la tinción de eosina-nigrosina (E-N) vistos con fluorescencia, según Lahnsteiner & Patzen (2008). La calidad del semen se evaluó mediante espermogramas clásicos en todos los individuos. Se calculó el volumen, concentración, motilidad (escala subjetiva de 1 a 5, donde 1 equivale a ningún espermatozoide móvil y 5 a todos los espermatozoides móviles), y viabilidad de acuerdo a Rodríguez (1992), con un microscopio Nikon eclipse 80i<sup>®</sup>.

Para detectar diferencias significativas entre los dos grupos experimentales se realizaron pruebas de *t*-Student, con significancia de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Los espermatozoides maduros de *M. sanctaefilomenae* tuvieron una longitud total de  $16,83 \pm 2,33 \mu\text{m}$  y consistió en una cabeza esférica pequeña, una pieza media reducida y un flagelo único. El diámetro de la cabeza fue de  $1,93 \pm 0,21 \mu\text{m}$  sin acrosoma, la pieza media de  $0,91 \pm 0,23 \mu\text{m}$  y longitud del flagelo de  $13,18 \pm 1,76 \mu\text{m}$ .

El volumen seminal del grupo control fluctuó entre 1 y 4  $\mu\text{L}$ , con promedio de  $2,14 \pm 1,55 \mu\text{L}$ . Mientras que en el grupo de astaxantina, fluctuó de 2,5 a 6,5  $\mu\text{L}$ , con promedio de  $3,87 \pm 1,06 \mu\text{L}$ . Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1)

La concentración espermática del grupo control fluctuó entre 3 y  $22 \times 10^8$  espermatozoides, con promedio de  $6,8 \times 10^8 \pm 292,8$ . En el grupo de astaxantina se registró una concentración espermática de 9 a  $25 \times 10^8$  espermatozoides, con promedio de  $13 \times 10^8 \pm 265,5$ , estimándose diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2)

La motilidad registrada para el grupo control varió de 1 a 5, con promedio de  $3,14 \pm 1,46$ . El grupo de astaxantina fluctuó entre 2 y 5, con promedio de  $3,50 \pm 0,92$ . No se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $P > 0,05$ ).

La viabilidad en los espermatozoides del grupo control fue de 65 a 94%, con promedio de  $81,14 \pm 9,68\%$ . El grupo de astaxantina varió de 73 a 86%, con promedio de  $78,62 \pm 4,92\%$ . No se detectaron diferencias significativas entre los grupos ( $P > 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

### Morfometría de los espermatozoides

De acuerdo con Mattei (1991) y Lahnsteiner & Patzen (2008), el espermatozoide de *M. sanctaefilomenae* co-

rresponde al tipo I, acuaesperma, es decir, típico esperma uniflagelado sin acrosoma, como el de la mayoría de los teleósteos de fertilización externa. Santana *et al.* (2013) caracterizaron la morfología del espermatozoide de *M. sanctaefilomenae* a nivel ultraestructural, con el núcleo esférico y excéntrico en relación al eje del flagelo, la pieza media asimétrica con un canal citoplásmico en la zona distal, un sistema endomembranal y varias mitocondrias alargadas; aunque no reportaron las medidas de las regiones antes descritas.

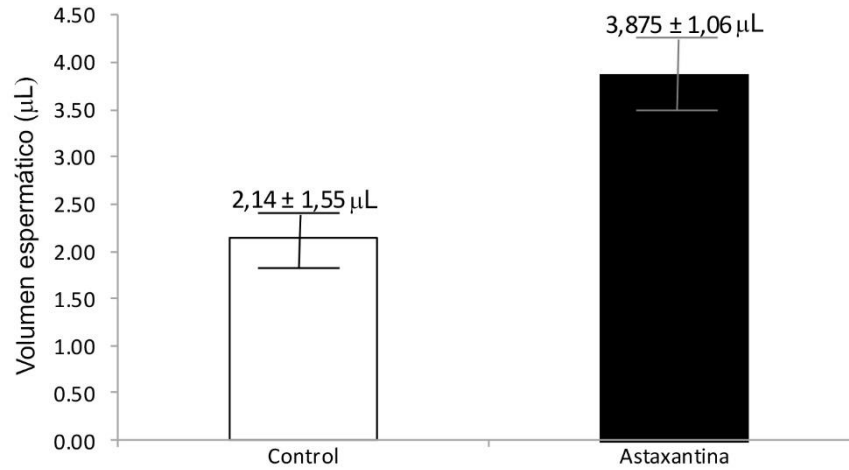
La morfometría de los espermatozoides descrita por primera vez en el presente trabajo, sigue el patrón general reportado en los carácidos: *Boehlkea fredcochui*, *Bryconacidnus ellisi*, *Bryconamericus exodon*, *Ceratobranchia obtusirostris*, *Cyanocharax alburnus*, *Creagrutus meridionalis*, *Knodus meridae*, *Odontostoechus lethostigmus*, *Piabina anhembi*, *Piabina argénte*, *Rhinobrycon negrensis* (Baicere-Silva *et al.*, 2011); *Hemigrammus marginatus* (Magalhães *et al.*, 2011); *Piaractus mesopotamicus* y *Serrasalmus maculatus* (Gusmão-Pompiani *et al.*, 2009) ya que la estructura está determinada por el modo de reproducción, tamaño de los ovocitos producidos por las hembras y nivel sistemático en que se encuentran las especies (Jemieson, 1991).

La descripción morfométrica del espermatozoide de *M. sanctaefilomenae* es importante para complementar la información de su biología reproductora. El aporte es significativo en lo particular y en lo general, para las especies de peces tropicales de importancia económica, de las cuales, es escasa su documentación en la literatura.

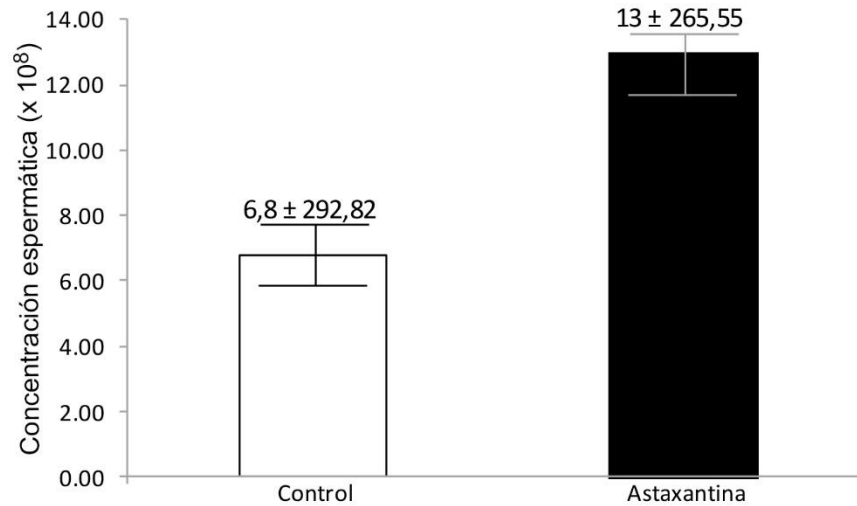
### Calidad seminal

Los resultados muestran una clara tendencia hacia el incremento de la calidad seminal (volumen, concentración y motilidad) en el grupo tratado con astaxantina. Este incremento puede atribuirse a que este agente posee propiedades antioxidantes. Los carotenoides brindan protección ante la peroxidación de los lípidos (Kurshize *et al.*, 1990), además de su capacidad para secuestrar radicales libres de oxígeno, resultantes de la peroxidación de los lípidos. Algunos peces presentan concentraciones elevadas de ácidos grasos poliinsaturados (Meyers, 2000) que pueden ser blancos de lipoperoxidación. Adicionalmente, los radicales libres pueden dañar también proteínas (enzimas) y ácidos nucleicos (ADN) (Miki, 1991).

Si bien en los peces no se ha documentado el daño ocasionado por los radicales libres, en espermatozoides humanos se ha documentado que pueden modificar el citoesqueleto y el axonema, ocasionando la reducción en la motilidad (De Lamirande & Gagnon, 1992); frag-



**Figura 1.** Volumen espermático en los grupos experimentales de *M. sanctaefilomenae* (promedio ± desviación estándar).



**Figura 2.** Concentración espermática en los grupos experimentales de *M. sanctaefilomenae* (promedio ± desviación estándar).

mentación del ADN nuclear, lo que causa alteraciones en el proceso de espermatogénesis, infertilidad o neoplasia en los descendientes (Roberts, 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que las concentraciones de vitaminas antioxidantes A, E y C, se incrementan significativamente en peces alimentados con una dieta suplementada con astaxantina (Christiansen *et al.*, 1995). De acuerdo a lo anterior, la astaxantina es un precursor natural de la vitamina A, que se ha relacionado con el aumento en la respuesta inmune en teleósteos (Thompson *et al.*, 1995). Además, la vitamina C tiene un efecto protector contra el daño oxidativo por radicales libres, en la función secretora del tejido endocrino; por lo tanto, en la esteroidogénesis y el mantenimiento de los niveles de testosterona en testículos de ratas (El-Missiry, 1999). En consecuencia,

la baja concentración de esta vitamina puede tener un impacto negativo sobre la gametogénesis (Gómes *et al.*, 1977). Asimismo, se ha documentado que la vitamina C es importante para mantener la integridad fisiológica de los testículos y glándulas accesorias en cerdos (Chinoy *et al.*, 1986). Por otra parte, se reportó el incremento del volumen seminal asociado a la reducción y prevención del daño oxidativo del ADN en las especies de teleósteos *Ctenopharyngodon idellus* (Metwally & Fouad, 2009) y *Oncorhynchus mykiss* (Dabrowski & Ciereszco, 1995), así como en ratas (Sönmez *et al.*, 2005) y en humanos (Potts *et al.*, 1999). También se ha demostrado que la vitamina E reduce significativamente la peroxidación lipídica (Massaelli *et al.*, 1999) y el incremento en la cantidad de espermatozoides en conejos (Yousef *et al.*, 2003).

Los resultados de este estudio sugieren que la adición de astaxantina a la dieta incrementa tanto el volumen seminal como la concentración de espermatozoides. Probablemente debido a la reducción del daño en las membranas celulares, en el material genético, y en la regulación de la esteroidogénesis en los testículos (Christiansen *et al.*, 1995; Meyers, 2000). La concentración de espermatozoides es uno de los parámetros más útiles en la evaluación de la calidad seminal de los teleosteos y con mayor trascendencia práctica en las granjas piscícolas (Rurangwa *et al.*, 2004).

También se ha sugerido que la astaxantina influye en la motilidad de los espermatozoides al inducir una quimiotaxis positiva (Hartmann *et al.*, 1947). En el presente trabajo, se registró un incremento en la motilidad del grupo de astaxantina con respecto al control, aunque no fue estadísticamente significativo, resultados similares a los reportados por Quantz (1980).

La viabilidad se evaluó en función de la integridad de la membrana. No obstante que el porcentaje de viabilidad fue menor en el grupo de astaxantina, no se detectaron diferencias significativas, con respecto al grupo control. Lo anterior sugiere que la astaxantina puede actuar a nivel de la espermatogénesis (en los tejidos epiteliales y células somáticas) y en las regulaciones endócrinas de este proceso, y no sobre la viabilidad de los espermatozoides *per se* (Gómes *et al.*, 1977; Chinoy *et al.*, 1986; Christiansen *et al.*, 1995).

Estos resultados permiten proponer que en *M. sanctaefilomenae*, la astaxantina por sí misma, o en sinergia con las vitaminas antes mencionadas, protege contra el estrés oxidativo a las estructuras celulares testiculares, como plantea Meyers (2000) para otras especies acuáticas. Esto permite mejorar el potencial reproductor de esta especie en condiciones de cultivo. Actualmente, no existen estudios similares en peces tropicales que permitan contrastar el alcance de la aplicación de este agente, aún cuando en las granjas de producción de peces en México, la administración de astaxantina es común. Por esta razón, es necesario profundizar en el modo de acción de los carotenoides sobre los espermatozoides o sobre el proceso de espermatogénesis, para deducir la posible vía de acción de este carotenoide sobre el aparato reproductor masculino.

#### AGRADECIMIENTOS

A Liliana García-Calva por sus comentarios para mejorar el manuscrito. A Bruno A. Marichal-Cancino por su revisión del texto y la elaboración del abstract.

A Mónica Bibiana Paz Arellano por la preparación del alimento impregnado con astaxantina. A los revisores anónimos por sus aportes para enriquecer el manuscrito.

#### REFERENCIAS

- Baicere-Silva, C.M., K.M. Ferreira, L.R. Malabarba, R.C. Benine & I. Quagio-Grassiotto. 2011. Spermatic characteristics and sperm evolution on the subfamily Stevardiinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotrop. Ichthyol.*, 9(2): 377-392.
- Billard, R., G. Cosson, G. Perchec & O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.
- Blaaxter, J.H. 1969. Development: eggs and larvae. In: W.S. Hoar & D.J. Randal (eds.). *Fish physiology*. Academic Press, Nueva York, pp. 177-178.
- Burton, G.W. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.*, 119: 109-111.
- Chinoy, N.J., R.P. Buch-Nee, R.R. Melita, L. Seethalakshimi, J.D. Sharman & M.R. Chinoy. 1986. Effect of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of Guinea pigs. *Int. J. Fertil.*, 31: 232-239.
- Choubert, G., J.M. Blanc & H. Poisson. 1998. Effects of dietary Keto-carotenoids (canthaxanthin and astaxanthin) on the reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquat. Nutr.*, 4: 249-254.
- Christiansen, R., O. Glette, O. Lie, O.J. Torrissen & R. Waagbø. 1995. Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed semi-purified diets with and without astaxanthin supplementation. *J. Fish. Dis.*, 18: 317-328.
- Christiansen, R. & O.J. Torrissen. 1997. Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 153: 51-62.
- Coward, K., N.R. Bromage, O. Hibbitt & J. Parrington. 2002. Gametogenesis, fertilization and egg activation in teleost fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 12: 33-58.
- Czeczuga, B. 1979. Carotenoids in fish. Carotenoids in *Salmo gairdneri* Rich. and *Salmo trutta* morpha *fario* L. *Hydrobiología*, 64: 251-259.
- Dabrowski, K. & A. Ciereszco. 1995. Protective effect of seminal plasma proteins on the degradation of ascorbic acid. *Mol. Cell. Biochem.*, 148: 59-66.
- Dawes, J. 2005. Complete encyclopedia of the freshwater aquarium. Firefly Book, London, 206 pp.
- De Lamirande, E. & C. Gagnon. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effect on the

- motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.*, 13: 368-378.
- Disch, A., J. Schewender, C. Müller, H.K. Lichtenthaler & M. Rohmer. 1998. Distribution of the mevalonate and glyceraldehydes phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem. J.*, 333: 381-388.
- Earle, K.E. 1995. The nutritional requirements of ornamental fish. *Vet. Q.* 17. Suppl., 1: 53-55 pp.
- El-Missiry, M.A. 1999. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. *Comp. Biochem. Phys.*, 124: 233-237.
- Gallardo, A.J., S.S. Sarma & S. Nandini. 2009. Prey selectivity and functional response by larval red-eyed *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Characiformes: Characidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52(5): 1209-1216.
- George, S.B., J.M. Lawrence, A.L. Lawrence, J. Smiley & L. Plank. 2001. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*, 199: 353-369.
- Gomes, S., O.D. Odour, B. Bharaj & Z.H. Verjee. 1977. Gonadal and plasma testosterone and cholesterol in scorbutic guinea pigs. *Int. Vit. Nutr. Res.*, 47: 75-80.
- Guerrero, R. 1975. Use of androgens for the production of all-male *Tilapia aurea* (Steindachner). *T. Am. Fish. Soc.*, 2: 342-348.
- Gusmão-Pompiani, P., L.R. Malabarba, C. Oliveira & I. Quagio-Grassiotto. 2009. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in the Serrasalminae (Ostariophysi: Characiformes) with further evidence on the relationships of the piranhas and pacus. *Neotrop. Ichthyol.*, 7(3): 385-394.
- Hartmann, M., F.G. Medem, R. Kuhn & H.J. Bielig. 1947. Untersuchungen, über die Befruchtungstoffe der Regenbogenforelle. *Naturforsch.*, 2: 330-349.
- Izquierdo, M.S., H. Fernández-Palacios & A.G.J. Tacon. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- Jemieson, B.G.M. 1991. Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, 2036 pp.
- Krinsky, N.L. 1993. Actions of carotenoids in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.*, 13: 561-587.
- Kurshize, M., E. Okimasu, E. Inoue & K. Utsuna. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med.*, 22: 27-38.
- Lahnsteiner, F. & R.A. Patzen. 2008. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: S.A. Hadi-Alavi, J.J. Cosson, K. Coward & G. Rafiee. (eds.). *Fish spermatology*. Alpha Science International, Oxford, pp. 1-61.
- Lourenço, L., A.L. Mateous & N.G. Machado. 2008. Sincronia na reprodução de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner) (Characiformes: Characidae) na planície de inundação do rio Cuiabá, Pantanal Mato-grossense, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, 25(1): 20-27.
- Luquet, P. & T. Watanabe. 1986. Interaction "nutrition-reproduction" in fish. *Fish. Physiol. Biochem.*, 2(1): 121-129.
- Magalhães, A.L.B., R.F. Andrade, B.V.C. Gomes, V.R. Perini, E. Rizzo & N. Bazzoli. 2011. Ultrastructure of the semicyclic spermatogenesis in the South American freshwater characid *Hemigrammus marginatus* (Teleostei, Characiformes). *J. Appl. Ichthyol.*, 27: 1041-1046.
- Mansour, N., A.N. McNiven & G. Richardson. 2006. The effect of dietary supplementation with blueberry, atocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology*, 66(2): 373-382.
- Martínez-Espinosa, D., E. Durán, A.C. Erna, D. Hernández, A. Galván, R. Goletto, A. Martínez, A. Malpica, M. Morfin, J. Hernández & A. Hernández. 2009. Plan rector para la piscicultura de ornato del Estado de Morelos. SAGARPA, México, pp. 200-873.
- Massaeli, H., S. Sobrattee & G.N. Pierce. 1999. The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free. Radic. Biol. Med.*, 26: 1524-1530.
- Mattei, X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Can. J. Zool.*, 69: 3038-3055.
- Metwally, M.A.A. & I.M. Fouad. 2009. Effects of L-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Global Vet.*, 3(2): 132-136.
- Meyers, P.S. 2000. Papel del carotenoide astaxantina en la nutrición de las especies acuáticas. In: R. Civera-Cerecedo, C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie & L.E. Cruz-Suárez (eds.). *Avances en nutrición acuícola*. Memorias del IV Symposium Internacional de Nutrición Acuícola, 15-18 de noviembre, 1998. La Paz, B.C.S. México, pp. 473-491.
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 63: 141-146.
- Nishigaki, L., A. Dmitrovsky, W. Miki & K. Yagi. 1994. Suppressive effect of astaxanthin on lipid peroxidation induced rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 16: 161-166.
- Potts, P.J., T.M. Jefferies & J.J. Notarianni. 1999. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum. Reprod.*, 14: 2513-2516.

- Quantz, G. 1980. Über den Einfluss von carotenoidreichem trockenfutter auf die eibefruchtung der regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* R.). Arch. Fisch., 31: 29-40.
- Roberts, K.P. 1998. Y-chromosome deletions and male infertility: state of the art and clinical implications. J. Androl., 19: 255-259.
- Rodríguez, G.M. 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. A.G.T. Editor, México, pp. 53-61.
- Rurangwa, E., D.E. Kime, F. Ollevier & J.P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234: 1-28.
- Sánchez, A., L. Flores-Cotera, E. Langley, R. Martín, G. Maldonado & S. Sánchez. 1999. Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. Rev. Lat. Microbiol., 41: 175-191.
- Santana, O.C., C.M. Baicere-Silva, P. Gusmão-Pompiani, R.C. Bene & I. Quaguio-Grassiotto. 2013. An assessment approach for application of spermatid data in phylogenetic analyses: within the genus *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae). Acta Zool., 94: 335-354.
- Sargent, R.J., R.T. Douglas & J. Gordon. 2002. The lipids. In: J. Halver & W. Ronal (eds.). Fish nutrition. Academic Press, London, 181-257 pp.
- Sawanboonchun, J., J.W. Roy, A.D. Robertson & J. Gordon. 2008. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua* L.). Aquaculture, 283: 97-101.
- Schewender, J., M. Seemann, H.K. Lichtenthaler & M. Rohmer. 1996. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehydes 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. Biochem. J., 316: 73-80.
- Sönmez, M., G. Türk & A. Yüce. 2005. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. Theriogenology, 63: 2063-2072.
- Thompson, I., G. Choubert, D.F. Houlihan & C.J. Secombes. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquaculture, 133: 91-102.
- Walter, E.B. 2012. Early ontogeny of aquarium-raised *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Characiformes: Characidae). Ichthyol. Res., 59: 95-103.
- Yousef, I.M., A.G. Abdallag & K.I. Kamel. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Anim. Reprod. Sci., 76: 99-111.

Received: 3 April 2014; Accepted: 10 November 2014