

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos
Naturales



Carrera de Medicina Veterinaria

TEMA: *CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES DE TRUCHA ARCOIRIS
(Oncorhynchus mykiss) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA
REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA
UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI*

**TESIS DE GRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

AUTOR

Darwin Omar Anchacaisa Velasco

DIRECTORA DE TESIS

M.V.Z. Rafael Alfonso Garzón Jarrin

LATACUNGA – ECUADOR

2015

AUTORIA

Yo, Anchacaisa Velasco Darwin Omar, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo a la Universidad Técnica de Cotopaxi, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Darwin Omar Anchacaisa Velasco', written over a horizontal dotted line.

Darwin Omar Anchacaisa Velasco

AUTOR

AVAL DIRECTOR DE TESIS

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Directora de la Tesis con el Tema: “Criopreservación de embriones de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi” propuesto por el egresado **Anchacaisa Velasco Darwin Omar** con CI. 050325415-3. presento el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.



M.V.Z. Rafael Garzón Jarrin

Director (a) de Tesis

AVAL MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Miembros de tribunal de la Tesis con el Tema:

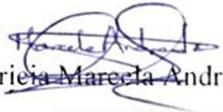
“Criopreservación de embriones de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi” propuesto por el egresado **Anchacaisa Velasco Darwin Omar**, presentamos el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.

Aprobado por:



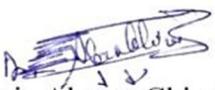
Dr. Miguel Angel Gutierrez Reinoso.

PRESIDENTE



Dra. Mg. Patricia Marcela Andrade Aulestia

OPOSITOR



Dr. Luis Alonso Chicaiza Sánchez

MIEMBRO

DEDICATORIA

El presente trabajo se la dedico a mi familia por el apoyo brindado desde los inicios de mi carrera, por su esfuerzo y lucha diaria a mi amada madre, con su motivación, hemos llegado a ser grandes.

Soledad

A mi padre por su interés de superación brindado y su apoyo, aunque ya no te encuentras aquí tú memoria, tus conejos y tus ideales siempre han sido una fuerza para seguir luchando.

José (+)

A mis hermanos que siempre están a mi lado, compañeros de desventuras y secretos, el apoyo siempre es y será mutuo hermanos,

Adriana, Cristian, Jostin, Monserath.

Darwin Omar Anchacaisa Velasco

AGRADECIMIENTO

A Dios, por guiarme hacia una de las profesiones más satisfactorias que podrían existir ayudando y contribuyendo hacia la sociedad en general.

A mi madrecita amada, por su cariño, comprensión, su apoyo y sobre todo su lucha incondicional, para la formación la formación profesional

A todos los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi, por compartir sus conocimientos en mi formación profesional así como su experiencia y sabiduría profesional y ética.

A los integrantes del Tribunal:

Doctor Miguel Gutiérrez.

Dra. Marcela Andrade

Doctor Alonso Chicaiza;

Quienes me ofrecieron su experiencia, colaboración y acierto profesional en la revisión de la tesis.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.



.....

Darwin Omar Anchacaisa Velasco

PRELIMINARES

Portada

Autoría.....	ii
Aval de la directora.....	iii
Aval de los miembros de tribunal.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Declaración expresa.....	vii
Índice de contenido.....	ix
Índice de figuras.....	xiii
Índice de cuadros.....	xiv
Índice de gráficos.....	xv
Índice de anexos.....	xvi
Índice de fotos.....	xvii
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xix
Aval de traducción.....	xx
Introducción.....	xxi

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I

1. REVISIÓN LITERARIA	29
1.1. La trucha arcoíris(Oncorhynchus mykiss) en ecuador	29
1.2. Origen	31
1.3. Morfología.....	31
1.4. Hábitat	32
1.5. Características anatómicas	33
1.5.1.Sistema tegumentario	33
1.5.2.Sistema muscular	33
1.5.3.Sistema respiratorio.....	33
1.5.4.Sistema circulatorio.....	34
1.5.5.Sistema digestivo	34
1.5.6.Sistema excretor.....	35
1.5.7.Sistema Reprodutor	36
1.6. Alimentación	36
1.7. Genética	36
1.8. Reproducción.....	37
1.8.1.Espermatozoides	37
1.8.2.Óvulos	38
1.8.3.Reproducción Artificial.....	39
1.8.4.Desove	39
1.9. Métodos para la extracción se las ovas	39
1.9.1.Método por comprensión manual	39
1.9.2.Método por inyección de aire	40
1.10.Fecundación artificial.....	40

1.10.1.Método seco.....	40
1.10.2.Método húmedo.....	40
1.10.3.Método mixto.....	41
1.10.4.Lavado De Ovas.....	41
1.10.5.Incubación.....	41
1.11.Desarrollo embrionario.....	41
1.11.1.Segmentación.....	41
1.11.2.Blastulación.....	42
1.11.3.Gastrulación.....	42
1.11.4.Embrionamiento.....	43
1.11.5.Eclosión del huevo.....	43
1.11.6.Alevinaje.....	43
1.12.Biotecnología aplicada a la acuicultura y criopreservación.....	44
1.12.1.Crioprotectores.....	46
1.12.2.Criopreservación de Embriones de Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	47

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
2.1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	49
2.1.1. Situación política.....	49
2.1.2. Situación geográfica.....	49
2.1.3. Datos meteorológicos.....	38
2.2 MATERIALES.....	38
2.2.1. Material Experimental.....	38
2.2.2. Materiales de campo.....	38

2.2.3. Materiales de laboratorio	38
2.2.4. Materiales de oficina	39
2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACION	40
2.3.1. Tipo de Investigación.	40
2.3.1.1. Investigación Exploratorio.....	40
2.3.1.2. Investigación descriptiva	40
2.3.2. Metodología	40
2.3.2.1. Investigación No Experimental.....	40
2.3.3. Métodos y técnicas	41
2.3.3.1. Método Deductivo.....	41
2.3.4. Análisis estadístico	41
2.4. Unidad de estudio.....	41
2.5. Manejo del Ensayo	41
2.5.1. Variables evaluadas.....	42
2.5.2. Protocolo para la obtención y crioconservación de embriones de Trucha arcoíris.....	43
2.5.2.1.Extracción y fertilización de ovas.	43
2.5.2.2. Aplicación del protocolo para crioconservación de embriones.	43
2.4.2.2.Descongelación de embriones.....	45
2.6. Diagrama de flujos de la crioconservación de embriones de Trucha Arcoíris	47

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	48
3.1. Número de Embriones crioconservados.....	48

3.2. Clasificación de Embriones	48
3.3. Viabilidad de Embriones pos descongelamiento.	51
4. CONCLUSIONES.....	58
5.RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadística productiva de la piscicultura de altura en Ecuador de acuerdo al censo trucha 2006-2007.....	30
Tabla 2. Frecuencia de la alimentación diaria para alevines.....	44
Tabla 3. Categoría de los embriones de trucha utilizados.....	48
Tabla 4. Morfología de estructuras intactas pos descongelación.....	51
Tabla 5. Estado de la membrana externa pos descongelación.....	52
Tabla 6. Color de embriones pos descongelación visto al microscopio.....	54
Tabla 7. Determinación de viabilidad porcentual de embriones al momento de la descongelación.....	56

ÍNICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°1. Rampa de desenso de tempereatura de usado para la crioconcepcion de embriones de trucha arcoiris.....	45
Gráfico N°2. Categoría de los embriones de trucha utilizados.....	49
Gráfico N°3. Representación de membranas pos descongelación de embriones (corion).....	52
Gráfico N°4. Representación de color de embriones pos descongelación.....	54
Gráfico N°5. Viabilidad al momento de la descongelación de embriones.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dimorfismo sexual en trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	32
Cuadro 2. Parámetros óptimos del agua para el desarrollo de la trucha arco iris..	37
Cuadro 3. Variables evaluadas	42

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Estadio de embriones seleccionados para criopreservar

ANEXO 2 Cambios posdescongelación de los embriones criopreservados

Foto N° 1 selección y captura de los reproductores

Foto N° 2 Transporte con oxígeno de los reproductores

Foto N° 3 Reproductores en las piscinas de reposo previo desove

Foto N° 4 Desove de las reproductoras

Foto N° 5 Ovas Fertilizadas

Foto N° 6 Preparación del Freezer Criobac

Foto N° 7 Embriones Seleccionados

Foto N° 8 Embriones en Solución Holding

Foto N° 9 Solución de ViGRO^R Holding (Bioniche).

Foto N° 10 Diluyente mantención ViGRO^R Ethylene Glycol Freeze Plus

Foto N° 11 Observación microscópica de los embriones seleccionados

Foto N° 12 Primer envasado para criopreservación de Embriones

Foto N° 13 Inicio del descenso de temperatura de las pajillas

Foto N° 14 Descongelación de los embriones

Foto N° 15 Descongelación e hidratación de Embriones

Foto N° 16 Embriones descongelados tipo A optima

Foto N° 17 Embriones descongelados con corion dañado por el frío tipos C y D

Foto N° 18 Observación de embriones descongelados

Foto N°19 Embrión descongelado tipo D visto microscópicamente

Foto N° 20 Embrión descongelado tipo B

Foto N° 21 Revisión de Embriones descongelados

Foto N° 22 Embrión descongelado Tipo C

Foto N°23 Embrión descongelado Tipo B estructura semiintacta

Foto N° 24 Embriones Descongelados tipo B

Foto N° 25 Embrión descongelado tipo D Daño total por la Temperatura

Foto N° 26 Embriones Tipo A vistos microscópicamente calidad optima

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la criopreservación de embriones de Trucha Arcoíris, aplicando un protocolo a base de 1.5 M de etilenglicol y 0.1 M de sacarosa como crioprotectores, ViGRO^R Ethylene Glycol Freeze Plus with Sucrose, se utilizaron embriones en estadio de blastocisto tras ocho horas pos fertilización, de calidad A y posteriormente evaluamos la morfología presentada posdescongelación categorizándola de acuerdo a los resultados obtenidos. Aplicamos la investigación no experimental con estadística descriptiva para describir el protocolo sin alterar las variables. De esta especie utilizamos 2 hembras y 2 machos, fueron fertilizadas las ovas, categorizarlas y finalmente clasificar y utilizar las de calidad “A” por mantener una estructura completa e intacta. Con 8 horas posteriores, en el laboratorio fueron clasificados de acuerdo a su estructura, utilizando las ovas de calidad A, seguidamente se mantuvo los embriones seleccionados en una plancha térmica a una temperatura de 23°C en solución Holding de mantenimiento. Luego se los embriones de la solución anterior para colocarlos en la solución de 1.5 molar de etilenglicol con 0.1 M de sacarosa, se envasaron los embriones en vainas para inseminar bovinos, siguiendo el procedimiento estándar de envasado de embriones con etilenglicol y dejando espacios de aire a los extremos. Se empezó el proceso de descenso de temperatura estabilizando la misma a -7°C, luego el seeding y el descenso de temperatura de -0.7°C por minuto hasta llegar a los -33 donde luego fueron depositados en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C. Se realizó la descongelación para analizar y evaluar su estructura posdescongelación, encontrando embriones N° 1, 2, 4 y 6, en Tipo A morfología intacta; embrión N° 8, Tipo B morfología buena; embriones N° 3,7, embriones Tipo C morfología regular, embrión N° 5, Tipo D morfología nula, deterioro por efecto del frío.

PALABRAS CLAVE: Embrión, Etilenglicol, Seeding, Trucha.

ABSTRACT

The following research was conducted in order to evaluate the cryopreservation of Rainbow Trout embryos, for this research was applied a protocol based on 1.5 M ethylene and 0.1 M of saccharose as cryoprotectants, ViGROR Ethylene Glycol Freeze Plus with Sucrose. Embryos with quality A in a blastocyst stage after eight hours post fertilization were used and subsequently we evaluate the morphology post thawing presented, then the procedure of categorization according to the results was performed. It was applied non experimental investigation with descriptive statistics to describe the protocol without altering variables. Two females and two males from Rainbow Trout specie were used, after that, the trout eggs were fertilized and finally, these were classified in order to use the fertilized eggs with quality “A” to keep a complete and intact structure. Eight hours after, the fertilized eggs were classified according to the structure, using quality “A” eggs, then the selected embryos were maintained on a thermal iron with a temperature of 23 °C in a Holding maintenance solution. Then the embryos were taken from the previous solution to be collocated in a solution of 1.5 molar of ethylene with 0.1 M of saccharose, the embryos were packaged in insemination sheaths according to the standard procedure of packaging embryos with ethylene as well as spaces with air at the top and the bottom were left. Later, the process of temperature decrease was started as well as the stabilization of it to -7°C, after that the seeding and the temperature decrease to -0.7°C per minute up to -33, at that period of time the selected fertilized eggs were deposited in a tank with liquid nitrogen with a temperature of – 196°C. Afterwards, the thawing of fertilized eggs was performed to analyze and evaluate it structure post thawing, the results were: embryos N° 1, 2, 4 and 6, Type A, presented an intact morphology; embryo N° 8, Type B, presented a good morphology; embryos N° 3, 7, Type C presented a regular morphology; embryo N°5, Type D, presented a null morphology, it was deteriorated as a result of the cold.

KEY WORDS: Embryo, Ethylene Glycol, Seeding, Trout

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de docente del idioma de inglés del Centro de Cultura de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal certifico que: la traducción del resumen de tesis al idioma de inglés presentado por el egresado de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; **ANCHACAISA VELASCO DARWIN OMAR** cuyo título versa ***“CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES DE TRUCHA ARCOIRIS (Oncorhynchus mykiss) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI”*** lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimara conveniente

Latacunga, 10 de marzo de 2015

Atentamente.



Lic. MSc. Marcia Janeth Chiluisa Chiluisa

DOCENTE CENTRO CULTURAL IDIOMAS

CI: 0502214307

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial y local las explotaciones de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) ocupa una demanda sustentable siendo está ocupada para la pesca deportiva, la acuicultura y obviamente para la alimentación. Según el censo 2006 elaborado por el Centro de Investigaciones Acuícolas (CENIAC), sostiene que el Ecuador cuenta con un total de 213 criaderos y con una producción promedio de 982.3 toneladas al año de trucha arcoíris. La reproducción y transporte de material genético está limitada a la manipulación humana, siendo la forma de embriones frescos la más aceptada y riesgosa por la pérdida de material genético por el mismo tiempo al no existir una manera óptima de transportar ovas y embriones.

En la presente formulamos de forma más precisa problema de investigación, dado que se carece de información suficiente y de conocimiento previos del objeto de estudio, resulta lógico que la formulación inicial del problema es imprecisa. En este caso la exploración permitió obtener nuevo datos y elementos que pueden conducir a formular con mayor precisión las preguntas de investigación.

A más del trabajo de Robles en el 2007, microinyectando proteínas anticongelantes en embriones de peces para hacerlos resistentes al frío no se tiene más referencias de ensayos exitosas, dado que dicha investigación culminó con el deterioro del corion por daños estructurales mecánicos al microinyectar, por ende la crioconservación de embriones de peces, ha sido un objetivo aun no alcanzado hasta el momento. Tomando en cuenta estas deficiencias, así como la falta de referencias en el tema se planteó un protocolo apropiado que nos lleve al éxito y la realización de información para investigaciones posteriores.

En el Capítulo I incluiremos todo sobre referencias bibliográficas de esta investigación. En el capítulo II detallamos la ubicación geográfica en donde se realizó el estudio, los materiales utilizados para su ejecución, la metodología y los pasos empleados para el desarrollo del experimento. En el capítulo III expondremos los resultados obtenidos en el proceso de la investigación, así como la discusión sobre dichos resultados y sus respectivas representaciones gráficas.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la crioconservación de embriones de trucha (*Oncorhynchus mikyss*)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar un protocolo de crioconservación de embriones de trucha arcoíris a base de concentrados de etilenglicol, y sacarosa como crioprotectores.
- Utilizar embriones en estadio blastocisto, ocho horas posfertilización, de calidad óptima, calidad A, para la crioconservación de embriones de trucha.
- Evaluar la morfología presentada en embriones de trucha arcoíris posdescongelación y categorizarlas.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA

- Mediante la aplicación de un protocolo para crioconservación de embriones de trucha arcoíris es posible mantenerlos viables posdescongelación.

HIPÓTESIS NULA

- Mediante la aplicación de un protocolo de crioconservación de embriones de trucha arcoíris no es posible mantenerlos viables posdescongelación

CAPÍTULO I

1. REVISIÓN LITERARIA.

En el presente capítulo se tratarán las principales características anatómicas, fisiológicas, alimentación, reproducción en trucha arcoíris, y finalmente el tema relacionado con la crioconservación de embriones de trucha arcoíris.

1.1. La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Ecuador.

La trucha arco iris es una especie utilizada en actividades de acuicultura en todo el mundo, por su facilidad de adaptarse a zonas de agua fría. El Ecuador por sus condiciones climáticas y de altura optó, décadas atrás (1930), por la construcción de salas de incubación y alevinaje en las provincias de Imbabura, Cotopaxi y Azuay, la introducción de ovas embrionadas de trucha sirvió para poblar los ríos y lagunas de la Región Interandina (16).

En 1993, el Gobierno del Japón otorgó al Ecuador un préstamo no reembolsable que permitió la construcción del Centro de Investigaciones Acuícolas (CENIAC), ubicado en Papallacta, Provincia de Napo, que se inauguró en 1996. Las actividades del centro se enfocaron principalmente en la producción de huevos y alevines de trucha, investigación y capacitación, todas tendientes al fomento y desarrollo de la piscicultura. En 1998, el CENIAC-P se constituyó en un soporte significativo de la difusión de truchicultura en el país. Por razones logísticas pasó a depender del Ministerio de Comercio Exterior Industrialización Pesca y Competitividad (MICIP) 1 (16).

En el 2006, el CENIAC-P, realizó el Primer Censo Piscícola de Producción de Trucha en las Zonas Norte, Centro y Sur de la Región Interandina, mediante

visitas, entrevistas y aplicación de cuestionarios a los propietarios y empleados de los criaderos por parte de los técnicos del centro. El principal objetivo del censo fue obtener una base de datos que sirva para hacer proyección de mercado e identificar necesidades del sector piscícola. Además conocer problemas relevantes en relación a genética, asistencia técnica, capacitación, producción, financiamiento y mercado (15).

TABLA 1. ESTADÍSTICA PRODUCTIVA DE LA PISCICULTURA DE ALTURA EN ECUADOR DE ACUERDO AL CENSO TRUCHA 2006-2007

Provincia	Criaderos	Vol. Producción. M3	Producción ton/año	%	Técnicos	Operarios
Azuay	47	11.999	190	19	7	82
Bolívar	25	1.811	38	4	1	51
Cañar	13	3.275	45	5	6	32
Carchi	10	5.830	35,7	4	2	16
Chimborazo	18	5.934	64,4	7	2	35
Cotopaxi	7	1.152	22,8	2	1	9
Imbabura	11	1.805	30,7	3	4	12
Loja	11	1.550	17	2	3	13
Napo	19	5.482	94,2	10	4	39
Pichincha	26	13.374	332,7	33	15	66
Sucumbíos	6	1.918	18,9	2	1	12
Tungurahua	20	4.746	92,9	9	1	39
Total	213	58.876	982,3	100	47	406

Fuente: Revista ACUIESPE, IDROVO R, 2008

1.2.Origen.

La trucha arco iris es originaria de las Costas del Pacífico de América del Norte, cubriendo una región que va desde Alaska hasta México. Desde 1874 ha sido introducida en casi todos los sistemas acuáticos del mundo excepto la Antártica. En 1950 la industria pesquera apostó por la producción de trucha desarrollándose una verdadera cultura de cultivo y domesticación en especial en muchos países tropicales y subtropicales de Asia, África Oriental y Sudamérica (9).

La trucha arco iris fue introducida a Sudamérica desde los Estados Unidos. A fines del siglo pasado fue introducida por primera vez en los países sureños sin éxito; posteriormente, en varias oportunidades a partir de 1904, fue llevada a Chile en forma de huevos embrionados, desde donde fue sembrada en muchos ambientes del resto del continente. En la actualidad ha sido introducida en casi todos los ambientes propicios del mundo (16).

El nombre de la trucha “arco iris” tiene su origen en el color de una franja rojiza sobre la línea lateral del cuerpo, esta franja de coloración es notable, especialmente en los machos en la época de desove y la presencia de un sin número de escamas iridiscentes (16).

1.3.Morfología.

La trucha arco iris es un pez de tamaño grande y vientre redondeado, con el cuerpo cubierto por numerosas escamas pequeñas. Es alargado y fusiforme, de complexión aerodinámica para poder habitar en ríos y lagunas. Posee una aleta dorsal, adiposa, caudal, anal, ventral y pectoral. Puede llegar a medir hasta 65 cm. y llegar a pesar 12 Kg. (16).

CUADRO 1. DIMORFISMO SEXUAL EN TRUCHA ARCO IRIS
(*Oncorhynchus mykiss*)

	MACHO	HERMBRA
Boca y mandíbula	Grande y puntiaguda	Pequeña y redondeada
Dientes	Agudos	No muy agudos
Musculatura	Dura	No muy agudo
Abdomen	Duro	Más blanda
Poros genitales	No prominente	Prominente
Poros genitales	No prominente	Prominente
Color nupcial	Muy negruzco	Norman
Ancho del cuerpo	Angosto	Ancha
Forma de cuerpo	Delgada	Redondeada

Fuente: Manual de Manejo y Crianza de Trucha arco iris, IMAKI A, 2003

1.4.Hábitat.

De manera que las truchas son peces nativos de regiones elevadas y montañosas donde existen aguas frías y claras, siendo en general la Sierra Norte una región apropiada para el cultivo de este pez, puesto que cuenta con aguas cristalinas y bien oxigenadas (6).

La trucha arco iris muestra una mayor docilidad a la cautividad, tolerancia y adaptación social a la alta densidad poblacional, con comportamientos menos agresivos que la trucha común. Tiene un amplio margen de adaptación a temperaturas de las aguas y a las diversas condiciones ambientales de los recintos artificiales donde se encuentra confinada, acudiendo con gran avidez a la distribución del alimento. (5),

1.5. Características anatómicas.

1.5.1. Sistema tegumentario.

La piel es el revestimiento, en caso de peces cubierto por escamas, lo cual en la trucha arcoíris se distingue generalmente por sus manchas más pequeñas, escamas de menor tamaño, moteado más abundante de la cola, aletas y línea iridiscente en la parte inferior de cada lado que se evidencia con determinadas luces (21),

La epidermis tiene la función de mantener separados el agua exterior de los líquidos tisulares, posee pequeñas glándulas y células caliciformes, dichas glándulas secretan un moco viscoso que reviste al pez con un líquido resbaladizo protector y anti infeccioso. Debajo de la epidermis se hallan las escamas donde se desarrollan en la fase alevina a medida que crece el pez crecen las escamas mas no el numero en la época de fresa (época donde las hembras empiezan a desovar). Sobre las escamas se hallan células pigmentadas (Melanóforos o cromatóforos o células oscuras que producen la coloración característica del pez). Cuando un pez se debilita por enfermedad, adquiere con frecuencia un color más oscuro (21; 13; 14).

1.5.2. Sistema muscular.

Los principales músculos se encuentran en serie de bloques, esta disposición determina una considerable fuerza de impulsión, estos paquetes o bloques se fijan directamente a la columna vertebral haciéndolo más flexible (21).

1.5.3. Sistema respiratorio.

Los peces respiran mediante branquias, un sistema de cuatro series de tubos muy finos a ambos lados de la garganta, al atravesar las branquias, la sangre cede CO₂ al agua y obtiene oxígeno de ella, por medio de la pared branquial (laminillas branquiales), estas laminillas deben ser muy finas para que el O₂ y el CO₂ puedan intercambiarse con facilidad, también contienen células productoras de moco, las branquias son muy vulnerables a las injurias causadas por el agua (21).

Las branquias tienen un área de contacto con el medio acuático muy extenso, hasta diez veces el resto del cuerpo (14).

Posee cinco pares de arcos branquiales, pero solo los cuatro primeros poseen filamentos, del borde externo convexo de cada arco branquial se originan dos hemibranquias, de las cuales se desprenden los filamentos y a ambos lados de cada filamento se originan las lamelas que le dan a cada filamento la apariencia de un pino. En el lado interno cóncavo del arco branquial, la superficie que da hacia la faringe del pez, posee prolongaciones a manera de espinas, que representan una especie de filtro que protege las lamelas branquiales del alimento o del detritus acuático. (14).

1.5.4. Sistema circulatorio.

El corazón posee cuatro cámaras, la cual bombea sangre al ventrículo triangular, que proporciona la presión suficiente para irrigar al interior del cono arterioso y a su vez difundirlo por todo el organismo. El corazón filtra la sangre por las branquias por medio de oleadas que a su vez se distribuyen al resto del organismo para proporcionar O₂ a los tejidos (21).

1.5.5. Sistema digestivo.

Se inicia por la boca posee dientes para capturar sus alimentos mas no para la masticación, una vez ingerido el alimento desciende por el esófago hasta el estómago (órgano en forma de u) que puede dilatarse fuertemente para contener grandes cantidades de alimentos, en el estómago el alimento se descompone mediante la cocción del ácido y las enzimas digestivas, posteriormente , es triturada por los músculos de su pared entre la porción posterior del estómago y del intestino delgado se presenta un grupo de sacos ciegos, que generalmente se hallan en un número de treinta a ochenta los cuales están cubierto por tejido adiposo blanco. Las enzimas desdoblan el alimento en azúcar, grasas y aminoácidos atravesando después la pared intestinal hasta llegar a la corriente sanguínea por medio del hígado, los alimentos restantes (fibra, cáscara), se van al intestino grueso y son posteriormente evacuados con las heces (21). Microscópicamente el epitelio del estómago es estratificado cuboidal o columnar

10 y puede ser ciliado, con muchas células caliciformes. Se pueden encontrar glándulas multicelulares serosas o cardiales (14).

Existen dos glándulas anexas asociadas a este sistema, una de ellas es el páncreas, órgano difuso a manera de fragmentos que circunda la grasa que rodea a los ciegos pilóricos, su principal función es la producción de enzimas e insulina que controla el metabolismo del azúcar del pez, este órgano es importante en las enfermedades víricas ya que es el lugar más importante de replicación de los virus más comunes en salmónidos (14).

En cuanto al hígado, está situado delante del estómago, es de color pardo-rojizo, blando y friable, cumple la función del metabolismo alimenticio ya que permite que moléculas del alimento, llevados a la sangre desde el intestino sean transformados en proteínas, grasas y carbohidratos (21).

Microscópicamente el hígado es similar al de los otros vertebrados, es una glándula retículo-tubular cubierta por una membrana serosa. Los hepatocitos son células poligonales con núcleos esféricos, en peces comunes contienen cantidades considerables de lípidos y glucógeno (12).

1.5.6. Sistema excretor.

El riñón filtra la sangre por el glomérulo y lo conduce a través de los conductos del uréter desembocando en la vejiga. En los peces la mayor parte de los desechos nitrogenados son eliminados por el riñón, además de la función de osmoregulación que cumple también con las branquias (14) el riñón de los salmónidos es un órgano largo de coloración negra, se extiende desde la parte posterior de la cabeza hasta el ano. En el riñón craneal se encuentra el tejido hematopoyético y algunos túbulos renales, a nivel caudal, se encuentra en mayor parte de las estructuras excretoras propias del órgano: las nefronas, cada nefrona se compone de una corpúsculo renal o glomérulo y de un sistema tubular, en esta región es muy escaso el tejido hematopoyético (13).

1.5.7. Sistema Reproductor.

Los órganos de los salmónidos consiste en ovarios para las hembras y testículos para los machos, el ovario se compone de células germinales el cual crece hasta el tamaño de un guisante. En la época de la fresa, la piel tanto del macho como de la hembra se engrosa, se hace más brillante y también se hincha la abertura urogenital, haciendo que los huevos sean expulsados al agua donde son esperados por el semen (producido por los testículos), formando una nube de células espermáticas vivas produciéndose la fertilización (14).

1.6. Alimentación.

En el ambiente natural la trucha se alimenta de insectos, moluscos, crustáceos, huevos de peces incluso peces más pequeños. El alimento más importante y quien le confiere la coloración rosada en la carne por contener pigmentos carotenoides como astaxantina, es el camaroncillo de río o Gammarus. Cuando se encuentran en estanques, se alimenta de balanceado con un alto grado de proteína animal (16).

1.7. Genética.

Actualmente, 1700 especies de peces han sido caracterizadas a nivel citogenético aunque sólo un 10% de ellas poseen cromosomas sexuales claramente diferenciados, la trucha arco iris tiene entre 58 y 64 cromosomas, con un tamaño de genoma de 2.4×10^9 pb (24). *Oncorhynchus mykiss* posee cuatro grupos de cromosomas más el par sexual, distribuidos en: Grupo A: 7 pares de cromosomas metacéntricos grandes Grupo B: 7 pares de cromosomas submetacéntricos grandes Grupo C: 8 pares de cromosomas metacéntricos medianos Grupo D: 7 pares de cromosomas telocéntricos Par sexual: XY (19)

**CUADRO 2 PARÁMETROS ÓPTIMOS DEL AGUA PARA EL
DESARROLLO DE LA TRUCHA ARCO IRIS**

Temperatura	De 7.2 a 17.0 °C para crecimiento De 7.2 a 12.8 °C para reproducción he incubación.
Oxígeno disuelto	Mayor a 5 mg/l
pH	6.7 a 9.0
Dióxido de carbono	Menor a 2 mg/l
Calcio	Mayor a 52 mg/l
Zinc	Menor a 0.04mg/l a pH de 7.6
Amonio	Menor a 0.012 mg/l como NH ₃ z
Nitrito	Menor a 0.55 mg/l
Nitrógeno	Menor a 110 % de saturación total
Sólidos suspendidos	Menor a 80 mg/l
Sólidos disueltos	Menor a 400 mg/l
Ácido sulfhídrico	Menor a 0.002mg/l

FUENTE: Guía para el cultivo de trucha, CAMACHO B ET AL., 2000

1.8.Reproducción.

Los machos de la trucha arco iris siempre son de mayor tamaño y durante la etapa de reproducción suelen desarrollar dimorfismo sexual, la trucha tiene un ciclo reproductor anual, siendo una condición indispensable que el macho y la hembra sean adultos y sexualmente maduros. Los machos pueden adquirir la madurez sexual a los 15 o 18 meses, mientras que en las hembras es un poco más tardado, ya que necesitan un mínimo de dos años (9).

1.8.1. Espermatozoides.

En los machos al llegar a su madurez se presentan dos fases del ciclo testicular, espermatogénesis y espermiación, la primera que consiste en la formación de células sexuales o espermatozoos y la segunda representada por la liberación de

las células desde los testículos, bien sea por un proceso normal o por reabsorción intratesticular (4).

La estructura de los espermatozoides de los salmónidos difiere de los mamíferos. Ellos carecen de acrosoma, parte anterior de la cabeza, el cual hace contacto con el huevo libera lisina para disolver localmente la membrana del huevo favoreciendo la penetración y fertilización. El huevo de los salmónidos está rodeado por un corion particularmente fuerte, pero puede ser penetrado vía micrópilo, poro a través del cual los espermatozoos nadan hasta alcanzar la membrana más delicada del huevo (Cohen, 1977). 25), indica que el semen de los salmónidos y de muchos otros animales es inmóvil dentro del testículo y en el semen no diluido, la actividad solo se inicia por dilución con agua, solución salina o fluido ovárico, además señalan que el semen de las truchas presenta una alta concentración, (9 millones espermatozoides / mm³). La calidad del semen (motilidad y concentración) está influenciada por el contenido de ácido ascórbico en la dieta, una deficiencia reduce tanto la concentración como la movilidad de los espermatozoos, afectando la fertilidad de la trucha arco iris (8).

1.8.2. Óvulos.

Al llegar la maduración de los óvulos, la envoltura que los rodea (estrato folicular) se desgarra, permitiendo la salida de las ovas hacia la cavidad abdominal, se puede decir que ha llegado al estado denominado ovulación donde los gametos pueden ser fecundados. El fenómeno por el cual se expulsa las ovas maduras fuera del cuerpo se denomina el desove (16).

Los óvulos de trucha arco iris mejor conocidas como ovas tienen un peso de 0,06-0,07 g y un diámetro de 4-6 mm. Su estructura es la siguiente; una membrana externa llamada corion, el citoplasma con una cantidad importante de deutoplasma o vitelo que constituye el material nutritivo y el núcleo que almacena la información genética. En un análisis microscópico, se encuentra un micrópilo que es una abertura apropiada para el ingreso del espermatozoide en el momento de la fecundación. De acuerdo a la cantidad de vitelo y su disposición, los óvulos de los salmónidos pertenecen a los telolecitos es decir que todo su material nutritivo está localizado en un polo (16).

1.8.3. Reproducción Artificial.

La reproducción artificial de la trucha arco iris, bajo condiciones de cultivo, involucra un conjunto de áreas técnicas que conducen a la producción de ovas y alevines. Es importante que para que exista un buen manejo productivo se tenga un previo conocimiento de las bases biológicas que sustentan el proceso reproductivo. Entre los aspectos biológicos más destacados tenemos: los aspectos genéticos, relacionados con la conservación de líneas genéticas; y los aspectos fisiológicos relacionados con el conocimiento del ciclo reproductivo. Entre los aspectos técnicos podemos hablar de una correcta selección de reproductores, manejo de gametos para la fecundación, bioseguridad, control de alimento y control de parámetros del agua. Es necesario destacar que la obtención de ovas y semen de excelente calidad dependerá de un riguroso proceso de manejo de los reproductores cuyo proceso iniciará meses incluso años atrás (14).

Al término de la ovulación, las ovas que no fueron expulsadas se convierten en sobre-maduras y con una capacidad de fecundación nula. Éstas ovas son fácilmente reconocidas por la presencia de una vesícula liposa (gotitas de aceite) en la parte superior (16).

1.8.4. Desove.

Los reproductores a ser desovados deben estar libres de deformidades, y tener un color plateado en la piel, la trucha es seleccionada como reproductora, tres años después de la primera alimentación. Un año antes de la selección de los reproductores, los peces con apariencia de madurez, es decir, color café, o con deformidades o con crecimiento lento (bajo peso), son cosechados, en la selección final de los reproductores, se consideran solamente truchas plateadas de forma esbelta (1).

1.9. Métodos para la extracción de las ovas.

1.9.1. Método por comprensión manual.

Los reproductores son anestesiados para evitar el estrés en el momento del desove, se acostumbra usar anestésicos de origen natural para no afectar la salud

posterior de los animales, el sedante más indicado es el aceite de clavo de olor cuyo principio activo es el compuesto conocido como eugenol, el cual adormece lentamente a los animales y disminuye su excitación nerviosa (19).

Se conocen dos métodos de desove, bipersonal y unipersonal, el primer método es efectuado por dos personas quienes sostienen a la trucha hembra por la región cefálica y la región caudal, de inmediato se procede a la aplicación de los masajes abdominales para que las ovas descendan verticalmente. Para el segundo método, se cuenta con un soporte de extracción de ovas, la trucha es colocada en posición inclinada en el apoyo del soporte de manera que su cuerpo quede arqueado y su tronco hacia atrás, con movimientos repetitivos en el abdomen y de arriba hacia abajo se van removiendo las ovas de la cavidad abdominal (16).

1.9.2. Método por inyección de aire.

El tradicional sistema de fecundación mediante el exprimido se sustituye ahora en los países transoceánicos por la introducción en la cavidad abdominal de aire, que presionando uniformemente de los huevos maduros. Se opera inyectando el aire mediante una aguja hipodérmica, unida a una bomba manual, que hará la presión necesaria y terminada la operación se aspira el aire precedentemente inyectado. (9)

1.10. Fecundación artificial.

Es la unión del espermatozoide y el ovulo en forma artificial existe técnicas y métodos para realizarlo

1.10.1. Método seco.

Se reciben los óvulos de 2 o 3 hembras en una coladera dejando drenar los líquidos, para luego transportarlos a una taza y agregarle el semen de un macho, se mezclan suavemente con una pluma de ave limpia por 1 minuto, se reposa y se lavan (14).

1.10.2. Método húmedo.

Se desova 2 a 3 truchas hembras en un depósito, luego el semen de un macho, se mezcla con una pluma limpia se reposa 1' y se lava, la desventaja que ofrece este método es que el micrópilo se cierra y también la pérdida de movilidad (14)

1.10.3. Método mixto.

Los huevos de 2 hembras se reciben en un colador, para que drenen y se laven con una solución isotónica al 1%, luego son trasladados a un depósito, y se agrega semen de un macho y con una pluma de ave limpia se homogeniza con movimientos suaves y concéntricos se dé reposar de 10 a 20 ' para que se hidrate el huevo (endurecimiento) después que haya sido fertilizado, este último método es el más utilizado por su mayor tasa de fecundación (14).

1.10.4. Lavado De Ovas.

Después de haber fertilizado las ovas, y haberse hidratado por unos 15 a 20 minutos se procede al lavado de las ovas. Hasta quitar todo residuo de líquido espermático, y residuos de ovas.

1.10.5. Incubación.

La duración de la incubación es inversamente proporcional a la temperatura media del agua. El período embrionario se confirma con la presencia de dos puntos negruzcos en el interior de la ova observables a simple vista. Las ovas embrionadas adquieren mayor resistencia contra los choques y vibraciones. Se conoce con el nombre de acumulación de temperatura al producto que se obtiene por la multiplicación de la temperatura media diaria del agua³ por el número de días requeridos para la incubación, y se expresa en grados acumulados. Se puede definir también como la cantidad de temperatura que requiere un ser viviente para su desarrollo en un tiempo determinado (16).

1.11. Desarrollo embrionario.

El desarrollo embrionario en los peces puede dividirse en tres fases: segmentación, gastrulación y embrionamiento (5).

1.11.1. Segmentación.

Es una serie de divisiones mitóticas que no están acompañadas por crecimiento celular. De acuerdo a las distintas clasificaciones los peces poseen una segmentación holoblástica desigual debido a que el vitelo está acumulado en el

polo vegetativo y cuando ocurre la división se hace por la zona de menor resistencia. Se forman 8 blastómeros desiguales (5).

1.11.2. Blastulación.

La segmentación morular produce una masa de células llamada blástula, sin aumento del tamaño, simplemente hay más células pero son más pequeñas, lo que sí aumenta en gran número es el material genético. Las células se disponen alrededor de una cavidad llena de fluido llamada blastocele excéntrico es decir ubicado hacia el polo (9).

1.11.3. Gastrulación.

El proceso de gastrulación implica un crecimiento embrionario, aumentando el tamaño. También hay una reorganización celular que lleva a la aparición de las capas germinales. Ahora aparecen dos de estas capas, el endodermo y el ectodermo. En los peces se origina una gastrulación por epibolia en donde la capa de células exterior (micrómeros) serán el ectodermo y las células internas (macrómeros) serán el endodermo. Tienen un pequeño arquéteron y un blastoporo pero desaparece el blastocele. Los micrómeros se unen en el polo vegetativo, las capas germinales son las mismas pero no hay ni blastocele ni arquéteron. El animal tendrá tubo digestivo completo pero se formará en etapas más tardías (9).

Según Bustos *et al.*, (2005) “durante este proceso se evidencia el engrosamiento del escudo embrional. El escudo embrional es una masa de células en forma de campana que prolifera hacia dentro desde el margen del blastodisco, formando el eje del embrión. Adicionalmente, se hace evidente una pigmentación puntiforme y uniforme sobre el vitelo”.

En trucha arco iris, desde el día tres hasta el diecisiete de incubación, las ovas son sumamente frágiles. Esta situación se debe a la diferenciación del blastodermo en sus tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo), a la formación del blastoporo y en definitiva, en aquellos estadios en que tiene lugar la organogénesis. A partir del cierre del blastoporo, el embrión va adquiriendo

progresivamente un aspecto cada vez más parecido a un pez, hasta el momento de la eclosión, que vuelve a ser una situación crítica (5).

1.11.4. Embrionamiento.

Una vez formadas las capas germinales, darán inicio a la formación de los diferentes tejidos, órganos y aparatos que en su conjunto constituirán un embrión completo. De esta forma tenemos:

- **Ectodermo:** cubierta exterior del cuerpo, tubo neural, nervios motores, ganglios simpáticos, cráneo, arcos branquiales. (5)
- **Endodermo:** tubo digestivo primitivo, epitelio del tracto respiratorio, faringe, tiroides, hígado, páncreas (5).
- **Mesodermo:** órganos internos, riñón, gónadas, sistema circulatorio, sangre, músculo esquelético, hueso y cartílago del esqueleto (9).

1.11.5. Eclosión del huevo.

La finalización de la etapa embrionaria tiene lugar por eclosión del huevo. El individuo que nace es conocido como alevín o larva, cuya morfología difiere del adulto y carece de madurez sexual (16).

Los alevines al eclosionar, poseen una longitud de 14 a 16 mm y un peso de 0,08 a 1,12 g. Durante esta etapa son delicados, siendo apenas móviles. Tienen un saco vitelino (reserva nutricional), necesario para su crecimiento (16).

1.11.6. Alevinaje.

El primer alevinaje comprende desde el nacimiento hasta la primera alimentación. Este período dura de 12 a 14 días, tiempo en el cual se mantienen alejados de la luz. Al empezar a nadar libremente es necesario alimentarlos en forma inmediata, en pocas cantidades y con mucha frecuencia, el alimento debe poseer un alto contenido proteínico. Según Leitritz (1980) en sus tablas muestran las tasas de alimento diario según la temperatura del agua y el peso de los peces (17).

TABLA 2. FRECUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN DIARIA PARA ALEVINES

Peso corporal (g)	<i>Frecuencia de alimentación (veces/día)</i>
0.2-0.3	8-10
0.5	6
1	4
9	3-4

Fuente: La trucha: cría industrial, BLANCO M, 1995.

1.12. Biotecnología aplicada a la acuicultura y criopreservación.

La Biotecnología como una ciencia multidisciplinaria que se centra en el uso práctico de las células biológicas y los componentes celulares. (8).

Cuando una solución es enfriada por debajo de su punto de congelación, inicialmente es “superenfriada”, es decir, que permanece en estado líquido a una temperatura inferior a la temperatura real de congelación. Esta es una situación inestable, y a medida que la temperatura desciende incrementa la probabilidad de que ocurra el denominado proceso de nucleación donde comienzan a formarse cristales de hielo. En una solución, el agua pura es lo primero en congelarse, de modo que la solución se hace cada vez más concentrada a medida que el agua pura se congela, alcanzando valores de osmolaridad 20 veces superiores cuando la solución se encuentra a -40 °C. Por debajo de esa temperatura, la solución solidifica totalmente (18).

Cuando la solución contiene una suspensión celular, tiene lugar el denominado “efecto solución”, es decir a medida que avanza el proceso de cristalización, se produce una salida de agua del interior celular debido al incremento de la osmolaridad del medio extracelular (18).

Si el enfriamiento es lo suficientemente lento, la célula se deshidrata totalmente antes de que se produzca la solidificación total del medio externo, evitando la

formación de cristales de hielo en el interior celular. Si esto no ocurre, es muy probable que la célula muera en el proceso (27).

La iniciación del crecimiento de los cristales de hielo es un punto muy importante a tener en cuenta, y difícilmente controlable, que tiene lugar tanto en el proceso de enfriamiento como durante la descongelación, momento en el cual se forma el hielo intracelular. La formación de hielo requiere una ordenación específica de las partículas en solución, de modo que los cristales tienden a crecer a partir de los centros de nucleación, que pueden ser otros materiales cristalinos, partículas sólidas o incluso las propias células de la suspensión (9).

En algunos casos especializados, la criopreservación se ha intentado en condiciones donde la formación de cristales de hielo sea muy limitada o inhibida por completo, produciendo la formación de un estado vítreo en el medio extracelular e intracelular a muy bajas temperaturas, formando una estructura estable, sin formación de hielo (Rall y Fahy, 1985).

Este proceso es conocido como vitrificación, y requiere una combinación de aditivos específicos (crioprotectores) así como un intensivo control de proceso de congelación/descongelación (9).

Este proceso implica la transformación de una solución acuosa en un sólido amorfo de aspecto vítreo donde no se forman cristales de hielo, debido a un drástico aumento en la viscosidad durante la congelación (26). Para que esto ocurra son necesarias altas concentraciones de crioprotectores (superiores a 6M), y velocidades de congelación relativamente rápidas (1000-2000 °C/min) (27).

Normalmente se utilizan combinaciones de varios de estos crioprotectores, ya que así se reduce la concentración final de cada uno de ellos disminuyendo su potencial toxicidad. Otra de las ventajas de este proceso, además de evitar la formación de cristales de hielo, es que la congelación se produce tan rápidamente que las células u órganos criopreservados apenas están expuestos al efecto solución, por lo que se reducen los daños producidos por la deshidratación (27).

A lo largo del proceso de descongelación (normalmente también rápido), tampoco se forman cristales de hielo y la célula es devuelta a temperatura ambiente sin sufrir los daños que se producen en la congelación convencional. La adición de cada crioprotector provoca un grado de deshidratación previo a la congelación el cual puede ser más o menos prolongado dependiendo del tipo de crioprotector (27).

1.12.1. Crioprotectores.

Los crioprotectores son sustancias que reducen el daño celular producido por el proceso de congelación y descongelación. El mecanismo por el cual ejercen su efecto está relacionado con la reducción de la concentración de electrolitos en el medio extracelular (17).

El grado de protección que puede aportar un crioprotector depende en gran medida de sus características propias. Entre las sustancias que pueden actuar como crioprotectores permeables encontramos, glicerol, metanol, etanol, etilenglicol, propilenglicol, dimetilformamida, dimetilacetamida y dimetil sulfóxido (DMSO), los crioprotectores no permeables son sustancias de elevado peso molecular, que actúan como estabilizadores de membrana o sobre las propiedades físico-químicas del medio de congelación, evitando la formación de cristales de hielo y el efecto de los solutos, la presencia de estas sustancias favorece un flujo de agua fuera de la célula inhibiendo el crecimiento de cristales en el interior, además de aumentar la viscosidad del medio extracelular manteniendo el hielo en forma de estructura amorfa evitando así el crecimiento de cristales que puedan dañar las membranas, dentro de este grupo de crioprotectores encontramos sustancias como la polivinilpirrolidona (PVP), los polivinil alcoholes (PVA), compuestos lipídicos como por ejemplo la yema de huevo, proteicos como la albúmina sérica bovina (BSA) y azúcares, principalmente sacarosa (17).

En medicina se han utilizado para preservación en frío (4 °C) de plaquetas o tejidos para transfusiones y transplantes, y en criocirugía para destrucción de tumores malignos (27).

En la industria alimenticia también se ha experimentado con AFPs debido a su capacidad para inhibir la cristalización y recristalización del hielo en los alimentos congelados a muy bajas concentraciones (0,003-0,0025 mM) (26)

Además, los promotores génicos de las AFPs son utilizados para dirigir la expresión de otros genes, como por ejemplo la hormona de crecimiento, de modo que al insertar dicha construcción se logra un incremento de las tasas de crecimiento en salmónidos y otras especies de gran interés en acuicultura (28).

1.12.2. Criopreservación de Embriones de Trucha (*Oncorhynchus mykiss*).

El mantenimiento en cautividad de los reproductores implica, como ya se ha citado, pérdida de variabilidad en cada generación (20)

Sin embargo, y a pesar de todas las ventajas que supondría, la criopreservación de embriones de peces es un objetivo no alcanzado hasta el momento. Así como la criopreservación de semen ha sido lograda con éxito en muchas especies de teleósteos, la congelación de ovocitos y embriones sigue siendo un reto para los criobiólogos. Esto es debido principalmente a su estructura multicompartimentada, que dificulta el intercambio de agua y crioprotectores entre el embrión y el medio, necesarios para llevar a cabo con éxito el proceso (22).

La velocidad de congelación también es crucial en el proceso. Aunque los protocolos de congelación lenta han sido muy utilizados en los ensayos de criopreservación de embriones de peces, hay estudios que demuestran que este proceso no permite una correcta deshidratación de las células. Como consecuencia de ello se formarán cristales de hielo en el citoplasma que dañarán las membranas y orgánulos provocando la muerte celular (1).

Por esta razón muchos autores consideran que la vitrificación es la mejor opción (11), consiguieron el mayor éxito logrado hasta el momento en criopreservación de embriones de peces cuando vitrificaron embriones de la especie *Pseudopleuronectes americanus*, y observaron indicios de desarrollo tras la descongelación. Este hecho fue atribuido a la expresión de AFPs, que como ya se explicó anteriormente, actúan como crioprotectores naturales que se adhieren a los cristales de hielo impidiendo su crecimiento, durante los procesos de congelación y descongelación, lo que conlleva una reducción del daño celular (27)

Los primeros ensayos de incorporación de AFPs en peces, se realizaron mediante micro inyección. El efecto beneficioso de estas proteínas se demuestra en trabajos como el de Robles y cols. (2007), en el cual, se produjo un incremento de la resistencia al frío en aquellos embriones en los cuales se micro inyectaron AFPs. Sin embargo, los daños mecánicos producidos en los embriones durante el proceso, hacen que este método resulte incompatible con la vitrificación. Estudios realizados en rodaballo, mostraron que embriones micro inyectados sometidos al protocolo de vitrificación/descongelación presentaron severas alteraciones, llegando en la mayoría de los casos a desintegrarse totalmente durante la descongelación (22).

Existen pocos estudios realizados con salmónidos, principalmente debido a su enorme tamaño, que dificulta los flujos de agua y crioprotectores, y a la gran cantidad de vitelo que contienen, que los hace especialmente sensibles (3)

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

En el presente Capítulo se detalla la ubicación geográfica en donde se realizó el estudio, los materiales utilizados para su ejecución, la metodología y los pasos empleados para el desarrollo del experimento.

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.

2.1.1. Situación política.

Provincia: Cotopaxi.

Cantón: Latacunga.

Parroquia: Eloy Alfaro.

Barrio: Salache Bajo.

2.1.2. Situación geográfica.

Latitud: 00° 59'47.68"S.

Longitud: 78° 31'9.16"W.

Altitud: 2757.591 m.s.n.m.

2.1.3. Datos meteorológicos.

Temperatura promedio: 10.7°C

Pluviosidad: 175 mm (anuales)

Horas luz/día: 12 horas.

Viento: Sureste-Noreste.

Nubosidad anual: 4.7/8.

Fuente: Registros administración CEYPSA/2007.

2.2 MATERIALES.

2.2.1. Material Experimental.

- 8 ovas fertilizadas Calidad “A” de trucha arcoíris de ocho horas pos fertilización.

2.2.2. Materiales de campo.

- Piscinas de piscicultura
- Chinchorro
- Contenedor ovas
- Baldes
- Overol
- Guantes de lana
- Botas de caucho

2.2.3. Materiales de laboratorio.

- Cofia.
- Mascarilla.
- Ropa quirúrgica.

- Mandil.
- Guantes.
- Jeringa de 10ml con aguja de 20-g
- ViGRO Ethylene Glycol Freeze Plus with Sucrose^R (Bioniche)
- ViGRO Holding^R (Bioniche).
- Portaobjetos
- Cajas Petri
- Vainas para inseminación artificial (adaptadas con calor de una plancha)
- Selladora de plásticos al calor
- Crioconservadora (Cryologic Freeze Control)
- Termo de nitrógeno líquido (SEMEX).
- Estereomicroscopio (NIKON SMZ 745).
- Micropipetas.
- Cloruro de sodio al 0.9%.

2.2.4. Materiales de oficina.

- Computadora
- Flash memory
- Bolígrafos
- Lápiz
- Libreta de apuntes
- Corrector
- Borrador
- Cámara de Fotos
- Material bibliográfico
- Impresiones.
- Empastados.
- Papel bond.
- Cd.
- Anillados.
- Esferográficos

2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.

2.3.1. Tipo de Investigación.

Se utilizó los tipos exploratorios y descriptivos.

2.3.1.1. Investigación Exploratorio.

En la investigación aplicamos el tipo exploratorio ya que no existe bibliografía referente a la crioconservación de embriones de trucha arcoíris, y de otras especies de peces es muy escasa la información que tenemos.

Al ser exploratorio la investigación nos permitió trabajar de forma cualitativa con libertad y flexibilidad de obtener abundante información sobre la posibilidad de crioconservar embriones de trucha arcoíris.

Dicha investigación fue dirigida a la formulación más precisa del problema de investigación, dado que se carece de información suficiente y de conocimiento previos del objeto de estudio, resulta lógico que la formulación inicial del problema es imprecisa. En este caso la exploración permitió obtener nuevo datos y elementos que pueden conducir a formular con mayor precisión las preguntas de investigación.

2.3.1.2. Investigación descriptiva.

Consiste en la descripción exacta de las actividades, objetos, procesos y personas

Este tipo de investigación se empleó en la investigación para describir de manera minuciosa y concreta el proceso para la criopreservación de embriones de trucha arcoíris.

2.3.2. Metodología.

2.3.2.1. Investigación No Experimental.

Aplicamos el método no experimental ya que realizamos una búsqueda empírica y casi sistemática sin manipular las variables donde básicamente se utilizó un protocolo para crioconservación de embriones de trucha previamente establecido es decir modificamos el entorno, al no manipular el objeto de estudio buscamos un resultado en contexto natural y tangible.

2.3.3. Métodos y técnicas.

2.3.3.1. Método Deductivo.

Este método se empleó en la búsqueda de información para el arco teórico, que nos ayudara a deducir la información más importante de los criterios más extensos.

2.3.4. Análisis estadístico.

Se aplicaba la estadística descriptiva ya que hemos analizando cada uno de los hechos que encontramos en la investigación y describimos de manera minuciosa y concreta el proceso para la criopreservación de embriones de trucha arcoíris, y para finalizar se pudo tabular la información, y representarlo mediante graficos de barras y pasteles .

2.4. Unidad de estudio.

02 truchas hembras y 02 truchas arcoíris machos.

2.5. Manejo del Ensayo.

2.5.1. Variables evaluadas.

Para la presente investigación se utilizó las siguientes variables.

CUADRO 3. VARIABLES EVALUADAS.

VARIABLES INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTES	INDICADORES
Protocolo de crioconservación de embriones de Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Calificación embriones	Embriones Tipo A(Excelente) Embriones Tipo B Embriones Tipo C
	Estado del embrión	Número de Embriones en estadio F (tail bud) Blastocistos.
	Viabilidad del embrión pos descongelamiento	Morfología intacta Mortalidad Porcentual (%)

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

2.5.2. Protocolo para la obtención y crioconservación de embriones de Trucha arcoíris.

2.5.2.1. Extracción y fertilización de ovas.

Para empezar el protocolo de criopreservación de embriones de trucha arcoíris se procedió a extraer las ovas de una hembra y semen de un macho de las especies mencionadas, para la fertilización y producción de embriones, de dicha especie de sujetos de la explotación piscícola “Tambuyaco” ubicado frente a la Brigada de fuerzas especiales N9 “Patria” en la parroquia Aláquez del cantón Latacunga.

Luego de ocho horas, los embriones fueron clasificados para apartar los de mejor calidad para proceder con el protocolo con los mismos, dadas sus características óptimas de fecundidad.

Posteriormente los embriones fueron transportados en un termo cooler a temperatura de 14 °C al laboratorio de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi, aprovechando el clima frío por la mañana los embriones podrían mantenerse viables durante un tiempo muy prolongado dada la reproducción de esta especie el climas extremos y fríos como páramos.

Ya en el laboratorio se procedió a ubicar a los embriones en cajas Petri para posteriormente colocarles solución de mantenimiento de Holding .

Luego fueron observados y seleccionados bajo estereomicroscopio (NIKON SMZ 745) con lentes 30x conservando a aquellos que habían sido fertilizados positivamente y con desarrollo posterior a este, con los cuales se procedería con el protocolo para su crioconservación.

2.5.2.2. Aplicación del protocolo para crioconservación de embriones.

Una vez seleccionados lo embriones fueron colocados en cajas Petri con ViGRO Holding^R (Bioniche), para mantención las cuales se encontraban en la plancha térmica a 23° C.

Posteriormente se procedió con una micro pipeta a extraer de la solución anterior a los embriones y colocarlos en una solución de etilenglicol con sacarosa, ViGRO Ethylene Glycol Freeze Plus with Sucrose^R (Bioniche), en la cual permanecieron un instante y después se repitió el procedimiento.

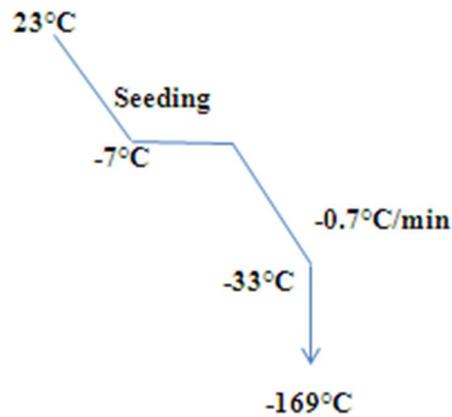
Luego de esto se envasaron los embriones en pajuelas adaptadas de catéteres de inseminación artificial de bovinos, dado que estos son de tamaño apropiado para los embriones antes mencionados. El proceso se realizó envasando etilenglicol luego dejando un espacio con aire y luego etilenglicol con el embrión, luego otro espacio de aire y otra parte de etilenglicol y se selló con un sellador de plásticos a calor.

Con las pajuelas ya cargadas con los embriones se procedió a colocar en la criocconservadora (Cryologic Freeze Control CL 5500) el cual previamente ya había sido cargado de nitrógeno líquido y estabilizado para que proceda con la etapa de descenso de temperatura de las pajuelas.

Empezamos programando la criocconservadora a una temperatura inicial de 23 °C para posteriormente estabilizarlo a -7°C donde se realizó un siding con un objeto metálico en nuestro caso una pinza, para empezar el proceso de descenso de temperatura de -0.7°C por minuto hasta llegar a los - 33 °C.

Al haber alcanzado la temperatura bajo cero de -0.33 °C en el Freezer, el proceso continuó al sacar las pajuelas del mismo ya enfriadas y transportarlas y colocarlas las el tanque de nitrógeno líquido a – 196°C para finalizar con el proceso de crioconcervación y su posterior almacenamiento.

GRÁFICO N°1. RAMPA DE DESENDO DE TEMPEREATURA DE USADO PARA LA CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES DE TRUCHA ARCOIRIS.



Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

2.4.2.2. Descongelación de embriones.

Posteriormente, se procedió a descongelarlas pajuelas que contenían los embriones de trucha arcoíris, con el fin de observar los principales cambios morfológicos a nivel celular sufridos por el descenso de temperatura que pudiesen causar posibles alteraciones.

Para descongelar las pajuelas se procedió a sacar las pajuelas del tanque de nitrógeno líquido, donde se encontraban almacenados, y a colocarlos en agua a una temperatura de 15°C durante 15 segundos con el fin de descongelarlos.

Tras la descongelación los embriones fueron extraídos de los catéteres donde se encontraban, para ser lavados cuidadosamente en tres baños sucesivos de solución isotónica de cloruro de sodio al 9%, con el fin de eliminar residuos de sustancias crioprotectoras.

Posteriormente se procedió a colocar los embriones en la caja Petri, manteniendo una temperatura de 14 ° C con la ayuda de una plancha térmica, para mantener su estado de incubación, para su posterior observación bajo estereomicroscopio (NIKON SMZ 745) con lentes 30x.

El objeto de la observación posterior a la descongelación fue evaluar la capacidad crioprotectora del protocolo seguido sobre los embriones sometidos al mismo, supervivencia embrionaria o porcentaje de embriones que presentan la morfología normal o en el caso para demostrar la existencia de actividad enzimática de ciertas enzimas citoplasmáticas tras la criopreservación lo que demostraría que aunque no haya desarrollo embrionario algunas células se mantienen viables.

Se observó y registro fotográficamente las principales alteraciones morfológicas provocadas por la exposición a los crioprotectores y la congelación manteniéndolos en incubación y observación a 14 °C, obteniendo así las siguientes clasificaciones:

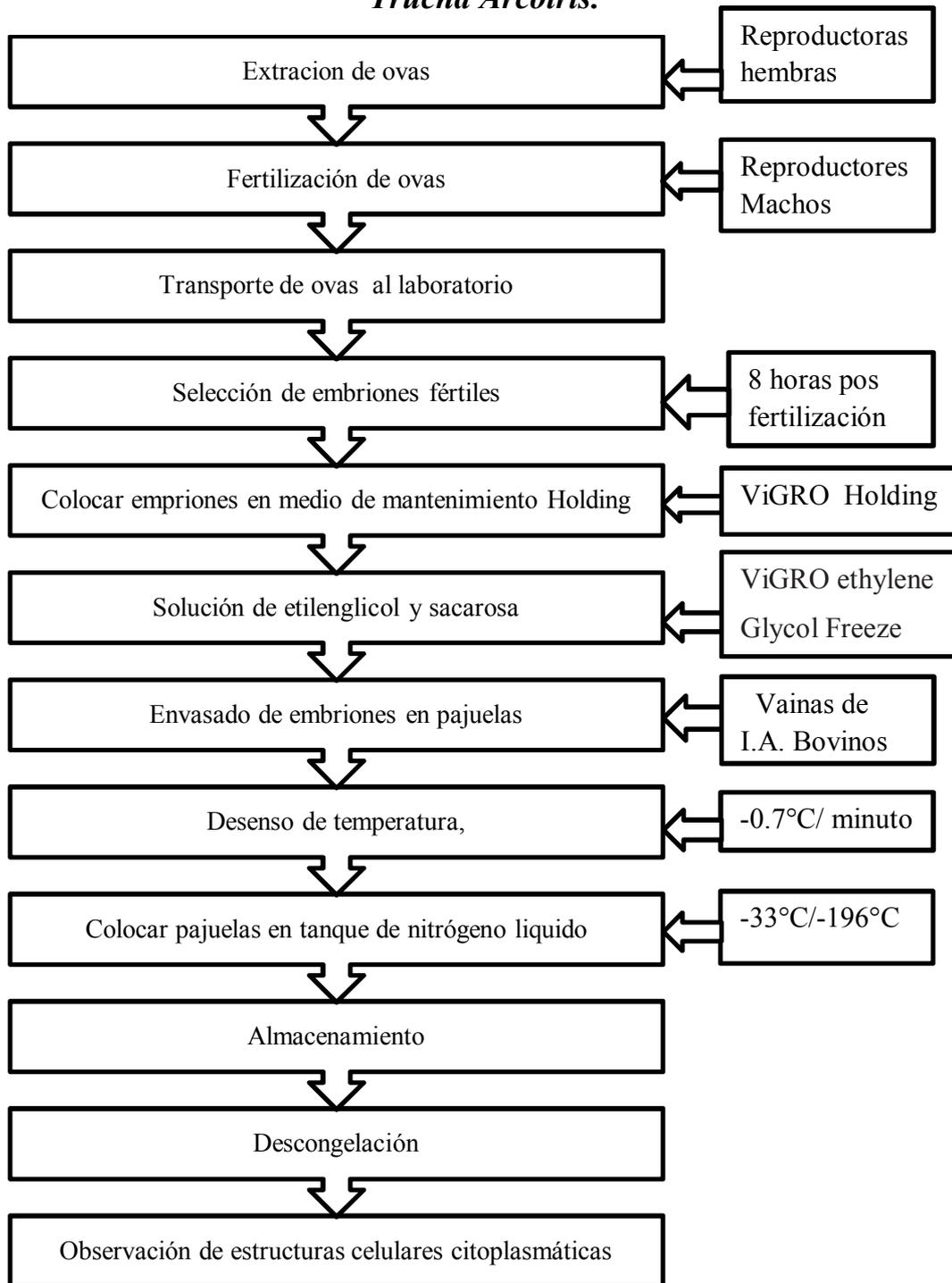
Embriones Categoría A (Embriones N° 1, 2, 4, 6) coloración anaranjada representan al 50% de las muestras: embriones de óptima calidad con máxima capacidad de desarrollo pos descongelación, que nos muestra la normalidad en el embrión al ser descongelado con altas posibilidades de supervivencia.

Categoría B (embrión N° 8): representa el 12.5% de la muestra, embrión de buena calidad con media capacidad de desarrollo posdescongelación la el corion o membrana externa intacta nos muestra una buena relación al proceso de descongelación y descongelación, al mismo tiempo que el vitelo blanquecino nos da señales ende posibles daños intracelulares.

Categoría C (embriones N° 3,7): representa al 25 % de la muestra, embriones regulares con bajas posibilidades de implantación, nos muestra daños de estructurales externos e internos lo que imposibilitara su viabilidad y desarrollo.

Categoría D (embrión N° 5): representa el 12.5 %, embrión de mala calidad con nula posibilidades de desarrollo y la coloración blanquecina y oscura nos demuestra como resultado daño estructural causado por la falta de penetración de crioprotector dándonos como resultado la degradación del embrión interna y externa de abertura del corion y por ende daño total lo que imposibilita todas las expectativas de desarrollo de dicha muestra

2.6. Diagrama de flujos de la crioconservación de embriones de *Trucha Arcoíris*.



Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

En el presente capítulo detallamos los resultados obtenidos en el proceso de la investigación, así como la discusión sobre dichos resultados y sus respectivas representaciones gráficas .

3.1. Número de Embriones crioconservados.

Los 150 embriones fueron obtenidos de dos hembras en diferentes fechas de la explotación piscícola “Tambuyaco” ubicado frente a la Brigada de fuerzas especiales N9 “Patria” en la parroquia Aláquez del cantón Latacunga, de los cuales mediante el análisis de variables, por clasificación, se seleccionaron para crioconservarlo los que se encontraban en óptimas condiciones de la categoría “A” 8 embriones.

3.2. Clasificación de Embriones.

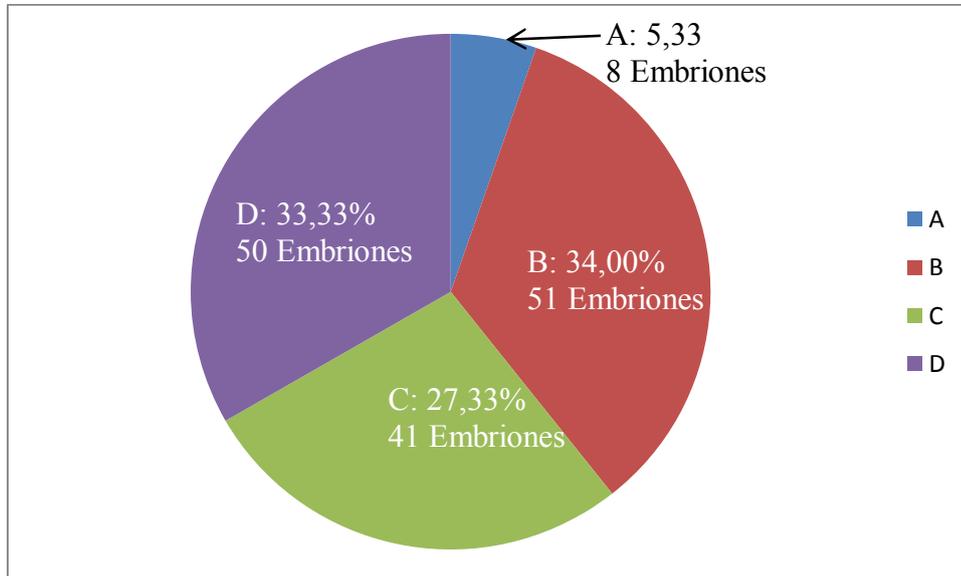
TABLA 3. CATEGORÍA DE LOS EMBRIONES DE TRUCHA UTILIZADOS.

Categorías	Número	Porcentaje %
A	8	5.33
B	51	34.00
C	41	27.33
D	50	33.33
TOTAL	150	100

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

GRÁFICO N°2. CATEGORÍA DE LOS EMBRIONES DE TRUCHA UTILIZADOS.



Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015

En la Tabla 3 y Gráfico N°2 se muestra los embriones totales empleados (150) de los cuales fueron categorizados de la siguiente manera:

Categoría A, 8 embriones “Excelente” óptima calidad embrionaria y máxima capacidad de desarrollo y eclosión, con membranas intactas, citoplasma homogéneo y formación de numerosas células citoplasmáticas.

Categoría B, 50 embriones “Buenos” buena calidad embrionaria y elevada capacidad de eclosión, rodeados parcialmente por saco vitelino grueso y con citoplasma irregular

Categoría C, 41 embriones, “Media” embrión de calidad media con una capacidad baja de eclosión y desarrollo

Categoría D, 50 embriones, Baja, embrión de no muy buena calidad con una capacidad nula de desarrollo y posterior eclosión, fue tomada en cuenta al momento de la crioconservación por sus sacos vitelinos recién formados y permeables además de su desarrollo celular.

Seleccionamos a los embriones categorizados como “A” por su excelente presentación, al mantener su estructura intacta, que consecuentemente garantizaría un mejor resultado para el estudio, por su baja calidad al presentarse con defectos, el resto de embriones fueron descartados ya que forman parte en caso de ovas no fertilizadas, ovas dañadas mecánicamente, u ovas muy maduras, lo que imposibilitaría en parte su supervivencia.

El degrado de embriones de trucha arcoíris esta mediado por el deterioro de su estructura, de donde partimos para su clasificación, podemos incluir entonces a los embriones de categoría “C” y ”D”, al ser los embriones de la peor categoría, como ovas no fertilizadas, que por situaciones de cambio de temperatura drástico, el cambio brusco del medio interno de la reproductora hacia el exterior, o incluso al ser ovas muy avejentadas no lograron completar su periodo de fertilización por ende están expuestas a una degradación inmediata por no contar con el material genético del macho para seguir su proceso de desarrollo. Además en estas clasificaciones se incluyen aquellos que por daños mecánicos en su estructura, se ven inviábiles a seguir un proceso de desarrollo. La luz solar es otro de los factores que provocan mortalidad embrionaria dentro de esta clasificación.

Los embriones clasificados como categoría “B”, son categorizados por ser aquellos embriones que durante el proceso de fertilización sufrieron ligeros daños mecánicos lo que alteró de manera mínima su estructura como el corion, esto dado por la presión al momento de manejar las reproductoras o durante el masaje de desove donde algunos son oprimidos para su salida y de ahí ubicados en el recipiente en donde al mezclarse con la lechaza del macho fueron agitados con una pluma para su mejor fertilización. Dicho daño no es muy significativo lo que no impide su desarrollo en un medio ambiente apropiado y posterior eclosión, pero al sufrir daños estructurales, aunque sean mínimos nos limitó su supervivencia al descenso de temperatura lo que provocaría un fracaso por su falla en la integridad de corion.

Con respecto a los embriones utilizados y categorizados como “A” mantienen una estructura intacta, lo que es resultado de ser embriones que se encontraron en la parte más interna de la reproductora lo que permite que el masaje y la presión al

desove no le afecten pero le permitan salir, así mismo durante la fertilización son los embriones que menos movimientos sufren y su tiempo de vida es apropiado para usarlos en el protocolo para criopreservación de embriones de trucha arcoíris ya que en un desarrollo normal serian embriones perfectos para su desarrollo y eclosión.

Entre los cambios más sobresalientes al embrión están: opacidad del embrión y/o vitelo, rotura del corion y aumento del espacio perivitelino debido a la pérdida de volumen del vitelo.

3.3. Viabilidad de Embriones pos descongelamiento.

TABLA 4. MORFOLOGÍA DE ESTRUCTURAS INTACTAS POS DESCONGELACIÓN.

Embriones	Membrana externa	Color	Opacidad del embrión y/o vitelo	Rotura del corion
N°1	Intacta	Naranja	No	No
N°2	Intacta	Naranja	No	No
N°3	Semi intacta	Blanquecino	No	Si
N°4	Intacta	Blanquecino	No	No
N°5	Con abertura	Negruzco	Si	Si
N°6	Intacta	Naranja	No	No
N°7	Con abertura	Blanquecino	Si	Si
N°8	Semi intacta	Naranja	Si	No

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

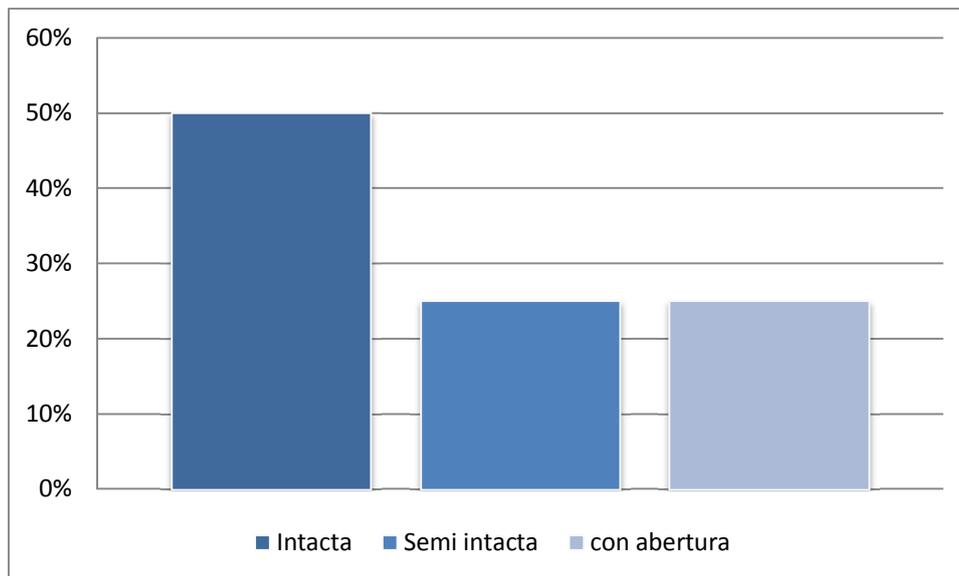
TABLA 5. ESTADO DE LA MEMBRANA EXTERNA POS DESCONGELACIÓN.

Estado	Número de Embriones	Porcentaje %
Intacta	4	50.00
Semi intacta	2	25.00
Con abertura	2	25.00

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

GRÁFICO N°3. REPRESENTACIÓN DE MEMBRANAS POS DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES (CORION).



Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

La representación de membranas externas o corion intactos representadas en la tabla 4 y 5 además del grafico 3 nos representa los valores obtenidos sobre daños estructurales sufridos por la congelación de los embriones o la descongelación de los mismos, al tiempo que nos representara la viabilidad de cada embrión tras la aplicación del protocolo, congelación y descongelación de los mismos, los resultados dados serian 4 embriones con membranas intactas con las posibilidad de viabilidad alta.

Mientras que las que han mostrado membranas semi intacta nos dan posibilidades bajas o nulas de un posible posterior desarrollo, así como los que indican aberturas en el corion, muestran por daños aparentes durante el proceso de congelación y/o descongelación, además de la manipulación lo que nos dan una posibilidad nula de desarrollo post descongelación . Entonces tenemos como resultado un 50 % de membrana intacta, un 25 % de membranas semi intactas y 25 % de estructuras con aberturas.

Al ser el etilenglicol un compuesto de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana, como nos indica la teoría, actúan desplazando el agua del interior de la célula evitando así la formación de cristales de hielo intercelulares los cuales actúan como cuchillos destruyendo las estructuras intracelulares dentro de los embriones. El etilenglicol fue el crioprotector utilizado por ser el apropiado en protocolos de congelación a velocidad muy lenta, lo que nos proporcionó el tiempo suficiente para que pudiese ingresar desplazando el agua de las células proporcionando así una protección ante el descenso de temperatura.

Al primer intento de envasar un embrión notamos la consistencia dura que este tenía, por ende se envaso en catéteres que habían sido reducidos de diámetro para que ingresara a la criocconservadora, entonces este embrión se vio afectado al estar en contacto directo con las paredes del catéter que lo contenía, al descongelarlo este presentaba una degradación del corion, con una abertura, que al momento de hidratarlo provoco que hubiera aumento del espacio perivitelino y visto más detenidamente se mostrara rota, en imposibilite su posterior desarrollo lo que nos llevó a que este embrión era inviable y había sido afectado directamente por la congelación al estar en contacto con las paredes no permitió la salida total de agua lo que lo llevo a la formación de cristales de hielo que dañaron su estructura.

Los embriones de tipo A y B presentan una estructura al descongelar intacta, igual al momento que se los congeló, podemos notar que tuvieron el tiempo suficiente para que el crioprotector ingresara, manteniendo el equilibrio osmótico, y desplazara el agua evitando así daños en el corion al momento de la congelación. Es así que el tiempo de descenso de temperatura a -0.7°C por minuto resulta eficaz al momento de congelar los embriones, ya que si fuera muy rápida habría

formación de cristales de hielo intra y extracelulares, mientras si fuera demasiada lenta habría colapso celular.

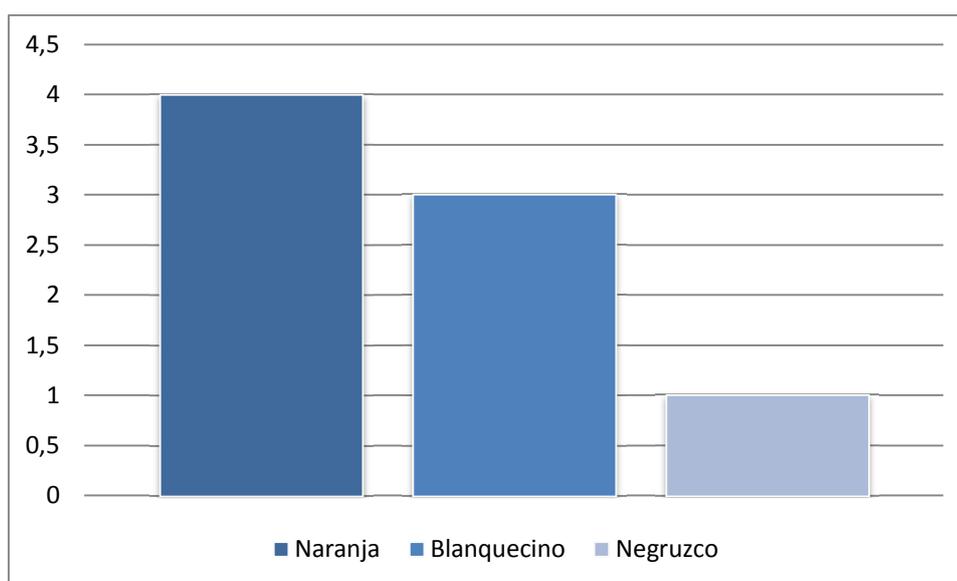
TABLA 6. COLOR DE EMBRIONES POS DESCONGELACIÓN VISTO AL MICROSCOPIO

color	Número de embriones	Porcentaje %
Naranja	4	50.00
Blanquecino	3	37.50
Negrusco	1	12.50

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

GRÁFICO N°4. REPRESENTACIÓN DE COLOR DE EMBRIONES POS DESCONGELACIÓN



Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

En la Tabla 6 y grafico 4 representamos la coloración a la vista del microscopio la cual categorizamos como: Embriones Categoría A (Embriones N° 1, 2, 4, 6) coloración anaranjada representan al 50% de las muestras: embriones de óptima calidad con máxima capacidad de desarrollo pos descongelación, que nos muestra

la normalidad en el embrión al ser descongelado con altas posibilidades de supervivencia; Categoría B (embrión N° 8): representa el 12.5% de la muestra, embrión de buena calidad con media capacidad de desarrollo posdescongelación la el corion o membrana externa intacta nos muestra una buena relación al proceso de descongelación y descongelación, al mismo tiempo que el vitelo blanquecino nos da señales ende posibles daños intracelulares; Categoría C (embriones N° 3,7):Representa al 25 % de la muestra, embriones regulares con bajas posibilidades de implantación. nos muestra daños de estructurales externos e internos lo que imposibilitara su viabilidad y desarrollo ; Categoría D (embrión N° 5): representa el 12.5 %, embrión de mala calidad con nula posibilidades de desarrollo y la coloración blanquecina y oscura nos demuestra como resultado daño estructural causado por la falta de penetración de crioprotector dándonos como resultado la degradación del embrión interna y externa de abertura del corion y por ende daño total lo que imposibilita todas las expectativas de desarrollo de dicha muestra.

La tonalidad o coloración de las estructuras en el embrión resultan de interés en la investigación, ya que al no existir la cristalización intracelular del agua la coloración de dichas estructuras permanecería igual frente al cambio de temperatura.

Al existir daño por efecto de cristales dentro de la célula el hielo provocaría quemaduras que se vislumbran de coloración oscura en la célula, en cierto caso incluso el daño es total. Mientras que al ser blanquecino podemos observar un ligero deterioro por formación de cristales de hielo por su tonalidad al llenarse el espacio perivitelino, y entre más intacto este el interior más se irá dando la tonalidad anaranjada original como antes de someterse a la congelación.

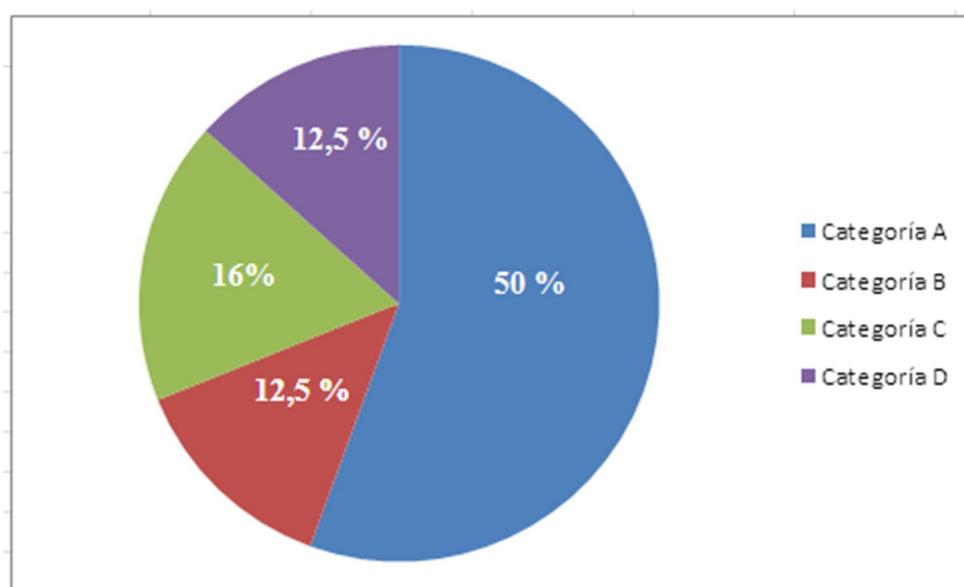
TABLA 7. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD PORCENTUAL DE EMBRIONES AL MOMENTO DE LA DESCONGELACIÓN

Categoría	Viabilidad	Embriones N°	Porcentaje %
Categoría A	Optima	1,2,4,6	50.00
Categoría B	Buena	8	12.50
Categoría C	Regular	3,7	16.67
Categoría D	Nula	5	12.50

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015.

GRÁFICO N°5. VIABILIDAD AL MOMENTO DE LA DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES



Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA DARWIN 2015

Al categorizar los embriones posdescongelación, después de haber sido sometidos a podemos determinar por ende la superioridad de supervivencia a la criopreservación de los embriones 1, 2, 4 y 6 por sus características óptimas al momento de la descongelación, presentan estructura intacta, en el corion que es la membrana externa, así mismo al observarse bajo microscopio se ven de coloración más anaranjado similar a cuando fueron sometidos al protocolo para criopreservación, en cuanto al tamaño del espacio peri vitelino estas

permanecieron sin mucha variación lo que nos proporciona la información que hubo buena permeabilidad del crioprotector, lo que permitió que no exista formación de cristales de hielo.

Mientras que el embrión N° 8 tendría una posibilidad media de desarrollo, se clasifico de tipo B, en hubo un ligero aumento del saco perivitelino, no muy significativo en lo que se concluye que hubo una ligera abertura en el corion, así mismo la hidratación puede provocar la entrada de líquido intracelular a través del corion, esto ocasiona que el embrión se vea con una tonalidad de color anaranjado blanzuco.

Los embriones N° 3 y 7, tipo C, catalogados como embriones de desarrollo regular, presentan una abertura en el corion con aumento del espacio perivitelino y coloración más blanquecina lo que nos da como resultado del degrado por formación de cristales de hielo extracelular lo que deterioro el corion, además de cristalización en el espacio perivitelino lo que llevo a un aumento de su tamaño al hidratarse, y al mismo tiempo le dio apariencia más clara.

Y el embrión N°5, tipo D, con posibilidad nula, dado sus características nos muestran daño a la congelación de dichos embriones, obviamente encontramos daños aparentes en la estructura como son rotura del corion, abertura que pone en contacto el espacio perivitelino con el exterior del embrión, su coloración bajo microscopio es de tonalidad oscura, lo que nos permite aparentemente darnos cuenta que el frio causo quemaduras intracelular, así como la formación de cristales de hielo durante el descenso de temperatura, no le dio tiempo para que ingresara el crioprotector, dichas formaciones que actuaron a modo de cuchillas dañando así la estructura celular en su totalidad dejando al embrión invalido para su posterior desarrollo.

4. CONCLUSIONES.

- Fue exitosa la aplicación del protocolo de crioconservación de embriones de trucha arcoíris
- La aplicación del protocolo de embriones de trucha arcoíris fue eficaz, al usar como base el etilenglicol, y sacarosa como crioprotectores
- En la valoración morfológica de los embriones se determinó diferentes respuestas a la aplicación del protocolo, caracterizando los embriones viables, regulares y de nula viabilidad.
- De acuerdo a la morfología y su caracterización los embriones se los clasifíco en: embriones N° 1, 2, 4 y 6, en Tipo A morfología intacta; embrión N° 8, Tipo B morfología buena; embriones N° 3,7, embriones Tipo C morfología regular, embrión N° 5, Tipo D morfología nula, deterioro por efecto de la formación de cristales de hielo.

5. RECOMENDACIONES.

Para el transporte de las muestras se recomienda realizarlo en medios apropiados como un cooler para mantener la temperatura constante durante el traslado

Hay que mantener a los donadores 24 horas antes en ayuno para evitar la contaminación de las ovas y la lechaza del macho con fecas de los mismos individuos.

Es necesario para la crioconservación de embriones de trucha que aumentemos la posibilidad de permeabilidad de membrana y disminuyamos la toxicidad de las sustancias crioprotectoras, además de cuidar que la estructura de los embriones no se vean afectadas durante y después de la congelación.

A fin de obtener un método apropiado para la investigación se recomienda realizar métodos alternos como la vitrificación para comparar resultados y beneficiarse del mejor.

BIBLIOGRAFÍA.

1. ACUAGEN, (2005). Reproducción y selección de trucha arco iris. Boletín Informativo No 2. Aqua Gen Chile SA
2. ACKER JP, ELLIOTT J, MCGANN LE. 2001. Intercellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores. *Biophysical journal*; 81(3): 1389-1397.
3. BILLARD R, ZHANG T, 2001. Techniques of genetic resource banking in fish. In: *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future.* (Eds Watson PF, Holt WV), pp. 145-170. Taylor and Francys, London.
4. BILLARD, R., FOSTIER, A., WEIL, C., & BRETON, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.*, 39:65-79
5. BLANCO, M. (1995). *La trucha: cría industrial.* Madrid: Mundi-Prensa Libros. (2da ed.).
6. BORQUES. A. 1995. Catálogo de recursos agropecuarios y pesqueros de uso potencial en la planificación y el desarrollo de la acuicultura en Chile. Chile: FOA.. 117- 130 pp.
7. BOYER, R., (2000). *Conceptos en Bioquímica.* Editorial Thomson Learning. p. 384
8. BUSTOS, C., & LANDAETA, M., (2005). Desarrollo de huevos y larvas tempranas de la merluza del sur, *Merluccius australis*, Cultivados bajo condiciones de laboratorio. *Revista Comunicaciones Breves* 69(2), 402-408.
9. CAMACHO B., E., M.; MORENO R., M., RODRIGUEZ G., C., LUNA ROMO Y M. VASQUEZ. 2000. Guía para el cultivo de trucha. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca Mexico D.F. 135-180 pp

10. CÁNEPA DE VARGAS L, MALDONADO V, AURAZO M, CEPIS; OPS. Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: teoría. Tomo I. Lima, CEPIS, 2004, p.2-56.
11. CIERESZKO, A. Y K. DABROWSKI. 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction*, 52:982-988.
12. FERGUSON H. 2006. *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease*. 2da ed. Scotian Press. London. 368 p.
13. HIBIYA, T. 1982. *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features*. Kodansha Tokyo.
14. IREGUI A. 2008. Morfología de los peces. Memorias II Curso Seminario Internacional de Ictiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. P: 277- 310.
15. IDROVO, R., (2008). Estadística Productiva de la Trucha en Ecuador según Censo Piscícola año 2006. *Revista ACUIESPE* 2008. 6-9.
16. IMAKI, A., (2003). *Manual de Manejo y Crianza de Trucha arco iris*. Quito: GD.
17. KAROW AM, 1997. Pharmacological interventions in vitro. In: *Reproductive tissue banking*. (Eds Karow AM, Critser JK), pp. 167-227. Academic Press, San Diego. Kuleshova y cols., 1999).
18. MAZUR P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*; 247: C125-142.
19. ORTIZ, J., RUEDA, D., ACOSTA, A., GARCÉS, J., DÁVILA, A., & SOLÍS, T. (2006). Estudio morfológico y citogenética de la preñadilla (*Astroblepus ubidai*). *Revista Ciencia*. 9(2), 173-182.
20. OSTERGAARD S, HANSEN MM, LOESCHCKE V, NIELSEN EE. 2003. Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout

- (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment. *Molecular Ecology*; 12: 3123-3135.
21. ROBERTS, R. J., AND C. J. SHEPHERD. 1974. Handbook of trout and salmon diseases. Fishing News Books Ltd., Surrey, England. 168 p.
 22. ROBLES V, CABRITA E, FLETCHER GL, SHEARS MA, KING MJ, HERRÁEZ MP. 2005. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology*; 64: 1633-1664.
 23. ROSADO Y ERAZO, 2000 Fundamentos de Acuicultura Continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura República de Colombia – Bogotá
 24. SAKAMOTO , T., Cols, 2000 microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific difference in recombination rates. *Genetics*. 155: 1313-1345
 25. SCOTT, A., & BAYNES A. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa, *J. Fish Biol.*, 17:707-739.
 26. WANG J-H. 2000. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology*; 41: 1-9.
 27. WATSON PF, FULLER BJ, 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos. In: *Cryobanking the Genetic Resource Wildlife conservation for the future*. (Eds Watson PF, Holt WV), pp. 21-46. Taylor and Francis, London.
 28. ZBIKOWSKA HM. 2003. Fish can be first--advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research*; 12: 379-389.

ANEXOS

**ANEXO 1 ESTADIO DE EMBRIONES SELECCIONADOS DE LOS
EMBRIONES PARA CRIOPRESERVAR**

Embriones Parámetros	N°1		N°2		N°3		N°4		N°5		N°6		N°7		N°8	
	SI	NO														
Opacidad del vitelo		X		X		X		X		X		X		X		X
Rotura del corion		X		X		X		X		X		X		X		X
Aumento del espacio perivitelino debido a la pérdida de volumen del vitelo.		X		X		X		X		X		X		X		X
Opacidad del embrión		X		X		X		X		X		X		X		X
Morfología intacta	X		X		X		X		X		X		X		X	
Posible mortalidad		X		X		X		X		X		X		X		X
Posible inviabilidad		X		X		X		X		X		X		X		X
OBSERVACIONES																

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA, Darwin

**ANEXO 2 CAMBIOS POSDESCONGELACIÓN DE LOS EMBRIONES
CRIOPRESERVADOS**

Embriones Parámetros	N°1		N°2		N°3		N°4		N°5		N°6		N°7		N°8	
	SI	NO														
Opacidad del vitelo		X		X	X		X		X			X	X			X
Rotura del corion		X		X		X		X	X			X	X			X
Aumento del espacio perivitelino debido a la pérdida de volumen del vitelo.		X		X	X			X	X			X	X			X
Opacidad del embrión		X		X	X		X		X			X	X			X
Morfología intacta	X		X		X		X			X	X			X		X
Posible mortalidad		X		X		X		X	X			X	X			X
Posible inviabilidad		X		X		X		X	X			X	X			X
OBSERVACIONES																

Fuente: Directa

Elaborado por: ANCHACAISA, Darwin

Foto N° 1 selección y captura de los reproductores



Foto N° 2 Transporte con oxígeno de los reproductores



Foto N° 3 Reproductores en las piscinas de reposo previo desove



Foto N° 4 Desove de las reproductoras

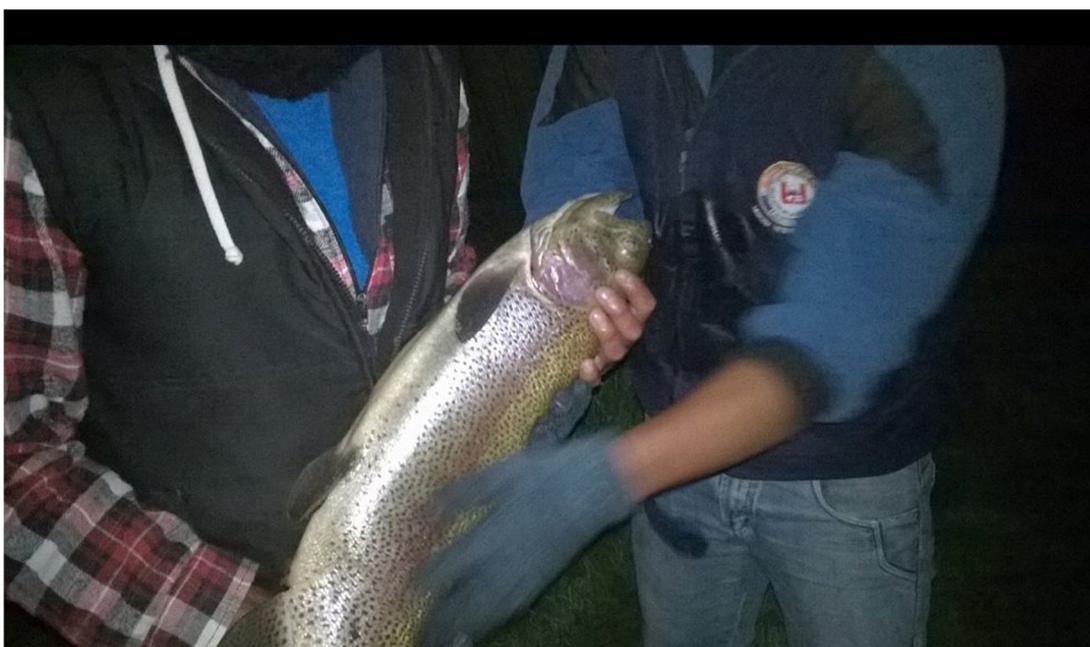


Foto N° 5 Ovas Fertilizadas



Foto N° 6 Preparación del Freezer Criobac



Foto N° 7 Embriones Seleccionados



Foto N° 8 Embriones en Solución Holding



Foto N° 9 Solución de ViGRO^R Holding (Bioniche).



- Foto N° 10 Diluyente mantención ViGRO^R Ethylene Glycol Freeze Plus with Sucrose (Bioniche)

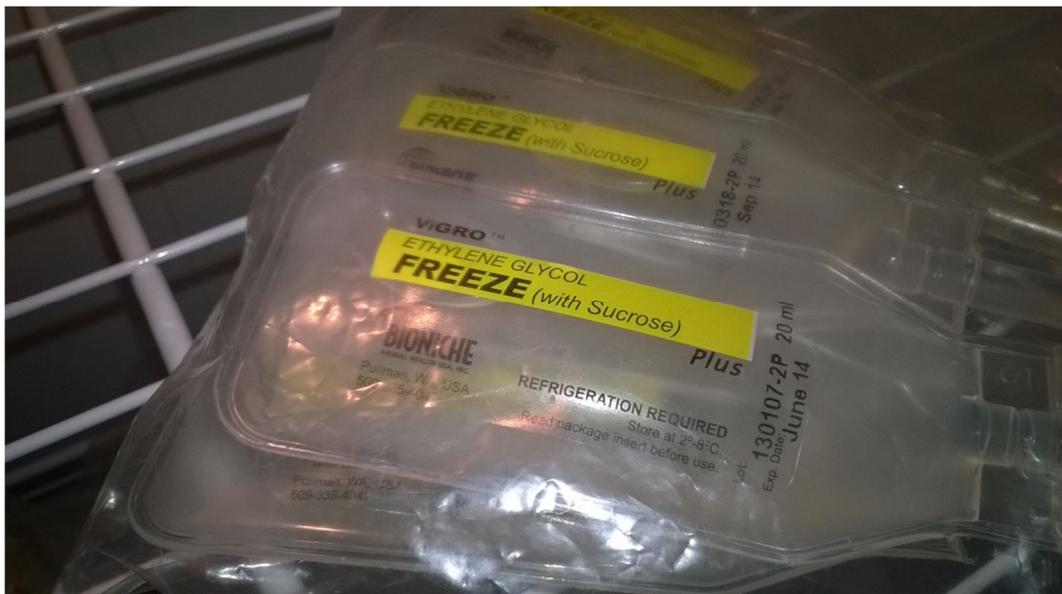


Foto N° 11 Observación microscópica de los embriones seleccionados



Foto N° 12 Primer envasado para criopreservación de Embriones

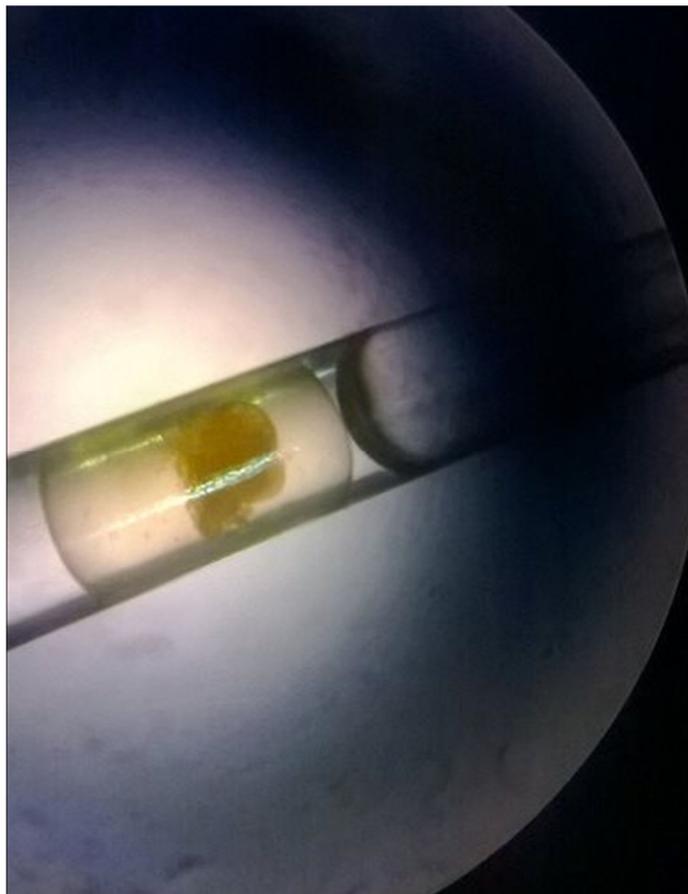


Foto N° 13 Inicio del descenso de temperatura de las pajillas



Foto N° 14 Descongelación de los embriones



Foto N° 15 Descongelación e hidratación de Embriones



Foto N° 16 Embriones descongelados tipo A optima



Foto N° 17 Embriones descongelados con corion dañado por el frio tipos C y D

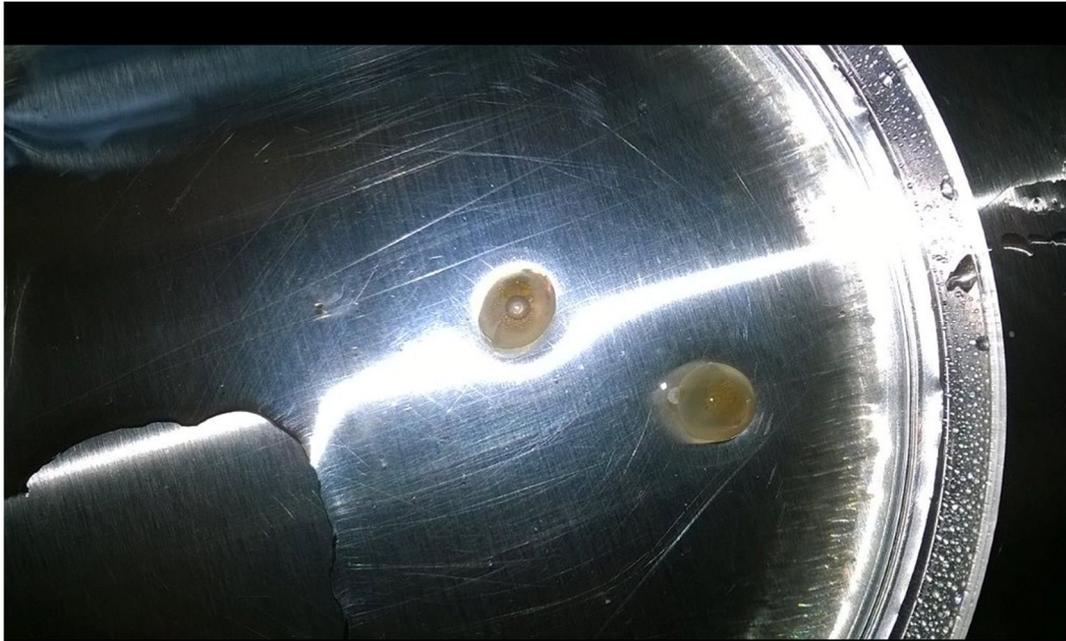


Foto N° 18 Observación de embriones descongelados



Foto N°19 Embrión descongelado tipo D visto microscópicamente



Foto N° 20 Embrión descongelado tipo B

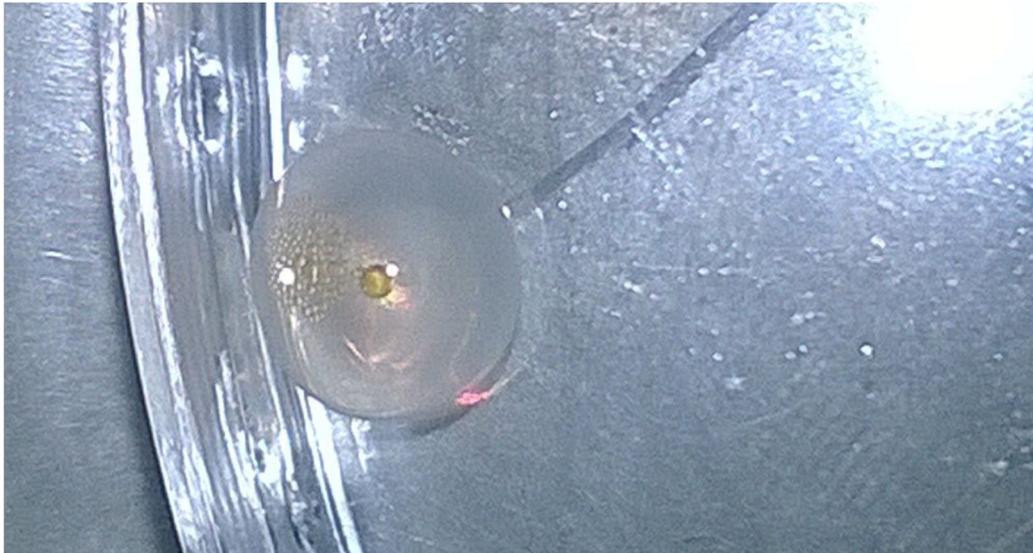


Foto N° 21 Revisión de Embriones descongelados



Foto N° 22 Embrión descongelado Tipo C

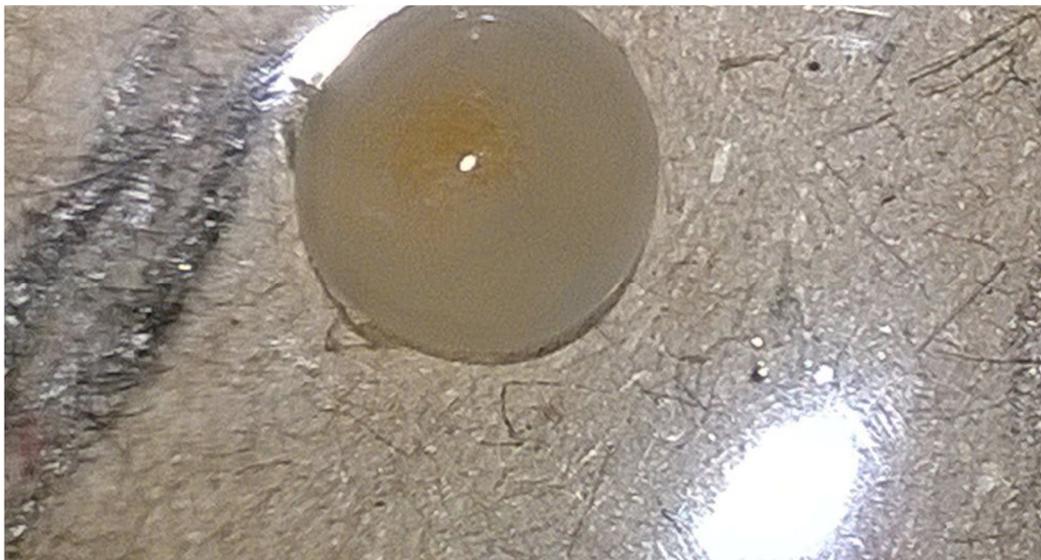


Foto N°23 Embrión descongelado Tipo B estructura semiintacta

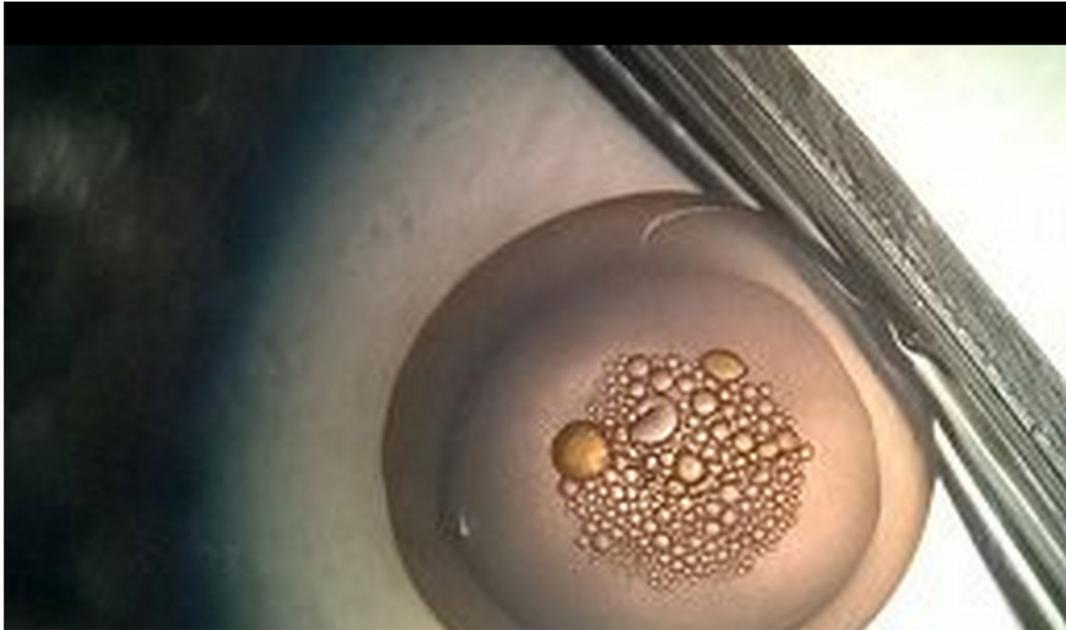


Foto N° 24 Embriones Descongelados tipo B



Foto N° 25 Embrión descongelado tipo D Daño total por la Temperatura



Foto N° 26 Embriones Tipo A vistos microscópicamente calidad optima

