

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos  
Naturales



Carrera de Medicina Veterinaria

**TEMA:** *CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(Oncorhynchus mykiss) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE  
REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.*

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

**AUTOR:**

Juan Carlos Chanatasig Chicaiza

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Rafael Garzón.

**LATACUNGA – ECUADOR**

**2015**

## **AUTORÍA**

YO, Chanatasig Chicaiza Juan Carlos, portador de la Cédula de Identidad l. 050363075-8, libre y voluntariamente declara que la tesis titulada, **“CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.”**, es original, auténtica y personal. En tal virtud declara que el contenido será de exclusiva responsabilidad del autor legal y académico, autoriza la reproducción total y parcial siempre y cuando se les cite al autor del presente documento.




**Juan Carlos Chanatasig Chicaiza**

**050363075-8**

**AUTOR**

## **AVAL DEL DIRECTOR**

En calidad de director de tesis de grado titulada “**CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCOÍRIS** (*Oncorhynchus mykiss*) **EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.**” presentada por el estudiante Juan Carlos Chanatasig Chicaiza portador de la Cédula de Identidad N° 050363075-8 como requisito a la obtención del grado de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos, y méritos suficientes para ser sometido a defensa de tesis.



---

**Dr. Rafael Alonso Garzón Jarrin**

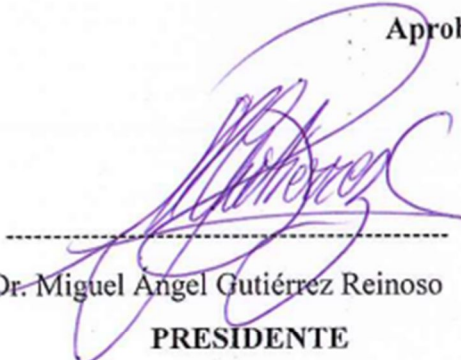
**Director de Tesis**

## **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: **“CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”** propuesto por el egresado Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, presentamos el **Aval Correspondiente** al presente trabajo, certificando que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones del presente documento.

Por lo antes expuesto se autoriza realizar los empastados correspondientes según la normativa institucional.

**Aprobado por:**



-----  
Dr. Miguel Angel Gutiérrez Reinoso  
**PRESIDENTE**



-----  
MVZ. Diego Xavier Medina Valarezo  
**OPOSITOR**



-----  
Dr. Edwin Orlando Pino Panchi  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA.**

*A mis docentes, que aportaron con sus conocimientos, enseñanzas y experiencias especialmente al Dr. Rafael Garzón, por su apoyo como Director de Tesis, pues me enseñó las pautas y brindó sus consejos durante la realización de este trabajo. A mi familia especialmente a mis padres Nicolás y María, que gracias a su apoyo económico y moral pude culminar con mis estudios universitarios con éxito.*

*A mis hermanos Leonardo, Fabián, Patricia, Wilmer, Héctor, Octavio, Cristian, Brenda, por su apoyo y cariño, por compartir a mi lado lo bueno y malo que la vida nos ha dado.*

*A mis hermanos políticos Víctor, Rita, Ana, Verónica, Susana, y sobrinos.*

*Con mucho cariño para todos.*

***Juan Carlos Chanatasig Chicaiza.***

## **AGRADECIMIENTO**

*A la Universidad Técnica de Cotopaxi, a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por permitirme estudiar en sus aulas y ver cristalizar mi sueño.*

*A los Señores (as) docentes de la UA- CAREN, por su dedicación en la noble labor de educar a los estudiantes.*

*Al Dr. Rafael Garzón, por su invaluable contribución para la realización del presente trabajo en calidad de director de tesis.*

*A los docentes Dr. Miguel Gutiérrez, MVZ. Diego Medina y Dr. Edwin Pino por su importante colaboración, aporte en la supervisión y calificación del presente estudio.*

## **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”.

---

**Juan Carlos Chanatasig Chicaiza**

## PRELIMINARES

### Portada

Autoría.....	ii
Aval del director.....	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

## CAPITULO I

1.- FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	23
1.1.- La trucha arcoíris. ....	23
1.2.- Órganos y productos sexuales masculinos de la trucha arcoíris.....	24
1.2.1.- Testículos .....	24
1.2.2.- Fases de desarrollo testicular.....	25
1.2.2.1.- Espermatogénesis.....	25
1.2.2.2.- Espermiogénesis. ....	25
1.2.3.- Regulación Hormonal. ....	26
1.3.- Reproducción.....	26
1.3.1.- Ciclo reproductor de la trucha arcoíris.....	28
1.3.2.- Crecimiento .....	29
1.4.- Diferencia en el desarrollo corporal del macho y de la hembra. ....	29
1.4.1.- Determinación sexual.....	29
1.4.2.- Diferenciación sexual.....	30
1.5.- Generalidades del Semen de trucha arcoíris. ....	30
1.5.1.- Características físicas y químicas del semen.....	31
1.5.2.- Activación de la movilidad espermática.....	32
1.6.- Caracterización seminal. ....	33
1.7.- Características macroscópicas.....	35
1.7.1.- Volumen Seminal. ....	35

1.8.- Características microscópicas.....	35
1.8.1.- Concentración espermática.....	35
1.8.2.- Motilidad Espermática. ....	36
1.8.3.- Tiempo de activación. ....	38
1.8.4.- Viabilidad espermática.....	38
1.9.- Crioconservación del semen de peces.....	38
1.10.- Diluyentes y crioprotectores. ....	42
1.10.1.- Crioprotectores no permeables. ....	42
1.10.1.- Yema de huevo. ....	43
1.10.2.- Glucosa.....	44
1.10.3.- Leche. ....	44
1.11.- Crioprotectores permeables. ....	44
1.11.1.- Dimetilsulfóxido (DMSO).....	45
1.11.2.- Metanol (MET). ....	46
1.11.3.- Etilenglicol (ETG). ....	46
1.12.- Congelación - descongelación del semen. ....	46

## CAPÍTULO II

2.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
2.1.- Ubicación de la toma de Muestras.....	47
2.1.1.- Características del lugar experimental. ....	47
2.2.- Recursos. ....	48
2.2.1- Recursos humanos. ....	48
2.3.- Materiales. ....	48

2.3.1.- Materiales de campo. ....	48
2.3.2.- Materiales de laboratorio.....	49
2.3.3.- Materiales de oficina.....	49
2.3.4.- Material biológico.....	50
2.4.- Diseño de la investigación. ....	50
2.4.1.- Tipo de investigación. ....	50
2.4.1.1.- Investigación Exploratorio. ....	50
2.4.2.- Metodología.....	51
2.4.2.1.- No Experimental. ....	51
2.4.3.- Métodos y técnicas empleadas. ....	51
2.4.3.1.- Método deductivo. ....	51
2.4.4.- Análisis estadístico. ....	52
2.4.4.1.- Estadística Descriptiva.....	52
2.6.- Manejo del Ensayo. ....	53
2.6.1.- Variables evaluadas. ....	53
2.6.2.- Obtención de los ejemplares.....	53
2.6.3.- Extracción del semen. ....	54
2.6.4.- Evaluación seminal. ....	55
2.6.4.1.- Características Macroscópicas del semen de trucha. ....	55
2.6.5.- Adición del diluyente y crioprotector. ....	55
2.6.6.- Evaluación de la muestra seminal en el laboratorio: ....	55
2.6.6.1.- Motilidad global espermática. ....	56
2.6.6.2.- Morfología.....	56
2.6.6.3.- Mortalidad espermática. ....	57

2.6.6.4.- Concentración espermática.....	57
2.6.7.- Envasado de las muestras seminales.....	58
2.6.8.- Protocolo congelación de las pajillas a crioconservarce.....	59
2.6.9.- Descongelación de las pajillas crioconservadas.....	60
2.6.9.1.- Descongelamiento de las pajillas.....	60
2.7.- Evaluación del semen crioconservado.....	61
2.8.- Flujo grama de la crioconservación de semen de trucha arco iris.....	62

### CAPÍTULO III

3.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	63
3.1.- Volumen seminal y peso corporal.....	63
3.2.- Motilidad espermática.....	64
3.3.- Activación espermática.....	65
3.4.- Características microscópicas evaluadas.....	67
3.5.- Análisis posdescongelacion.....	68
4.- CONCLUSIONES.....	71
5.- RECOMENDACIONES.....	72
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N° 1.-</b> Reproductor de trucha hembra arcoíris. ....	27
<b>FIGURA N° 2.-</b> Reproductor de trucha macho arcoíris.....	27

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N° 1.-</b> Clasificación taxonómica de la trucha arcoíris. ....	24
<b>CUADRO N° 2.-</b> Dimorfismo Sexual En la Trucha Arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ). ....	27
<b>CUADRO N° 3.-</b> Diferenciación de las pajillas criopreservadas.....	59

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO N° 1.-</b> Volumen seminal individual con relación a su peso corporal	63
<b>GRÁFICO 2.-</b> Motilidad global espermática precongelación. ....	64
<b>GRÁFICO N° 3.-</b> Tiempo de activación espermática precongelación.....	66
<b>GRÁFICO N° 4.-</b> Concentración, motilidad y mortalidad espermática precongelación.....	67
<b>GRÁFICO N° 5.-</b> Análisis espermático posdescongelacion.....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA N° 1.-</b> Variables Evaluadas. ....	53
<b>TABLA N° 2.-</b> Rangos de temperatura para la congelación de pajuelas. ....	60
<b>TABLA N° 3.-</b> Volumen seminal individual con relación a su peso corporal. ....	63
<b>TABLA N° 4.-</b> Motilidad global espermática precongelación. ....	64
<b>TABLA N° 5.-</b> Tiempo de activación espermática precongelación.....	65
<b>TABLA N° 6.-</b> Concentración, motilidad y mortalidad espermática precongelación.....	67
<b>TABLA N° 7.-</b> Análisis espermático posdescongelacion. ....	68



## **ANEXOS**

- ANEXO N° 1.-** Instalaciones piscícolas el Madrigal.
- ANEXO N° 2.-** Equipo de trabajo en las instalaciones piscícolas el Madrigal.
- ANEXO N° 3.-** Alimentación de los ejemplares.
- ANEXO N° 4.-** Captura de los ejemplares
- ANEXO N° 5.-** Ejemplar de trucha capturado y listo para realizar la espermiación.
- ANEXO N° 6.-** Ejemplar macho de trucha arcoíris.
- ANEXO N° 7.-** Espermiación y recolección de semen de los reproductores.
- ANEXO N° 8.-** Medición de volumen seminal ml en campo.
- ANEXO N° 9.-** Transporte de las muestras seminales al laboratorio.
- ANEXO N° 10.-** Refrigeración de las muestras seminales en el laboratorio.
- ANEXO N° 11.-** Identificación de las pajuelas
- ANEXO N° 12.-** Colocación de la cámara de Neubauer a la platina del microscopio para observar la concentración espermática.
- ANEXO N° 13.-** Concentración espermática.
- ANEXO N° 14.-** Realización del frotis y flameado para observar la mortalidad.
- ANEXO N° 15.-** Llenado de pajillas
- ANEXO N° 16.-** Pajillas llenas listas para ser refrigeradas.
- ANEXO N° 17.-** Refrigeración de las pajillas para su congelación.
- ANEXO N° 18.-** Congelación de pajillas.
- ANEXO N° 19.-** Sujeción de una caña del tanque criogénico a 5 cm sobre el nivel de Nitrógeno Líquido.
- ANEXO N° 20.-** Alzando una caña para elegir las pajillas a ser descongeladas.
- ANEXO N° 21.-** Preparación de las placas petri con solución activadora de Bicarbonato de Sodio al 1%.
- ANEXO N° 22.-** Evaluación del semen crioconservado.

## RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi con el objetivo de evaluar los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) sometido al proceso de crioconservación. Se seleccionaron 5 reproductores adultos (trucha arcoíris) provenientes de la pesca deportiva el Madrigal, a los que se les extrajo semen por medio de masajes abdominales, las muestras fueron recolectadas en frascos estériles para luego ser enviadas al laboratorio y realizar su respectiva dilución, las muestras seminales se mezclaron en una relación de 1:2 con el diluyente preparado a base de 8 ml de metanol, 15 gr de leche en polvo y 100 ml agua destilada, y aplicar el protocolo de crioconservación. Para la congelación de las pajillas seminales, se estabilizó a temperatura de refrigeración de 5°C durante 2 horas, transcurrido este tiempo se colocaron las pajillas en las canastillas criogénicas, para entrar en contacto con el vapor de nitrógeno líquido a -112°C, esto se realiza manteniendo a 5 cm por encima del nivel de LN2 durante 20 minutos, pasado este tiempo se sumerge lentamente la canastilla criogénica al LN2 para su almacenaje a -196°C, y se descongeló en agua a temperatura ambiente a 12°C por 1 minuto. Las variables evaluadas pre y poscongelamiento fueron motilidad en masa, mortalidad y concentración espermática. Se utilizó la estadística descriptiva y se encontró los siguientes resultados; volúmenes seminales q oscilan de 6,6 a 7 ml con pesos corporales de 2,75 a 3,15 kilogramos, la motilidad global espermática con remolinos rápidos de 60%, y con remolinos lentos de 40%, siendo aptos para la crioconservación, el tiempo de activación espermática oscila entre 0,35 a 0,49 minutos este determina el porcentaje de motilidad espermática, las concentraciones espermáticas obtenidas fue de  $2,1 \times 10^6$  a  $3,6 \times 10^6$  por ml de semen colectado, la mortalidad pre congelación fue de 18,33 a 41,67%, mientras que poscongelación se encontró 31,67 a 58,34%, es decir que durante la descongelación existe mayor mortalidad y por ende baja la motilidad espermática. En conclusión, la calidad seminal encontrada en la trucha arcoíris es adecuada para procesos de fertilización artificial y crioconservación; sin embargo, los protocolos de congelación y post-descongelación deben aun ser ajustados para mejorar los porcentajes de motilidad espermática.

**Palabras claves:** concentración, crioconservación, motilidad, mortalidad, semen, trucha arcoíris.

## ABSTRACT

This research was conducted at the Laboratory of Reproductive Biotechnology at the Technical University of Cotopaxi in order to evaluate the macroscopic and microscopic semen parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) submitted to the cryopreservation process. five adults were selected (rainbow trout) from sport fishing Madrigal were selected, which were extracted semen through abdominal massage, the samples were collected in sterile bottles and then be sent to the laboratory and perform their respective dilution, semen samples were mixed in a ratio of 1:2 with the diluent prepared from 8 ml of methanol, 15 gr of milk powder and 100 ml distilled water, and apply the cryopreservation protocol. For freezing the semen straws, it was stabilized at refrigeration temperature of 5 ° C for 2 hours, After this time the straws were placed into cryogenic baskets to contact vapor liquid nitrogen at -112°C, This is accomplished by maintaining a 5 cm above the level of LN2 for 20 minutes after which time the cryogenic slowly submerged cage at LN2 for storage at -196°C, and thawed in water at room temperature to 12°C 1 minute. The variables were evaluated pre and post-freezing motility, sperm concentration and mortality. Descriptive statistics were used and the following results were found ; seminal volumes ranging from 6.6 to 7 ml with body weights of 2.75 to 3.15 kg , sperm motility with rapid swirls overall 60 %, and 40 % slow swirls , being suitable for cryopreservation of sperm activation time ranges from 0.35 to 0.49 minutes This determines the percentage of sperm motility , sperm concentrations obtained was  $2,1 \times 10^6$  a  $3,6 \times 10^6$  collected per ml of semen, pre-freezing mortality was 18.33 to 41.67 %, while post- freezing is found 31.67 58.34 %, there is increased mortality during defrosting and thus low sperm motility. In conclusion, the seminal quality found in rainbow trout is suitable for processes of artificial fertilization and cryopreservation; however, freezing protocols and post-thaw should even be adjusted to improve the percentage of sperm motility.

**Keywords:** concentration, cryopreservation, motility, mortality, semen, rainbow trout.

## **AVAL DE TRADUCCIÓN**

En calidad de docente del idioma inglés del Centro Cultural de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal CERTIFICO que: la traducción del resumen de tesis al idioma inglés presentado por el egresado de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; **Chanatasig Chicaiza Juan Carlos** cuyo título versa “CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI” lo realizo bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma

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

Latacunga 21 de Abril del 2015

Atentamente

  
**Lic. M.Sc. Marcia Janeth Chiluisa Chiluisa**  
C.C. 050221430-7  
**DOCENTE CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS**

## INTRODUCCIÓN

Existe un déficit en la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a nivel nacional, por lo que es necesario implementar y adaptar tecnologías empleadas en otros países, para ser más competitivos frente a la industria internacional.

Los principales problemas que enfrentan la mayor parte de explotaciones acuícolas a nivel nacional son la escasa producción de carne de trucha, deficiente conocimiento en la crianza y explotación de trucha arco iris, insuficiente conservación de gametos sexuales y la falta de impulso estatal al sector acuícola en la serranía.

La crioconservación de gametos masculinos permitirá obtener nuevas alternativas para el desarrollo acuícola a menor costo y con mejor rédito económico para el productor nacional; la crioconservación y producción de la trucha en nuestro país y a nivel de la provincia es baja por lo que la Universidad Técnica de Cotopaxi con la Carrera de Medicina Veterinaria se ven enormemente interesados en realizar este estudio.

Las nuevas técnicas de crioconservación de gametos sexuales de trucha empleando la biotecnología o manipulación genética en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) contribuirá al desarrollo y al progreso de todo el sector truchícola en general, debido a que se estará trabajando con animales que darán un máximo de rendimiento, con un menor costo de mantenimiento.. Este trabajo es un valioso aporte para el desarrollo de la industria truchícola por la que se gestionara con los organismos estatales para impulsar la producción de carne de trucha además aportaran al desarrollo de la biotecnología que ayudara a suplir las necesidades de los productores en el subsector para que puedan ser competitivas tanto en el mercado nacional como internacional.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la crioconservación de semen de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la motilidad en masa del semen de trucha arcoíris antes y después de crioconservarse.
- Establecer el porcentaje de mortalidad de los espermatozoides de semen de trucha arcoíris antes y después de crioconservarse.
- Determinar la concentración espermática del semen de trucha arcoíris antes y después de crioconservarse.

## **HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

- Se puede congelar el semen de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## **HIPÓTESIS NULA**

- No se puede congelar el semen de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## CAPITULO I

### 1.- FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

En este capítulo se describe las características anatómo-fisiológicas de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a la vez se profundiza la crioconservación de semen de trucha y las técnicas a utilizarse.

#### 1.1.- La trucha arcoíris.

Según Blanco (17), la trucha arcoíris se caracteriza por la forma fusiforme que presenta su cuerpo cubierto por finas escamas. La coloración depende del ambiente en que vive, del sexo, de la edad y del estado de maduración sexual, entre otros factores. La coloración de su dorso varía entre el castaño y el verdoso, sus flancos son de tonalidad grisácea y el vientre es de color blanco con pintas oscuras que se las aprecia esparcidas por el cuerpo y las aletas. Este pez es carnívoro y se alimenta en la naturaleza de presas vivas, como insectos, larvas, moluscos, crustáceos y pequeños peces (1).

En la actualidad esta especie se encuentra distribuida en los principales lagos y arroyos de aguas frías (alrededor de 13°C- 18°C), en alturas superiores a 1800 msnm (33).

Esta especie es un salmónido que se caracteriza por presentar cuerpo alargado, fusiforme y cabeza relativamente pequeña que termina en una boca grande puntiaguda hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas que le permiten aprisionar las presas capturadas. Su nombre genérico *Oncorhynchus spp.* Significa nariz ganchuda o belfo, característica que se acentúa más en los machos en la época de reproducción (59) (Ver cuadro 2)

**CUADRO N° 1.-** Clasificación taxonómica de la trucha arcoíris.

Phylum	Cordata
Subphylum	Vertebrata
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterygii
Súper orden	Teleosteica
Orden	Clupeiformes
Familia	Salmonidae
Subfamilia	Salmoninae
Genero	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	<i>mykiss</i>

**Fuente:** Pineda Santis H, 2004.

## **1.2.- Órganos y productos sexuales masculinos de la trucha arcoíris.**

### ***1.2.1.- Testículos***

Los testículos en los peces son internos y longitudinales. Se originan como estructuras pares y permanecen así en la mayoría de las especies. Están suspendidos por mesenterios alargados en la sección superior de la cavidad del cuerpo y se les puede localizar hacia los lados, a todo lo largo, o por debajo de la vejiga gaseosa, cuando este órgano está presente. El tamaño y color varían de acuerdo al estado de maduración de estos órganos y al grado de maduración del pez. Los testículos tienen un aspecto blanquecino, y son más lisos que los ovarios, ocupando una posición muy similar a la de estos. (75).



Se encuentra envuelto de una capa celular de tipo fibroso denominada túnica albugínea, y está compuesto de una porción intersticial y de otra porción lobular o tubular, según las especies. La porción intersticial se localiza entre los lóbulos testiculares y está compuesta por células intersticiales o células de Leydig, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. En la porción lobular o tubular se localizan las células de la línea germinal y las células somáticas o células de Sertoli. (76).

### ***1.2.2.- Fases de desarrollo testicular.***

#### ***1.2.2.1.- Espermatogénesis.***

La espermatogénesis en teleósteos tiene lugar en estructuras císticas del testículo delimitadas por las células de Sertoli. Cada ciste contiene células que parecen originarse por divisiones mitóticas a partir de una misma espermatogonia, ya que se encuentran en el mismo estadio de espermatogénesis y avanzan en su desarrollo de forma sincrónica. Generalmente, se habla de la existencia de distintos tipos de espermatogonias (espermatogonias A, B, etc.), que se diferencian por la tasa de proliferación y el estado de desarrollo. Después de experimentar una serie de divisiones mitóticas, las espermatogonias empiezan la división meiótica y se transforman en espermatoцитos. También se consideran distintos tipos de espermatoцитos según su tamaño, apariencia general y aspecto nuclear. Tras la segunda división meiótica, los espermatoцитos se transforman en espermátidas. (77; 76).

#### ***1.2.2.2.- Espermiogénesis.***

Consiste en la transformación de las espermátidas en espermatozoides. Los espermatozoides, que experimentan una serie de transformaciones morfológicas, aparecen en la luz del lóbulo testicular y viajan hacia el conducto espermático, donde adquieren su motilidad característica y la capacidad de fertilización. (77).

### ***1.2.3.- Regulación Hormonal.***

En los machos, los dos esteroides gonadales más frecuentes son 11-ketotestosterona (11KT) y la testosterona (T), y se cree que son los probables controladores de una serie de procesos que definen el desarrollo de los testículos y la espermatogénesis. En la mayoría de los teleósteos estudiados, el desarrollo testicular coincide con el aumento de los niveles circulantes de 11-ketotestosterona (11- KT) y en menor intensidad de la testosterona (T). La 11-KT es considerada como el principal andrógeno en los machos y es el producto de la transformación enzimática de la testosterona, vía 11 $\beta$ -hidroxitestosterona en las células intersticiales de Leydig. La testosterona parece ser el estimulador más efectivo de las actividades hipotalámica e hipofisiaria, con la posterior activación testicular. (74)

### **1.3.- Reproducción.**

Para su reproducción intervienen hembra y macho, es decir es sexual. Una de las principales características que presentan es que sus órganos sexuales son indiferenciados los primeros períodos de vida, de manera que no es posible determinar microscópicamente si la glándula sexual de un ejemplar es testículo u ovario, este fenómeno es conocido como gonocorismo indiferenciado, el cual lo presentan las truchas en los primeros meses de vida. Hasta luego de aproximadamente 4 meses, estos órganos no adquieren la estructura histológica funcional típica (69). Las truchas arco iris completan su maduración sexual a los 2 años de edad con un peso de alrededor de 1.000 gramos (19)

**CUADRO N° 2.- Dimorfismo Sexual En la Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).**

	<b>MACHO</b>	<b>HEMBRA</b>
Boca y mandíbula	Grande y puntiaguda	Pequeña y redondeada
Dientes	Agudos	No muy agudos
Musculatura	Dura	Suave
Abdomen	Duro	Más blanda
Poros genital	No prominente	Prominente
Color nupcial	Muy negruzco	Normal
Ancho de cuerpo	Angosta	Ancha
Forma de cuerpo	Delgada	Redondeada

**Fuente:** Manual de reproducción de la trucha arcoíris 2005.

**FIGURA N° 1.-** Reproductor de trucha hembra arcoíris.



**Fuente:** Manual de reproducción de la trucha arcoíris 2005.

**FIGURA N° 2.-** Reproductor de trucha macho arcoíris.



**Fuente:** Manual de reproducción de la trucha arcoíris 2005.

Al finalizar el primer año de vida, algunos machos se presentan maduros sexualmente, sin embargo, este proceso puede ser perjudicial para la ganancia de peso (1).

Según Bromage, Porter y Randall (15) existen varios factores ambientales que regulan la función reproductiva en los peces. Como pueden ser, el fotoperiodo y la temperatura; que son los más importantes, especialmente en salmónidos. El principal factor es el fotoperiodo, ya que es determinante de la maduración y del desove, actuando sobre el mecanismo de la pubertad, gametogénesis y ovulación. La temperatura del agua actúa como modulador, regulando la progresión del proceso reproductivo, como la liberación de los gametos, la fertilización, la embriogénesis, la diferenciación sexual, etc.

### ***1.3.1.- Ciclo reproductor de la trucha arcoíris.***

En los salmónidos los dos principales eventos del ciclo testicular son espermatogénesis y espermiación. Estos están separados por un estadio de maduración de los espermatozoos, en el cual estos sufren cambios fisiológicos. La iniciación de un nuevo ciclo de espermiación ocurre cuando los espermatozoos han sido liberados desde los testículos, esto demuestra la independencia espacial de la espermatogénesis y la espermiación (7).

A nivel industrial una de las principales ventajas obtenidas por el cultivo monosexo, es cuando los ejemplares de uno de los sexos presentan, en relación al otro, una marcada superioridad en la tasa de crecimiento. Dependiendo de la especie el uso de las técnicas de control de los sexos pueden traer otros beneficios, como: supresión de la reproducción, contención de gastos energéticos con la actividad reproductiva, uniformidad de tamaño en la cosecha, reducción de los efectos de la maduración sexual en la apariencia y en la calidad de la carne (70).

La trucha arcoíris ha sido tradicionalmente comercializada en la forma de trucha porción, con un peso aproximado de 250gramos, que puede ser alcanzado antes

del inicio de la actividad reproductiva. En los machos existen problemas, ya que una considerable proporción de ellos alcanza su madurez sexual el primero año de vida, mientras las hembras lo hacen a los dos años de edad (65).

### ***1.3.2.- Crecimiento***

Los periodos de alevinaje y post alevinaje van desde el nacimiento hasta la primera alimentación. Dichos períodos duran de 12 a 14 días en el que los alevines deben permanecer alejados de la luz. Cuando ya comienzan a nadar libremente es necesario empezar a alimentarlos de forma inmediata, en intervalos seguidos y pocas cantidades de alimento (16).

### **1.4.- Diferencia en el desarrollo corporal del macho y de la hembra.**

La maduración sexual de los peces está relacionada con modificaciones que conducen a la reducción del crecimiento y disminución de la calidad del producto, debido a la alta demanda de energía para el desarrollo gonadal. En salmónidos, estos problemas afectan más a los machos, ya que ellos alcanzan su madurez sexual al año de edad, antes de alcanzar la talla comercial, en cambio la hembra al tener desarrollo gonadal más tardío (a los dos años de edad) puede utilizar esa energía para la obtención de una mayor ganancia de peso y talla (Bastardo H, Guedez C, León M (7). Por lo tanto, la producción de poblaciones solo hembra constituye una alternativa útil para mejorar la productividad y calidad de los lotes comerciales.

#### ***1.4.1.- Determinación sexual.***

En primer lugar es importante recordar que la determinación del sexo genético ocurre al momento de la fecundación. En algunas especies de peces, entre las que se cuentan algunos salmónidos, como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el sistema de determinación del sexo genético es del tipo XX (hembra) / XY (macho) y la diferenciación de los cromosomas sexuales es suficientemente

evolucionada ya que permite el reconocimiento de estos cromosomas al examinar el cariotipo de los individuos (32).

#### ***1.4.2.- Diferenciación sexual.***

En peces teleósteos (peces óseos), la diferenciación gonadal se puede dar de muchas formas, desde el caso más común en donde los individuos desarrollan directa y finalmente solo testículos u ovarios al completar la maduración sexual, hasta casos menos comunes como es el de las especies hermafroditas que poseen tejidos gonadales funcionales tanto de hembra como de macho (31).

### **1.5.- Generalidades del Semen de trucha arcoíris.**

El estudio de las características del semen de peces comenzó en el siglo XIX. Varias características de la biología del semen de peces fueron rápidamente identificadas: la inmovilidad del espermatozoide en el semen, la corta duración de su movimiento después de su activación y la necesidad de dilución en agua para el inicio del movimiento del espermatozoide (12).

Los espermatozoides de los peces tienen una estructura simple de tipo primitivo (71). Los principales tipos de espermatozoides en peces son: espermatozoides de fertilización externa, con o sin acrosoma, uniflagelados o biflagelados (aquaspermatozoides) y espermatozoides de fertilización interna con o sin acrosoma, uniflagelados o biflagelados (introespermatozoides) (72). La forma de la cabeza del espermatozoide varía ampliamente en la mayoría de las especies de peces (10).

La carencia de acrosoma en la mayoría de los teleósteos es compensada con la presencia de micrópilo, un orificio en el corión del oocito que permite la entrada del espermatozoide (24).

La producción espermática en peces es muy alta debido al gran número de

divisiones espermatogónicas. Entre tanto es difícil observarse un verdadero análisis cuantitativo de espermatogénesis en teleósteos especialmente en aquellas en que los testículos son lobulares (10).

La gran diferencia con el esperma de los mamíferos, radica en que la secreción espermática de los peces permanece inmóvil en la gónada y al ser expulsada, su movilidad se activa cuando entra en contacto con el agua, debido a la disminución de la presión osmótica y por la disminución de las altas concentraciones de potasio existentes en la secreción testicular a este proceso se le denomina activación (9); los espermatozoides permanecen móviles por un corto periodo de tiempo, raras veces superiores a 50 segundos.

#### ***1.5.1.- Características físicas y químicas del semen.***

El semen está compuesto por el plasma seminal y por los espermatozoides. La concentración de los componentes del plasma seminal puede variar de individuo a individuo dentro de una misma especie. Cabe destacar que su función es proveer un ambiente óptimo para el almacenamiento de los espermatozoides dentro y fuera de los testículos (22).

El plasma seminal contiene principalmente compuestos minerales y bajas concentraciones de sustancias orgánicas; predominan tres iones en su composición: sodio, potasio y cloro, sus concentraciones pueden variar entre 75 a 175 mM, 32 a 86 mM y 112 a 183 mM, respectivamente (62).

Los iones de calcio y magnesio también contribuyen significativamente en la composición del plasma seminal y sus concentraciones están entre 1 a 2 mM (22). Estos iones son importantes en la regulación de la movilidad espermática, así mismo como en la osmolaridad del plasma seminal, más allá de su efecto directo en la activación espermática (12).

Hasta el momento, han sido considerados dos mecanismos que mantienen inmóviles los espermatozoides en el fluido seminal, en peces de agua dulce. El

primer mecanismo, observado en salmones principalmente, está basado en la concentración del potasio; cuando su concentración está elevada (por encima de 40 mM), la motilidad es inhibida y posteriormente activada cuando su concentración disminuye (menos de 25 mM). Y el segundo mecanismo, presente en la mayoría de las especies, está basado en la diferencia de la osmolaridad del plasma seminal con la del medio ambiente. La osmolaridad espermática, en especies de agua dulce, es inhibida cuando la osmolaridad del medio es mayor en relación con la del plasma seminal (encima de 300 mOsm.kg<sup>-1</sup>), y activada cuando la osmolaridad ambiental es menor a 200 m Osm.kg<sup>-1</sup> (22).

Estudios sobre la composición del semen también han demostrado grandes variaciones intraespecíficas e interespecíficas, principalmente en la concentración espermática y en la composición del plasma seminal. Estas variaciones han sido a factores como variables genéticas, envejecimiento de los espermatozoides en el testículo, estado reproductivo y estrategia reproductiva (56). Al respecto de la calidad de la composición del plasma seminal. Lahnsteiner *et. al.*, (42), establecen que el semen apto para la crioconservación debe contener osmolaridad elevada (encima de 320 mOsm.kg<sup>-1</sup>) y pH menor que 8.2.

### ***1.5.2.- Activación de la movilidad espermática.***

La activación de la movilidad espermática ocurre en respuesta a los cambios del medio externo, tales como: concentración de los iones, osmolaridad y pH (50).

Los espermatozoides de los teleósteos marinos y de agua dulce permanecen inmóviles en soluciones con o sin electrolitos, cuando la osmolaridad es isotónica al plasma seminal. Entretanto, cuando el semen se encuentra diluido en una solución hiposmótica, para las especies de agua dulce, e hiperosmótica para especies marinas, los espermatozoides inician su movilidad (50).



Un incremento en la osmolaridad en torno a los espermatozoides provoca aumento en las concentraciones intracelulares de potasio, y que afecta el axonema flagelar, induciendo el inicio de la movilidad del flagelo, en espermatozoides de especies marinas. También se ha observado que el volumen celular es menor cuando los espermatozoides se encuentran en soluciones hipertónicas, esto quiere decir, que el aumento de potasio intracelular ocurre en repuesta del agua de la célula. En los espermatozoides de los teleósteos de agua dulce, el volumen celular aumenta en condiciones hipertónicas y posiblemente, ocurre disminución en la concentración de potasio intracelular (47).

Cambios en la osmolaridad externa es ampliamente perjudicial en la estructura y función celular. En general la hiper e hipo osmolaridad provocan alteraciones en el tamaño de las células, aumentándolas o disminuyéndolas (50). Estas perturbaciones drásticas en la homeóstasis en las células espermáticas pueden modificar las propiedades mecánico-químicas del dispositivo móvil en el axonema flagelar conduciendo al inicio de la motilidad espermática (50).

Hasta ahora no se conoce el mecanismo por el cual el aumento o la disminución de las concentraciones intracelulares de potasio inducen la cascada de eventos que inician la motilidad espermática, en peces de agua dulce o teleósteos marinos (53).

## **1.6.- Caracterización seminal.**

En todas las especies animales, evaluar la calidad espermática es requisito indispensable para asegurar el éxito de la inseminación artificial y para monitorear los procedimientos de manipulación del material seminal, tales como su almacenamiento en fresco (29), junto con la movilidad y el tiempo de activación; la concentración espermática es una de las variable más utilizadas para determinar la calidad seminal en peces (13). La evaluación de la calidad seminal ha sido objeto de numerosos estudios y según Cruz-Casallas y Velasco- Santamaría (28) comprender las siguientes etapas:

- Obtención de la muestra de semen.
- Determinación de las características macroscópicas.
- Evaluación de las características microscópicas.
- Pruebas bioquímicas.
- Pruebas de fertilidad.

Sin embargo, en los peces, aún no han sido establecidos parámetros que permitan clasificar el potencial reproductivo de un individuo en particular, debido principalmente a que las características seminales difieren considerablemente entre las especies; luego la información disponible constituye apenas una referencia de las características seminales consideradas propias de la especie (29).

Para poder obtener éxito en el proceso de congelamiento de semen, es preciso tener un material fresco y de buena calidad, aliado a una apropiada técnica de crioconservación. La calidad del semen puede ser afectada por condiciones adversas, tanto en el proceso de espermatogénesis, almacenamiento intratesticular, así mismo por el tiempo de permanencia de los espermatozoides en los testículos (22).

Toth *et. al.* (67) y Lahnsteiner (43), resaltan la importancia de conocer las características morfológicas y funcionales de los espermatozoides, para el estudio básico de la biología reproductiva y para la producción en cautiverio de cualquier especie íctica, así mismo, como para el desarrollo de la técnica dirigida hacia la conservación de las especies nativas.

Suquet *et. al.* (62) destaca que la descripción de las características físicas y químicas del plasma seminales un prerrequisito importante en la implementación de diluyentes para la inseminación y almacenamiento de los espermatozoides.

La calidad del semen se puede evaluar en diferentes niveles de complejidad: espermatocrito, viabilidad espermática, porcentaje de movilidad espermática, intensidad de movilidad espermática, ultraestructura de los espermatozoides, composición química del plasma seminal o la capacidad de fertilización que poseen los espermatozoides (58). El objetivo es evaluar las características seminales, teniendo en cuenta, que los criterios utilizados para la evaluación de semen de los peces, hasta el momento, han sido basados en exámenes de movilidad, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (41).

## **1.7.- Características macroscópicas.**

### ***1.7.1.- Volumen Seminal.***

Se mide directamente dentro del recipiente de recolección, por lo cual se recomienda siempre utilizar un tubo aforado para recibir el semen. Esta característica se expresa en mL y su valor puede utilizarse posteriormente para calcular el número de espermatozoides presentes en la muestra, así como la cantidad de espermatozoides obtenidos por kilogramo de reproductor (29).

La cantidad de semen producida por un reproductor depende de muchos factores, incluyendo desde la especie hasta la habilidad del técnico que realiza su extracción (29).

## **1.8.- Características microscópicas.**

Las características microscópicas del semen deben determinarse dentro de las 8 horas siguientes a su recolección, ya que a medida que pasa el tiempo su calidad disminuye considerablemente, especialmente la movilidad espermática.

### ***1.8.1.- Concentración espermática.***

Varios factores pueden afectar la concentración espermática de los peces, entre

los cuales se pueden mencionar los factores ambientales y la época de la estación reproductiva. La concentración espermática es una de las medidas cuantitativas más importantes utilizadas en la investigación y la rutina de la evaluación del semen de peces de fecundación externa e interna, para maximizar el aprovechamiento del material fecundante y para así obtener mejores resultados en la fertilización (34).

Los peces producen cantidades viables de gametos. En algunas especies, el macho produce 100 billones de espermatozoides/año/kg de peso corporal o más de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/gramo de testículo/día, siendo diez veces mayor de la producción relatada en mamíferos (14). En peces teleósteos la concentración espermática puede variar de  $2 \times 10^6$  a  $6,5 \times 10^{10}$  espermatozoides por mililitro de semen, según datos obtenidos por (44).

### ***1.8.2.- Motilidad Espermática.***

El parámetro más utilizado para la evaluación seminal es la motilidad y, dentro de esta variable, las células espermáticas presentan características, como por ejemplo: el inicio, duración y parada de la motilidad (25). Sin embargo, espermatozoides infértiles también presentan algún tipo de movilidad (13).

Como característica general los espermatozoides de los peces son inmóviles e inactivos en cuanto permanezcan en la luz testicular. La movilidad ocurre en un medio acuoso o, en especies con fertilización interna, dentro del tracto reproductor femenino, sugiriendo que la movilidad es inhibida en la mayoría de las especies estudiadas, por factores químicos específicos de los testículos o del plasma seminal (Stoss, (63) y Morisawa, (48)). Los cambios en las concentraciones del plasma seminal, tales como en la concentración de iones, en el pH y en la osmolaridad, pueden despolarizar la membrana celular e inducir la movilidad o activación espermática. En algunas especies, altas concentraciones de cationes (potasio), pH ácido y condiciones isotónicas podrían ser las responsables de la inhibición de la movilidad espermática. Mientras en algunos

de estos factores, tales como la dilución de iones, variaciones de pH y el aumento de la osmolaridad en los teleósteos marinos o la disminución en teleósteos de agua dulce, activan la movilidad (Morisawa y Morisawa, (49), Cosson *et. al.*, (25).

Durante la reproducción natural, en las especies con fecundación externa, la movilidad es inducida por el simple contacto del semen con el medio acuoso. Por lo tanto, para evaluar la movilidad espermática es necesario adicionar a la muestra de semen agua o una solución hiposmótica que active el movimiento de los espermatozoides (29).

Los principales problemas limitantes de la investigación en la movilidad espermática consisten en su corta duración y la dificultad de obtener una mezcla homogénea de semen con la solución activadora en el momento del análisis (24).

Inicialmente puede estimarse el porcentaje de motilidad global o en masa, el cual consiste en observar una gota de semen inmediatamente después de adicionarle agua u otra solución activadora, la cual debe tener una osmolaridad menor a la del plasma seminal, como por ejemplo bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 1% en proporción 1:10 a 1:100 (semen : solución activadora). La solución de bicarbonato de sodio es especialmente útil para activar la movilidad espermática de semen crioconservado (28). La muestra así diluida debe observarse con objetivo de bajo aumento (máximo 10X) y la movilidad en masa se califica subjetivamente con base en la amplitud de las ondas o remolinos que despliegan las células en movimiento. Su valor puede expresarse directamente en porcentaje o en una escala de 1 a 4, donde 1=0-25%; 2=25-50%, 3=50-75% y 4=75-100% de espermatozoides móviles (62).

Lahnsteiner *et. al.*, (42) consideraba que el valor del porcentaje de movilidad debería ser exhibidos junto con el tipo de movimiento de los espermatozoides,

por ejemplo, porcentaje de espermatozoides con movimiento circular, con movimiento no lineal, porcentaje de espermatozoides con movimiento lineal y dentro de estos últimos, la velocidad de movimiento.

### ***1.8.3.- Tiempo de activación.***

La duración e intensidad de la motilidad espermática permite inferir sobre la capacidad fecundante del semen estudiado. Esta variable es evaluada junto con la motilidad, cronometrando el tiempo transcurrido desde el momento en que se adiciona al semen la solución activadora, hasta la verificación de ausencia de motilidad espermática en la muestra. La duración de la movilidad espermática varía ampliamente entre las especies de peces (29). Y coincide en general con el periodo fértil del espermatozoide. Las características químicas, así como el volumen de la solución activadora utilizada determinan la duración de la movilidad del espermatozoide. Por ejemplo, una solución de bicarbonato al 1% aumenta el tiempo de activación de espermatozoides (51).

### ***1.8.4.- Viabilidad espermática.***

Determina el porcentaje de células espermáticas muertas o con graves daños en la integridad de su membrana celular. Para el cálculo se utiliza el método de la coloración diferencial, empleando una solución de eosina y como colorante de contraste nigrosina (64), basada en que los espermatozoides muertos son permeables a los colorantes y por lo tanto aparecen coloreados en el micropreparado.

## **1.9.- Crioconservación del semen de peces.**

Investigadores han observado como ciertas formas de vida pueden vivir congeladas durante algún tiempo y luego al descongelarse continúan con sus funciones vitales normales (18). La tecnología de crioconservación (criobiología) de semen se revolucionó hace 50 años aproximadamente, por el descubrimiento

que el glicerol podía actuar como crioprotector. Esta importante observación facilitó la congelación de espermatozoides y su almacenamiento por largos periodos, para luego usarlos en programas de inseminación artificial (40). La crioconservación requiere de la deshidratación de las células, inducidas por un diluyente que debe congelarse más rápido que las células en él contenidas (39), evitando así la formación de cristales de hielo y la concentración de los solutos intracelulares, lo cual es deletéreo para la célula (38).

La crioconservación es una técnica de conservación de tejidos, células u otros materiales biológicos a muy bajas temperaturas, en la cual los materiales permanecen genéticamente estables y metabólicamente inertes (38). Además, es la rama de la criobiología (estudio de la vida a bajas temperaturas) por medio de la cual se espera prolongar indefinidamente el potencial de vitalidad y las funciones metabólicas normales de las células a temperaturas criogénicas generalmente de  $-196^{\circ}\text{C}$ , permitiendo su conservación (57). La Criobiología se refiere a la ciencia que estudia los sistemas celulares, ya que esta puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar las membranas celulares y los organelos (4).

El dramático descenso en los *stocks* naturales de peces y de la presión antrópica ejercida sobre los hábitats naturales de las especies, ha generado la creación de bancos genéticos para la conservación de sus genotipos, práctica que se ha tornado relevante para la acuicultura (Harvey, 2000). Se ha reportado la congelación de semen de aproximadamente 200 especies de peces (Rana, (56), con resultados altamente variables (13).

La disponibilidad continua de semen que ofrece la crioconservación, facilita el manejo de la asincronía reproductiva de algunas especies ícticas, en las cuales las hembras presentan maduración gonadal aun cuando los machos no se encuentran en actividad reproductiva, ya sea por inmadurez o por disminución de la calidad seminal hacia finales de su periodo reproductivo (35).

Por otra parte, el uso de semen congelado es un medio práctico para aumentar el tamaño genéticamente efectivo de las poblaciones y mantener su diversidad genética, especialmente de aquellas mantenidas en cautiverio (55). En general, los efectos benéficos de la preservación de gametos en peces teleósteos, citado por Lubzens *et. al.* (45) incluyen:

- Facilitar la selección de reproductores a través del almacenamiento de gametos de individuos genéticamente mejorados.
- Incrementa la protección sanitaria, permitiendo la introducción de nuevas líneas genéticas reduciendo el peligro de transmisión de patógenos desconocidos en los cultivos de peces (2).
- Suministro permanente de gametos para la óptima utilización de criaderos o para investigación.
- Economía para el mantenimiento de criaderos proporcionando un resguardo por pérdidas en líneas genéticas.
- Facilidad de transporte de material genético entre criaderos realizando protección genética con gametos y embriones crioconservados.

Por otro lado se sabe que el daño a las células espermáticas crioconservadas es inducido por la formación de hielo, lo cual ocurre más frecuentemente durante la descongelación que durante la congelación. También es conocido que a menor velocidad de descongelación, la formación de pequeños cristales de hielo es más común. Sin embargo, células de algunas especies pueden tolerar una mayor gama de velocidad de descongelación que otras (14).

Los efectos perjudiciales del hielo intracelular, se deben al aumento del volumen del agua al congelarse, a la recristalización durante el descongelamiento y al estrés osmótico celular, al fundirse el hielo intracelular. Sin embargo, cuando una suspensión de células se enfría por debajo de 0°C, se forman cristales de hielo extracelulares lo cual hace que los solutos se concentren en el agua líquida restante.



De este modo, la membrana celular actúa como una barrera impidiendo la diseminación de los cristales de hielo hacia los compartimentos intracelulares (38).

Los procedimientos de crioconservación para semen de peces incluye la dilución del semen en un diluyente, un periodo corto de equilibrio, congelación del semen diluido, almacenamiento en nitrógeno líquido y descongelación en soluciones apropiadas (19).

La calidad del semen es también crítica para el éxito de la crioconservación (12). Las muestras de semen contaminadas con orina, materia fecal o bilis, y almacenadas por periodos prolongados antes de la congelación, son más difíciles de crioconservar (56).

En el proceso de la crioconservación usualmente se producen daños en un gran número de espermatozoides. Por consiguiente, sólo una pequeña fracción de espermatozoides es viable después de los procesos de congelación y descongelación. Por esta razón, se requiere de mayor cantidad de semen crioconservado que de semen fresco (alrededor de 10 veces) para fertilizar un número igual de oocitos (12).

Según Medina-Robles *et. al.* (46) se busca que los diluyentes utilizados en la crioconservación de células espermáticas deben cumplir las siguientes condiciones:

- Ser isotónica en el plasma seminal cuando es utilizado en refrigeración para no producir cambios iónicos membranales y la consecuente activación espermática.
- Tener capacidad tampón con el fin de mantener el pH cerca de la neutralidad.
- Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.
- Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se pueden

utilizar antibióticos en su composición, siendo los más utilizados penicilina G-sódica y sulfato de dihidro-estreptomicina.

- Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples seminaciones.
- Contener moléculas que protejan a los espermatozoides contra el frío, clasificada en función de su capacidad de atravesar la membrana plasmática en sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.

La causa de pérdida de la movilidad y mayor mortalidad espermática durante la crioconservación se debe al aumento en la concentración de sales, formación de cristales de hielo en el interior del espermatozoide, cambios en el pH, desnaturalización de proteínas, aumento del tamaño de la mitocondria y rotura mecánica de elementos estructurales, durante el proceso del cambio de estado (68).

### **1.10.- Diluyentes y crioprotectores.**

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen de peces, con los cuales se busca prolongar la viabilidad de la célula espermática por un período corto de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación) y aumentar el número de dosis inseminantes de un reproductor; además proteger el esperma de la acción tóxica de agentes extraños y de los cambios bruscos de temperatura (23).

#### ***1.10.1.- Crioprotectores no permeables.***

Son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática de los espermatozoides protegiendo su estructura de la acción del frío. No atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular, además, previene el choque osmótico por medio del control de la

rehidratación intracelular durante la descongelación (46).

Los compuestos que no atraviesan la membrana celular o extracelular, entre los cuales se encuentran azúcares como la glucosa o sacarosa; proteínas y glicoproteínas como las contenidas en la yema de huevo, su función es la de cubrir la superficie de la célula estabilizando su membrana, e interactuando con los crioprotectores que se traspasan la membrana celular, para inhibir el punto de congelación y aumentar la temperatura de transición del estado de líquido a sólido de los cristales de hielo (60).

#### ***1.10.1.- Yema de huevo.***

Los huevos han de ser frescos, no transcurrido más de cuatro días desde la postura hasta el momento de su utilización. La incorporación de la yema se realiza sobre el volumen final del diluyente base homogenizándose adecuadamente. Para eliminar las partículas gruesas se realiza centrifugación del diluyente. La yema de huevo posee acción termo protectora, la cual es ejercida por la fracción lipídica compuesta por la lecitina y cefalina y una acción conservadora, dada por la acción de la lipoproteína (57).

La adición de la yema de huevo como estabilizador de la membrana fue investigado por Cabrita *et. al.*, (20), quienes observaron que esta proporcionó una mayor supervivencia post-descongelación. Otros estudios demuestran que la adición de huevo de gallina a la muestra congelada protege la membrana de la célula espermática durante los procesos de congelación y mejora significativamente los porcentajes de fertilización post-descongelación (5)

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo, se adhieren a las membranas celulares durante la congelación y descongelación, han sido consideradas como el principal factor crioprotector en la crioconservación de espermatozoides en mamíferos (6).

### ***1.10.2.- Glucosa.***

Los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido al aporte energético al espermatozoide, ya que estos son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa, esta última por la vía oxidativa; y su acción como crioprotectores contribuye a mantener el equilibrio osmótico. Tal como menciona Ramos (57), quien reafirma que los azúcares (fructosa y glucosa) suministran energía a los espermatozoides en los procesos vitales y aportan sustitutos de electrolitos para el mantenimiento de la presión osmótica.

### ***1.10.3.- Leche.***

Es muy utilizada la leche en polvo, a cual también ejerce un efecto termoprotector y proporciona nutrientes a los espermatozoides. El uso de la leche mejora la visibilidad de la movilidad espermática, lo cual no es posible en la leche entera, debido a la presencia de glóbulos de grasa (8).

### ***1.11.- Crioprotectores permeables.***

La elección del crioprotector ha sido asunto de ensayo y error en la mayoría de las investigaciones, quizá porque aún no existe una explicación satisfactoria para la acción de los mismos sobre la célula espermática Holt, (40). Aunque Shlafer (60) afirma que los crioprotectores permeables como el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol (MET) son extensamente usados para disminuir el punto de congelación del medio extracelular, minimizando los efectos deletéreos de los cristales de hielo y regulando la tasa de deshidratación celular. Estas sustancias protegen los espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación, por su alta solubilidad en el agua, lo cual permite la formación de enlaces de hidrógeno y agua, permitiendo mantenerse en solución a temperaturas en que se forman los primeros cristales de hielo; esta propiedad altera las condiciones físicas del hielo y las soluciones que rodean la células, favoreciendo la

sobrevivencia celular al disminuir los daños electrolíticos causados en la membrana celular por la mayor concentración de iones en la fase líquida (37).

Medina-Robles *et. al.*, (46) aclara que los crioprotectores permeables son aquellos que penetran al interior de la célula, evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos de medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en su interior. Son sustancias que poseen un bajo peso molecular y se destacan por su amplia utilización el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2 propanodiol, butenediol, acetamina, propilenglicol, etilenglicol (ETG), metanol (MET) y etanol.

Sin embargo, la exposición del espermatozoide a los crioprotectores por tiempos prolongados, y a altas concentraciones puede causar desnaturalización de las proteínas celulares (60).

#### ***1.11.1.- Dimetilsulfóxido (DMSO).***

El DMSO ha sido muy utilizado en el estudio de congelación de semen, en los cuales se reporta la observación de efectos positivos en la descongelación del semen (52); además, ha demostrado ser el crioprotector de elección en la conservación de semen en salmónidos usado a concentraciones de 5 a 15% (73).

La interacción del DMSO con la célula puede tener diferentes mecanismos y se ha sugerido que existe una interacción electrostática entre el grupo sulfóxido polar del DMSO y la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática (3).

En estudios realizados por Yao *et. al.*, (68), estos investigadores mencionan que el DMSO fue esencial para evitar la muerte del semen durante la crioconservación, utilizándolo al 20%, mostró la más alta movilidad (20-25%) después de la descongelación, además se demostró que la inseminación artificial *in vitro* de óvulos frescos con semen crioconservado produjo una fertilidad del

33% vs 48% con semen fresco.

### ***1.11.2.- Metanol (MET).***

El metanol suele ser menos tóxico en unas especies que en otras y su efecto suele ser atribuido a su capacidad de salir y entrar más rápidamente de la célula que otros crioprotectores, lo cual podría conducir a un menor daño de la membrana espermática por formación de cristales de hielo (66).

### ***1.11.3.- Etilenglicol (ETG).***

En los trabajos realizados con etilenglicol se evidencia que dentro de los crioprotectores evaluado (DMSO, glicerol, ETG), el ETG presenta un mayor efecto protector para la preservación del acrosoma (30), lo cual no es relevante para la crioconservación de semen de peces, ya que esta estructura está ausente en el espermatozoide de la mayoría de las especies.

## **1.12.- Congelación - descongelación del semen.**

Durante el proceso de congelación es necesario proceder con tiempos rápidos para que el choque térmico sea mínimo, pero al mismo tiempo no puede ser exageradamente rápido, esto es requerido para permitir la formación de cristales de hielo intracelular. Asimismo se recomienda que el semen crioconservado se descongele lo más rápidamente posible para evitar la recristalización del agua intracelular (36).

Las pajuelas son descongeladas normalmente por inmersión a baño María. Al ser retirada la pajuela del tanque de nitrógeno líquido, debe ser agitada en baño María por pocos segundos, para que se descongele uniformemente. Con pajuelas de más volumen este proceso se hace más difícil, ya que la descongelación no es uniforme y la superficie se descongela más rápido que la porción céntrica (27).

## CAPÍTULO II

### 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

En el segundo capítulo se detalla la metodología utilizada en la investigación, características y ubicación del lugar donde se realizó el experimento.

#### *2.1.- Ubicación de la toma de Muestras.*

**País:** Ecuador.

**Provincia:** Cotopaxi.

**Cantón:** Latacunga.

**Parroquia:** San Buenaventura

**Barrio:** Bellavista

**Sector:** Santo Domingo

**Nombre de la explotación Piscícola:** “El Madrigal”

➤ **Coordenadas geográficas**

**Altitud:** 2805 msnm.

**Latitud:** 0° 53' 54.26" S

**Longitud:** 78° 37' 32.95" W

#### *2.1.1.- Características del lugar experimental.*

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Técnica de Cotopaxi, en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (UACAREN), en la Carrera de Medicina Veterinaria, en el Laboratorio de Reproducción Animal.

**Provincia:** Cotopaxi.

**Cantón:** Latacunga

**Parroquia:** Eloy Alfaro.

**Barrio:** Salache Bajo.

➤ **Coordenadas geográficas.**

**Latitud:** 00° 59'47.68"S

**Longitud:** 78° 31'9.16"W.

**Altitud:** 2757.591 m.s.n.m.

• **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 2005.

## **2.2.- Recursos.**

### **2.2.1- Recursos humanos.**

- Tesista: Chanatasig Chicaiza Juan Carlos
- Transporte: la movilización se lo realizo en transporte propio y de alquiler.

## **2.3.- Materiales.**

### **2.3.1- Materiales de campo.**

- Instalaciones acuícolas.
- Chinchorro.
- Frascos de recolección.
- Valdés.
- Atrarraya.
- Overol.



- Contenedores para transporte de material biológico.

### ***2.3.2.- Materiales de laboratorio.***

- Metanol al 8 % como crioprotector.
- Agua destilada.
- Leche en polvo, para el aporte de nutrientes necesarios para los espermatozoides.
- Microscopio.
- Balanza gravimétrica.
- Jeringuillas de 5, 10 ml.
- Bicarbonato de sodio disuelto al 1%.
- Frascos estériles para transporte de muestras.
- Cámara de Neubauer y cubreobjetos (para conteo de Esperma).
- Portaobjetos.
- Pipetas.
- Termo de nitrógeno líquido.
- Tinta china (para tinción y observación de la mortalidad de los espermatozoides).
- Cámara de flujo laminar.
- Pajillas de 0.5 ml.

### ***2.3.3.- Materiales de oficina.***

- Papelería.
- Computadora.
- Flash memory.
- Bolígrafos.
- Lápiz.
- Libreta de apuntes.
- Corrector.
- Borrador.
- Cámara de Fotos.

- Material bibliográfico.
- Internet.

#### ***2.3.4.- Material biológico.***

Semen de trucha arco iris recolectado de reproductores provenientes de la Piscícola el “Madrigal”.

### **2.4.- Diseño de la investigación.**

#### ***2.4.1.- Tipo de investigación.***

##### ***2.4.1.1.- Investigación Exploratorio.***

Esta investigación tiene carácter exploratorio, pues representa uno de los primeros acercamientos al fenómeno de la congelación y crioconservación de semen de trucha arcoíris, en cuanto a su forma de representación e identificación de los parámetros de las características macro y microscópicas relacionados a su semen. A través de este, se intenta generar un conocimiento que permita un incremento en las investigaciones en el tema, y además construir una alternativa para el mejoramiento acuícola y proliferación de la especie en cautiverio.

Por otra parte, la investigación sigue una lógica descriptiva, pues se busca especificar las propiedades importantes sobre la congelación de semen que está sometido a este análisis. En base a esto se describieron las situaciones que se constituyeron como más sobresalientes en la realización de este estudio, tomando principal interés en la congelación y crioconservación de semen de trucha arcoíris, que mediante sus argumentos proveen el elemento fundamental para el análisis.

## ***2.4.2.- Metodología.***

### ***2.4.2.1.- No Experimental.***

La metodología utilizada en este ensayo es no experimental, ya que se observó los fenómenos como tal y como se presentó en su medio natural para después analizarlos. Durante la toma de muestras seminales de trucha arcoíris, se observó en su ambiente natural a cada uno de los ejemplares y se dio masajes abdominales a los ejemplares, y se consiguió las muestras seminales, el semen se midió directamente en jeringuillas de 20 ml y se observó sus características macroscópicas para luego ser enviada al laboratorio y analizar sus características microscópicas pre y poscongelación, dando así datos únicos para el ensayo y los mismos se interpretó en tablas y gráficos.

Por tal motivo se aplicó un protocolo de congelación de semen de trucha arcoíris y se observó los resultados obtenidos, la viabilidad posdescongelación de cada muestra seminal evaluada con este protocolo aplicado, se planteó alternativas para la conservación de germoplasma de dichos peces de agua dulce.

Por lo cual se diseñó tal protocolo de congelación, con dichas especificaciones y observar resultados para generar información para estudios futuros y su aplicación en el cultivo de trucha arcoíris, sirviendo de forma innovadora al cultivo tradicional.

### ***2.4.3.- Métodos y técnicas empleadas.***

#### ***2.4.3.1.- Método deductivo.***

Este método servirá para detallar las experiencias y destrezas adquiridas dentro de la parte experimental de la tesis. Mediante el método deductivo se planteará la elaboración de un protocolo para crioconservar semen de trucha arcoíris, utilizando metanol al 8% y leche en polvo como crioprotectores, de la misma

forma que se empleara parámetros controlados de descensos de temperatura sin variabilidades para lograr nuestra meta.

Luego se deducirá que alcanzamos crioconservar el semen de trucha arcoíris utilizando metanol al 8 % como crioprotector y el aporte de nutrientes proporcionado por la leche en polvo. Este método se usó al analizar los resultados obtenidos y compararlos con la hipótesis planteada

#### ***2.4.4.- Análisis estadístico.***

##### ***2.4.4.1.- Estadística Descriptiva***

En esta investigación se utilizó la estadística descriptiva de datos, ofreciendo modos de presentar y evaluar las características principales de los efectos que se obtuvo en el desarrollo del ensayo, con el fin de construir y apreciar los resultados e identificar los datos sobresalientes través de tablas y gráficos. Este análisis de interpretación de resultados es para ayudar a la toma de decisiones o para manifestar los condicionantes que determinan la ocurrencia de algún fenómeno.

Los datos que se consiguió en esta investigación, son descritos por el valor porcentual que se logró durante el análisis microscópico de cada muestra seminal, estos resultados se representó en tablas y gráficos, y se ejecutó sus respectivos análisis y discusión de resultados.

#### **2.5.- Unidad de Estudio.**

Para la siguiente investigación se trabajó con 5 machos adultos de trucha arcoíris de los cuales se extrajo el semen de cada reproductor obteniendo muestras seminales con diferente volumen, las muestras obtenidas fueron recolectadas en frascos estériles, refrigeradas y llevadas al laboratorio para diluir y aplicar el protocolo crioconservación.

## 2.6.- Manejo del Ensayo.

### 2.6.1.- Variables evaluadas.

**TABLA N° 1.-** Variables Evaluadas.

<b>VARIABLES INDEPENDIENTE</b>	<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>	<b>INDICADORES</b>
Semen de trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) diluyente utilizado (leche en polvo, metanol, agua destilada)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Motilidad espermática antes y después de crioconservarse.</li><li>➤ Mortalidad espermática antes y después de crioconservarse.</li><li>➤ Concentración espermática antes y después de crioconservarse.</li></ul>	<p style="text-align: center;">%.  %  # Espermatozoides por ml.</p>

**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza.

### 2.6.2.- Obtención de los ejemplares.

Se consiguió 5 truchas machos reproductores de la especie *Oncorhynchus mykiss*, provenientes de la Piscicultura “El Madrigal” perteneciente a la Pesca Deportiva “El Madrigal” ubicado en la Parroquia de San Buenaventura, barrio Bellavista, sector Santo Domingo, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi.

Con la finalidad de evitar estrés entre ellos y tenerlos confortables, se separaron de las pozas de reproductores a pozas más pequeñas para facilitar su manejo, y se

trató de mantenerlos bajo las mismas condiciones de temperatura, alimento y sanidad.

Se proporcionó la misma cantidad de alimento balanceado (piscis) con una cantidad de proteína 32.00%, grasa 6.00%, humedad máxima 13.00%, fibra máxima 6.00%, cenizas 10.00%, NNP 0.10%, en la mañana (8:00 a.m.) y en la tarde (3:00 p.m.), para la extracción del semen, los ejemplares se mantuvieron sin alimento un día antes de la extracción, para limpiar sus estómagos y evitar que se contaminaran las muestras seminales con heces.

### **2.6.3.- Extracción del semen.**

Para la extracción de semen se utilizó machos maduros de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), provenientes de la Piscicultura “El Madrigal” perteneciente a la Pesca Deportiva “El Madrigal” ubicado en la Parroquia de San Buenaventura, barrio Bellavista, sector Santo Domingo, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi.

Antes de la extracción, los peces fueron seleccionados y aislados de las pozas de reproductores a pozas más pequeñas durante 24 horas para facilitar su manejo. A los ejemplares se tomó con una red individual y se envolvió con un pedazo de tela húmeda dejando libre la región abdominal se sujetó firmemente para que las aletas no se lesionen por un mal manejo ya que no se utilizó anestésicos, procediendo posteriormente a vaciar la vejiga urinaria, se localizó el poro genital y se colocó un recipiente plástico estéril con capacidad de 100 ml de volumen para colectar la muestra, se comenzó a dar masajes abdominales con ligeras presiones para no lastimar a los ejemplares.

La muestra es homogénea, y de coloración cremosa y blanco lechoso espeso. Aquí se observó las características macroscópicas.

## **2.6.4.- Evaluación seminal.**

### ***2.6.4.1.- Características Macroscópicas del semen de trucha.***

**Volumen:** el volumen seminal fue medido en jeringuillas de 10 ml y de cada trucha macho se obtuvo los siguientes resultados (Ver tabla 6).

**Coloración:** el semen recolectado es homogénea, cremoso y blanco lechoso para todas las 5 muestras tomadas.

Finalmente se guardaron las muestras dentro de un contenedor térmico con hielo (cooler), el mismo día fueron trasladadas al Laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, para luego procesar las muestras y mezclar con el diluyente previamente preparado y se realizó los análisis macroscópicos y microscópicos.

### ***2.6.5.- Adición del diluyente y crioprotector.***

En el laboratorio, el semen fue diluido en una proporción 1:2 (semen: diluyente espermático), el diluyente fue preparado a base de 15 gr de leche en polvo, 8 ml de metanol, 100 ml de agua destilada, y diluimos por cada ml de semen recolectado se le agrego 2 ml de diluyente obteniendo volúmenes seminales para cada muestra espermática.

### ***2.6.6.- Evaluación de la muestra seminal en el laboratorio:***

En el laboratorio se evaluaron la movilidad, mortalidad y concentración espermática.

Todos los procedimientos fueron realizados a temperatura de refrigeración y ambiente.

#### **2.6.6.1.- Motilidad global espermática.**

Este es el parámetro más utilizado para la evaluación seminal, dentro de esta variable las células espermáticas presentan características tales como: el inicio, duración y suspensión de la motilidad, para determinar la motilidad espermática es necesario adicionar a la muestra de semen soluciones hiposmóticas que active el movimiento de los espermatozoides.

Para la motilidad se tomó con una pipeta desechable una gota de semen y se colocó en un portaobjetos se le adiciono una gota de solución activadora “bicarbonato de sodio al 1%”, se le puso un cubreobjetos y se montan en el microscopio electrónico, observándose a 40X ubicando bien el área de observación. Para determinar esta prueba se cronometró el inicio de la observación, hasta el decremento de la actividad móvil de los espermatozoides en un 90% aproximadamente. Ese fue el tiempo de motilidad que nos interesó. El Movimiento en masa se calificó en 4 categorías estimadas para las 5 muestras seminales y se determinó las siguientes calificaciones para cada muestra seminal en base al tiempo de activación. (Ver tabla 7)

#### **2.6.6.2.- Morfología.**

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad in vivo.

Para observar la morfología se colocó una gota de la muestra en el medio del portaobjetos y en cada muestra se colocó una gota de tinta china, se dejó en reposo la muestra y finalmente observo la estructura de los espermatozoides.



#### **2.6.6.3.- Mortalidad espermática.**

Para la determinación de la mortalidad espermática se utilizó un cubreobjetos, en este se puso una gota de la muestra seminal y una gota de tinta china (azul), se realizó el respectivo frotis y se flameo con un a vela por 30 segundos, para luego observar en el microscopio con lente de 40x.

Mediante la manipulación del macro y micrométrico del microscopio se observó los espermatozoides muertos, estos se tiñen porque la membrana se vuelve permeable y absorbe el color del reactivo utilizado a la vez que aumentan el tamaño de la célula espermática, mientras que los que no se tiñen son células espermáticas vivas y conservan su morfología y alta viabilidad.

#### **2.6.6.4.- Concentración espermática**

Para la valoración de la concentración espermática se basa en contar el número de células espermáticas por unidad de volumen y se expresa en millones de espermatozoides por mililitro (mL). Su determinación se realizó dentro de las 2 horas siguientes a la colección del semen, previamente se hizo una dilución de 1:2.

Posteriormente una gota de semen diluido fue colocada en la cámara de Neubauer. La cámara fue mantenida en reposo durante 10 minutos para permitir que los espermatozoides se ubiquen en los cuadrantes de la cámara de Neubauer; luego se observó al microscopio con un aumento de 40X y se realizó el recuento de las células espermáticas colocadas en cinco cuadros de cada una de las cuadrículas, estos 5 cuadrados se sumó el resultado de las cuadrículas y se sacó el promedio. Para cada muestra se realizó el conteo en las 5 cuadrículas de la cámara y se utilizó el promedio para los cálculos posteriores. Una vez contados los espermatozoides, la concentración espermática fue calculada aplicando las siguientes fórmulas:

Fórmula para el conteo de los espermatozoides.

$$SC = C1 + C2 = R / 2 = X$$

Dónde:

**SC**= suma de cuadrículas

**C1**= cuadrícula 1

**C2**= cuadrícula 2

**R**= respuesta

**X**= promedio

Fórmula para la determinación de la concentración espermática.

$$C.E. = \frac{n}{A \times P \times D}$$

Dónde:

n: número promedio de espermatozoides contados en los cinco sub-cuadros de las dos cuadrículas.

P: profundidad de la cámara (0.1 mm).

A: área de la cámara de Neubauer contada (generalmente 0.2 mm<sup>2</sup>).

D: dilución del semen (en este caso 1:2).

### ***2.6.7.- Envasado de las muestras seminales.***

Se utilizó pajillas criogénicas de 0,5 ml, se identificó con un código para diferenciarlas y para ello se utilizó marcador de cd. Estas pajillas por un extremo presentan un tapón de fibra sintética de color blanco, que se distingue claramente, es por este extremo donde se succionó manualmente el semen diluido dejando un espacio de aire para su sellado con bolillas y plastilina para su identificación de cada reproductor, luego se procedió a dejar en reposo por 2 horas a refrigeración transcurrido este tiempo se aplicó el protocolo de congelación de pajuelas. Se congeló 4 pajillas de 0,5 de cada reproductor.

Se selló el extremo libre de las 20 pajillas con plastilina de diferente color para diferenciarlas de los 5 reproductores.

**CUADRO N° 3.-** Diferenciación de las pajillas crioconservadas.

<b>Pajillas crioconservadas</b>	<b>Color de la plastilina para el sellado de la pajilla</b>
1	Blanco
2	Azul
3	Amarillo
4	Tomate
5	Verde

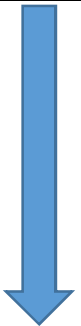
**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

### ***2.6.8.- Protocolo congelación de las pajillas a crioconservarce.***

Una vez que las pajillas se sellaron, se estabilizo a una temperatura de refrigeración de 5°C durante 2 horas en el refrigerador transcurrido este tiempo, se colocaron las pajillas en las canastillas del contenedor criogénico, para que entraran en contacto con el vapor de nitrógeno a -112°C, procurando no tocarlo directamente; esto se logró manteniendo la canastilla a aproximadamente 5 centímetros arriba del nivel del nitrógeno, durante 20 minutos. Pasados los 20 minutos se sumergió lentamente la caña que contenía las pajillas para su almacenaje a -196°C y se cerró el termo criogénico.

**TABLA N° 2.-** Rangos de temperatura para la congelación de pajuelas.

<b>Rangos de temperatura</b>	<b>Tiempo estimado para alcanzar la temperatura °C idónea.</b>	<b>Características de la temperatura</b>	
	5°C	2 horas	Refrigeración
	-112°C	20 minutos	Vapores de nitrógeno líquido LN2
	-196°C	Almacenaje	Nitrógeno líquido LN2

**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

### ***2.6.9.- Descongelación de las pajillas crioconservadas.***

Posterior a la congelación se descongeló las pajuelas a las 24 horas.

#### ***2.6.9.1.- Descongelamiento de las pajillas.***

Para la descongelación de las pajillas se utilizó agua a temperatura ambiente por 1 minuto, la temperatura para descongelar fue de 12°C. Al mismo tiempo en una caja petri, se colocó solución activadora de bicarbonato de sodio al 1% preparado a una temperatura ambiente, en donde se drenaran las pajillas.

Se extrajo del termo de nitrógeno líquido (LN2) la canastilla que contienen las pajillas a descongelar, se toma una pajilla de cada reproductor para su descongelación. Inmediatamente se sumergen en el agua, cronometrándose 1 minuto exactamente. Se sacaron las pajillas para drenarse en una caja Petri que contenía la solución activadora.

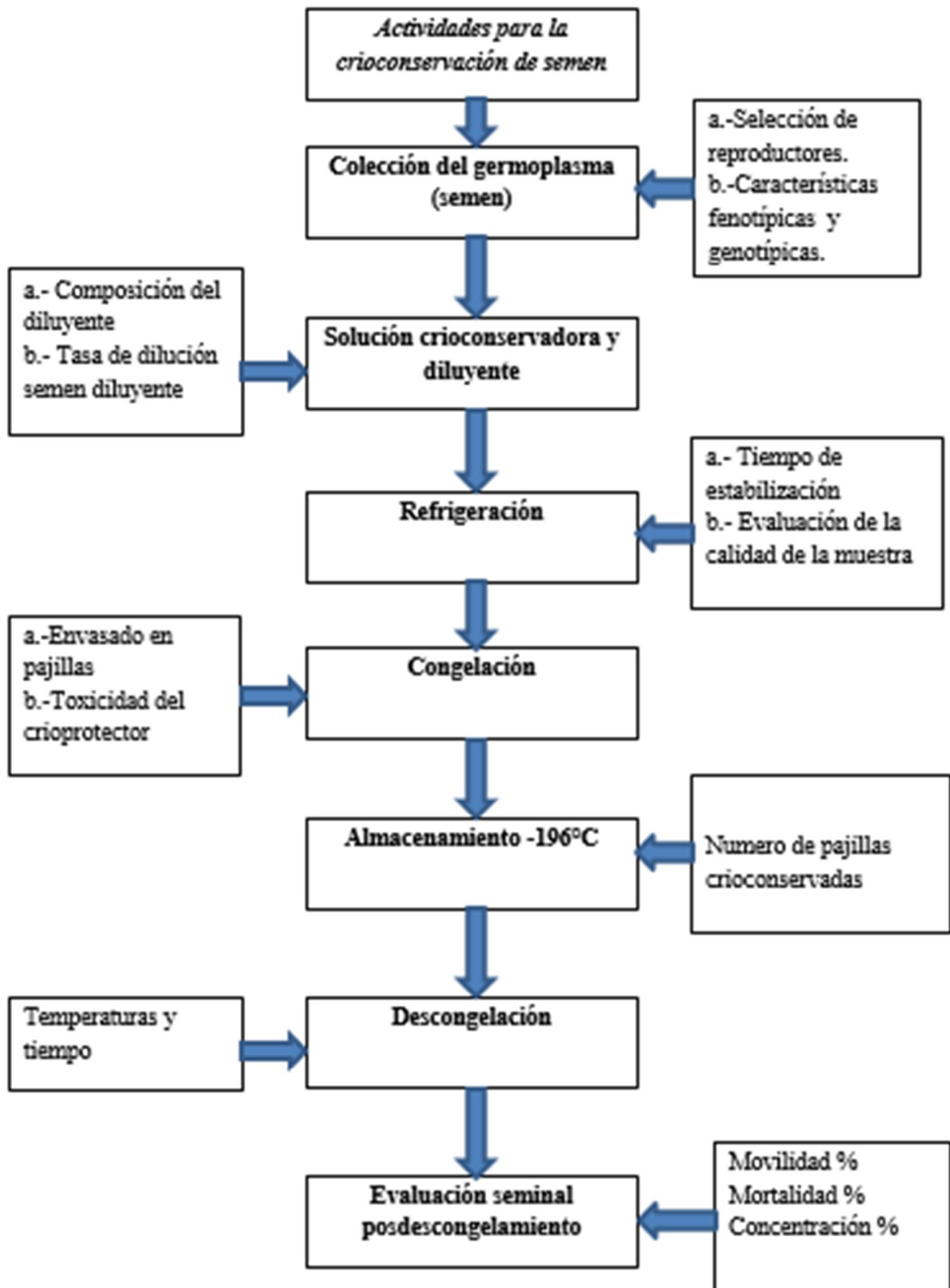
Se sostienen las pajillas en el extremo que contiene el tapón. Con unas tijeras se cortaron los extremos sellados de la parte inferior de las mismas pajillas, que por el vacío existente en ellas "no drenaron", solo hasta que se cortaron los extremos superiores. Se drenó el contenido en la solución activadora de bicarbonato de sodio al 1%.

### ***2.7.- Evaluación del semen crioconservado.***

En esta parte se hizo una evaluación final al semen descongelado. Se toma una muestra con una pipeta y se repite el procedimiento de observación al microscopio a 40 X. Se evalúa la motilidad y el porcentaje de sobrevivencia.

La prueba de sobrevivencia del semen, es una prueba objetiva en la que se calculó de forma aproximada el porcentaje de células vivas (con motilidad) y las muertas (inmóviles).

**2.8.- Flujo grama de la crioconservación de semen de trucha arco iris.**



Fuente: Directa.

Elaborado por: Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

## CAPÍTULO III

### 3.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se analiza los resultados obtenidos de la investigación, que son expresados mediante tablas y gráficos para su fácil interpretación.

#### 3.1.- Volumen seminal y peso corporal.

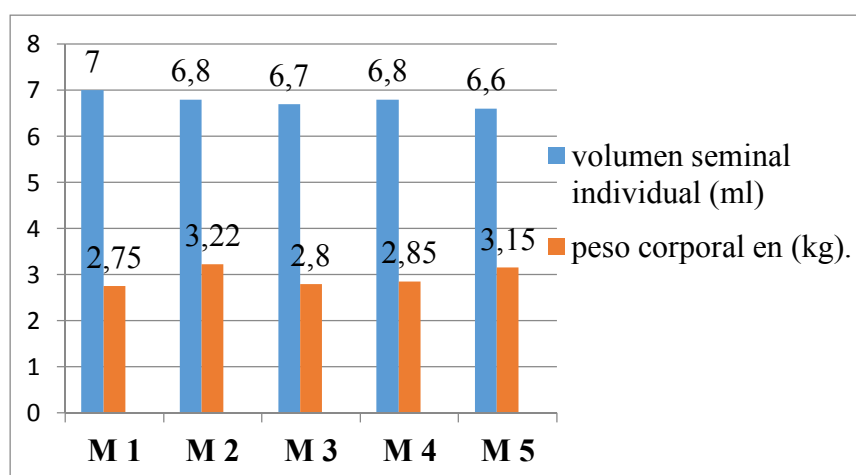
**TABLA N° 3.-** Volumen seminal individual con relación a su peso corporal.

Muestras	Volumen ml	Peso en kilogramos (kg) de cada reproductor
1	7	2.75 kg.
2	6,8	3.22 kg.
3	6,7	2.8 kg.
4	6,8	2.85 kg.
5	6,6	3,15 kg.
<b>Total</b>	<b>33.9 ml</b>	<b>14.77 kg.</b>

Fuente: Directa.

Elaborado por: Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

**GRÁFICO N° 1.-** Volumen seminal individual con relación a su peso corporal.



Fuente: Directa.

Elaborado por: Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

De acuerdo a la TABLA N° 3, GRÁFICO N° 1, se muestra la relación entre el eyaculado y el peso de las truchas arcoíris en la que se evidenció los volúmenes seminales que oscilan entre 6,6 a 7 ml (promedio 6,7 ml), y sus pesos corporales oscilan entre 2,75 a 3,15 kilogramos (promedio 2,95 kilogramos), según Bastardo *et al.* (2004), dice que el volumen encontrado en truchas machos de tres años es de 10 a 13 ml, además encontró que los machos jóvenes (dos años), presentan un volumen de semen significativamente más bajo que los de tres, cuatro y cinco años. Estos rangos son mucho más superiores a los que se encontró durante el desarrollo de esta investigación, estas grandes diferencias entre volúmenes seminales son debido a que hubo inexperiencia durante la extracción o el estrés provocado a los reproductores durante la espermiación, según Guarnizo (2007), la edad es un factor determinante en los volúmenes de producción de gametos masculinos, por lo que se determinó que las muestras evaluadas son provenientes de machos jóvenes.

### 3.2.- Motilidad espermática.

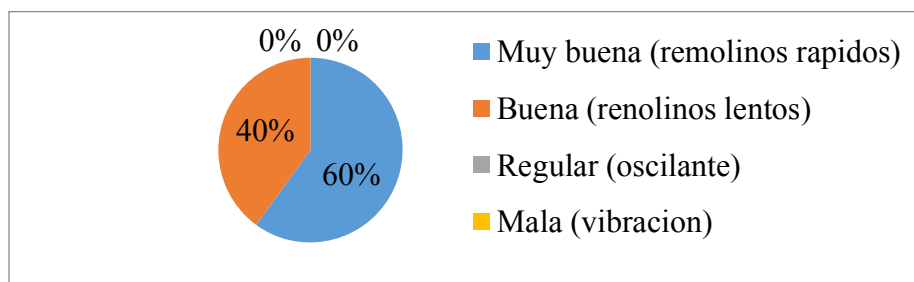
TABLA N° 4.- Motilidad global espermática precongelación.

Calificación	Movimiento en masa	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5
Muy buena (75-100%)	Remolinos rápidos	■	□	■	■	□
Buena (50-75%)	Remolinos lentos	□	■	□	□	■
Regular (25-50%)	Oscilante	□	□	□	□	□
Mala (00-25%)	Vibración	□	□	□	□	□

Fuente: Directa.

Elaborado por: Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

GRÁFICO 2.- Motilidad global espermática precongelación.



Fuente: Directa.

Elaborado por: Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.



En la TABLA N° 4, GRÁFICO N° 2, se muestra la motilidad global espermática que se obtuvo en el desarrollo del experimento, es así que se observó en el microscopio electrónico y se determinó que tres muestras seminales son de muy buena calidad, esto demostró que las muestras con motilidad que presentan remolinos rápidos tiene un porcentaje de 75 a 100%, y representa el 60% de la motilidad global ; además hay dos muestras seminales buenas, que presentan remolinos lentos y tienen un porcentaje de 50 a 75%, y representa el 40%, siendo aptos para crioconservarse, durante la observación y calificación espermática no se encontraron muestras seminales regulares con movimientos oscilantes y malas con movimientos vibratorios representando un 0%. Según Linhart (1995), señala que la presión osmótica, concentración de potasio y sacarosa y un pH menor a 7 del plasma seminal, son los principales factores que inhiben la motilidad en salmónidos. Esto indicó que la motilidad que se obtuvo en este ensayo tiene las características idóneas por las que no se encontró inhibición de la motilidad global.

### 3.3.- Activación espermática.

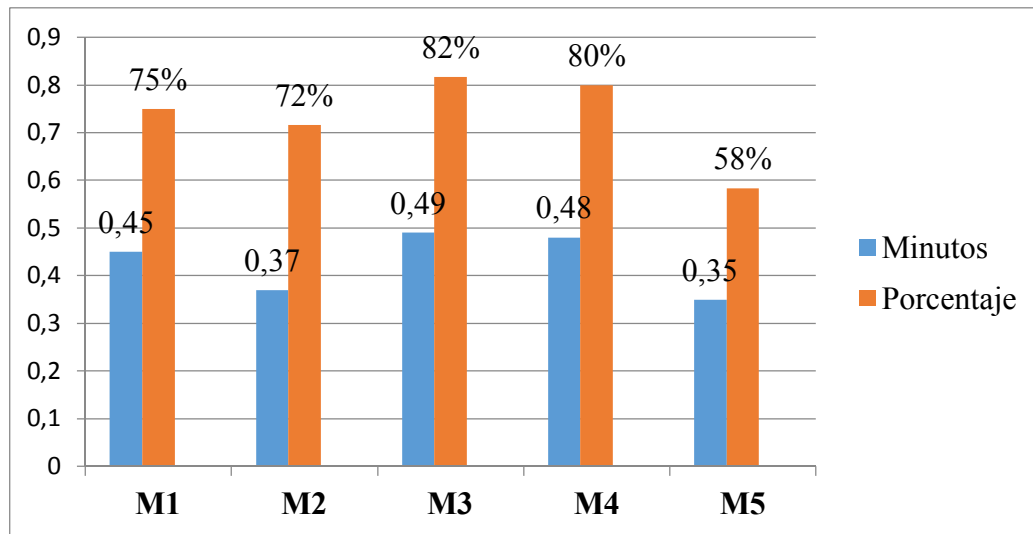
**TABLA N° 5.-** Tiempo de activación espermática precongelación.

<b>Muestras</b>	<b>Tiempo de activación segundos</b>	<b>Porcentaje de motilidad</b>
1	45 segundos	75 %
2	37 segundos	71.68%
3	49 segundos	81.67%
4	48 segundos	80%
5	35 segundos	58.33%

**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

**GRÁFICO N° 3.-** Tiempo de activación espermática precongelación.



**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

En la TABLA N° 5, GRÁFICO N° 3, se muestran los tiempos mínimos y máximos de activación espermática de las muestras seminales evaluadas y fue de 0,35 a 0,49 minutos (promedio 0,43 minutos) con estos datos se determinó el porcentaje de motilidad, esta tuvo diferencias significativas entre las cinco muestras de semen evaluadas, en las que hay valores positivos con porcentajes de 75, 80 y 81,67% con alta motilidad, indicando que tiene un buen movimiento cuando son activados con una solución de bicarbonato de sodio al 1%, además haya muestras con valores porcentuales de 58,73 y 71,68%, de motilidad (promedio de motilidad global 74%) estos valores determinan la capacidad fecundante y la buena o mala calidad del semen. Según Araujo (2007), encontró un porcentaje de motilidad del 80%, lo cual demuestra que el porcentaje de motilidad está a 0,6% al porcentaje encontrado en el ensayo, es decir que no hay mucha variabilidad y se semejan, en cuanto a minutos según Vascones M, Ortiz J y Giacometti J. (2009), encontraron tiempos mínimos y máximos de activación espermática en machos normales fue de 0,30 a 0,38 minutos, esto demuestra que el tiempo de activación en este estudio es superior al mencionado por dichos autores.

### 3.4.- Características microscópicas evaluadas.

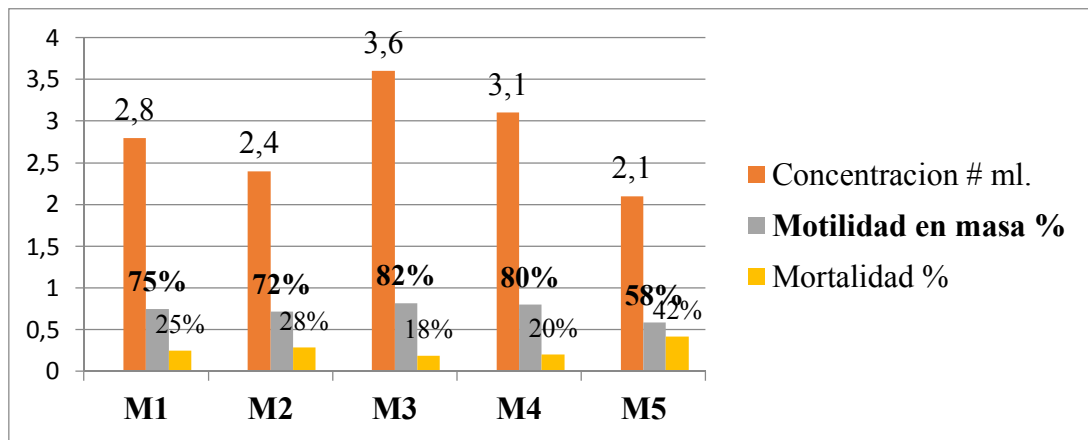
**TABLA N° 6.-** Concentración, motilidad y mortalidad espermática precongelación.

Muestras	Concentración espermática $\times 10^6$	Motilidad en masa	Mortalidad
M1	2.8	75 %	25%
M2	2.4	71.68%	28.32%
M3	3.6	81.67%	18.33%
M4	3.1	80%	20%
M5	2.1	58.33%	41,67%

**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

**GRÁFICO N° 4.-** Concentración, motilidad y mortalidad espermática precongelación.



**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

En la TABLA N° 6, GRÁFICO N° 4, se muestra las concentraciones espermáticas en millones de espermatozoides por ml de semen y se encontró concentraciones que oscilan entre  $2,1 \times 10^6$  a  $3,6 \times 10^6$  espermatozoides por ml de semen (promedio de concentración espermática es de  $2,8 \times 10^6$  espermatozoides por ml de semen colectado). Según Leung (1991), reporta que las concentraciones espermáticas pueden variar de  $2 \times 10^6$  a  $6,5 \times 10^{10}$  espermatozoides por ml de semen, en este

estudio se comprobó que las concentraciones de espermatozoides están dentro del rango establecido por Leung. Liley *et al.* (2002), encontraron resultados similares a los de este trabajo en relación a la concentración del esperma. Estos autores investigaron esta variable en truchas y encontraron que los machos jóvenes presentaron una concentración mayor que los adultos (uno y tres años, respectivamente). Iguales resultados fueron informados por Vladić *et al.* (2002), en estudios realizados en el salmón, pariente cercano de las truchas, quienes encontraron que los machos (jóvenes) presentaron valores más altos de espermatozoides que los machos adultos. Además se determinó que la concentración espermática está ligada a la motilidad ya que mayor sea el número de espermatozoides por ml de semen mayor será la motilidad. El porcentaje de espermatozoides muertos que se encontró en este estudio osciló entre 18,33 a 41,67% (promedio general de mortalidad espermática 26,6%), el alto índice de mortalidad encontrado en este estudio fue de 41,67% y se debió a que hubo un excesivo estrés térmico, baja concentración de sacarosa o cambio brusco del pH.

### 3.5.- Análisis posdescongelación.

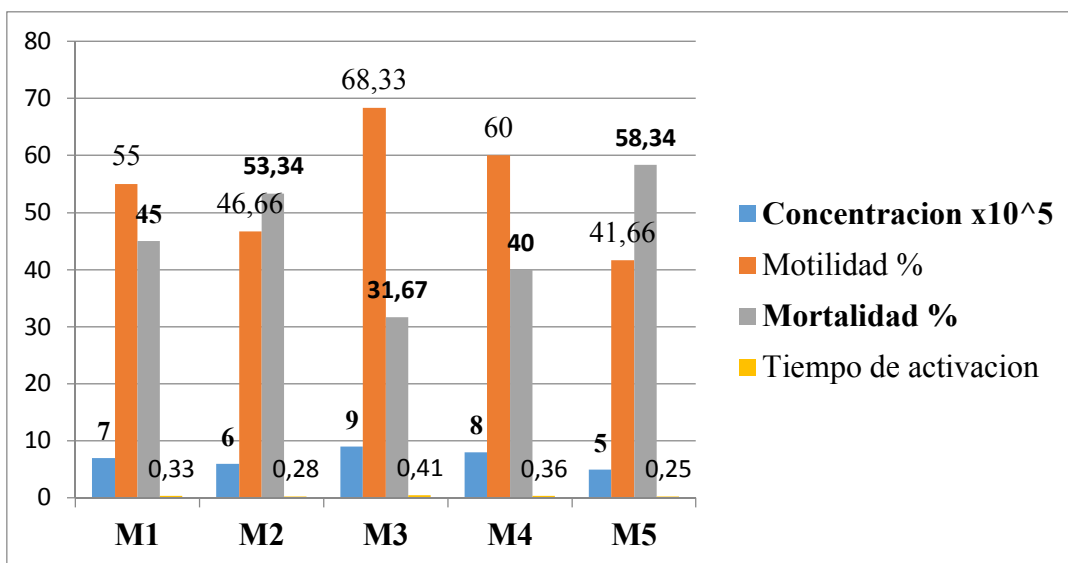
**TABLA N° 7.- Análisis espermático posdescongelación.**

Muestra	Color de sellado	Volumen de pajilla crioconservada	Concentración por pajilla # ml.	Tiempo de activación espermática segundos	Motilidad %	Mortalidad %
M1	Blanco	0,5	$7 \times 10^5$	33	55%	45%
M2	Azul	0,5	$6 \times 10^5$	28	46.66%	53.34%
M3	Amarillo	0,5	$9 \times 10^5$	41	68.33%	31.67%
M4	Tomate	0,5	$8 \times 10^5$	36	60%	40%
M5	Verde	0,5	$5 \times 10^5$	25	41.66%	58.34%

**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

**GRÁFICO N° 5.-** Análisis espermático posdescongelacion.



**Fuente:** Directa.

**Elaborado por:** Juan Carlos Chanatasig Chicaiza, 2015.

En LA TABLA N° 7, GRÁFICO N° 5, se determinó el tiempo de activación, concentración espermática la motilidad y mortalidad posdescongelación es así que los resultados obtenidos son satisfactorios ya que se encontró un tiempo de activación de 0,25 a 0,41 minutos, este tiempo fue determinado por la concentración de espermatozoides vivos que se observó en el microscopio en su descongelación y se valoró la motilidad que se encontró en cada una de las muestras crioconservadas y esto varió de 41,66 a 68,33% (promedio de motilidad posdescongelación 54,33%) a diferencia de lo que se encontró en las muestras de semen en fresco estos datos son altamente variables ya que radica grandes variaciones solo en su promedio de motilidad; además se comprobó la mortalidad es muy alta posdescongelación por la formación de microcristales de hielo a nivel intracelular y se obtuvo una mortalidad de 31,67 a 58,34%, (promedio de mortalidad posdescongelación 45,67%), es decir que durante la descongelación estos rangos de mortalidad son muy altos. En estos parámetros posdescongelación se observó gran significancia. El efecto de congelación y descongelación provoca que el espermatozoide se torne lento, sufre lesiones en la estructura celular, disminuyendo su aptitud seminal. Según Medina *et al.* (2005), los protocolos de crioconservación producen daños potenciales sobre las células con la formación y

disolución de cristales en ambientes intra y extracelular, ocasionado por el choque térmico, estrés tóxico y estrés osmótico durante el proceso.

## 4.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y los resultados obtenidos en la presente investigación, se detallan las siguientes conclusiones:

La crioconservación de semen de trucha es posible siempre y cuando aumentemos las tasas de la viabilidad espermática, y su calidad seminal, y el semen congelado sea viable durante toda la época del año y así mejorar los réditos económicos para los pequeños productores y suplir las necesidades de carne de trucha en el mercado.

Se determinó la motilidad espermática global pre y poscongelación en truchas arcoíris considerándose una variable clave para la optimización del uso del semen en las actividades de acuicultura con el fin de obtener altos porcentajes de fecundación asistida.

Al comparar semen fresco y semen congelado se nota un ligero deterioro en la calidad espermática del semen congelado ya que la mortalidad aumenta y la motilidad espermática disminuye lo que nos lleva a concluir que la variación de temperatura o el crioprotector produce deterioro espermático.

La concentración espermática por ml de semen fue y está influenciada por la edad de las truchas considerando que mientras menor sea su edad mayor número de espermatozoides habrá por ml de semen con relación a otro grupo etario de mayor edad con baja actividad fecundante o mala calidad seminal.

## **5.- RECOMENDACIONES**

De las conclusiones obtenidas en la investigación se llega a las siguientes recomendaciones:

Para la crioconservación de semen de trucha arcoíris es necesario mantener a los reproductores un día en ayuno, para evitar la contaminación seminal con heces, estas alterarían su calidad para el proceso de dilución y crioconservación seminal.

A fin de obtener un método apropiado para la investigación se recomienda realizar métodos alternos como la vitrificación para comparar resultados en cuanto a su motilidad y aumentar la viabilidad espermática.

Los resultados conseguidos en el presente trabajo deben ser ajustados especialmente en el uso de tasas de congelación-descongelación que nos permitan aumentar la viabilidad espermática posdescongelación inhibiendo al máximo la mortalidad espermática y mejorando las características microscópicas, con el objetivo de determinar su eficiencia durante el proceso de crioconservación y ajustar un protocolo definitivo para la especie.

Desde el punto de vista productivo y reproductivo es más beneficioso mantener truchas machos jóvenes de entre uno y tres años que truchas de mayor edad, ya que ejemplares más viejos presentan un descenso en la calidad del semen y baja actividad fecundante.



## 6.- BIBLIOGRAFÍA

1. ARAUJO, R. (2007). *Criopreservación de semen de machos XX de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)*.
2. ASTURIANO, J. 2003. *El control de la reproducción de peces. Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas, Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia: FEDER. Valencia, España. 1-2p.*
3. ANCHORDOGUY T. 1991. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethylsulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology*. 28:467-473p.
4. ÁVILA, P., MADERO, J., LÓPEZ, C., LEÓN, M., ACOSTA, L., GÓMEZ, C., DELGADO, L., GÓMEZ, C., LOZANO, J., REGUERO, M. 2006. *Fundamentos de crioconservación. Revista Colombiana de obstetricia y ginecología*. Vol. 57. No. 4. Bogotá (Colombia). 291-300p.
5. BABIAK J., GLOGOWSKI M., LUCZYNSKI D., KUCHARCZY K. y LUCZYNSKI M. 1995. *Cryopreservation of the milt of the northern pike. Journal of Fish Biology*. Department of Animal Biochemistry. Fisheries and Basic Fishery Sciences, Olsztyn. Poland. 819-828p.
6. BABIAK J., GLOGOWSKI M., LUCZYNSKI M. y DEMIANOWIZ. 1999. *The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (Esox lucius) spermatozoa*. *Theriogenology*. 52:473-479p.
7. BASTARDO H, GUEDEZ C, LEON M. *Características del semen de trucha arcoíris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Merida, Venezuela*. *Zootecnia Trop* 2004; 22(3):277-288.
8. BEARDEN H. y FUQUAY J. *Reproducción animal aplicada*. Ed. Manual Moderno. 167-185p.
9. BILLARD R. 1988. *Artificial insemination and gamete management in fish. Marine behavior and physiology*. No14. 3-21p.
10. BILLARD R. 1990a. *Artificial Insemination in Fish*. In: LAMMING G. E (Org.). *Marshall's physiology of Reproduction*. 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone. 9: 870-887p.
11. BILLARD R. 1990b. *Spermatogenesis in teleost fish*. In: LAMMING, G.

- E (ed.). Marshall' s Physiology of Reproduction. 4. ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone. 3: 183-213p.
12. BILLARD R. y COSSON M.P. 1992. *Some problems related to the assesment of sperm motility in fresh water fish. The Journal of Experimental Zoology.*261: 222-131p.
  13. BILLARD R., COSSON J., CRIM L.W. y SUQUET M. 1995. *Sperm Physiology and Quality.* in N.R. Bromage and R.J. Roberts, Editors. Broodstock management and eggs and larval quality. *Blackwell Sciencie,* Cambidge UK. 25 52p.
  14. BOLLA S., HOLMEFJORD I. y REFSTIE T. 1987. *Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm.* *Aquaculture.* 65:371-374p
  15. BROMAGE, N., PORTER, M., RANDALL, C. 2001. *The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin.* *Aquaculture,* Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 63-98.
  16. BASTIDAS, F. CARTAGENA, J. 2002. *Evaluación del crecimiento de la trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) en su etapa juvenil mediante alimentos alternativos a 2880 msnm.*
  17. BLANCO, C. 1995. *España. La Trucha Cría Industrial.* Mundi Prensa, pp.: 40, 48, 54, 139
  18. CHAPARRO N. 1994. *Reproducción artificial y manipulación genética en peces.* Editorial Mejoras. Barranquilla. 36p.
  19. CLOUD J.G., MILLER, W.H. y LEVANDUSKI M.J. 1990. *Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations.* *Prog. Fish Cult.* 52: 51-53p.
  20. CABRITA, E., ROBLES, V., ALVAREZ, R., HERRÁEZ, M. 2001. *Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization.* *Aquaculture.* 201:301-304p.
  21. CASTRO, R. QUINTONG, F. 2003. Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral. *Proyecto para la producción y exportación de trucha ahumada.*

22. CIERESZKO A., GLOGOWSKI J. y DABROWSKI K. 2000. *Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. Cryopreservation in Aquaculture Species*. Tiersch T.R. and Mazik P.M. Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 20-48p.
23. CORTÉS G. 2000. *Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino*. Universidad Complutense. Facultad de ciencias biológicas. Madrid-España. 27-32p.
24. COSSON J., BILLARD R., CIBERT C., DREANNO C. y SUQUET M. 1999. *Ionic factors regulating the motility of fish sperm*. In: GAGNON, C. (ed.). *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Vienna: Cache River Press. 16:162-186p.
25. COSSON J., LINHART O., MIMS S., SHELTON W., RODINA M. 2000. *Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa*. J. Fish Biol. Vol. 56. 1348-1367p.
26. CRUZ, P., VELASCO, Y. 2005. *Determinación de las características seminales y inseminación artificial en peces*. Reproducción de peces en el trópico. INCODER. Bogotá (Colombia). 175-195p.
27. CRUZ, V. 2001. *Criopreservação do sêmen de curimatá (Prochilodus lineatus)*. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
28. CRUZ-CASALLAS P.E., PARDO-CARRASCO S.P., LOMBO-CASTELLANOS P.E., LOMBO-RODRÍGUEZ D.A. y PARDO-MARIÑO J.E. 2004. *Cryopreservation of Yamú Brycon Siebenthalae Milt*. World Aquaculture Society, 35(4):529-535p.
29. CRUZ-CASALLAS P.E. y VELASCO-SANTAMARÍA Y.M. 2005. *Determinación de las características seminales y seminación artificial en peces*. Reproducción de peces en el trópico. INCODER. Bogotá (Colombia). 175-195p.
30. DEPPE M., ORTLOFF C., SALINAS G., BRAVO D., y SANCHEZ R. 2003. *Effect of cryoprotectant substances on acrosome preservation*. International Journal of Morphology. Universidad de la Frontera. Temuco

(Chile). Vol. 21. No. 2.

31. DEVLIN RH, NAGAHAMA Y. *Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences*. Aquaculture 2002; 208: 191-364.
32. DIAZ NF, NEIRA R. *Biología aplicada a la acuicultura. (Biologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas.)* Cien. Inv. Agr 2005; 32(1): 45- 59.
33. ESPINAL CF, MARTINEZ COVADELA HJ, GONZALES RODRIGUEZ FA. *La cadena de la piscicultura en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005*.
34. FOGLI DA SILVEIRA W., KAVAMOTO E.T. y NARAHARA M.Y. 1990. *Avaliação espermática, preservação criogenica do semen do pacu Piaractus mesopotamicus, proveniente de reprodução induzida*. Bull Inst Pesca. 17:1- 13p.
35. GONZÁLEZ S.E. y DÍAZ S.J. 2000. *Principios básicos de la crioconservación de semen de peces*. Instituto Nacional de pesca y acuicultura. 253-264p.
36. GUARNIZO, M. 2007. *Caracterización seminal y ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (pseudoplatystomafasciatum- linnaeus 1766)*.
37. GRAHAM, E. *The integrity of frozen spermatozoa*. 1-14p.
38. HAFEZ, E. 2004. *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo: Manole. 513 p.
39. HARVEY B. y CARLOSFELD. 1993. *Induced breeding in tropical fish culture, Ottawa, Ont., IDRC, III, 144p*.
40. HOLT W. 2000. *Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science*. 62: 3-22p.
41. KAVAMOTO E.T., FOGLI DA SILVEIRA W., RIGOLINO M.G. y CARVALHO FIHLO C. *Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta Arco Iris, Salmo irideus Gibbons. Boletim do Institut de Pesca*. 12(3):73-81p.
42. LAHNSTEINR F., BERGER B., WEISMANN T., PATZNER R.A. 1995. *Evaluation of semen fitness of the Rainbow Trout Oncorhynchus*

- mykiss for cryopreservation by physiological and biochemical parameters in July* Goetz F. W. and Thomas P. Eds. Proceedings of the fish international symposium on the reproductive physiology of fish. University of Texas At Austin. Austin, Texas.
43. LAHNSTEINER F., BERGER B., HORVATH A., URBANYI B. y WEISMANN T. 2000. *Cryopreservation of spermatozoa in Ciprinid fishes. Theriogenology*. 54:1477-1498p.
  44. LEUNG K.P. y JAMIESON G.M. 1991. Live preservation of fish gametes. Jamison G.M. Eds. *Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press. 245-269p.
  45. LUBZENS E. 1997. *Carp (Cyprinus carpio L.) spermatozoa criobanks strategies in research an application*. *Aquaculture*. 155: 13 –30p
  46. MEDINA-ROBLES V.M., VELASCO-SANTAMARÍA Y.M. y CRUZ-CASALLAS P.E. 2005. *Aspectos generales de la crioconservación espermática es peces teleósteos*. Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 181. Villavicencio (Colombia). 34- 48p.
  47. MORISAWA M., SUSUKI K., MORISAWA S. y YASUDA K. *Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes*. *J. Exp. Biol.* Vol. 107. 95-103p.
  48. MORISAWA M. *Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts*. *Zool. Sci.* Vol. 2. 605-615p.
  49. MORISAWA M. y MORISAWA S. 1990. *Acquisition and initiation of sperm motility*. *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. (Ed. C. Gagnon). CRC Press. Boca Raton. FL. 137-151p.
  50. MORISAWA M. 1994. *Cell signaling mechanism for sperm motility*. *Zoo. Sci.* Vol. 11. 647-662p.
  51. NAVARRO-POVEDA O.J., LOMBO-CASTELLANOS P.E. y CRUZ- CASALLAS P.E. 2000. *Calidad y fertilidad de semen de cachama blanca, Piaractus brachypomus crioconservado con etilenglicol*. En: Memorias XI Simpósio Brasileiro de Aquicultura – SIMBRAQ. Florianópolis (SC), Brasil.

52. NEIRA J., CRUZ-CASALLAS P.E., JIMÉNEZ J. y MUÑOS D. 1992. *Caracterización y congelación de semen de cachama blanca (Piaractus brachyomus)* P 141-14. Programa Nacional de Ciencia y Tecnología del mar- Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura. 141-146p.
53. ODA S. y MORISAWA M. 1993. *Rises of intracellular  $Ca^{2+}$  and pH mediate the initiation of sperm motility by hypoosmolality in marine teleosts.* Cell. Motil. Cytoskel. Vol. 25. 171-178p.
54. PINEDA SANTIS H, JARAMILLO PINO J. *Triploidia en trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss): posibilidades en Colombia.* Rev Col CiencePec 2004; 17 (1): 45 -52
55. PHRONEN J. 1994. *Composition and cryopreservation of sperm from some Fin fish teleost fish.* Finnish Fish Research.15: 27-48p.
56. RANA K. 1995. *Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications.* Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of fish. University of texas at Austin. 147p.
57. RAMOS S. *Anotaciones sobre inseminación artificial.* Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá.
58. RURANGWA E., VOLCKAERT F.A.M., HUYSKENS KIME G.D.E. y OTLEVIER F. 2001. *Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (Clarias gariepinus), Theriogenology.* 55:751-769p.
59. Salazar Ariza G. *Introducción: consideraciones generales sobre la acuicultura.* En: Rodríguez Gomez H, Daza PV, Carrillo Avila M. *Fundamentos de acuicultura continental.* Bogota: Editorial Instituto Nacional de pesca y acuicultura; 2001. p. 1- 18.
60. SHLAFER M. *Pharmacological considerations in cryopreservation.* Organ Preservation for Transplantation. Segunda edición. 177-212p.
61. SUQUET, M. DREANNO, C. FAUVEL, C. COSSON, J. BILLARD, R. 2000. *Crioconservación de semen de pescados marinos.*

62. SUQUET M., OMNES M.H., NORMANT Y. y FAUVEL C. 1992. *Assessment of sperm concentration and motility in turbot (Scophthalmus maximus)*. *Aquaculture*, 101:177-185p.
63. STOSS J. *Fish gamete preservation and spermatozoan physiology*. Hoar W.S., Randall D. J., Donaldson E.M. Eds. *Fish physiology*. Vol. 9B. New York: Academic Press. 305-351p.
64. SWANSON E.W. y BEARDEN H.J. *An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa*. *Journal of Animal Science*. 10:981-987p.
65. TABATA, Y., PORTS, L. 2004. *Truchicultura en clima tropical*. In: Cyrino, J. E. P. et al. (Ed.) *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt/ Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Cap. 11, p. 308-341.
66. TIERSCH T. 1998. *Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127:95-104p.
67. TOTH G.P., CIERESZKO A., CHRIST S.A. y DABROWSKI K. 1997. *Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, Acipenser fulvescens: activation and inhibition conditions*. *Aquaculture* 154: 337-348p.
68. YAO Z., CRIM L., RICHARDSON B. y EMERSON C. 1999. *Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout Macrozoarce americanus L. Sperm after cryopreservation*. *Ocean Science Center and Department of Biology*. Newfoundland (Canada). 361-375p.
69. Dávila, A., Garcés, J. 2007. *Optimización de tres protocolos de extracción de ADN en las especies Oncorhynchus mykiss y Astroblepusubidiai y su cuantificación con técnicas moleculares para la acuicultura*.
70. Beardmore, J., Mair, G., Lewis, R. 2001. *Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 283-301.
71. ANDRADE R.F., BAZZOLI N., RIZZO E. y SATO Y. 2001. *Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, Bryconops affinis (pisces: Characidae)*. *Tissue & Cell*. 33: 524 – 532p.

72. JAMIESON G.M. y LEUNG K.P. 1991. *Introduction to fish spermatozoa and themicropyle*. In: JAMIESON, B. G. M. (ed.) *Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press. 5: 56- 72p.
73. GALLANT R. y RICHARDSON G. 1993. *Comparison of different extenders for the cryoprsvervation of Atlantic Salmon spermatozoa*. *Theriogenology*. 40: 479-486p.
74. CRISCUOLO URBANITI ELISABETH. *Bases Biológicas de la Reproducción en Peces Tropicales* [sede web]. Colombia: Criscuolo.com; 2005-[acceso 8 de agosto del 2012].
75. HICKMAN CLEVELAND; ROBERTS LARRY; LARSON ALLAN. *Principios Integrales de Zoología* [sede web]. España: Hickman.com; 2002-[acceso el 1 de agosto del 2012].
76. MUÑOZ CUETO JOSÉ ANTONIO. *Control Hormonal de la Reproducción en Peces* [sede web]. España: Muñoz.com; 2011-[acceso el 13 de agosto del 2012].
77. PTASZNSKA MÓNICA. *Compendio de Reproducción Animal: Reproducción en los Peces*. 9ª edición. Paraguay;2007.



# A N E X O S

**ANEXO N° 1.- Instalaciones piscícolas el Madrigal.**



**ANEXO N° 2.- Equipo de trabajo en las instalaciones piscícolas el Madrigal.**



**ANEXO N° 3.- Alimentación de los ejemplares.**



**ANEXO N° 4.-** Captura de los ejemplares.



**ANEXO N° 5.-** Ejemplar de trucha capturado y listo para realizar la espermiación.



**ANEXO N° 6.-** Ejemplar macho de trucha arcoíris.



**ANEXO N° 7.-** Espermiación y recolección de semen de los reproductores.



**ANEXO N° 8.-** Medición de volumen seminal ml en campo.



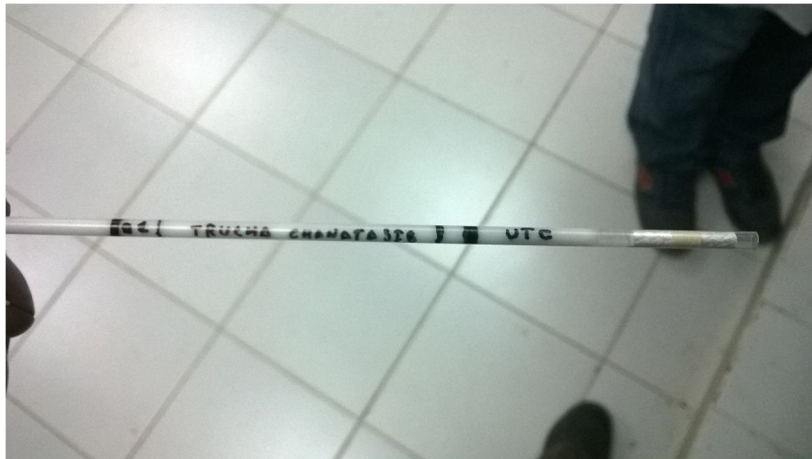
**ANEXO N° 9.-** Transporte de las muestras seminales al laboratorio.



**ANEXO N° 10.-** Refrigeración de las muestras seminales en el laboratorio.



**ANEXO N° 11.-** Identificación de las pajuelas.



**ANEXO N° 12.-** Colocación de la cámara de Neubauer a la platina del microscopio para observar la concentración espermática.



**ANEXO N° 13.-** Concentración espermática.



**ANEXO N° 14.-** Realización del frotis y flameado para observar la mortalidad.



**ANEXO N° 15.-** Llenado de pajillas.



**ANEXO N° 16.-** Pajillas llenas listas para ser refrigeradas.



**ANEXO N° 17.-** Refrigeración de las pajillas para su congelación.



**ANEXO N° 18.-** Congelación de pajillas.



**ANEXO N° 19.-** Sujeción de una caña del tanque criogénico a 5 cm sobre el nivel de Nitrógeno Líquido.

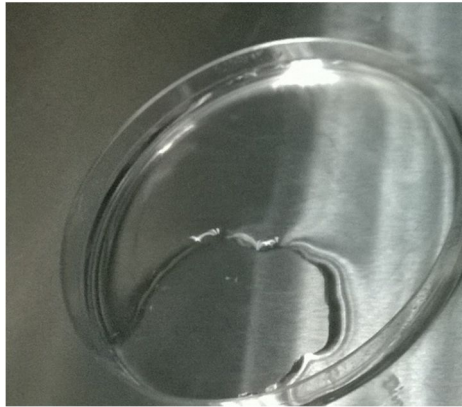


**ANEXO N° 20.-** Alzando una caña para elegir las pajillas a ser descongeladas.





**ANEXO N° 21.- Preparación de las placas petri con solución activadora de Bicarbonato de Sodio al 1%.**



**ANEXO N° 22.- Evaluación del semen crioconservado.**

