



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL



#### TESIS

**EFFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE CONGELACIÓN SOBRE LA  
CALIDAD DE SEMEN DE LA TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

**PRESENTADA POR:**

**YAN PIERR MANRIQUE QUISPE**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL  
MENCIÓN EN PRODUCCION ANIMAL**

**PUNO, PERÚ**

**2021**



## DEDICATORIA

A nuestro divino creador Jehová Dios, porque gracias a su bendición y su cuidado hoy hice realidad uno de mis grandes anhelos.

A mis padres: Amelia Nélica Quispe Quispe y José Benito Manrique Flores (Q.E.P.D). Que supieron apoyarme en todo momento, a ellos con cariño mi eterna gratitud.

A mis hermanos: José R. Manrique Quispe, Flor M. Manrique Quispe y Juan C. Manrique Quispe. Por el apoyo incondicional, moral y el cariño que me brindaron durante mis estudios.

A la persona más especial del mundo, mi princesa; Damaris Kristel Manrique Díaz a quien quiero y hace que mi vida tenga sentido.

A mi gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Puno, por la calidad de formación profesional



## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano y de manera especial a sus docentes por haberme impartido sus conocimientos que contribuyeron a mi formación profesional.

Al Mg Sc. Uri Harold Pérez Guerra, director de la tesis, mi agradecimiento eterno quien con su capacidad, sencillez y gran profesionalismo dirigió el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Roberto Gallegos Acero, Dr. Domingo Ruelas Calloapaza, Mg. Halley Rodríguez Huanca; revisores de la tesis, por su apoyo incondicional y la colaboración de manera entusiasta en la ejecución y realización del presente trabajo de investigación

A todos mis amigos que apoyaron en la ejecución de este trabajo quienes con su apoyo facilitaron la ejecución del trabajo.



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1

### CAPÍTULO I

#### REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Marco teórico	3
1.1.1. Congelación de semen.	3
1.1.2. Selección de reproductores.	5
1.1.3. Espermatozoides de peces	5
1.1.4. Obtención de semen.	5
1.1.5. Características macroscópicas del semen de peces.	6
1.1.6. Características microscópicas del semen de peces.	7
1.1.7. Crioprotectores.	12
1.1.8. Yema de huevo en la crioconservación.	13
1.1.9. Congelación.	14
1.1.10. Temperatura de congelación.	16
1.1.11. Descongelación	18
1.1.12. Fecundación.	20



1.2.	Antecedentes	22
------	--------------	----

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.	Identificación del problema	34
2.2.	Enunciados del problema	35
2.3.	Justificación	35
2.4.	Objetivos	36
2.4.1.	Objetivo general	36
2.4.2.	Objetivos específicos	36
2.5.	Hipótesis	36
2.5.1.	Hipótesis general	36
2.5.2.	Hipótesis específicas	36

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.	Lugar de estudio	37
3.2.	Población	37
3.3.	Muestra	37
3.4.	Método de investigación	38
3.5.	Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	38
3.6.	Análisis estadístico	40

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Parámetros macroscópicos y microscópicos del semen fresco de la trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).	42
4.2.	Parámetros microscópicos del semen de la trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) post descongelación por efecto de temperaturas de congelación	44



4.3 Tasa de fertilidad de semen de la trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) por efecto de temperaturas de congelación	49
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	68

Puno, 29 de octubre del 2021

**ÁREA:** Producción animal

**TEMA:** Calidad de semen de truchas

**LÍNEA:** Reproducción animal



## ÍNDICE DE FIGURAS

### Pág.

1. Comparación gráfica del tiempo de activación (segundos) con las temperaturas de congelación (T1=-80°C; TII=-100°C; TIII=-120°C) 45
2. Comparación gráfica de la motilidad masal (%) con las temperaturas de congelación (T1=-80°C; TII=-100°C; TIII=-120°C) 46
3. Comparación gráfica de la vitalidad (%) con las temperaturas de congelación (T1=-80°C; TII=-100°C; TIII=-120°C) 46
4. Porcentaje de fertilidad en semen fresco (control) y descongelado de semen de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por efecto de las temperaturas de congelación. 49
5. Plot de correlaciones entre parámetros seminales y la fertilidad post descongelación 91



## ÍNDICE DE ANEXOS

**Pág.**

1. Panel fotográfico	69
2. Chi cuadrado para comparación de tasas de fertilidad	92



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

°C =	Grados Celsius
ml =	Mililitro
Kg =	Kilogramo
ul =	Microlitro
NaHCO <sub>3</sub> =	Bicarbonato de sodio
ATP =	Adenosín -5- trifosfato
T° =	Temperatura
NaCl =	Cloruro de sodio
pH =	Potencial de hidrogeniones
DMSO =	Dimetilsulfoxido
PVA =	Alcohol polivinílico
CIP =	Centro de Investigación y Producción Pesquera
msnm =	Metros sobre el nivel del mar
rpm =	Revoluciones por minuto



## RESUMEN

La truchicultura en la región Puno tiene potencial de exportación; sin embargo, no se dispone de alevinos todo el año para mantener la producción, pero se tiene la opción de criopreservar semen para la época no reproductiva. Por lo que el trabajo de investigación tuvo el objetivo de determinar el efecto de diferentes temperaturas de congelación sobre la calidad de semen de truchas arcoíris. Se colectó el semen de 12 machos reproductores en las instalaciones del Centro de Investigación y Producción Chucuito de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, a los cuales se les hizo una evaluación seminal macroscópica, microscópica pre y post descongelación y la tasa de fertilidad por efecto de 3 temperaturas de congelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-100^{\circ}\text{C}$ ,  $-120^{\circ}\text{C}$ ), la criopreservación tuvo una curva de descenso de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Se obtuvo parámetros seminales en fresco similar a resultados de otros investigadores. La congelación tuvo efectos nocivos sobre la calidad seminal pero los mejores resultados para tiempo de activación (51.33 segundos) y vitalidad (35.33%) se obtuvo con  $-100^{\circ}\text{C}$  mientras que la mejor motilidad se obtuvo para  $-120^{\circ}\text{C}$  (36.33%); por último, la mayor tasa de fertilidad se obtuvo para  $-100^{\circ}\text{C}$  (70.97%), mientras que a  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-120^{\circ}\text{C}$  se obtuvo 68.86% y 64.34% respectivamente. Por lo que concluimos que la mejor temperatura de congelación para truchas arcoíris en condiciones del altiplano peruano es  $-100^{\circ}\text{C}$ .

**Palabras clave:** Calidad espermática, congelación, fertilidad, peces, ovas.



## ABSTRACT

Truchiculture in the Puno region has export potential; however, alevins are not available the whole year to maintain production, but there is the option of cryopreserving semen for the non-reproductive season. The objective of this research was to determine the effect of different freezing temperatures on the quality of rainbow trout semen. Semen was collected from 12 reproductive males at the installations of the Centro de Investigación y Producción Chucuito of the Universidad Nacional del Altiplano de Puno, which were evaluated macroscopically, microscopically pre and post thawing and the fertility rate by the effect of 3 freezing temperatures ( $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-100^{\circ}\text{C}$ ,  $-120^{\circ}\text{C}$ ), cryopreservation had a descent curve of  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Fresh semen parameters were obtained similar to the results of other researchers. Freezing had damaging effects on seminal quality but the best results for activation time (51.33 seconds) and vitality (35.33%) were obtained with  $-100^{\circ}\text{C}$  while the best motility was obtained for  $-120^{\circ}\text{C}$  (36.33%); finally, the highest fertility rate was obtained for  $-100^{\circ}\text{C}$  (70.97%), while at  $-80^{\circ}\text{C}$  and  $-120^{\circ}\text{C}$  we obtained 68.86% and 64.34% respectively. Therefore, we conclude that the best freezing temperature for rainbow trout in conditions of the peruvian highlands is  $-100^{\circ}\text{C}$ .

**Keywords:** Fertility, fish, freezing, ova, sperm quality.

## INTRODUCCIÓN

La Región Puno tiene casi la totalidad de las unidades productivas de jaulas flotantes para crianza de truchas a nivel nacional lo cual lo posiciona como una región importante en la crianza de truchas (Carpio Vargas y Tito Ccopa, 2017) además de ocupar el primer lugar en producción de truchas (PNIPA, 2020).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es muy prolífica (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010), pero viene disminuyendo la diversidad genética en las granjas acuícolas destinadas a la producción de alevinos (Torres *et al.*, 2014). En condiciones naturales las hembras desovan según su estacionalidad reproductiva (Bustamante-González *et al.*, 2018; Castro-Castellón *et al.*, 2017) y con limitaciones en la producción de alevinos (Betancur *et al.*, 2008). Esta limitante en la producción, propicia la conservación de semen para reproducción en época no reproductiva para lo cual existen métodos como la vitrificación (Cuevas-uribe *et al.*, 2013) que se aplica en peces con semen de poco volumen (Xin *et al.*, 2017).

Otro método es la refrigeración a 4°C, pero se restringe por el corto tiempo de conservación (10 días), lo que es poco atractivo para conservar semen por largos periodos (Merino *et al.*, 2020; Ulloa-Rodríguez *et al.*, 2018; Trigo *et al.*, 2015) esta técnica ofrecen pocas ventajas sobre la congelación lenta (Cuevas-uribe *et al.*, 2017) como bajos costos, fácil mantenimiento y transporte (Martínez-Páramo *et al.*, 2009) facilitando la reproducción artificial en salmónidos (Judycka *et al.*, 2019; Restrepo-Betancur *et al.*, 2017).

La congelación seminal es una alternativa biotecnológica reproductiva *ex situ* (Di Iorio *et al.*, 2019; Benson *et al.*, 2012) pero tiene baja fertilidad con respecto al semen fresco (Merino *et al.*, 2020; Bustamante-gonzález *et al.*, 2019), por la formación de cristales de hielo que dañan la membrana espermática (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010), cambios bruscos de temperatura, estrés osmótico (Hezavehei *et al.*, 2018), cambios de volumen celular y toxicidad de crioprotectores (Asturiano *et al.*, 2017) que conducen a la destrucción del espermatozoide (Lopes *et al.*, 2011).

A pesar de que se tienen estudios en conservación de semen, continúa la búsqueda de métodos e insumos que puedan hacer más viables a los espermatozoides (Pereira *et al.*, 2020; Hezavehei *et al.*, 2018). La mayoría de investigaciones se centran en



crioprotectores ideales, y dejan de lado la velocidad y temperatura de congelación que son críticas en la formación de cristales de hielo y afectan la calidad de semen (Stornelli *et al.*, 2005). Debido a que no se cuenta con reportes de crio-conservación seminal de trucha bajo condiciones hipobáricas naturales del altiplano peruano, en el presente estudio se pretende determinar la influencia de tres temperaturas de congelación sobre la calidad seminal de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1.Marco teórico

El 94% de peces tiene una reproducción externa en la que los óvulos y los espermatozoides son liberados al medio acuático en un acto sincronizado, donde los gametos se activan por el agua y los espermatozoides fertilizan los óvulos. El ciclo reproductivo típico de un pez, se divide en dos fases principales: la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de los gametos, constituyen la primera fase (vitelogénesis y espermatogénesis); mientras que la maduración de los óvulos, los espermatozoides y la preparación para la liberación, constituyen la segunda (espermiación y ovulación) (López-Hernández *et al.*, 2018).

En acuicultura conocer el diagnóstico del semen ayuda a determinar la capacidad fecúndate del eyaculado y genera mejoras en las técnicas de fertilización *in vitro* y el desarrollo de protocolos de crioconservación para el mejoramiento genético (López-Hernández *et al.*, 2018). La calidad del semen está dado por la capacidad del espermatozoide de fertilizar al ovocito y esta a su vez depende del plasma seminal que está constituido por secreciones testiculares originadas en los conductos espermáticos que le dan la inmovilidad al esperma (Martínez *et al.*, 2019).

##### 1.1.1. Congelación de semen.

La crioconservación se define como una técnica para la conservación de tejidos, células u otros materiales biológicos a muy baja temperatura (generalmente a  $-196^{\circ}$  C), a la cual permanecen genéticamente estables y metabólicamente inertes. Muchos protocolos fueron diseñados hasta la actualidad pero variables en sus resultados por

lo que es necesario ajustar un protocolo para cada especie y zona de producción (Navarro *et al.*, 2004).

Esta puede ocasionar daño irreversible a la membrana plasmática por la formación de cristales de hielo, o por la despolarización de la membrana como consecuencia del intercambio iónico, conllevando a la activación y capacitación espermática espontánea; en la congelación se forma cristales, este proceso de cristalización toma lugar intracelularmente cuando el agua en su fase líquida pasa a sólida en forma de cristales y el medio externo también cambia a forma sólida, lo que conlleva a que la concentración de solutos en los canales residuales aumente progresivamente, mostrándolo hiperosmótico con respecto a la célula, e induciendo la salida de agua y la concentración de solutos intracelulares, conllevando a una deshidratación (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010).

Al fenómeno anterior de presentación de cambio de forma líquida a sólida (cristales) en la que aparece el primer núcleo de hielo o nucleación al llegar a una temperatura de  $-5$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ , por otro lado el medio externo también se solidifica por lo que se incrementa la concentración de solutos, siendo hiperosmótico con respecto a la célula, induciendo la salida de agua de la célula y su congelamiento externo (Medina *et al.*, 2005).

En general si un crioprotector es penetrante reemplaza el agua intracelular y baja la fracción congelada, evitando la congelación de solutos. No se debe olvidar que se tiene varias hipótesis sobre los daños por la criopreservación, como el daño por la concentración de solutos en el líquido extracelular que ocasiona cristales de hielo, también por contracción de la célula por debajo del volumen mínimo tolerable y la ruptura de la membrana que consideran que la sobrevivencia depende del tiempo permitido para que ocurra el evento de separación de fases durante la congelación. Si este no ocurre se pueden crear orificios en la membrana por fallas en el agrupamiento de los lípidos durante la descongelación y por último la ruptura de la membrana puede ser por la fricción del agua al pasar rápidamente a través de ella, excediendo la capacidad de la membrana de conducirla (Medina *et al.*, 2005).

### 1.1.2. Selección de reproductores.

Los reproductores aptos son aquellos que liberan el líquido seminal ante una suave presión del abdomen, aquel que presenten semen en la papila urogenital después de un suave masaje abdominal en sentido cráneo-caudal. La presencia de semen indica que el macho ha alcanzado la madurez gonadal y por lo tanto, puede ser sometido al tratamiento hormonal para inducir la espermiación (Cruz-casallas *et al.*, 2006). La biología reproductiva de machos y hembras de trucha difiere en diferentes aspectos, entre ellos la edad a la cual maduran sus gametos; en el caso de los machos ocurre al año de edad, mientras que las hembras maduran a los dos años (Bastardo *et al.*, 2004).

### 1.1.3. Espermatozoides de peces

El espermatozoide de los peces se denomina primitivo, y se diferencia en una cabeza, una pieza media y un flagelo. La cabeza contiene el núcleo que transfiere el conjunto haploide del cromosoma a la siguiente generación. El acrosoma no existe en los peces óseos. Las mitocondrias, el centriolo proximal y el centriolo distal se encuentran en la parte media. Las mitocondrias suministran energía para el batido del flagelo (Alavi *et al.*, 2019)

### 1.1.4. Obtención de semen.

Es recomendable anestésarlos con benzocaína a 30 ppm (Şahin *et al.*, 2013) y secar su abdomen para evitar el contacto con agua, orina o heces que pudieran activar al espermatozoide o ensuciar la muestra ya que cualquier contaminación en semen de salmónidos afecta la calidad inicial de las muestras y la aptitud de las mismas para la crioconservación (Betancur *et al.*, 2008) y recolectado mediante un tubo graduado de 50 ml o jeringa o una cánula que podría usar para obtener semen puro pero con el riesgo de lesiones testiculares (López-Hernández *et al.*, 2018).

La contaminación con orina durante el estrujamiento es casi inevitable debido a la proximidad entre el ducto espermático y el uréter, esta contaminación frecuentemente causa alteración de la calidad del semen y puede ser responsable de las variaciones en la calidad espermática (Medina *et al.*, 2005). Por lo general la obtención de semen es en forma manual por presión en los flancos en dirección céfalo caudal (Torres *et al.*, 2014). Generalmente, el esperma se recoge mediante un suave masaje abdominal en un vaso de cristal abierto (0,5 cm de profundidad), con especial

cuidado para evitar la contaminación. La aplicación de catéteres durante el muestreo reduce el riesgo de contaminación del esperma por la orina. Sin embargo, en el caso de los salmónidos, el uso de catéteres puede dañar los conductos espermáticos, especialmente en los peces pequeños, lo que provoca una hemorragia (Judycka *et al.*, 2019).

### **1.1.5. Características macroscópicas del semen de peces.**

Es importante para determinar la calidad del semen que se destinara para producción de peces en forma comercial o para introducir nuevas especie o conservarlas, toda la evaluación se realiza a 28 °C por no más de 30 minutos durante la cual se evalúa por microscopio (Cruz-casallas *et al.*, 2006).

#### **1.1.5.1. Volumen.**

Se mide en un tubo aforado en ml y en base a ello se calcula la cantidad de diluyente. Se debe evita el contacto con agua, heces y orina para evitar la activación de los espermatozoides y la contaminación de la muestra, el semen en algunos casos un poco viscosa, en el cual se distinguen dos componentes fundamentales principalmente, uno celular, que son los espermatozoides, y otro el líquido seminal que sirve de medio de suspensión a los espermatozoides, y que es segregado por los testículos y por los conductos espermáticos (Torres *et al.*, 2014).

También debe considerarse que los peces más jóvenes y las especies de menor tamaño suelen producir esperma de volumen bajo y variable (pocos mL). Esto limita la aplicación de la tecnología de alto rendimiento, ya que los pequeños volúmenes de esperma implican la producción de un número limitado de pajuelas con esperma criopreservado. (Judycka *et al.*, 2019).

Además, los organismos que presentan mayor volumen de semen, son los que tienen mayor peso, pues Castro-Castellón *et al.*, (2017) demostró que de los organismos el que más volumen presentó fue el M1 con 30 mL, el cual a su vez tiene el mayor peso de todos los organismos siendo de 3.21 kg. El que menos semen produjo fue el M2 con un total de 10 mL y un peso de 1.59 kg.

### 1.1.5.2. Color

De acuerdo con lo reportado por la mayoría de investigadores, es más común encontrar semen de color blanco y aspecto lechoso (Bustamante-González *et al.*, 2018). En general, el semen en los salmónidos es una secreción blanca lechoso (Torres *et al.*, 2014).

### 1.1.6. Características microscópicas del semen de peces.

#### 1.1.6.1. Activación espermática.

Se expresa en segundos desde que el espermatozoide es activado con agua hasta que disminuye a 5% (Martínez *et al.*, 2019) o cesa el movimiento flagelar o desde la adición de la solución de NaHCO<sub>3</sub> hasta el cese completo de los movimientos espermáticos (Cruz-casallas *et al.*, 2006). Es mejor diluciones altas (p.e 1:1000) para tener una activación sincrónica además de la viscosidad del semen; generalmente, este tiempo de motilidad es influenciado por el hábitat del cual se origina el reproductor macho como para el caso de peces de agua dulce que necesita medios hipotónicos, por lo tanto el tiempo de motilidad depende del agua, T°, osmolaridad y cantidad de ATP generada por las mitocondrias (López-Hernández *et al.*, 2018).

Otros autores como Castro-Castellón *et al.*, (2017) usan el suero fisiológico como activador espermático ya que prolonga la duración de la movilidad espermática post descongelación o agua del mismo estanque, para garantizar la calidad de las muestras (Restrepo-Betancur *et al.*, 2017). Por ejemplo Şahin *et al.*, (2013) usaron una solución de activación (0,3% de NaCl) en una proporción de 1:100 (1 µl de esperma por 99 µl de solución de activación) mientras que Necmettin *et al.*, (2003) usaron 10 µl de semen en un portaobjetos de cristal y añadiendo 100 µl de solución de activación (0,3% de NaCl).

Los espermatozoides están inmóviles por las altas concentraciones de K en el líquido seminal también por el pH y la osmolaridad de la solución activadora, la estimación se realiza de manera subjetiva en la escala de 0 a 100% con intervalos de 10% (López-Hernández *et al.*, 2018).

Para todas las especies, la función mitocondrial normal es un factor clave factor de fertilidad de los espermatozoides y para los peces es especialmente crítico mantener la actividad mitocondrial porque la alta motilidad normalmente dura sólo de 30 s a pocos minutos. Los espermatozoides de la trucha arco iris sólo tienen una mitocondria para producir suficiente ATP para impulsar esta alta motilidad transitoria, y los daños sufridos durante la criopreservación seguramente conducirá a la disminución de la motilidad y como resultado la capacidad de fertilización (Merino *et al.*, 2011). Las reservas de energía de los espermatozoides (principalmente ATP) son limitadas debido a la ausencia de sustratos disponibles en el agua dulce o marina. Por ello, la duración de la motilidad de los espermatozoides es corta en los peces y el ATP es producido por la respiración mitocondrial (Alavi *et al.*, 2019).

#### **1.1.6.2. Motilidad.**

La motilidad del espermatozoide es considerada como uno de los parámetros más utilizados para determinar la calidad del semen (Valdebenito *et al.*, 2009). Permite el pronóstico del éxito de la fertilización, ya que los valores altos de los parámetros de motilidad de los espermatozoides generalmente se correlacionan fuertemente con la capacidad de fertilización (Judycka *et al.*, 2021).

La motilidad puede verse afectada por alteraciones en la actividad mitocondrial que agotan a los suministros de energía de las células espermáticas, lo que condujo a la reducción de los movimientos de los flagelos y varía de pocos segundos a minutos en función de la especie estudiada por lo que es uno de los parámetros que presenta mayor correlación con las tasas de fertilización (Bustamante-gonzález *et al.*, 2019). Es evaluado de forma subjetiva en un campo visual bajo el microscopio óptico (40X), para la crioconservación el porcentaje optimo es > a 80% porque menor a esto causa reducción en la fecundación (López-Hernández *et al.*, 2018).

La activación de la movilidad, implica la respuesta a los cambios iónicos, que conducen en última instancia a la transducción de señales intracelulares y finalmente, la maquinaria móvil, el axonema, que es activado mediante la fosforilación de las subunidades asociadas con las dineínas responsables de la

conversión de energía química de hidrólisis de ATP a energía mecánica para llevarla a cabo, la cual es dependiente del número de mitocondrias y de las reservas energéticas disponibles (Bustamante-gonzález *et al.*, 2019).

En general, el semen en los salmónidos tiene una motilidad menor a 30 segundos después del desove en agua dulce (Castro-Castellón *et al.*, 2017). Pero el principio rector es congelar espermatozoides de alta movilidad, ya que es un determinante clave para el éxito de la criopreservación. Cualquier contaminante conduce a la disminución de la motilidad del esperma y, en consecuencia, reduce el éxito de la criopreservación. Las fuentes potenciales de contaminación en los espermatozoides son la orina, las heces y la sangre (Judycka *et al.*, 2019).

La movilidad de los espermatozoides en peces de fertilización externa se adquiere al iniciar el contacto con un medio acuoso, en donde responden a condiciones fisicoquímicas, como cambios en la presión osmótica, temperatura y pH, las cuales se pierden pocos segundos después pero también se debe contemplar que el pH para la movilidad óptima de los espermatozoides en trucha arcoíris es de 8.0 a 8.2; sin embargo, se ha reportado que la frecuencia del batido flagelar de los espermatozoides de trucha depende del pH de la solución activadora (Bustamante-González *et al.*, 2018). No es recomendable el uso de cubre objetos ya que afecta negativamente el movimiento de los espermatozoides dando lugar a un movimiento de escaso cambio de posición y no uno progresivo (Castro-Castellón *et al.*, 2017). Alguno autores usan bicarbonato de sodio al 1% en una proporción de 3.3 ml de activador para cada 0.2ml de semen (Fogli Da Silveira *et al.*, 1994).

Sin embargo, el mecanismo por el que disminuye la motilidad no se ha dilucidado a fondo hasta la fecha. Existe una fuerte correlación entre el porcentaje de espermatozoides inmóviles y los defectos mitocondriales tras la descongelación. También se ha sugerido que los cambios rápidos en la osmolaridad y la formación de cristales de hielo intracelulares en el proceso de criopreservación pueden provocar cambios en las proteínas de la membrana y en la composición de los carbohidratos, que pueden alterar las estructuras de la membrana (Hezavehei *et al.*, 2018) también como fuente de activación se usa

el fluido ovárico o líquido celómico que acompaña las ovas durante el desove es un activador natural muy efectivo para el espermatozoide (Valdebenito *et al.*, 2009).

Los iones de potasio son los iones clave que controlan la motilidad del esperma en los salmónidos. Una disminución de las concentraciones ambientales de iones de potasio provoca el eflujo de iones de potasio a través de canales de membrana, lo que conduce a la hiperpolarización de la membrana y al inicio de la motilidad de los espermatozoides (Judycka *et al.*, 2016).

### **1.1.6.3. Concentración espermática.**

La concentración de esperma es uno de los principales parámetros de calidad que se evalúa como parte del análisis estándar de semen de peces. Se refiere al número de espermatozoides por ml (Judycka *et al.*, 2021).

Este parámetro está relacionado con la estación reproductiva, las hormonas adicionadas, la especie, alimento y calidad de agua que es variable entre individuos de la misma especie y entre especies, no hay un número exacto de espermatozoides para garantizar la fertilización debido al que están en función del número de óvulos a fertilizar considerando un aproximado de 2 a 3.5 millones de espermatozoides vivos por ovulo tanto papa el semen fresco, refrigerado y congelado (López-Hernández *et al.*, 2018).

La concentración espermática consiste en diluir una muestra de semen en una proporción 1:1200 con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) en una cámara contadora de partículas (Neubauer o Makler) y se expresa en porcentaje (Cruz-casallas *et al.*, 2006). También se debe reconocer que la relación esperma/huevo en las pajillas utilizadas podría mejorar las tasas de fecundación artificial en la trucha esto enfatiza la importancia de la elección de la relación óptima espermatozoides/huevos para determinar la capacidad de fecundación de los espermatozoides descongelados (Di Iorio *et al.*, 2019).

La concentración de espermatozoides varía entre las especies, las poblaciones e incluso dentro de las muestras de un mismo pez, en función del período de recogida durante la estación reproductiva. Por lo tanto, la concentración de espermatozoides en las pajuelas después de la dilución con un diluyente a una

proporción constante (generalmente 1:3 o 1:5) difiere entre los individuos, lo que podría causar diferencias en la motilidad espermática después de la descongelación y en las condiciones de la fecundación con respecto a la proporción espermatozoide-huevo (Judycka *et al.*, 2019).

Además se podría sugerir que la baja dilución probablemente inducida por las condiciones de hipoxia, afectan los parámetros de movilidad, mientras altas diluciones podrían hacer perder las propiedades protectoras de los compuestos del plasma seminal, lo que afectaría los valores de los diferentes parámetros de movilidad (Betancur *et al.*, 2008).

#### **1.1.6.4. Viabilidad espermática.**

La viabilidad del espermatozoide es un determinante clave de la calidad del espermatozoide y se basa principalmente en el análisis de la integridad y funcionalidad de la membrana celular. La viabilidad de los espermatozoides a menudo está relacionada con una membrana plasmática intacta, ya que el plasmalema es fundamental para las interacciones de los espermatozoides con otras células y su entorno (Judycka *et al.*, 2021).

Se sugiere que durante la congelación y descongelación, la osmorregulación celular puede dañarse cuando los espermatozoides se exponen a soluciones crioprotectoras, lo que resulta en un agrandamiento de la cabeza o la cola, seguido de lesiones en los orgánulos intracelulares, por lo que lleva a la disfunción de las mitocondrias y al derrame de la cromatina nuclear, dando lugar a células espermáticas anormales o muertas, además las anomalías morfológicas de la pieza media y la cola causan alteraciones progresivas en la motilidad, aumentando el número de espermatozoides con movimientos circulares u oscilatorios, reduciendo así la tasa de fertilización y por último en caso de congelación se presentan un aumento de tamaño o pérdida parcial de mitocondrias en la pieza media, además de colas rotas (Galo *et al.*, 2019).

Por otro lado la identificación de los parámetros de los espermatozoides relacionados con la viabilidad y la fertilidad posteriores a la descongelación es siempre un tema importante para la criopreservación en cualquier especie (Yang *et al.*, 2018). La viabilidad se refiere a los espermatozoides vivos y

muertos detectados con la tinción eosina – nigrosina en la que los vivos se tiñen de rojo y los vivos no; y en la morfología se detectan anomalías como espermatozoides con doble flagelo, gotas de citoplasma en el flagelo próximas a la cabeza, flagelos curvados o doblados y cabezas sin flagelo (López-Hernández *et al.*, 2018). Además, la viabilidad de los huevos debe ser estable en la solución de fecundación durante el tiempo que dura la fecundación, que es de unos  $2\pm 3$  min (Lahnsteiner, 2000)

### 1.1.7. Crioprotectores.

Tanto los diluyentes como los crioprotectores, son soluciones que tienen como función proteger la integridad del espermatozoide ante la acción tóxica de los productos generados por su propio metabolismo durante el proceso de crioconservación, e incrementar el volumen del eyaculado, protegiendo contra la acción tóxica de su propio metabolismo y cambios de temperatura, con características como la no presencia de sustancias tóxicas, simulación con la composición y osmolaridad seminal de cada especie, capacidad amortiguadora para proteger a los espermatozoides de las variaciones de pH, poseer sustancias que favorezcan la anaerobiosis, tales como citratos, fosfatos, glucosa, fructosa yema de huevo y leche (Medina *et al.*, 2005).

La glucosa es muy usada ya que suministra energía a los espermatozoides para los procesos vitales y el aporte de electrolitos (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010). Los crioprotectores reemplazan el agua intracelular de tal manera que el líquido intracelular es enfriado rápidamente entre  $-5$  y  $-15$  °C evitando así la presentación de cristales de hielo (Bustamante-gonzález *et al.*, 2019).

En el caso de los crioprotectores se tiene los penetrantes (glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, butanediol, acetamida y el dimetil sulfóxido (DMSO) y los no penetrantes (polivinil alcohol (PVA), hialuronato de sodio y la albúmina); por su efecto osmótico remueven el agua del citoplasma, para ser reemplazado por los crioprotectores permeables o penetrantes por otro lado tiene el efecto de prevenir el choque osmótico durante la descongelación (Medina *et al.*, 2005).

La mayoría de autores mencionan que el uso de DMSO (dimetilsulfoxido) tiene los mejores resultados post descongelación en las variables de movilidad total y

progresiva. El DMSO 10%, es confirmado como la preferencia en la mayoría de los procesos de crioconservación de semen de peces. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción a nivel celular, pero se ha sugerido que existe una interacción electrostática entre el grupo sulfóxido polar del DMSO y la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática (Pineda-Santis *et al.*, 2015).

Esta interacción podría darse entre la molécula de colina de los grupos cabeza de la fosfatidilcolina o por una interacción entre el oxígeno sulfóxido del DMSO y un grupo fosfato de la cabeza de fosfolípidos por medio de un enlace de hidrógeno con una molécula de agua, pero la toxicidad del DMSO está dirigida al estado bioenergético del espermatozoide, interfiriendo con el balance entre síntesis y utilización de ATP, al faltar ATP, el control metabólico sobre los procesos celulares dependientes de iones podría verse afectado, ocasionando una inapropiada activación de fosfolipasas y proteasas y un daño celular irreversible (Medina *et al.*, 2005).

El diluyente es una solución en agua destilada estéril de 5.5% (p:v) de glucosa, 12% (v:v) de yema de huevo de gallina y 10% (v:v) de dimetilsulfóxido (DMSO), primero se debe mezclar la glucosa con aproximadamente el 60% del agua destilada, previamente calentada a 37°C y luego se adiciona el volumen total de DMSO, la yema debe incorporarse inmediatamente antes de la utilización del diluyente y cuando la reacción exotérmica del DMSO con el agua haya terminado y luego se completa el diluyente (Cruz-casallas *et al.*, 2006). No olvidemos que también se debe considerar el uso glucosa en la formula porque a concentraciones de glucosa más bajas, el crioprotector sólo proporcionó una protección insuficiente, mientras que las concentraciones de glucosa más altas pueden tener un efecto deletéreo en los espermatozoides debido a la alta osmolalidad (Judycka *et al.*, 2019).

#### **1.1.8. Yema de huevo en la crioconservación.**

La yema de huevo ha sido usada con éxito en diluyentes en combinación con crioprotectores intracelulares para crioconservar espermatozoides de peces y mamíferos para atenuar los daños ocasionados por el choque térmico durante el enfriamiento, congelación y descongelación con un efecto de sinergia con el crioprotector (Atencio *et al.*, 2015). Tiene una acción termo protectora, la cual es ejercida por la fracción lipídica compuesta por lecitina y cefalina y una acción conservadora dada por la fracción lipoproteica (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010) o

como otros lo consideran debido a su contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL siglas en inglés) (Attencio *et al.*, 2015).

Por otra parte, la yema de huevo ha sido usada con éxito en diluyentes en alianza con crioprotectores extracelulares para espermatozoides criopreservados (peces y mamíferos) contra el choque térmico durante el enfriamiento, congelación y descongelación, por su composición química en términos de colesterol, ácidos grasos, lipoproteínas y fosfolípidos, los cuales influyen en la protección del semen criopreservado (Poma, 2004). También se usa la glucosa con el efecto de crioprotector no penetrante ya que la glucosa parece ser esencial para la criopreservación, lo que concuerda con los estudios que documentan la importancia de utilizar crioprotectores externos para preservar el semen de la trucha arco iris. El espermatozoide de la trucha arco iris parece ser sensible al daño criogénico resultante de las altas concentraciones de espermatozoides en las pajas (Ciereszko *et al.*, 2014).

### 1.1.9. Congelación

La congelación lenta utiliza bajas concentraciones de crioprotectores que se asocian a la toxicidad química y al choque osmótico; pero antes de congelar es necesario la refrigeración del semen a 4°C pues se reduce la actividad metabólica celular y aumenta la vida útil de los espermatozoides (Barbas y Mascarenhas, 2009). La congelación lenta, la congelación rápida y la congelación ultrarrápida (es decir, la vitrificación cinética) son métodos convencionales de criopreservación. La congelación lenta es un método en el que los espermatozoides se enfrían progresivamente durante un periodo de 2 a 4 horas en dos o tres pasos, de forma manual o automática, utilizando una máquina programable. Se ha sugerido que en la congelación lenta, la formación de cristales de hielo da lugar a altas concentraciones de electrolitos en el interior de las células y a posibles daños químico-físicos en los espermatozoides (Hezavehei *et al.*, 2018).

La criopreservación consiste en el congelamiento del semen en nitrógeno líquido para mantener su calidad por un periodo indeterminado. Durante la congelación la estructura de la membrana plasmática del espermatozoide puede perder su estructura lipídica, cuando los lípidos que la componen alcanzan su punto de transición, la membrana puede desorganizarse, empaquetándose para formar pequeñas micelas, afectando a la permeabilidad y otras funciones celulares ya que los lípidos se

desorganizan y las proteínas que hay entre ellos formando canales de permeabilidad o moléculas de reconocimiento, se ven afectados (Muñoz, 2011).

La superficie celular tiene regiones o dominios diferentes con funciones específicas, la pérdida del mosaico fluido durante la congelación conlleva a que esta regionalización se pierda, afectando la recepción y envío de señales que inician la movilidad, o el reconocimiento de la membrana entre los gametos (Bustamante-gonzález *et al.*, 2019). Además se mostró que hubo un aumento de la fragmentación del ADN después de la criopreservación que se puede observar por los píxeles y la longitud de la cola de los cometas (Cabrita *et al.*, 2005).

El congelado con vapores de nitrógeno es el más usado en peces, también dan buenos resultados la congelación con hielo seco e inmersión en nitrógeno líquido directo, sin olvidarse que el factor crítico en la congelación es la velocidad de congelación y es una variable menos estandarizada en estudios de crioconservación de semen (Medina *et al.*, 2005). En el caso de curvas de congelación lenta las células tienen más tiempo para deshidratarse antes de la congelación; sin embargo, la exposición prolongada puede presentar un medio residual hiperosmótico que puede influir en la viabilidad de la célula (Atencio *et al.*, 2014).

El crio daño que ocasiona la baja tasa de fertilidad puede ser el daño de la membrana espermática involucrada en el intercambio iónico que desencadena el proceso de activación además la desestabilización de la membrana espermática es causada por cambios abruptos de temperatura durante el enfriamiento y descongelación, en la transición de este evento se postula la hipótesis que tal daño se genera por la peroxidación de los lípidos de membrana y desacople de aminoácidos que desestabilizan las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y lípidos de membrana. Por otro lado, existe evidencia que sugieren que el proceso de criopreservación pueden generar daños significativos al genoma espermático, criodaños subletales que en muchos casos no pueden ser detectados por procedimientos estándar de evaluación espermática (Betancur *et al.*, 2008).

Las pajillas también juegan un papel importante en la congelación por que las pajillas con un volumen de 0,5 ml son adecuadas para los bancos de genes y para fines experimentales; las pajillas con un volumen de 1,2 ml tienen ventajas para la fertilización de grandes lotes de óvulos. Sin embargo, con las pajitas de 1,2 ml la

fecundación a gran escala es complicada, ya que se necesitan al menos 16 pajillas de 1,2 ml para fecundar 500 ml de óvulos (Lahnsteiner, 2000).

#### **1.1.10. Temperatura de congelación.**

En el curso de la criopreservación, los espermatozoides deben soportar varias tensiones graves iniciadas por el proceso de congelación / descongelación. Los principales agentes que afectan la supervivencia de los espermatozoides son la sensibilidad al choque por frío, la congelación y sobre todo las velocidades de enfriamiento además de la composición del diluyente y el estrés osmótico (Judycka *et al.*, 2021).

La mayoría usa caja de espuma de poliestireno llena de NL, utilizando marcos de espuma de poliestireno (o balsas) de fabricación casera o comercial, en los que se colocan pajitas que flotan en la superficie del nitrógeno líquido. Esta técnica permite la congelación en el gradiente de densidad de los vapores de NL, y se supone que las tasas de congelación dependen de las alturas de los marcos. Se trata de un método eficaz, que presenta algunas limitaciones importantes 1) una variabilidad relativamente alta de las condiciones de congelación, ya que es difícil conseguir condiciones reproducibles en una caja de espuma de poliestireno, 2) la falta de posibilidades de controlar la tasa de congelación utilizando programas informáticos y 3) una baja eficiencia (sólo se pueden cargar hasta 90 pajitas en un marco, mientras que se necesitan unas 1000 pajitas para ser congeladas en condiciones prácticas de incubación). En conjunto, las limitaciones restringen su uso en la tecnología de alto (Judycka *et al.*, 2019) además los cambios en los niveles de nitrógeno líquido como resultado de la evaporación tenían que ser compensados en intervalos de 15 - 20 min, una desventaja en comparación con las bandejas que flotan libremente (Lahnsteiner, 2000).

Cada especie tiene velocidad óptima de congelación de semen que garantiza su supervivencia; si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta. El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada por lo que se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevida,

implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido (Lahnsteiner, 2000).

Pero a la vez debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula. Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15-60 °C/ min, lo cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de sobrevivencia celular (Stornelli *et al.*, 2005), además la aparición espontánea del primer núcleo de hielo o nucleación, ocurre cuando la solución llega a temperaturas entre -5 y -15°C en cuyo caso la velocidad de enfriamiento juega un papel importante en este sentido. Si la congelación es suficientemente lenta el equilibrio es alcanzado a través del eflujo de agua, pero si la congelación es muy rápida, la célula no puede perder agua lo suficientemente rápido para alcanzar el potencial de equilibrio, congelándose intracelularmente.

Aunque la velocidad de congelación es una de los factores más críticos en el proceso de crioconservación de semen, esta es la variable menos estandarizada en los estudios de crioconservación seminal en peces (Medina *et al.*, 2005). En otras especies se han reportado tasas de mayor sobrevivencia espermática postdescongelación utilizando tasas de enfriamiento entre 20 y 30 °C/min antes del sumergimiento en nitrógeno líquido (Medina-Robles *et al.*, 2007). La mayoría de técnicas de conservación de semen aplican tasa de congelación lenta de 5°C hasta -80°C a una velocidad de 1 a 10°C/min y se sumergen al nitrógeno, también se han hecho con equipos programables con enfriamientos de 20°C hasta -80°C a una velocidad de 6°C/min y luego almacenadas en nitrógeno y aun así se causa daño al espermatozoide, además las temperaturas de congelación pueden variar entre -70°C, -80°C y -99°C, con diferentes resultados postdescongelación (Di Santo *et al.*, 2012).

Los resultados de la calidad seminal post descongelación pueden depender del protocolo de congelación utilizado, por sus cambios de descenso de temperatura entre los procedimientos por vapores de nitrógeno, versus los tratamientos de congelación programable. Otro factor determinante pudo ser la calidad de las muestras seminales utilizadas, la cual pudo presentar variaciones por efectos como la época y la edad de los reproductores, además la criopreservación es un método sensible a diversos

factores como el descenso de temperatura o el tipo de protector; siendo el DMSO como uno de los crioprotectores permeables de bajo peso molecular más empleado en la criopreservación de semen de teleósteos tropicales y salmónidos (Betancur *et al.*, 2008).

Durante el proceso de enfriamiento y congelación, los espermatozoides se ven sometidos a cambios drásticos en su entorno físico y químico. Uno de estos cambios tiene lugar cuando el agua líquida se convierte en hielo. La nucleación espontánea del hielo suele producirse después de que la solución se sobre enfríe a una temperatura entre -5 y -15°C. Los cristales de hielo crecerán rápidamente en todas las direcciones. El calor latente calienta la muestra hasta que la fracción restante no congelada de la solución alcanza la temperatura de congelación. En este punto, la formación de hielo se detiene o avanza a un ritmo que se rige por la velocidad a la que se sigue enfriando la muestra. La concentración de solutos y, en consecuencia, la presión osmótica de la fracción no congelada aumenta rápidamente, provocando un eflujo de agua de las células (Di Santo *et al.*, 2012).

Por lo tanto, las células se deshidratan y se encogen. Cuando las células se enfrían lentamente, la deshidratación puede proceder hasta el punto de equilibrio osmótico entre el espacio intra y extracelular. La deshidratación celular y, en consecuencia, la contracción osmótica de las células será máxima, y las células estarán expuestas durante demasiado tiempo a un aumento continuado de la concentración de solutos en la fracción no congelada, lo que puede causar los llamados efectos de solución. El aumento de la velocidad de enfriamiento conducirá a una menor deshidratación celular excesiva, a una menor concentración de solutos intracelulares y a una menor contracción celular (Viveiros *et al.*, 2001).

Al considerar el daño por congelación lenta, que parece ser causado por la contracción celular y el aumento de la concentración de electrolitos, durante un enfriamiento muy lento, el proceso de deshidratación gradual de la célula a medida que el hielo se forma lentamente (Fowler & Toner, 2005).

#### **1.1.11. Descongelación**

La descongelación es un punto importante en el proceso de criopreservación y también tiene efectos adversos, la recrystalización del hielo al momento de la

descongelación provoca efectos similares a los de la congelación, por otro lado se considera que además de los cristales de hielo también el desbalance osmótico que ocurre durante el proceso de descongelación y no a la formación de hielo intracelular, causando daños en la célula a nivel morfológico (membrana) y daño a nivel de DNA por la alteración del material genético de la célula (Atencio *et al.*, 2014). Para el descongelamiento, se realiza un baño-maría con agua a diferentes temperaturas (30-65°C), durante algunos segundos (5-15s) (Muñoz, 2011).

El rango de temperaturas de descongelación en semen crioconservado en peces es muy amplio, variando desde temperaturas cercanas a las de refrigeración de 4 °C hasta temperaturas por encima de los 80 °C, las temperaturas altas en corto tiempo son viables, pero es probable que las temperaturas óptimas puedan estar relacionadas directamente con las temperaturas del agua en la cual los peces desovan; es decir, temperaturas de descongelación más bajas para peces de agua fría y más altas para peces de agua cálida (Medina *et al.*, 2005). La evaluación del semen post descongelación, en los procesos de crioconservación son importantes, ya que se pueden evidenciar los posibles daños sufridos por los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010). En este caso, el tiempo de descongelación las pajitas no es un reto en los ensayos de fertilización, porque una pajita de 0,5 mL se descongela a 40° C durante 10 segundos (Judycka *et al.*, 2019).

Pero gracias a las temperaturas de descongelación y sus variantes se puede obtener mejores tasas de fertilidad ya que la alta tasa de descongelación (40 ° C / 5 s) resulta en un mayor porcentaje de espermatozoides móviles (Rusco et al., 2020). Cuando el periodo de descongelación se modifica por sólo 5 s o la temperatura de descongelación por 5 °C, la fertilidad del semen después de la descongelación se reduce significativamente. Cuando las pajuelas de 0,5 ml se descongelan a 25 °C durante 30 s, el semen se calienta a 20 °C, una temperatura superior a su óptimo. Se sugiere que, o bien la recristalización, la formación de cristales de hielo durante la descongelación, se reduce o se evita mediante este procedimiento de descongelación, o bien se reactivaron mejor las vías metabólicas (actividades enzimáticas) (Lahnsteiner, 2000). Normalmente, altas velocidades de enfriamiento producen cristales intracelulares pequeños que pueden llegar a ser inocuos, pero estos pueden

unirse y crecer durante la descongelación por medio de un proceso denominado recristalización (Medina *et al.*, 2005).

En general, las tasas de descongelación deben ser altas para evitar la recristalización pues se ha demostrado en salmónidos que la descongelación era el parámetro más sensible durante la criopreservación y que ligeras desviaciones de las condiciones óptimas reducían el éxito de la fecundación por lo que se sugirió un baño de agua a 25 °C durante 30 s para la descongelación del semen de la trucha arco iris pues parece que la recristalización y la formación de cristales de hielo durante la descongelación se redujeron o bien las actividades enzimáticas o las actividades enzimáticas se reactivaron mejor (Sarvi *et al.*, 2006). A este respecto, se acepta generalmente que, si la velocidad de congelación es suficientemente baja para inducir la deshidratación celular, se requiere una velocidad de descongelación baja para asegurar una rehidratación adecuada; por el contrario, las altas velocidades de congelación inducen la congelación del agua intracelular, por lo que es necesaria una velocidad de descongelación rápida para evitar la recristalización (Rusco *et al.*, 2019).

#### **1.1.12. Fecundación.**

En caso de la fecundación se sabe que no hay una correlación entre la motilidad y la tasa de fecundación por lo que la tasa de fertilización adecuada observada podría estar relacionada con el alto vigor de las células espermáticas vivas, a pesar de su movilidad reducida, los espermatozoides que permanecieron viables después de la descongelación probablemente no tuvieron daños en la pieza media. (Galo *et al.*, 2019).

Los huevos fecundados u oculados se consideran fértiles, la tasa de fecundación se calcula después de 21 días, debido a que en este tiempo se aprecia con mayor claridad la fase de división celular y la tasa de fertilización además se considera que peces con buena calidad en el desove se caracterizan por porcentajes de fertilización mayor al 90% y bajos porcentajes de malformación (Vargas, 2013).

En promedio algunos autores usan la proporción de espermatozoides-huevos de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides/huevos para un éxito óptimo de la fecundación (Şahin *et al.*, 2013) para ellos usan 10 gramos de huevo (100 ovas), mientras que para Bastardo *et al.*, (2004) es necesario  $1 - 2 \times 10^5$  espermatozoides

por huevo. Mientras que según Judycka *et al.*, (2021) es necesario 300.000 espermatozoides de semen fresco por ova para garantizar la fertilidad, además es posible usarlo en criaderos si aceptamos que una trucha arco iris hembra (peso de 1,5 kg) produce alrededor de 3000 huevos, la fertilización de ese número de huevos en una proporción espermatozoide / huevo de 1.000.000: 1 se puede realizar utilizando solo dos pajitas de 0,5 ml de esperma criopreservado utilizando un protocolo estandarizado, que asegura que  $3 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$  es obtenido, por otro lado también menciona que si suponemos que una hembra trucha arco iris (peso de 1,5 kg) produce unos 3.000 huevos, la fecundación de ese número de huevos puede cumplirse utilizando sólo seis pajuelas de 0,5 mL de esperma criopreservado (Judycka *et al.*, 2019).

También se considera que, en comparación con los espermatozoides del semen fresco, el porcentaje de espermatozoides inmóviles aumentó significativamente y la tasa de espermatozoides móviles disminuyó. Con una proporción baja de espermatozoides por óvulo, la tasa de fecundación de los espermatozoides también disminuyó significativamente; sin embargo, la disminución de la capacidad de fecundación se pudo compensar completamente con una mayor proporción de espermatozoides por óvulo (Lahnsteiner, 2000).

Como el semen congelado-descongelado presenta numerosas alteraciones y su calidad no es estable, debe activarse y entrar en contacto con los óvulos lo antes posible. Bajo estas consideraciones, la técnica de fecundación húmeda tiene las siguientes ventajas. Los óvulos ya se han introducido en la solución de fecundación antes de descongelar las pajuelas y, una vez descongeladas éstas, el semen se mezcla inmediatamente con los óvulos y se activa simultáneamente con la solución de fecundación (Judycka *et al.*, 2019).

En cambio, cuando se utiliza la técnica de fecundación en seco, los espermatozoides se mezclan primero con los óvulos y luego se añade la solución de fecundación. El retraso entre la descongelación del semen y su activación puede disminuir la calidad del esperma. Los restos de líquido ovárico que se adhieren a los óvulos pueden activar parcialmente la motilidad de los espermatozoides, pero debido a los volúmenes restringidos, no es posible el movimiento progresivo de los espermatozoides hacia el micrópilo (Lahnsteiner, 2000).

Además, la proporción de espermatozoides por ova también juega un papel importante en la fertilidad pues se demuestra que la capacidad de fecundación posterior a la descongelación del semen de trucha arco iris puede ser similar a la del semen fresco con una relación espermatozoides-óvulo tan baja como 600.000:1 (Ciereszko et al., 2014). Hay que destacar que para los peces salmónidos se recomienda una relación de 300 000:1 para la fecundación con semen fresco mientras que la fecundación con semen de trucha marrón descongelado, la relación espermatozoides-óvulo más baja ( $1,2-2,4 \times 10^6$  espermatozoides por óvulo) aseguraba una alta tasa de fecundación post descongelación (Nynca *et al.*, 2014).

## 1.2. Antecedentes

Rusco *et al.* (2020) tuvo el objetivo de probar la efectividad de un procedimiento simple de criopreservación de semen, desarrollado para salmónidos cultivados, en salmónidos silvestres del área mediterránea y evaluar el efecto de diferentes tasas de descongelación y proporciones espermatozoides-óvulos. El semen de cinco machos individuales se diluyó en una concentración final de diluyente de glucosa 0,15 M y metanol al 7,5% y se cargó en pajitas de plástico de 0,25 ml y una concentración final de espermatozoides de  $3,0 \times 10^9$  Se obtuvo espermatozoides / mL. Después del equilibrio, las pajitas se congelaron por exposición a vapor de nitrógeno líquido a 3 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido durante 5 min. El semen se descongeló a 40 °C / 5 y 10 °C / 30 s. La criosupervivencia de los espermatozoides se evaluó examinando in vitro los parámetros de motilidad de los espermatozoides utilizando el sistema CASA, seguido de ensayos de fertilización in vivo, utilizando tres proporciones diferentes de espermatozoides a óvulo  $6 \times 10^5$ ,  $4,5 \times 10^5$  y  $3 \times 10^5 : 1$ . El procedimiento de crioconservación aplicado resultó en una motilidad total de los espermatozoides después de la descongelación notablemente alta (85,6%), cuando el semen se descongeló a 40 °C / 5 s, mientras que la tasa de fertilización más alta (53,1%) se registró para un espermatozoide a óvulo relación de  $4,5 \times 10^5 : 1$ . De acuerdo con estos resultados, el procedimiento de crioconservación que se probó resultó ser efectivo para la población silvestre de trucha marrón mediterránea y práctico para la creación del primer criobanco de semen europeo.

Di Iorio *et al.* (2019) en su trabajo sobre criopreservación de semen para la trucha marrón mediterránea del río Biferno, tratando de optimizar el protocolo de congelación de semen de la trucha marrón a través de un análisis in vitro de los efectos de dos extensores básicos

combinados con tres crioprotectores sobre la calidad del semen post descongelación; y una in vivo prueba para evaluar la tasa de fertilización y eclosión. En la que uso diferentes tipos de extensores como la glucosa y adicionando a los extensores DMSO 10%, y 10% de yema de huevo como crioprotector no penetrante, haciendo unja dilución de 1:3 (v: v; semen: diluyente). El semen extendido se envasó en pajitas de plástico de 0,25 ml. A continuación, las pajillas se equilibraron durante 10 minutos a 4°C (tiempo de equilibrio) y se congelaron mediante exposición a vapor de nitrógeno líquido a 5 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido durante un período de 10 minutos. Después de la crioconservación, las pajitas se sumergieron en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -196 ° C. Posteriormente, las muestras de semen se descongelaron en un baño de agua a 30 ° C durante 10. Los resultados que encontró fueron que para la motilidad de los espermatozoides (%) y su duración (segundos) en semen fresco fueron  $81,2 \pm 5,7$  y  $46,3 \pm 6,1$ , la viabilidad espermática y la integridad del ADN (%) fueron  $83,8 \pm 3,3$  y  $97,6 \pm 1,2$   $10^9$  respectivamente, y la concentración promedio de espermatozoides fue  $10,6 \pm 1,4 \times$  espermatozoides / ml. En caso de la viabilidad espermática por efecto del dilutor se tiene desde 29.9 hasta 36.3%, mientras que la integridad de membrana es de 97.3%, la motilidad iba desde 20 a 42%, con un tiempo de activación de entre 30 a 40 s por efecto de la congelación, mientras que la fertilidad estuvo entre 27 al 36%.

Castro-Castellón *et al.* (2017) evaluó la calidad del semen utilizando muestras de reproductores del lote Michoacano a finales de su periodo reproductivo. Se seleccionaron siete machos y una hembra con edad promedio de tres años; fueron sedados con anestésicos económicos, una vez anestesiados se obtuvieron medidas biométricas de cada organismo, así como la extracción del semen mediante una ligera presión abdominal. Se realizaron pruebas cuantitativas y cualitativas para determinar la calidad del semen y también se determinó la tasa de fecundación. Los resultados, en cuanto al volumen de semen promedio, fue de  $18.80 \pm 7.77$  mL. El número de espermatozoides promedio fue de  $7.7 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^7$  con un máximo de  $14 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> y un mínimo de  $38 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>. La motilidad promedio fue de  $46.25 \pm 9.08$  s con una motilidad vigorosa de  $22.33 \pm 4.34$  s. Para determinar el porcentaje de fecundación se utilizaron 421 huevos obteniendo el 98% de viabilidad.

Judycka *et al.* (2016) tuvo el objetivo de determinar el efecto de la dilución en diferentes medios de maduración sobre la calidad del esperma (características de motilidad del esperma y capacidad de fertilización) del esperma congelado / descongelado de trucha

arco iris hembra con sexo inverso. También se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento posterior a la descongelación (0, 15, 60 y 120 min) sobre la calidad del semen. Se evaluaron los parámetros de motilidad de los espermatozoides y la tasa de fertilización en las etapas de ojos y eclosión para el semen posterior a la descongelación diluido en diferentes medios. El procedimiento de criopreservación resultó en una alta motilidad de los espermatozoides después de la descongelación de aproximadamente el 57% y no difirió del semen fresco. Inesperadamente, los medios de maduración disminuyeron la capacidad de activación de los espermatozoides inmediatamente después de la dilución; sin embargo, la motilidad de los espermatozoides aumentó con el tiempo. Las tasas de fertilización del semen congelado / descongelado fueron altas (71-87%) y no difirieron significativamente entre las variantes experimentales en ninguno de los períodos de almacenamiento probados. Para la crioconservación uso glucosa-metanol (GM; 0,18 M de glucosa en 9% de metanol) en pajuelas de 0,25 ml. La concentración final concentración de glucosa fue de 0,162 M y la concentración final de metanol fue del 8,1%. Las pajillas con el semen diluido se colocaron en un marco de 3 cm de altura hecho de espuma de poliestireno y se equilibraron durante 15 min en hielo, seguido de la flotación en nitrógeno líquido durante 5 min y la inmersión en líquido. A continuación, las pajitas se descongelaron por inmersión en un baño de agua a 40 °C durante 5 s, usando una proporción de 500.000:1 espermatozoides por huevo.

Figuroa *et al.* (2016) tuvo el objetivo de determinar el efecto de la congelación sobre la función en espermatozoides de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). El semen se congeló en medio de Cortland+1,3M dimetilsulfóxido+0,3M glucosa+2% albúmina de suero bovino (concentración final) en una proporción de 1:3 (semen: crioprotector) como tratamiento (T) y semen fresco como control (F). Se congelaron pajuelas de 0-5ml de suspensión espermática en 4 cm de N2L. Se descongelaron en un baño termorregulado (40° C). Tras la descongelación, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado [transferasa dUTP (desoxiuridina trifosfato) nick-end labelling (TUNEL)], la integridad de la membrana plasmática (SYBR-14/PI) y el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ MMit, JC-1) mediante citometría de flujo y se evaluó la motilidad mediante microscopio óptico bajo luz estroboscópica. Las tasas de fecundación del semen de control y de tratamiento se comprobaron a una densidad de espermatozoides de  $1-5 \times 10^7$  espermatozoides ovocito-1, mediante la observación de los primeros clivajes tras 16 h de incubación a 10° C. En el semen criopreservado (T), la media  $\pm$  d.s. La

fragmentación del ADN fue del  $4-8 \pm 2-5\%$ ; la integridad de la membrana plasmática, del  $75-2 \pm 6-3\%$ ; el potencial de la membrana mitocondrial, del  $51-7 \pm 3-6\%$ ; la motilidad, del  $58-5 \pm 5-3\%$ ; la velocidad de los espermatozoides (VCL)  $61-2 \pm 17-4 \mu\text{ms}^{-1}$ ; la velocidad de la trayectoria media (VAP)  $50-1 \pm 17-3 \mu\text{ms}^{-1}$ ; la velocidad de la línea recta (VSL)  $59-1 \pm 18-4 \mu\text{ms}^{-1}$ ; la tasa de fecundación, del  $81-6 \pm 1-9\%$ . Hubo diferencias significativas en la integridad de la membrana plasmática, el potencial de la membrana mitocondrial, la motilidad y la VCL en comparación con los controles ( $P < 0-05$ ). También el potencial de la membrana mitocondrial se correlacionó con la motilidad, la tasa de fecundación, la velocidad de la línea curva (VCL) y la VSL ( $r = 0-75$ ;  $r = 0-59$ ;  $r = 0-77$  y  $r = 0-79$ , respectivamente;  $P < 0-05$ ); y la tasa de fecundación se correlacionó con la VCL y la VSL ( $r = 0-59$  y  $r = 0-55$ , respectivamente)

Golshahi *et al.* (2015) en un estudio para determinar la motilidad y capacidad de fertilización de los espermatozoides criopreservados de trucha marrón del Caspio (*Salmo trutta caspius*) en el que investigaron el efecto de las proporciones espermatozoides a óvulos de 100.000: 1, 300.000: 1 y 600.000: 1 sobre la fertilidad del semen. La calidad se evaluó midiendo los parámetros de motilidad de los espermatozoides y las tasas de fertilización en las etapas de ojos y eclosión. El porcentaje de motilidad fue mayor al 60% para el semen criopreservado y no se vieron afectados por 60 min de almacenamiento por otro lado la tasa de fertilidad fue de más de 70% y no fue afectada por los 60 minutos de almacenamiento. Para su procedimiento de congelación las muestras de semen se diluyeron 1:3 en un diluyente compuesto por 0,3 M de glucosa y 10% de metanol. El esperma se cargó en pajitas de plástico de 0,5 ml colocadas en un marco de 3 cm de altura hecho de espuma de poliestireno, y se equilibró durante 15 minutos en hielo. A continuación, las pajitas se hicieron flotar en la superficie del nitrógeno líquido durante 5 minutos y se sumergieron en nitrógeno líquido. Las pajuelas se descongelaron en un lote de agua a 40 °C durante 5 s.

Iaffaldano *et al.*, (2015) en su trabajo determinó: (i) los efectos in vitro de diferentes tasas de congelación sobre la calidad del semen después de la descongelación de truchas marrones mediterráneas (*Salmo trutta macrostigma*) del río Biferno; y (ii) el porcentaje de fecundación e incubación in vivo de la tasa de congelación que da lugar a la mejor calidad del semen después de la descongelación. Las muestras de semen agrupadas se diluyeron 1:3 (v:v) en un diluyente de congelación compuesto por 300 mM de glucosa, 10% de yema de huevo y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). El semen diluido se envasó

en pajitas de plástico de 0,25 ml y se congeló a diferentes alturas sobre la superficie de nitrógeno líquido (1, 5 o 10 cm) durante 10 minutos para obtener tres velocidades de congelación diferentes. Las muestras de semen se descongelaron a 30°C durante 10 s. Las variables evaluadas tras la descongelación fueron la motilidad espermática, la duración de la motilidad y la viabilidad. Nuestros resultados indican claramente un efecto significativo de la velocidad de congelación sobre la calidad del semen después de la descongelación. El semen congelado a 5 cm por encima de la superficie de nitrógeno líquido mostró la mejor calidad tras la congelación/descongelación. Basándose en estos datos *in vitro*, se fecundaron 2 grupos de 200 óvulos con semen fresco o con semen congelado a 5 cm por encima de la superficie de nitrógeno líquido. Las tasas de fecundación y eclosión registradas en los óvulos fecundados con semen congelado fueron significativamente inferiores (25,4% y 22,5%, respectivamente) a las obtenidas con semen fresco (87,8% y 75,5%, respectivamente). Un protocolo de congelación eficaz permitirá la creación de un criobanco de semen para recuperar la población original de trucha marrón mediterránea en el río Biferno

Ciereszko *et al.* (2015) en su trabajo con hembras de trucha arcoiris masculinizadas intentó criopreservar el semen obtenido de la cepa de primavera de la trucha arco iris de sexo invertido. Su segundo objetivo era probar la capacidad de fertilización del esperma criopreservado con el uso de un número creciente de óvulos, en el rango de 100 a 1600, con el fin de ampliar el uso del esperma criopreservado. Se observó una elevada movilidad de los espermatozoides tras la congelación-descongelación. El porcentaje de movilidad de los espermatozoides del semen criopreservado (56%) no difiere del semen fresco (49%). Se obtuvieron altas tasas de fecundación absoluta del semen criopreservado:  $91,2 \pm 1,5$ - $93,7 \pm 1,7\%$  y  $83,0 \pm 5,5$ - $90,3 \pm 3,5\%$  para los embriones con ojos y las larvas eclosionadas, respectivamente. No se registraron diferencias entre el número de huevos. En conclusión, hemos demostrado que un procedimiento eficaz de criopreservación de semen de trucha arco iris hembra de desove otoñal es también muy eficaz para los peces de desove primaveral. desove de primavera. Es posible aumentar el número de huevos fecundados hasta 1600 huevos. Por lo tanto, es posible incorporar el semen criopreservado en los programas de cría con el uso de semen de hembras de sexo invertido de trucha arco iris de la cepa de primavera.

Ciereszko *et al.* (2014) tuvo el objetivo de mejorar la calidad del semen de trucha arco iris criopreservado después de la descongelación. La calidad se evaluó midiendo la

espermotilidad y las tasas de fecundación en los estadios de ojo, eclosión y larva nadadora. En primer lugar, se comprobó cómo afectaban a la motilidad post-descongelación las diferentes concentraciones de glucosa en un diluyente de metanol (0,1, 0,2 y 0,3 M,  $n = 9$  machos diferentes por concentración) y las diferentes relaciones semen-extensor (1:3, 1:1 y 3:1,  $n = 3$  machos y, en un experimento separado, 1:3 y 1:5,  $n = 6$ ). Se midió la motilidad de los espermatozoides y las tasas de fecundación de las muestras con 0,18 M de glucosa en 9% de metanol como diluyente, una proporción de 1:5 de espermatozoides por diluyente y un período de equilibrio de 15 minutos, con proporciones de 100.000, 300.000 y 600.000:1 de espermatozoides por huevo. Las condiciones óptimas de criopreservación fueron 0,15 M de glucosa en el diluyente, un período de equilibrio de 15 minutos y una proporción de 1:5 entre el semen y el diluyente. Esta combinación dio como resultado una alta motilidad después de la descongelación (49,9%) y tasas de eclosión ( $67,1 \pm 18,7$ ,  $78,6 \pm 17,0$  y  $84,4 \pm 10,0\%$  para relaciones esperma-huevo de 100.000, 300.000 y 600.000:1, respectivamente). Hasta donde sabemos, este es el primer informe que demuestra que la capacidad de fecundación posterior a la descongelación del semen de trucha arco iris puede ser similar a la del semen fresco con una relación esperma-huevo tan baja como 600.000:1.

Kutluyer *et al.* (2014) en su estudio sobre criopreservación de espermatozoides de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la que usó pajuelas con un volumen de 0,25 ml se preenfriaron a 4 °C antes de su uso. El semen se diluyó en los diferentes tipos de diluyentes fríos a 4 °C en una proporción de 1:10 (semen:diluyente). De dos a 10 minutos después de la dilución, el semen se aspiró en pajitas de 0,25 ml; las pajillas se colocaron en la bandeja durante 10 minutos y se sumergieron en nitrógeno líquido. Después de una semana, las pajitas congeladas se descongelaron en un baño de agua a 40 °C durante 5 s inmediatamente antes de utilizarlas para las mediciones de motilidad y los ensayos de fecundación. El diluyente estándar tuvo 10% de DMSO y 7.5% de yema de huevo además de otros antioxidantes, por lo que pudo determinar que la motilidad con el dilutor estándar fue mayor al 30%, pero con la adición de antioxidantes con la metionina se logró hasta más de 60%, mientras que el tiempo de activación fue de casi 20 segundos para el dilutor estándar mientras que con el uso de antioxidantes como ácido úrico llegó hasta casi 30 segundos y por último en cuanto a la tasa de fertilidad para el dilutor estándar fue de 86% y al complementarlo con antioxidantes se logró tasas de hasta 90% como en el caso de la carnitina.

Lahnsteiner *et al.* (2011) realizó una investigación sobre el efecto de los antioxidantes sobre la calidad del semen criopreservado en dos salmónidos, la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Se empajillo en pajillas de 0.5 ml que se enfriaron a 4°C antes de su congelación con una dilución de 1:3, de dos a cinco minutos después de la dilución, se aspiró el semen en pajitas de 0,5 ml, se colocaron las pajitas en la bandeja, se congelaron durante 10 minutos y se sumergieron en nitrógeno líquido, la congelación en vapores de nitrógeno a un nivel de 2.5 cm del nivel de nitrógeno. Para la descongelación, las pajuetas se sacaron del recipiente y se descongelaron en agua a 25 °C durante 30 segundos. El semen descongelado se utilizó inmediatamente para las mediciones de motilidad, las pruebas de viabilidad, las pruebas de integridad del ADN o los ensayos de fertilización. El extensor fue 10% de metanol para el experimento. En la que pudo determinar una motilidad de 30% para el semen congelado, y una actividad seminal de 38 segundos, mientras que la tasa de fertilidad para la trucha arcoiris fue de 87% cuando se utilizó el diluyente estándar, el control del semen fresco fue de 88,9%.

Necmettin, *et al.* (2003), realizaron un experimento con 25 truchas machos a los cuales les extrajó semen y los mezcló con diferentes preparaciones a base de DMSO, las primeras dos disponían de un número alto de compuestos adicionales mientras que la solución III solo disponía de DMSO, glucosa y yema de huevo. Para la congelación usaron una dilución de 1:3. Las muestras diluidas se equilibraron unos 2-5 minutos a 4°C. A continuación, las pajitas etiquetadas se colocaron horizontalmente en una bandeja sobre nitrógeno líquido en una caja de espuma de poliestireno. Las pajitas se congelaron en el vapor del nitrógeno líquido, a 3 cm por encima de la superficie del líquido, durante 10 minutos y luego se sumergieron en el nitrógeno líquido. Las pajitas se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido y se almacenaron durante varios días. Las pajitas congeladas se descongelaron en un baño de agua a 30°C durante 10 segundos y se activaron con NaCl al 0,3%. El autor encontró que la media para el volumen fue de 19.72 ml, motilidad masal de 76%, activación espermática de 98.6 segundos, concentración espermática de  $7.2 \times 10^9$  ml, y un Ph de 7.18 y al hacer la prueba de fertilidad pudo encontrar que el mejor resultado se obtuvo con el dilutor III con 56% de motilidad post descongelación, 84.33 segundos de activación espermática post descongelación y una fertilidad de 80% comparado con el 92% del control con semen fresco.

Betancur *et al.* (2008) en su trabajo sobre la estandarización del manejo y la crío preservación de semen de hembras masculinizadas de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) pudo encontrar que la demanda de líneas monosexo hembras en la producción de trucha ha incrementado significativamente en los últimos años, por lo que se han desarrollado tecnologías para estandarizar este proceso como el uso de semen de hembras genéticas sometidas a reversión sexual. El objetivo de la presente investigación fue estandarizar la maduración *in vitro* y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas (neomachos XX) de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) como estrategia para producir descendencias 100% hembras de reproductores colombianos. Para la obtención del semen los neomachos fueron sacrificados y el semen recuperado fue sometido a proceso de maduración con plasma seminal de machos normales o plasma seminal artificial. Para la criopreservación del semen se probaron los crioprotectores dimetilsulfóxido 10% y metanol 10%. En el experimento se evaluaron la movilidad post maduración y post descongelación y la fertilidad del semen. El proceso de maduración tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de movilidad ( $p < 0.05$ ), al obtener los mejores valores con el plasma seminal artificial ( $55 \pm 10.4\%$  espermatozoides móviles). Los mayores valores de movilidad postdescongelación ( $29.9 \pm 13.3\%$ ) al igual que la mejor fertilidad ( $26.33 \pm 7.53\%$ ), se registraron con el protocolo de dimetilsulfóxido al 10%.

Salte *et al.* (2004) en truchas arcoiris con una tasa de congelación de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta llegar a  $-110^{\circ}\text{C}$  y su inmersión tuvo motilidad de  $30 \pm 0.9$ , las tasas de fecundación después de la descongelación fueron superiores al 80% de los controles con machos de trucha arco iris noruega con una proporción media de espermatozoides móviles por óvulo de  $3,8 \times 10^6$ . Las muestras de orina se diluyeron 1:3 o 1:5 en un diluyente de hielo que contenía metanol como crioprotector y las alícuotas se transfirieron a pajillas de 0,5 ml, que se equilibraron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y luego se congelaron en bastidores en una unidad de congelación programable; la curva de congelación tuvo una tasa de congelación de  $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  de  $+4$  a  $-110^{\circ}\text{C}$ . Los machos italianos produjeron por término medio sólo la mitad del número de espermatozoides de los sementales noruegos por unidad de volumen, 704 frente a 1633, y tuvieron la mitad de la fracción de espermatozoides móviles después de la descongelación (17,9% frente a 35,1%). Por lo tanto, el número de espermatozoides móviles por dosis criopreservada de los sementales noruegos fue cuatro veces mayor.

Sarvi *et al.* (2006) estudió la criopreservación del semen de la trucha marrón del Caspio (*Salmo trutta caspius*), en peligro de extinción, y los efectos de dos diluyentes y tres tasas de descongelación sobre la capacidad de fecundación. Tras evaluar la calidad del semen, se diluyó una parte de semen con tres partes de diluyente y se introdujo en pajuelas de 0,5 ml. La congelación se realizó a 2 cm por encima de la superficie de nitrógeno líquido y la descongelación a 5 °C durante 90 s, 15 °C durante 45 s y 25 °C durante 30 s en baños de agua y se utilizó para la fecundación. Uso del diluyente: 0,3 M de glucosa+10% de metanol +10% de yema de huevo, y 0,6 M de sacarosa+10% de DMSO+10% de yema de huevo, produjo tasas de ojeo del  $66,6\% \pm 2,2$  y  $59,8\% \pm 5,1$ , respectivamente. La descongelación del semen criopreservado fue mejor a 25 °C en baño de agua durante 30 s y se observaron diferencias significativas en las tasas de ojeo e incubación entre 25 °C en baño de agua con 5 °C, 15 °C ( $p < 0,05$ ). En este estudio se encontraron interacciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre el tipo de diluyente y la velocidad de descongelación.

Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) realizó la criopreservación de semen de hembras de trucha arco iris de sexo inverso y tubo como objetivo racionalizar la producción de poblaciones compuestas por un 100% de hembras. Semen de machos normales (M) y dos tipos de hembras genotípicas (R y G), con sexo inverso mediante la administración oral de 17  $\alpha$ -metiltestosterona. Se obtuvo la fertilización de óvulos normales con semen de hembras con sexo inverso de R, G y M. El semen se diluyó en una solución diluyente (glucosa 5,4 g, yema de huevo 10 ml, dimetilsulfóxido 10 ml, agua 80 ml) en una proporción de 1: 3 (semen / diluyente), se almacenó en pajetas de 0,5 ml y se congeló en un envase seco (Cryopac CP-65) a -180°C. La descongelación se realizó con agua a 70°C durante 3 segundos. No hubo diferencias significativas en la tasa de fertilización ( $P > 0.05$ ) entre los grupos de semen descongelado ( $M = 73.1 \pm 11.5\%$ ;  $R = 67.2 \pm 23.6\%$ ;  $G = 64 \pm 5.8\%$ ), lo que confirma que la metodología de congelación utilizada fue eficiente para criopreservar el semen de los tres grupos de truchas.

Babiak *et al.* (2001) en su trabajo sobre efecto de la composición del diluyente y el tiempo de equilibrio sobre la capacidad de fertilización y la actividad enzimática de los espermatozoides criopreservados de trucha arco iris. En la que uso diferentes tipos de crioprotectores, diferentes diluyentes, adicionando o no yema de huevo y don aplicación de 10 minutos de tiempo de equilibrio. En los tratamientos con un tiempo de equilibrio de 10 minutos se diluyó progresivamente una parte de semen con tres partes de diluyente durante 8 min, y luego se dejó el semen diluido durante 2 min más y se congelaron. En la

que encuentro que la fecundación de los huevos con semen congelada sin equilibrar en el diluyente de Erdahl y Graham + 10% de DMA + 10% de yema y en glucosa 0,3 M + 10% de DMA dio lugar a tasas de eclosión del 80,9% y el 77,2%, respectivamente. Por lo que el uso de tiempo de aclimatación solo bajo las tasas de fertilidad. En resumen se concluye que el DMSO es un buen crioprotector como también el DMA. El elevado porcentaje de larvas nadadoras (72,9%), obtenido tras la fecundación de los huevos con espermatozoides congelados en Erdahl & Graham's + 10% DMA + 10% de yema, demuestra que se trata de uno de los procedimientos más eficaces. El efecto del equilibrado dependió significativamente del tipo de crioprotector utilizado, el equilibrado no fue perjudicial en el caso del DMA, mientras que disminuyó significativamente la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados cuando se utilizó DMSO o etilenglicol como crioprotectores. De los resultados del presente estudio podría concluirse que el equilibrado de los espermatozoides de trucha arco iris antes de la congelación no es necesario.

Fogli Da Silveira *et al.* (1994) condujeron un experimento en el que se usó un Pool de semen de 3 reproductores de trucha arco iris y evaluando sus parámetros cuantitativos y fue dividido en 3 partes. La primera fue semen fresco mantenido en refrigeración entre 0 a 5 °C hasta su uso en la fertilización, la segunda fue diluida con un dilutor y mantenido en refrigeración entre 0 a 5 °C hasta su uso en la fertilización y la tercera parte de semen fue diluido en el mismo dilutor al cual se le agregó 10% de DMSO, y envasada en pajillas de 0.5 ml para cuando la temperatura fue bajada a 2°C se puso en los vapores de nitrógeno hasta provocar un descenso de temperatura de 30°C/min hasta llegar a -80°C e inmediatamente inmerso en el nitrógeno líquido. En la que pudo encontrar que los siguientes parámetros pre congelación como volumen de 8 ml por macho, concentración de  $16 \times 10^6$ /mm, motilidad de 90%, Vivos de 97% y las tasas de fertilidad de 93% para semen fresco, 86% para diluido refrigerado, 36% para descongelado rápido (70 a 80 °C por 3 a 4 segundos), 31% para descongelación lenta (10°C por minuto) por lo que concluye que es necesario mejorar la técnica de congelación para aumentar la tasa de fertilidad.

Lahnsteiner *et al.* (1996 b) investigó la influencia de las variaciones admisibles de los parámetros metodológicos bajo el aspecto de la utilización rutinaria bajo condiciones experimentales optimizadas, las tasas de fecundación fueron del 90-100% de los controles en *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta* L, / *lacustris*. *Salmo trutta* L, / *fario* y *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), sus resultados fueron: 1, El almacenamiento de semen no tratado

durante más de 1 h antes de la criopreservación disminuyó la fertilidad post descongelación; 2, El equilibrio del semen hasta 20 min en el diluyente no afectó a la fertilidad post descongelación; 3, La proporción óptima de dilución del semen en el diluyente fue el triple en *Oncorhynchus mykiss* y *Salvelinus fontinalis*. Las proporciones de dilución más bajas disminuyeron la fertilidad después de la descongelación, mientras que las proporciones de dilución más altas no afectaron a la fertilidad después de la descongelación. En *Salmo trutta f. lacustris* y *Salmo trutta* que tienen una mayor densidad espermática, la relación de dilución óptima del semen en el diluyente fue de cinco a siete veces. 4, En *Oncorhynchus mykiss*, al igual que en *Salmo trutta f. lacustris* y *Salmo trutta f. fario*, la altura óptima de congelación fue de 1,5 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido ( $-110 \pm 2^\circ\text{C}$ ); en *Salvelinus fontinalis* fue de 2,5 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido ( $-92 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Los cambios en la altura de congelación de 0,5 cm (alrededor de  $10^\circ\text{C}$ ) resultaron en una disminución significativa de la fertilidad post-descongelación, 5, El almacenamiento de semen congelado hasta 3 70 días en nitrógeno líquido no tuvo influencia en su tasa de fertilización post-descongelación, 6, El almacenamiento de semen congelado/descongelado durante 30 s antes de la inseminación disminuyó significativamente su fertilidad post-descongelación, 7, Relación espermatozoides y óvulos para obtener tasas de fecundación del 90-100% del control fue de  $3-5 \times 10^5$  espermatozoides/óvulos.

Conget *et al.* (1996) en un intento de establecer un protocolo para la criopreservación de los espermatozoides de la trucha arco iris trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), estudiamos el efecto de varios agentes crioprotectores (CA) en la motilidad la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, antes, durante y después de la congelación. La congelación se realizó mediante un sistema de de congelación controlada, que permite el ajuste preciso de diferentes velocidades de de enfriamiento, así como un registro adecuado de las temperaturas intra-muestra durante todo el procedimiento. Los resultados obtenidos indican que, antes de iniciar la congelación, la motilidad de los espermatozoides se ve afectada más por el tiempo de exposición a la CA que por la naturaleza química de los agentes. Los periodos de exposición superiores a 10 minutos afectaron a la motilidad de forma irreversible, lo que parece estar relacionado con la alta osmolaridad de las soluciones diluyentes. Para estudiar los cambios en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides durante y después de la criopreservación, las células en



la solución crioprotectora (glicerol, DMSO o DMSO-sacarosa) se procesaron en un congelador biológico programable a velocidades de enfriamiento lentas ( $1^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) o rápidas ( $30^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos indicaron que tanto durante ( $-60^{\circ}\text{C}$ ) como después de finalización del programa de congelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ . seguido de almacenamiento bajo nitrógeno líquido), la motilidad y la viabilidad se conservaban bien sólo en las células en DMSO-sacarosa cuando se sometían a una velocidad de enfriamiento rápida. En estas condiciones, aproximadamente el 63% de los espermatozoides estaban vivos y mostraban una motilidad progresiva. En conjunto, el potencial de fecundación medio del semen criopreservado fue del 58% (47% a 85%) en comparación con el del semen fresco. El procedimiento descrito aquí proporciona consistencia y precisión, y permite el procesamiento congelación y almacenamiento de espermatozoides de trucha en en menos de 15 minutos.

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Identificación del problema

La reproducción de truchas es estacional; por lo que no se dispone de ovas fértiles todo el año ante esta disyuntiva la criopreservación de semen se usa para proporcionar gametos para fertilización asistida por fuera de las temporadas reproductiva normal y es la única alternativa biotecnológica reproductiva *ex situ* (Di Iorio *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2014); pero el semen congelado tiene una baja fertilidad con respecto al semen fresco por lo que es necesario obtener un protocolo de congelación de semen adecuado para esta especie (Bustamante-gonzález *et al.*, 2019), además es sabido que el almacenamiento y congelación de semen causa efectos nocivos sobre la calidad y fertilidad del semen (Merino *et al.*, 2020; Bustamante-gonzález *et al.*, 2019) por la formación de cristales de hielo que dañan la membrana espermática, cambios bruscos de temperatura, estrés osmótico, cambios de volumen celular y toxicidad de crioprotectores que conducen a la destrucción del espermatozoide (Hezavehei *et al.*, 2018; Asturiano *et al.*, 2017; Ramírez-Merlano *et al.*, 2010); a pesar de que se tienen estudios en conservación de semen, continua la búsqueda de métodos e insumos que puedan hacer más viables a los espermatozoides (Pereira *et al.*, 2020; Hezavehei *et al.*, 2018) aunque la mayoría de investigaciones se centran en crioprotectores ideales, dejan de lado las velocidades y temperatura de congelación y es sabido dentro de la importancia de la criopreservación que la tasa de congelación es crítica en la formación de cristales de hielo para mejorar la calidad de semen (Stornelli *et al.*, 2005) y hasta la fecha no se tiene reportes de congelación de semen en truchas en el altiplano peruano.

## 2.2. Enunciados del problema

- ¿Cuál será el efecto de diferentes temperaturas de congelación sobre la calidad de semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)?

## 2.3. Justificación

Puno es el principal productor de truchas en el país con una producción de las de 50 mil toneladas en el 2018, y junto a Junín y Huancavelica representan el 92.7% de la producción nacional y es la región con mayor potencial de exportación internacional; pero aún se tiene limitaciones en su producción como por ejemplo, la disponibilidad de ovas fértiles locales ya que la mayoría de ovas son de importación (PNIPA, 2020). Por otro lado la truchicultura es parte esencial del quehacer económico y social, pues ha favorecido la producción de pesquerías y el aumento en el consumo de productos acuícolas, los cuales han permitido que esta actividad se convierta en una alternativa para ampliar y contribuir a la oferta alimentaria, además de crear fuentes permanentes de empleo que estimulan el desarrollo regional y generación de divisas (Bustamante-González *et al.*, 2018). La trucha tiene un gran potencial productivo y comercial en la piscicultura por su fácil adaptación a los medios de crianza además tiene una excelente calidad y sabor de carne que le da aceptación en el mercado (Castro-Castellón *et al.*, 2017). Debido a las características antes mencionadas se tiene un crecimiento del número de productores para la crianza de trucha por lo que se tiene una gran demanda por las ovas de trucha (Judycka *et al.*, 2021) a nivel local y nacional pero se tiene limitación de la oferta de ovas debido a la estación reproductiva y tiempo de obtención de ovas fértiles (Bastardo *et al.*, 2004) por esta razón se necesita una tecnología de criopreservación confiable para la conservación del semen a fin de preservar los recursos genéticos, reducir los costos de mantenimiento y proporcionar eficiencia operativa en los criaderos comerciales para la fertilización artificial, es así que en la región de Puno y hasta en el Perú no se viene desarrollando biotecnologías en peces, por lo que es menester la búsqueda de estas tecnologías adecuándolas a cada zona; además la crioconservación de semen es actualmente la única tecnología disponible para desarrollar programas de conservación *ex situ* porque la criopreservación de ovocitos y embriones sigue siendo insatisfactoria.

## 2.4. Objetivos

### 2.4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes temperaturas de congelación sobre la calidad de semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

### 2.4.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen fresco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Determinar los parámetros microscópicos post descongelación por efecto de temperaturas de congelación del semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Determinar la tasa de fertilidad por efecto de temperaturas de congelación del semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

## 2.5. Hipótesis

### 2.5.1. Hipótesis general

Diferentes temperaturas de congelación generan diferencias en la calidad del semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

### 2.5.2. Hipótesis específicas

- Diferentes temperaturas de congelación generan diferencias en los parámetros seminales del semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)
- Diferentes temperaturas de congelación generan diferencias sobre los parámetros microscópicos del semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Diferentes temperaturas de congelación generan diferencias sobre la tasa de fertilidad de semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio

La investigación se realizó en el Centro de Investigación y Producción Pesquera (CIP) Chucuito perteneciente a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ubicada en el distrito de Chucuito, Provincia de Puno, Departamento de Puno a una altura de 3850 msnm en las coordenadas 15°53'48.59" S y 69°53'45.08" O.

El estudio se realizó entre los meses de junio y julio del 2021 con una temperatura de agua que estuvo entre 10°C a 12°C en cada poza durante todo el proceso, las hembras y machos del experimento en edad reproductiva fueron separados en estanques diferentes y los reproductores usados fueron llevados a otros estanques para evitar confusión en el manejo post colección de gametos.

#### 3.2. Población

La población fueron los truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) reproductores machos y hembras del Centro de Investigación y Producción Pesquera (CIP) Chucuito, que comprenden un total de 545 hembras y 355 machos de 1, 2 y 3 años.

#### 3.3. Muestra

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia con 15 reproductores de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): 12 machos (3 control, 9 para el experimento, comprendidos entre uno y dos años de edad) y 3 reproductoras hembras (Donadoras de ovocitos de dos años de edad).

### 3.4. Método de investigación

El método de investigación es experimental pues la variable independiente ha sido manipulada en la investigación por lo que se tiene mayor control y evidencia de la causa y efecto.

### 3.5. Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

#### a) Selección de reproductores

Los reproductores aptos fueron machos, de color pardo moteado con un peso promedio  $1.61 \pm 0.08$  kg, que liberaron líquido seminal ante una suave presión del abdomen, luego fueron llevados a piletas 24 horas antes de iniciar la colecta sin suministro de alimento (Cruz-casallas *et al.*, 2006).

#### b) Colección de semen

Se realizó con un masaje opérculo-caudal del abdomen del pez para la colección de semen en un vaso colector de plástico de 50 ml, estéril y seco evitando contacto con agua, orina y heces en cuyo caso fue descartado la muestra (Cruz *et al.*, 2006); posteriormente se realizó la evaluación macroscópica y microscópica.

#### c) Método de evaluación de los parámetros macroscópicos

- **Volumen:** Se colectó el semen en un vaso colector de plástico de 50 ml de aforo, estéril.
- **Color:** Se realizó una observación subjetiva del vaso colector; en general, otros colores fueron sinónimo de contaminación en esos casos las muestras fueron eliminadas.

#### d) Método de evaluación de los parámetros microscópicos pre y post descongelación

- **Concentración:** Se procedió a llenar la cámara Neubauer contabilizando cinco cuadrantes observados en un microscopio óptico a 40x de aumento, se utilizó una dilución de 10  $\mu$ L de semen y 990  $\mu$ L de diluyente (NaCl) (1:200) (Sanches *et al.*, 2011).
- **Motilidad masal:** Para la observación de la motilidad masal de los espermatozoides se realizó en un lamina portaobjeto donde se colocó un 1 ul

de semen y fue activado con 20 ul de bicarbonato de sodio al 1%. Fueron considerados muestras mayores al 80% de motilidad para la congelación (Betancur *et al.*, 2008)

- **Tiempo de Activación seminal:** Para la observación del tiempo de activación seminal, en una lámina portaobjeto se colocó una gota 1 ul de semen y fue activado con 20 ul de bicarbonato de sodio al 1% y con el uso de un cronometro se midió el tiempo hasta que el 100% de los espermatozoides perdieron su actividad (Betancur *et al.*, 2008)
- **Vitalidad:** En una lámina porta objetos temperada a 37°C se colocó 10 ul de semen y a su vez se colocó 10 ul de Eosina - Nigrosina, y se homogenizó y procedió hacer el frotis y secado para su evaluación a 100x. Las células muertas se tiñeron, mientras que las células vivas se mantuvieron sin coloración (Peralta-Martínez *et al.*, 2018).

#### e) Congelación de semen

Como diluyente para la congelación se usó DMSO (Dimetilsulfoxido) 10%, Glucosa 5.4%, yema de huevo 10%. Se llevó a 100 ml de agua destilada (Betancur *et al.*, 2008; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006) y fue centrifugado a 2500 rpm/15 minutos usándose solo el sobrenadante como dilutor. Se bajó la temperatura del semen y dilutor desde la temperatura de colección (10°C a 12°C) hasta 4°C en menos de 20 minutos; momento el en cual se realizó la mezcla del semen con el dilutor en una relación de 1:3 (Lahnsteiner *et al.*, 1996 a) sin tiempo de equilibrio (Babiak *et al.*, 2001). Enseguida se empajilló en pajillas de 0.5ml y se procedió a la congelación con una tasa de congelación de -20°C/min (Huang *et al.*, 2004) y como variación del protocolo fueron congelados a tres temperaturas de congelación (TI: -80°C, TII: -100°C y TIII: -120 °C) en cuyo caso fueron sumergidas al NL hasta su uso (Conget *et al.*, 1996; Lahnsteiner *et al.*, 1996 a, Iaffaldano *et al.*, 2015; con algunas modificaciones).

#### f) Descongelación de pajillas

Las pajillas fueron descongeladas a una temperatura de 25°C por 30 segundos (Martínez-Páramo *et al.*, 2009) y se procedió a evaluar el tiempo de activación, motilidad, vitalidad según lo descrito anteriormente y fertilidad post descongelación

### g) Método de evaluación de fertilidad

Para la prueba de fertilidad; se usó 3 hembras mayores a dos años que liberaron ovas ante una ligera presión del abdomen. Se procedió a colectar las ovas de las tres hembras con masajes manuales ventrales en dirección opérculo caudal y los óvulos fueron depositados en un recipiente de plástico previamente seco y limpio para homogenizarlo. Se tomó 5 gramos de ovas por replica en las que se adicionó 1 pajilla de 0.5 ml mezclándolo con una pluma suavemente (Necmettin *et al.*, 2003) adicionando 5 ml de solución activadora (Bicarbonato de sodio) (Iaffaldano *et al.*, 2015) por 2 minutos, enseguida se adicionó agua del estanque para enjuagarlo y las ovas fueron depositadas en incubadoras de flujo descendente. La fertilidad fue evaluado a los 21 días en embriones en estado de ojo (fertililes). La prueba fue realizado por triplicado (Betancur *et al.*, 2008).

### h) Variables a medir

- Volumen (Evaluación visual en mL)
- Color (Observación subjetiva)
- Concentración (Expresado en  $10^9$  x mL)
- Motilidad (Evaluación subjetiva)
- Tiempo de activación seminal (Expresado en segundos)
- Vitalidad (Expresado en porcentaje de 200 células)
- Fertilidad (Expresado en porcentaje, calculando los embriones en fase de ojo en relación al número inicial de ovas de cada prueba).

### 3.6. Análisis estadístico

Los datos de los parámetros macroscópicos y microscopios de semen fresco y descongelado fueron sometidos a estadística descriptiva (Media, error de la media, mediana, desviación estándar, varianza, máximo, mínimo). Los datos fueron sometidos a pruebas de homogeneidad y normalidad seguidamente se sometió a un Diseño bloque completamente al azar para determinar la existencia o no de diferencia estadística entre las temperaturas de post descongelación. Para la comparación de medias se utilizó la Prueba múltiple de significación de Tukey. En ciertas variables espermática se utilizó la matriz de correlación para determinar el grado de asociación y para la comparación de las tasas de fertilidad se usó Chi cuadrado, que fueron analizados en el programa The Jamovi projet (2021). Versión 1.6



Diseño Bloque Completo al Azar, cuyo modelo aditivo lineal es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + e_{ij}$$

Donde:

$i$  = Tratamientos 1 (-80), 2 (-100) y 3 (-120).

$j$  = Bloques (machos 1, 2, ...,9).

$Y_{ij}$  = Variable respuesta.

$\mu$  = Media general.

$\tau_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\beta_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo bloque.

$e_{ij}$  = Error experimental.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1. Parámetros macroscópicos y microscópicos del semen fresco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).**

Los datos obtenidos sobre los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen fresco de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Tabla 1) muestran un volumen promedio de  $6.03 \pm 0.34$  ml comprendidos entre volúmenes máximos y mínimos de 8.1 y 5.1 ml respectivamente; el color del semen fue blanco lechoso. Los parámetros microscópicos muestran una concentración de  $4.54 \pm 0.08 \times 10^9$ /ml con extremos de 4.2 y  $4.89 \times 10^9$ /ml; el tiempo de activación fue de  $169 \pm 10.24$  segundos; se tuvo una motilidad masal de  $90.56 \pm 1$  % y vitalidad de  $91.89 \pm 0.77$  %.

Tabla 1

*Parámetros espermáticos macroscópicos y microscópicos de semen fresco de Trucha Arcoíris (Oncorhynchus mykiss)*

Parámetros seminales	Media $\pm$ EE	Min -Max
Volumen (ml)	6.03 $\pm$ 0.34	5.1 - 8.10
Color	Blanco	-
Concentración ( $10^9$ /ml)	4.54 $\pm$ 0.08	4.2 - 4.89
Tiempo de activación (segundo)	169 $\pm$ 10.24	135 - 217
Motilidad (%)	90.56 $\pm$ 1.0	85 - 95
Vitalidad (%)	91.89 $\pm$ 0.77	87 - 94

EE: Error estándar

Nuestros resultados (Tabla 1) al ser comparados con los resultados de Bustamante-González *et al.*, (2018); Torres *et al.*, (2014); Castro-Castellón *et al.*, (2017) y Necmettin *et al.*, (2003) mostraron mejores volúmenes seminales con 24.62 ml, 19.61 ml, 25 ml, 19.72 ml; respectivamente, mientras que Fogli Da Silveira *et al.*, (1994) tuvo semejante volumen (8ml). Respecto al color Bustamante-González *et al.*, (2018) y Torres *et al.*, (2014) reportaron un color blanco al igual que nosotros, lo cual está relacionado con la alta concentración espermática. Para la característica microscópica de concentración, Bustamante-González *et al.*, (2018); Castro-Castellón *et al.*, (2017); Nynca *et al.*, (2017); Ciereszko *et al.*, (2015) y Necmettin *et al.*, (2003) tuvieron mejores resultados al nuestro con  $8.17 \times 10^9$ /ml,  $15.0 \times 10^{10}$ /ml,  $10^9$ /ml  $42.8 \times 10^9$ /ml y  $7.2 \times 10^9$ /ml; respectivamente, mientras que Peralta-Martínez *et al.*, (2018), Ninhaus-Silveira *et al.*, (2006) y Lahnsteiner, F. *et al.*, (1996 a) reportaron menores concentraciones que nosotros con  $3.02 \times 10^9$ /ml,  $15.9 \times 10^6$ /ml y  $3.2 \times 10^9$ /ml; respectivamente. Respecto al tiempo de activación nuestros resultados fueron superiores a los resultados de Iaffaldano *et al.*, (2015), Berríos *et al.*, (2010) y Necmettin *et al.*, (2003) con 64 s, 100 s y 98.63 s; respectivamente, pero semejante al resultado de Secer *et al.*, (2004) con 174 segundos. Para la motilidad masal nuestros resultados fueron semejantes a los resultados de Bustamante-González *et al.*, (2018); Nynca *et al.*, (2017); Trigo *et al.*, (2015) y Fogli Da Silveira *et al.*, (1994) con

88.79%, 84%, 95% y 90%; respectivamente, pero fue superior a los resultados de Castro-Castellón *et al.*, (2017), Ciereszko *et al.*, (2015), Iaffaldano *et al.*, (2015), Necmettin *et al.*, (2003), Lahnsteiner, F. *et al.*, (1996 a) y Conget *et al.*, (1996) con 56.33%, 49.4%, 72%, 76%, 8.2% y 64%; respectivamente. Para la tasa de vitalidad Fogli Da Silveira *et al.*, (1994) mostró mejores resultados al nuestro (97.34%) mientras que Iaffaldano *et al.*, (2015) mostró resultados menores (70%) y Nynca *et al.*, (2017) mostro resultados semejantes (93%) al nuestro.

Las diferencias entre los resultados en las características seminales macroscópicas y microscópicas de semen fresco se deben a múltiples factores como edad, peso de los reproductores, manejo, alimentación, calidad de agua (Necmettin *et al.*, 2003), sexo invertido (Ciereszko *et al.*, 2015), tipo de colecta, época reproductiva, calidad de agua (Secer *et al.*, 2004), fotoperiodo (Félix *et al.*, 2021) y temperatura; los dos últimos relacionados con la latitud y altitud (Bustamante-González *et al.*, 2018); por lo que al considerar que nuestro trabajo se realizó a una altitud de 3875 m.s.n.m quizá pudo tener alguna influencia en nuestros resultados, que deberán ser corroborados en futuras investigaciones.

#### **4.2. Parámetros microscópicos del semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) post descongelación por efecto de temperaturas de congelación**

En referencia a los parámetros microscópicos del semen post descongelación por efecto de temperaturas de congelación (Tabla 2) se puede observar que el tiempo de activación y la vitalidad fueron superiores en el TII con 51.33 segundos y 35.33 %, respectivamente; mientras que para la tasa de motilidad masal fue superior en el TIII con 36.33%. No se mostró diferencias estadísticas entre tratamientos.

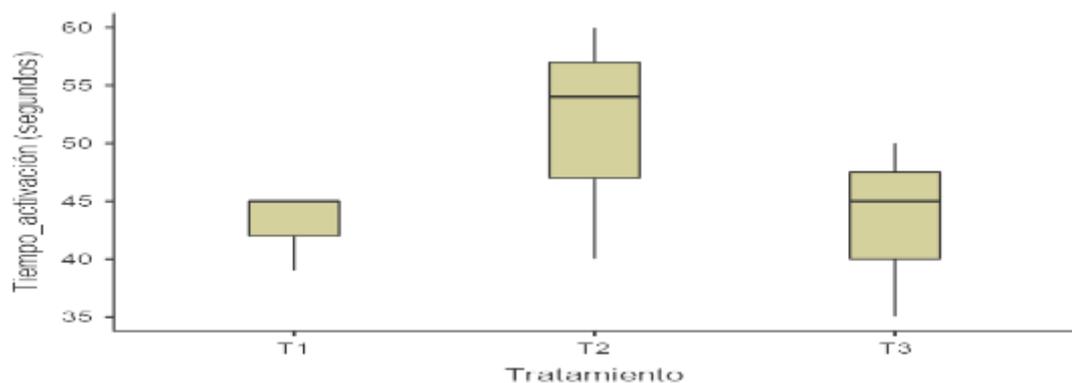
Tabla 2

*Parámetros espermáticos microscópicos de semen de Trucha Arcoíris (Oncorhynchus mykiss) post descongelación por efecto de temperaturas de congelación*

	TI (-80°C)	TII (-100°C)	TIII (-120°C)	p - valor
	Media ± EE	Media ± EE	Media ± EE	
Tiempo activación (Segundos)	43.00 ± 2.00 <sup>a</sup>	51.33 ± 5.93 <sup>a</sup>	43.33 ± 4.41 <sup>a</sup>	0.3804
Motilidad Masal (%)	33.33 ± 2.40 <sup>a</sup>	33.00 ± 2.89 <sup>a</sup>	36.33 ± 1.33 <sup>a</sup>	0.5615
Vitalidad (%)	33.33 ± 2.03 <sup>a</sup>	35.33 ± 2.19 <sup>a</sup>	32.00 ± 3.06 <sup>a</sup>	0.6499

EE: Error estándar

La Figura 1, muestra la comparación del tiempo de activación en las temperaturas de congelación, observando un mayor tiempo para el TII seguido por el TIII y finalmente el TI, en cuanto a la variabilidad de los resultados el tratamiento con mayor variabilidad fue el TII mientras que el T1 fue el de menos variable.



*Figura 1.* Comparación gráfica del tiempo de activación (segundos) con las temperaturas de congelación (T1=-80°C; TII=-100°C; TIII=-120°C)

La Figura 2, muestra la comparación de la motilidad con respecto a las temperaturas de congelación, observando una mejor motilidad para el TIII seguido del TI y TII, a su vez el más variable fue el TII seguido del TI y TIII.

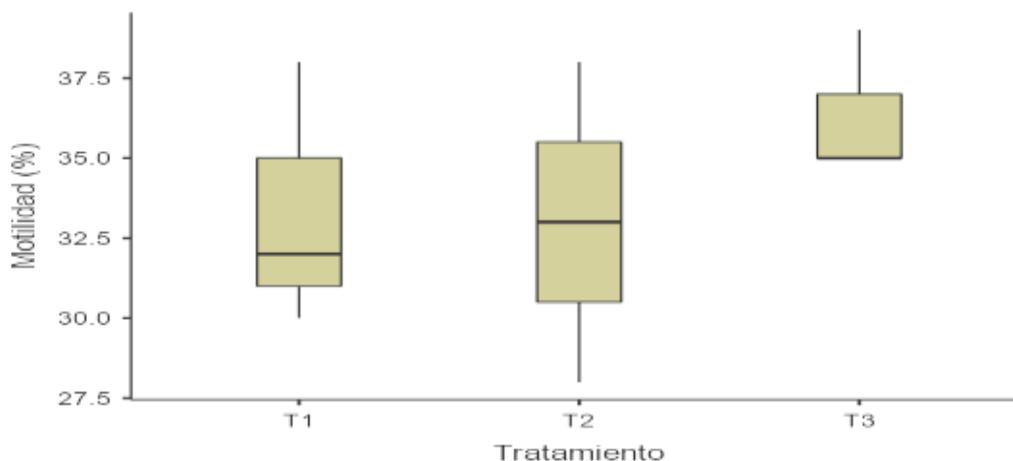


Figura 2. Comparación gráfica de la motilidad masal (%) con las temperaturas de congelación (T1=-80°C; TII=-100°C; TIII=-120°C)

La Figura 3, muestra la comparación de la vitalidad en las temperaturas de congelación, en la que se observa que el TII tuvo mejores resultados con menor variabilidad, mientras que el TI y TIII tuvieron menores resultados y más variables.

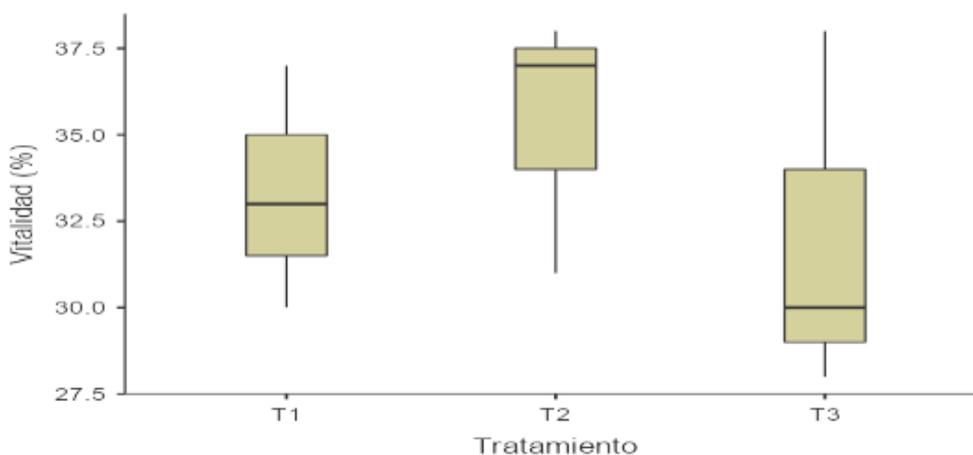


Figura 3. Comparación gráfica de la vitalidad (%) con las temperaturas de congelación (T1=-80°C; TII=-100°C; TIII=-120°C)

Nuestros resultados (Tabla 2) muestran que el tiempo de activación fue semejante al resultado de Di Iorio *et al.*, (2019) con 40.7 segundos; mientras que los resultados de Iaffaldano *et al.*, (2015) y Necmettin *et al.*, (2003) fueron mejores al nuestro con 60 y 84.33 segundos; respectivamente. Para el caso de motilidad Di Iorio *et al.*, (2019), Judycka *et al.*, (2016), Ciereszko *et al.*, (2015), Ciereszko *et al.*, (2014) y Necmettin *et al.*, (2003) mostraron mejores resultados al nuestro con 42.6%, 56.8%, 56.6%, 49.9% y

56.76%; respectivamente, mientras que Iaffaldano *et al.*, (2015), Nynca *et al.*, (2015), Betancur *et al.*, (2008) y Salte *et al.*, (2004) tuvieron parecidos resultados con menos de 40%, 33.3%, 29.9% y 30%. Para la tasa de vitalidad nuestros resultados fueron semejantes a los resultados de Di Iorio *et al.*, (2019) y Iaffaldano *et al.*, (2015) con 36% y 30%; respectivamente.

Las diferencias comparativas con los resultados de los autores anteriores puede estar influenciado por el tipo de nutrición que recibieron los reproductores, diferencias entre especies (Cabrita *et al.*, 2010) y dentro de la misma especie (Iaffaldano *et al.*, 2015), diferencia del volumen de pajilla, concentración seminal final (Nynca *et al.*, 2017), diferencias entre tecnología de congelación, diluyentes o crioprotectores (Nynca *et al.*, 2014, Ciereszko *et al.*, 2014), tiempo de equilibrio (Babiak *et al.*, 2001) o temporada reproductiva (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010)

El experimento TII mostró mejor respuesta para el tiempo de activación y vitalidad que los tratamientos TI y TIII lo que sugiere una mejor protección al espermatozoide en la criopresevación, pues suponemos que a esta temperatura de inmersión al nitrógeno se podría estar generando menor daño celular, mientras que en los otros tratamientos se pudieron generar mayor criodaño pues en el TI pudo generarse estrés por la inadecuada osmolaridad, mientras que en el TIII probablemente porque las células permanecieron a bajas temperaturas un minuto adicional lo cual pudo causar deshidratación excesiva y mayor exposición a solutos (Viveiros *et al.*, 2001).

En nuestro trabajo se usó una tasa de congelación de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-100^{\circ}\text{C}$  y  $-120^{\circ}\text{C}$  que no fue un descenso de temperatura ni tan rápida ni tan lenta, pero fue cercano a la recomendación de Beirão *et al.*, (2011) quien recomendó hacerlo a  $-21.6^{\circ}\text{C}$  en pajillas para semen del pez dorada (*S. aurata*) en vista de que el punto más crítico de la congelación es desde  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ , que está vinculado con la fase solida sustentado por el concepto de la nucleación de las células espermáticas que se produce entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$  (Viveiros *et al.*, 2001).

Nuestros resultados se deben a que el protocolo de congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) no fue lenta ( $8,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) pues este tipo de congelación podría ser ineficaz (Cabrita *et al.*, 2001) lo que hubiera podido generar exposición adicional a los solutos intracelulares, osmolaridad extracelular, contracción celular (Fowler & Toner, 2005), formación de cristales de hielo dando lugar a altas concentraciones de electrolitos en el interior de las células, posibles

daños químico-físicos en los espermatozoides (Di Santo *et al.*, 2012) y generar el efecto solución (Viveiros *et al.*, 2001) pues se sabe que al congelar semen de truchas arcoíris con curvas de descenso lentas (-1 a -10°C/min) hasta llegar a -60 o -80°C para su inmersión en el nitrógeno líquido (NL) se podrían tener nulas tasas de parámetros seminales por el daño celular irreversible (Benson *et al.*, 2012). Tampoco usamos congelación rápida de -30°C/min o menos hasta llegar a -60 o -80°C (Conget *et al.*, 1996) pues ocasionaría que la deshidratación de las células no sea adecuada sin alcanzar el equilibrio osmótico y formación de hielo intracelular que pudiera dañar la membrana del espermatozoide (Kumar *et al.*, 2019; Lahnsteiner *et al.*, 2000) disminuyendo la calidad seminal

Como en todo proceso de congelación los parámetros espermáticos en nuestro trabajo disminuyeron por la congelación (Tabla 1 y Tabla 2); pues la criopreservación produjo daño a nivel de las estructuras del espermatozoide y considerando que los espermatozoides de peces tienen particularidades respecto a otros tipos de espermatozoides como el tiempo de activación, proporción de ATP, tamaño espermático, ausencia de acrosoma (Lahnsteiner *et al.*, 2000); los vuelve más propensos al criodaño (Bustamante-gonzález *et al.*, 2019; Martínez-Páramo *et al.*, 2009).

La vitalidad espermática disminuyó en comparación con el semen fresco; pero fue mejor para el TII respecto a los otros tratamientos, lo que sugiere que el TII tuvo una mejor resistencia al criodaño. La disminución en general de este parámetro pudo deberse a que la criopreservación tiene consecuencias fatales en las células espermática específicamente produciendo cromática aglomerada, cambios en la membrana del flagelo (Conget *et al.*, 1996), daño del núcleo (Labbe *et al.*, 2001) con fragmentación del ADN (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010), disminución en la integridad de membrana espermática (Figuroa *et al.*, 2016) por formación de especies reactivas de oxígeno (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010), menor actividad de las enzimas antioxidantes (Aitken *et al.*, 2012) cambios en la morfología por cambios en la osmolaridad (Galo *et al.*, 2019) y daños subletales no detectados en los parámetros seminales (Nynca *et al.*, 2015; Cabrita *et al.*, 2010).

Respecto a la motilidad el TIII tuvo la mejor motilidad, mientras que para el tiempo de activación el TII fue mejor respecto a los otros tratamientos; en ambos casos la disminución con los parámetros en fresco fueron notorios pues las temperaturas de congelación generaron efectos negativos sobre el potencial de membrana mitocondrial

por la formación de cristales de hielo intracelular o alteraciones osmóticas, efectos que dañan a la mitocondria por lo que no se tendría ATP para la activación y por ende, disminución de la motilidad (Figuroa *et al.*, 2016; Martínez y Carrasco, 2010) también se puede considerar la pérdida de proteínas espermáticas lo que genera alteración en la producción de ATP (Nynca *et al.*, 2015) y las anomalías en los espermatozoides lo que contribuyó a la disminución de la motilidad y tiempo de activación, como se pudo demostrar en *Piaractus mesopotamicus* (Galo *et al.*, 2019).

#### 4.3 Tasa de fertilidad de semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por efecto de temperaturas de congelación.

Referente a las pruebas de fertilidad (Figura 4) del semen descongelado de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el TII posee una ligera superioridad numérica ( $70.97 \pm 7.84$ ) en relación al TI ( $68.86 \pm 8.83$ ) y TIII ( $64.34 \pm 6.00$ ). Sin embargo, estadísticamente no muestran diferencia ( $p=0.8236$ ) pero al ser comparado con la fertilidad del semen fresco (Control) si se tuvo diferencia ( $p=0.006377$ ).

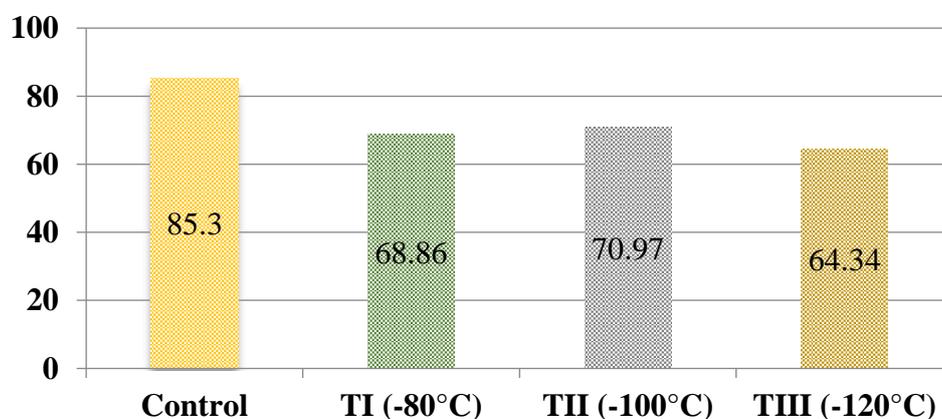


Figura 4. Porcentaje de fertilidad en semen fresco (control) y descongelado de semen de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por efecto de las temperaturas de congelación.

Algunos autores reportaron mejores tasas de fertilidad al nuestro (Figura 4) como Judycka *et al.*, (2016) con 72 a 87% en hembras androgenizadas y a 3cm del NL por 5 min, Ciereszko *et al.*, (2015) con 91.2% usando diferentes dilutores y con congelación a 3cm del NL por 15 min; Ciereszko *et al.*, (2014) con 84% usando metanol, glucosa, 3cm al

NL y dilución de 600000:1; Necmettin *et al.*, (2003) con 80.5%; Babiak *et al.*, (2001) hasta 83% con diferentes crio protectores y método de congelación y Lahnsteiner *et al.*, (1996 b) con 83.8% (-110°C), 63.2% (-130°C) y 62.8% (-100°C); también se reportaron menores tasas de fertilidad al nuestro como Di Iorio *et al.*, (2019) con 36.5%; Yang *et al.*, (2018) con 1% al congelar a -40°C/min hasta -80°C en salmón atlántico; Iaffaldano *et al.*, (2015) con 25.4%, Betancur *et al.*, (2008) con 26.33% en truchas hembra masculinizadas; Conget *et al.*, (1996) con 58% para congelación rápida (-30°C/min); Lahnsteiner *et al.*, (1996 a) con 53.8% al congelar a 1.5 cm del nivel del NL y Fogli Da Silveira *et al.*, (1994) con 31-36% al congelar a -80°C. y muy semejantes al reporte de Ninhaus-Silveira *et al.*, (2006) con 73%, 67% y 64% para machos y hembras androgenizadas. También se reportaron semejantes tasas de fertilidad con 74.1% a 64.8% en truchas arcoíris noruegos e italianos con dosis de 1633 a 704 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/pajilla (Salte *et al.*, 2004)

Nuestros resultados difieren en relación al resultados de los investigadores anteriores debido a que usaron formas de congelación basada en centímetros por encima del nivel del NL, y se supone que las tasas de congelación dependen de la altura (Lahnsteiner *et al.*, 1996 b; Conget *et al.*, 1996) y de la tasa de evaporación en el tiempo de la congelación (Lahnsteiner, 2000) generando variabilidad en la fertilidad ya que no se puede conseguir reproducir la misma temperatura en los experimentos ni controlar la tasa de congelación (Judycka *et al.*, 2019; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2006) mientras nosotros usamos curvas de descenso controladas que mejoran la eficiencia de la congelación al controlar el criodaño (Torres *et al.*, 2016)

El parámetro más confiable de la calidad seminal es la fertilidad y nuestros datos muestran que los parámetros seminales han disminuido por efecto de la congelación lo cual explica las reducidas tasas de fertilidad. Se ha demostrado que la criopreservación daña a las células espermáticas lo que disminuye su capacidad de fecundar (Martínez-Páramo *et al.*, 2009) por la formación de especies reactivas de oxígeno (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010), alteraciones en la composición de los lípidos de membrana, disminución de colesterol de la membrana, anormalidades de la pieza media, cabeza y la cola (Díaz *et al.*, 2019) que disminuyen la fertilidad.

En nuestro estudio el TII tuvo mejores tasas de fertilidad en condiciones del altiplano peruano en comparación al TI y TIII aunque esta diferencia no es significativa, demostrando que el rango adecuado de congelación es estrecho (Cabrita *et al.*, 2001).

Además concuerda con Viveiros *et al.*, (2001) quien probó diferentes temperaturas de inmersión en NL del semen de Siluro africano (*Clarias gariepinus*) con congelaciones lentas concluyendo que el rango para esta especie fue inmersión entre  $-36^{\circ}\text{C}$  y  $-45^{\circ}\text{C}$  e igualmente con Iaffaldano *et al.*, (2015) en truchas marrón (*Salmo truttamacrostigma*) confirmó que a 5cm ( $-125^{\circ}\text{C}$ ) del NL tubo mejores resultados en parámetros seminales y también fue demostrado por Lahnsteiner *et al.*, (1996 b) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) pues la fertilidad post descongelación del semen fue mayor cuando se congeló a 1,5 cm ( $-110^{\circ}\text{C}$ ) por encima del nivel de nitrógeno líquido y disminuyó cuando se congeló a 1 cm ( $-130^{\circ}\text{C}$ ) o a 2 cm ( $-100^{\circ}\text{C}$ ) por encima del nivel de nitrógeno líquido, lo cual demuestra que las temperaturas de congelación por encima o por debajo del rango de congelación disminuyen la calidad seminal y fertilidad, pues a la temperatura ideal según cada especie se tuvo tiempo suficiente para alcanzar o acercarse al equilibrio osmótico (Fowler & Toner, 2005).

EL TII no tuvo la mejor motilidad pero si la mejor fertilidad post descongelación lo cual indica que no necesariamente las mayores tasas de motilidad definen las mejores tasas de fertilidad pues se ha demostrado que no siempre hay una correlación positiva entre ambos (Labbe *et al.*, 2001). Glogowski *et al.*, (2002) en Esturiones siberianos (*Acipenser baeri*) demostró que la motilidad post descongelación podría no correlacionarse con la fecundación. En nuestro experimento se demostró que no solo la motilidad jugo un papel preponderante en la fertilidad si no también la vitalidad (Yang *et al.*, 2018) y el tiempo de activación, pues el TII mostró mejoría en estos parámetros (Merino *et al.*, 2011; Galo *et al.*, 2019) pues se tuvo una mayor correlación de la vitalidad ( $r = 0.94$ ) y el tiempo de activación ( $r = 0.72$ ) con la fertilidad (Cabrita *et al.*, 2010; Martínez y Carrasco, 2010)

También se puede considerar que a pesar de que la congelación disminuyó la motilidad; tal vez el TII generó menores cambios en los patrones de la velocidad en línea recta y curva (Rusco *et al.*, 2020) o sobre el vigor espermático (Galo *et al.*, 2019) lo que generó mejor tasa de fertilidad respecto a los otros tratamiento aun con su menor motilidad; puesto que en el Salmon Atlántico se demostró que a pesar de la baja motilidad se tuvo una correlación positiva entre la fertilidad y velocidad en línea curva y recta (Kommisrud *et al.*, 2020; Figueroa *et al.*, 2016) mientras que en truchas marrones (*Salmo trutta m. fario L*) se demostró que la congelación afecto la motilidad pero no afectó la velocidad curvilínea (Nynca *et al.*, 2014) por lo que podría ser considerado un indicador de calidad de semen (Golshahi *et al.*, 2015) aun en bajas tasas de motilidad; por otro lado se tiene la



hipótesis de que los espermatozoides que están alrededor de la ova cercano al micropilo necesitan un corto tiempo de activación (Kommisrud *et al.*, 2020) aun con poca motilidad masal para asegurar la fertilidad, estos mismos efectos pudieron haber ocurrido en el TII de nuestro experimento, debido a la mejor respuesta para el tiempo de activación espermática; esto sugiere que se debería hacer más trabajos relacionados a los tipos de motilidad y velocidad en relación a la fertilidad en esta especie y en las condiciones de crianza en altura.

Las tasas de fertilidad de nuestro trabajo (68.86%, 70.97%, 64.34% para TI, TII, y TIII; respectivamente) también pudo estar relacionado a la concentración de nuestras pajillas que en promedio fue  $5.68 \times 10^9$  lo que pudo mejorar nuestras tasas de fertilidad (Salte *et al.*, 2004; Lahnsteiner *et al.*, 1996 b) generando una mayor fertilidad para el TII, compensando así la calidad seminal (Ciereszko *et al.*, 2014 a; Necmettin *et al.*, 2003) pues ha sido demostrado anteriormente que una proporción adecuada de espermatozoides podrían tener tasas de fertilidad altas (Di Iorio *et al.*, 2019; Judycka *et al.*, 2019; Judycka *et al.*, 2016; Ciereszko *et al.*, 2014).



## CONCLUSIONES

Los parámetros seminales macroscópicos en fresco fueron de  $6.03 \pm 0.34$  mL de volumen y color blanco, mientras que los parámetros microscópicos seminales fueron de  $4.54 \pm 0.08 \times 10^9$ /mL para concentración,  $169 \pm 10.24$  segundos para tiempo de activación,  $90.56 \pm 1$  % para motilidad y  $91.89$  % para vitalidad.

Las temperaturas de congelación mostraron mejores resultados post descongelación para el tratamiento TII en tiempo de activación y vitalidad; mientras que la motilidad fue mejor para el tratamiento TI.

La tasa de fertilidad fue mayor para el tratamiento TII respecto a los tratamientos TI y TIII, lo cual demuestra que la temperatura de congelación óptima para semen de truchas arcoíris en condiciones de altura es el TII.

## RECOMENDACIONES

Utilizar en el proceso de congelación de semen de truchas arcoíris diferentes crio protectores penetrantes y en diferentes concentraciones para mejorar las tasas de fertilidad.

Utilizar en el proceso de congelación de semen de truchas arcoíris diferentes crio protectores no penetrantes y azúcares en diferentes proporciones para mejorar las tasas de fertilidad.

Utilizar en el proceso de congelación de semen de truchas arcoíris diferentes proporciones de dilución para incrementar la eficiencia de número de pajillas por gramo de ovas.

Utilizar en el proceso de congelación de semen de truchas arcoíris diferentes tasas de descongelación para el semen congelado.

Utilizar en el proceso de congelación de semen de truchas arcoíris diferentes tiempos de equilibrio entre el semen y la solución crioprotectora.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health. *Journal of Andrology*, 33(6), 1096–1106. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>
- Alavi, S. M. H., Cosson, J., Bondarenko, O., & Linhart, O. (2019). Sperm motility in fishes: (III) diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme. *Theriogenology*, 136, 143–165. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.038>
- Asturiano, J. F., Cabrita, E., & Horváth. (2017). Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 245, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019>
- Atencio García, V. J., Dorado, M., Navarro, E., Pérez, F., Herrera, B., Movilla, J., & Espinosa-Araujo, J. (2014). Evaluation of Ethylene Glycol as a Cryoprotectant in the Sperm Cryopreservation of Trans-andean Shovelnose Catfish (*Sorubim Cuspicaudus*, Pimelodidae). *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 271–280. <https://doi.org/10.15446/abc.v19n2.41288>
- Atencio Garcia, V., Prieto Guevara, M., Pertuz Buelvas, C., Dorado, M., & Navarro, E. (2015). Protocolo para la crioconservacion del semen de dorada *Brycon moorei* [Universidad de cordoba. Instituto de investigaciones piscicolas CINPIN Monteria]. In *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J., & Demianowicz, W. (2001). Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, 56(01), 177–192. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00553-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00553-2)
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1), 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Bastardo, Hi., Carlina, G., & Leon, M. (2004). Características del semen de trucha arcoiris

- de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 22(3), 1–6. Recuperado de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692004000300006](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692004000300006)
- Beirão, J., Cabrita, E., Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., & Herráez, M. P. (2011). Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology*, 62(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.11.005>
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78(8), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
- Berríos, O., Valdebenito, I., Treulén, F., & Ubilla, A. (2010). Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), 179–186. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2010000300009>
- Betancur, J. J., Montoya, A. F., Mira, T., Rojas, F. A., & Ángel, M. O. (2008). Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(3), 340–350. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n3/v21n3a04.pdf>
- Bustamante-gonzález, J. D., Rodríguez-gutiérrez, M., Cortés-garcía, A., Arenas-Ríos, E., Figueroa-Lucero, G., & Ávalos-Rodríguez, A. (2019). Fisiología y criopreservación del espermatozoide en teleósteos. *AquaTIC*, 53, 1–17. Recuperado de <https://www.redalyc.org/journal/494/49460634001/html/>
- Bustamante-González, J., Dámaso, Cortés-García, A., & Rodríguez-Gutiérrez, M. (2018). Growth and sperm quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei: Salmonidae) during the reproductive season. *Hidrobiológica*, 28(2), 163–170. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n2/bustamante>
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., & Herráez, M. P. (2001). Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: Application to large scale fertilization. *Aquaculture*, 201(3–4), 301–314. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00636-6)
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., & Herráez, M. P. (2005).

- Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50(2), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.12.003>
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., & Herráez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
- Carpio Vargas, E., y Tito Ccopa, E. (2017). Escalas productivas y nivel de riesgo del productor de trucha, Puno-Perú. *COMUNI@CCIÓN: Revista de Investigación En Comunicación y Desarrollo*, 8(2), 81–93. Recuperado de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2219-71682017000200002](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2219-71682017000200002)
- Castro-Castellón, A., González-Villaverde, P., Cortés-García, A., Martínez-Regalado, D., & Jiménez-Valencia, J. (2017). Calidad del semen en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) lote Michoacano, a finales de su periodo reproductivo. *Revista Digital Del Departamento, El Hombre y Su Ambiente - E - BIOS*, 1(13), 1–9. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/330292980>
- Ciereszko, A., Dietrich, G. J., Nynca, J., Dobosz, S., & Zalewski, T. (2014). Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*, 420–421, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.014>
- Ciereszko, A., Dietrich, G. J., Nynca, J., Krom, J., & Dobosz, S. (2015). Semen from sex-reversed rainbow trout of spring strain can be successfully cryopreserved and used for fertilization of elevated number of eggs. *Aquaculture*, 448, 564–568. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.039>
- Conget, P., Ferrhdez, M., Herrera, G., & Minguell, J. J. (1996). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) spermatozoa using Programmable Freezing. *Aquaculture*, 143(96), 319–329. Doi: 10.1016/0044-8486(96)01275-6
- Cruz-casallas, P. E., Mauricio, V., & Robles, M. (2006). Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 146–151. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-)

06902006000200005

- Cruz Casallas, P., Medina Robles, V., & Velasco Santamaría, Y. (2006). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev. Colomb. Cienc. Pecu*, 19(2), 152–159. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902006000200006&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-06902006000200006&script=sci_abstract&tlng=es)
- Cuevas-uribe, R., Chesney, E. J., Daly, J., & Tiersch, T. R. (2013). Vitrification of Sperm from Marine Fishes: Effect on Motility and Membrane Integrity. *Aquaculture Research*, 46(7), 1770–1784. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.12337>
- Cuevas-uribe, R., Hu, E., Daniels, H., Gill, A. O., & Tiersch, T. R. (2017). Vitrification as an Alternative Approach for Sperm Cryopreservation in Marine Fishes. *N Am J Aquac*, 79(2), 187–196. <https://doi.org/10.1080/15222055.2017.1281855>
- Di Iorio, M., Esposito, S., Rusco, G., Roncarati, A., Miranda, M., Gibertoni, P. P., Cerolini, S., & Iaffaldano, N. (2019). Semen cryopreservation for the Mediterranean brown trout of the Biferno River (Molise-Italy): comparative study on the effects of basic extenders and cryoprotectants. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45006-4>
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>
- Díaz, R., Lee-Estevez, M., Quiñones, J., Dumorné, K., Short, S., Ulloa-Rodríguez, P., Valdebenito, I., Sepúlveda, N., & Farías, J. G. (2019). Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm morphology and membrane lipid composition related to cold storage and cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 204(February), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.004>
- Félix, F., Oliveira, C. C. V., & Cabrita, E. (2021). Antioxidants in fish sperm and the potential role of melatonin. *Antioxidants*, 10(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/antiox10010036>
- Figuroa, E., Valdebenito, I., Merino, O., Ubilla, A., Risopatrón, J., & Farias, J. G. (2016). Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *Journal of Fish Biology*, 89(3), 1537–1550.

<https://doi.org/10.1111/jfb.13052>

- Fogli Da Silveira, W., Kavamoto, E. T., Rigolino, M. G., Tabata, Y. A., Silveira, A. N., & Verissimo, R. (1994). Congelamento do semen da truta arco iris *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. *B. Inst. Pesca*, *21*(1), 55–60. Recuperado de <https://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Congelamento-Do-S%C3%A9men-Da-Truta-Arco-Iris/65409151.html>
- Fowler, A., & Toner, M. (2005). Cryo-injury and biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1066*, 119–135. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>
- Galo, M., Streit-Junior, D., Oliveira, C., Povh, J., Fornari, D., Digmayer, M., & Ribeiro, R. (2019). Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, *9*(3), 438–445. Recuperado de <https://www.scielo.br/j/bjb/a/sj4XJv4zSnt756k5SFyt4JC/?lang=en>
- Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horváth, Urbányi, B., Siczynski, P., Rzemieniecki, A., Domagała, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., & Ciereszko, A. (2002). Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture*, *211*(1–4), 367–373. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00003-0)
- Golshahi, K., Shabani, N., Aramli, M. S., & Noori, E. (2015). Motility and fertilizing ability of cryopreserved Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) sperm: Effect of post-thaw storage time and different sperm-to-egg ratios. *Cryobiology*, *71*(2), 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.005>
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, *37*(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Huang, C., Dong, Q., Walter, R., & Tiersch, T. R. (2004). Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. *Cryobiology*, *48*(3), 295–308. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cryobiol.2004.02.004>
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Manchisi, A., Esposito, S., & Gibertoni, P. P. (2015). Effective freezing rate for semen cryopreservation in endangered Mediterranean

- brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) inhabiting the Biferno river (South Italy). *Zygote*, 24(5), 668–675. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000647>
- Judycka, S., Ciereszko, A., Dobosz, S., Zalewski, T., & Dietrich, G. J. (2016). Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 245, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.016>
- Judycka, S., Nynca, J., & Ciereszko, A. (2019). Opportunities and challenges related to the implementation of sperm cryopreservation into breeding of salmonid fishes. *Theriogenology*, 132, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.022>
- Judycka, S., Nynca, J., Hliwa, P., & Ciereszko, A. (2021). Characteristics and cryopreservation of semen of sex-reversed females of salmonid fish. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms22020964>
- Kommisrud, E., Myromslien, F. D., Stenseth, E. B., Zeremichael, T. T., Hofman, N., Grevle, I., & Sunde, J. (2020). Viability, motility, ATP content and fertilizing potential of sperm from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in milt stored before cryopreservation. *Theriogenology*, 151, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.008>
- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (2019). Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 17(6), 603–612. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- Kutluyer, F., Kayim, M., Öğretmen, F., Büyükleblebici, S., & Tuncer, P. B. (2014). Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*, 69(3), 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.005>
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., & Maisse, G. (2001). Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60(3), 397–404. <https://doi.org/10.1002/mrd.1102>

- Lahnsteiner, F. (2000). Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research*, 31(3), 245–258. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00452.x>
- Lahnsteiner, F, Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., & Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatzoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54, 1477–1498. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00469-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00469-6)
- Lahnsteiner, F, Berger, B., Weismann, T., & Patzner, R. (1996). Physiological and Biochemical Determination of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Semen Quality for Cryopreservation. *Journal of Applied Aquaculture*, 6(4), 47–73. [https://doi.org/10.1300/J028v06n04\\_05](https://doi.org/10.1300/J028v06n04_05)
- Lahnsteiner, F, Patzner, R. A., & Weismann, T. (1996). Semen cryopreservation of salmonid fishes: Influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research*, 27(9), 659–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1996.tb01301.x>
- Lahnsteiner, Franz, Mansour, N., & Kunz, F. A. (2011). The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, 76(5), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.019>
- Lopes, T. da S., Romagosa, E., Streit, D. P., Ribeiro, R. P., & Digmayer, M. (2011). Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology*, 75(3), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.030>
- López-Hernández, J. C., Osorio Pérez, A., Jiménez-Félix, S. A., Páramo-Delgadillo, S., Márquez-Couturier, G., Yasui, G. S., & Arias-Rodríguez, L. (2018). La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 10(1), 67–96. <https://doi.org/10.15359/revmar10-1.5>
- Martínez-Páramo, S., Pérez-Cerezales, S., Gómez-Romano, F., Blanco, G., Sánchez, J. A., & Herráez, M. P. (2009). Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*, 71(4), 594–604. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.034>

- Martínez, J. G., & Carrasco, S. P. (2010). Crioconservación de semen en peces: Efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biologica Colombiana*, 15(2), 3–24. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2010000200001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2010000200001)
- Martínez, R. O. S., Robles, V. M. M., & Casallas, P. E. C. (2019). Effect of two semen collection in a breeding season on the seminal quality of red-bellied pacu (*Piaractus brachyomus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(3), 1184–1195. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15515>
- Medina-Robles, V. M., Sanchez-Carvajal, E., Velasco-Santamaria, Y. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). Bovine sperm cryopreservation using a programmab. *Orinoquia*, 11. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/896/89611108.pdf>
- Medina, R. V. M., Velasco Santamaría, Y., & Cruz Casallas, P. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu*, 18(1), 34–48. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295022952005.pdf>
- Merino, O., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., & Isachenko, V. (2011). Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Animal Reproduction Science*, 124(1–2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.023>
- Merino, Osvaldo, Dumorné, K., Leidy, S. V., Figueroa, E., Valdebenito, I., Farías, J. G., & Risopatrón, J. (2020). Short-term storage sperm of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at 4 °C: Effect of sperm: Extender dilution ratios and antioxidant butylhydroxytoluene (BHT) on sperm function. *Cryobiology*, 95, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.06.007>
- Muñoz Gutierrez, M. E. (2011). Biotecnología aplicada en la reproducción de peces. *Informador Técnico (Colombia)*, 75(1), 66–72.

<https://doi.org/10.23850/22565035.21>

- Navarro, O., Velasco Santamaría, Y., & Cruz Casallas, P. (2004). Evaluación de cinco protectores para la criopreservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev. Colomb. Cienc. Pecu*, 17(Suplemento), 53–59.
- Necmettin, T., Selçuk, S., Yusuf, B., & Ergun, A. (2003). Cryopreservation Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Semen. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 55(3), 208–212. <https://doi.org/10.46989/001c.20345>
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Tabata, Y. A., Rigolino, M. G., & Veríssimo-Silveira, R. (2006). Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(1), 73–77. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000100009>
- Nynca, J., Arnold, G. J., Fröhlich, T., & Ciereszko, A. (2015). Cryopreservation-induced alterations in protein composition of rainbow trout semen. *Proteomics*, 15(15), 2643–2654. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400525>
- Nynca, J., Dietrich, G. J., Dobosz, S., Grudniewska, J., & Ciereszko, A. (2014). Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen. *Aquaculture*, 433, 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.037>
- Nynca, J., Judycka, S., Liszewska, E., Dobosz, S., & Ciereszko, A. (2017). Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*, 477, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.036>
- Peralta-Martínez, M. de los Á., García, S. R., Kjelland, M. E., & González-Márquez, H. (2018). Effect of pH on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm motility using five extender solutions. *Hidrobiologica*, 28(2), 171–178. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n2/paralta>
- Pereira, V. A., de Alencar, D. B., Araújo, I. W. F. de, Rodrigues, J. A. G., Lopes, J. T., Nunes, L. T., Ferreira, Y. M., Lobato, J. S., Montenegro, A. R., & Salmito Vanderley, C. S. B. (2020). Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) semen. *Aquaculture*, 528(May), 735553. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735553>

- Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J., & Herráez, M. P. (2010). Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction*, *139*(6), 989–997. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0037>
- Pineda-Santis, H., Gómez-Oquendo, J., Montoya-Páez, J., Toro-Rendón, V., Acevedo-Villa, O., & Restrepo-Betancur, G. (2015). Crioconservación de semen y calidad espermática en sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae) TT - Semen cryoconservation and sperm quality regardin the Neotropical fish *Brycon henni* (Pisces: Characidae) TT - Criopreservação de sêmen e qualidade do esperm. *Orinoquia*, *19*(2), 166–173. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-37092015000200003&lang=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092015000200003&lang=pt)
- PNIPA. (2020). *Cadena de Valor de la Trucha - PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN EN PESCA Y ACUICULTURA - PNIPA*. Recuperado de <https://pnipa.gob.pe/trucha/>
- Poma Cerron, C. (2004). Tesis: “Efecto de la concentración de dimetilsulfoxido y yema de huevo sobre las características macroscópicas y microscópicas en espermatozoides crioconservados del *Piaractus brachyomus*-Cuvier, 1818 (PACO) –Coronel Portillo -Ucayali.” In *Universidad Nacional Del Centro Del Centro De Peru*. Universidad Nacional Del Centro Del Centro De Peru. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.12894/4001>
- Ramírez-Merlano, J., Medina Robles, V., & Cruz Casallas, P. (2010). Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *Orinoquia*, *14*(1), 59–71. <https://doi.org/10.22579/20112629.128>
- Restrepo-Betancur, G., Páez, J. D. M., & Chacón, L. A. (2017). Evaluación de dos crioprotectores y tres curvas de congelación programable en la criopreservación de semen de *brycon henni* (Pisces: Characidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *28*(3), 597–605. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13349>
- Rusco, G., Di Iorio, M., Gibertoni, P. P., Esposito, S., Penserini, M., Roncarati, A., Cerolini, S., & Iaffaldano, N. (2019). Optimization of Sperm Cryopreservation Protocol for Mediterranean Brown Trout: A Comparative Study of Non-Permeating

- Cryoprotectants and Thawing Rates In Vitro and In Vivo. *Animals*, 9(6), 304.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani9060304>
- Rusco, G., Iorio, M. Di, Iampietro, R., Esposito, S., & Gibertoni, P. P. (2020). A Simple and Efficient Semen Cryopreservation Method to Increase the Genetic Variability of Endangered Mediterranean Brown Trout Inhabiting Molise Rivers. *Animals*, 10(3), 403. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani10030403>
- Şahin, T., Kurtoğlu, İ. Z., & Balta, F. (2013). Effect of Different Extenders and Storage Periods on Motility and Fertilization Rate of Rainbow Trout ( *Oncorhynchus Mykiss* ) Semen. *Universal Journal of Agricultural Research*, 1(3), 65–69.  
<https://doi.org/10.13189/ujar.2013.010304>
- Salte, R., Galli, A., Falaschi, U., Fjalestad, K. T., & Aleandri, R. (2004). A protocol for the on-site use of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) applied to the production of progeny groups: Comparing males from different populations. *Aquaculture*, 231(1–4), 337–345.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.037>
- Sanches, E. A., Marcos, R. M., Baggio, D. M., Tessaro, L., Balen, R. E., & Bombardelli, R. A. (2011). Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(6), 1163–1167.  
<https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>
- Sarvi, K., Niksirat, H., Mojazi Amiri, B., Mirtorabi, S. M., Rafiee, G. R., & Bakhtiyari, M. (2006). Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture*, 256(1–4), 564–569.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.012>
- Secer, S., Tekin, N., Bozkurt, Y., Bukan, N., & Akcay, E. (2004). Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 56(4), 274–280.  
<https://doi.org/10.46989/001c.20390>
- Stornelli, M. C; Tittarelli, C. M; Savignone, C. A; Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25(2), 28–35. Recuperado de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11180/Documento\\_completo.pdf?](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11180/Documento_completo.pdf?)

sequence=1&isAllowed=y

- Torres, J. M. G., Maíz Padrón, R. A., & Castellano Rangel, J. de J. (2014). Aspectos de la producción anual de semen de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en los andes venezolanos. *Mundo Pecuario*, *10*(1), 9–14. Recuperado de <http://www.saber.ula.ve/mundopecuario/>
- Torres, L., Hu, E., & Tiersch, T. R. (2016). Cryopreservation in fish: current status and pathways to quality assurance and quality control in repository development. *Reprod Fertil Dev*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/RD15388>
- Trigo, P., Merino, O., Figueroa, E., Valdebenito, I., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2015). Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. *Andrologia*, *47*(4), 407–411. <https://doi.org/10.1111/and.12276>
- Ulloa-Rodríguez, P., Contreras, P., Dumorné, K., Lee-Estevez, M., Díaz, R., Figueroa, E., Valdebenito, I., Risopatrón, J., & Farías, J. G. (2018). Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) spermatozoa quality after storage at 4 °C in Cortland medium. *Animal Reproduction Science*, *197*(August), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.019>
- Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V., & Fernández, J. (2009). Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: Aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *41*(2), 97–106. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2009000200002>
- Vargas, R. (2013). Evaluación de la reproducción de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) producida en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, *14*(1), 123. <https://doi.org/10.15517/am.v14i1.11999>
- Viveiros, A. T. M., Lock, E. J., Woelders, H., & Komen, J. (2001). Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cryobiology*, *43*(3), 276–287. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2362>
- Xin, M., Siddique, M. A. M., Dzyuba, B., Cuevas-Uribe, R., Shaliutina-Kolešová, A., & Linhart, O. (2017). Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. *Theriogenology*, *98*, 16–22.



<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.043>

Yang, H., Hu, E., Buchanan, J. T., & Tiersch, T. R. (2018). A Strategy for Sperm Cryopreservation of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, for Remote Commercial-scale High-throughput Processing. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(1), 96–112. <https://doi.org/10.1111/jwas.12431>



## ANEXOS

## 1. Panel fotográfico



Selección de machos



Secado de abdomen para colección  
de semen



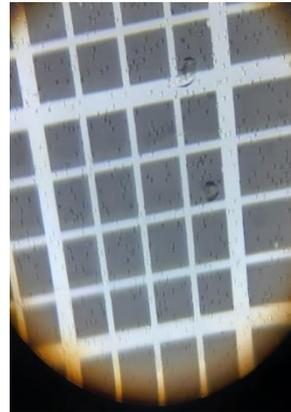
Colección de semen en vaso  
colector



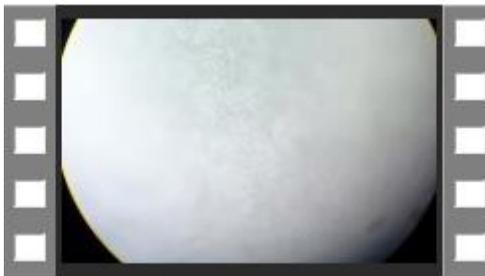
Evaluación del color



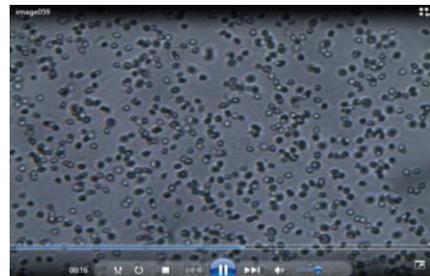
Evaluación del volumen



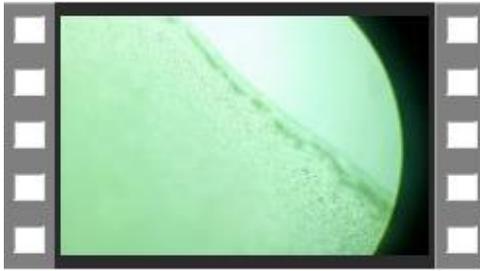
Concentración espermática con  
Cámara Neubauer



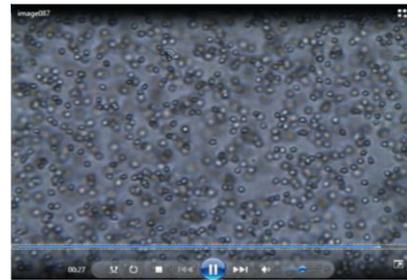
Video de la motilidad en  
semen fresco



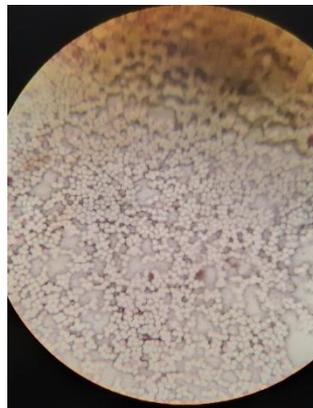
Video de motilidad post  
descongelación



Video de tiempo de activación  
en semen fresco



Video de tiempo de activación  
post descongelación



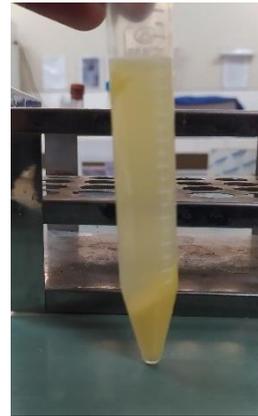
Vitalidad de semen fresco



Vitalidad de semen post  
descongelación



Pesado de Glucosa en balanza analítica



Crio protector centrifugado con sobrenadante



Acondicionamiento de semen y dilutor a temperatura del estanque ( $10^{\circ}\text{C} - 12^{\circ}\text{C}$ )



Descenso de temperatura y estabilización a  $4^{\circ}\text{C}$



Llenado de pajillas de 0.5ml con la dilutor (semen: dilutor; 1:3) – 4°C



Sellado de pajillas



Clasificación de pajillas según tratamiento



Clasificación de pajillas según tratamiento para la congelación



Materiales para la fertilización



Pesado de ovas para cada repetición



Descongelación de semen según  
tratamiento



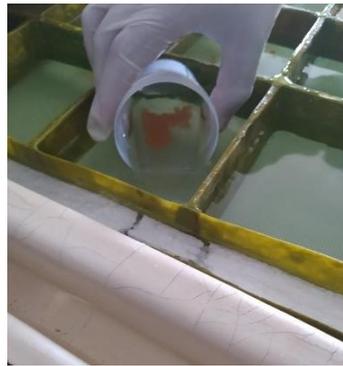
Fertilización con semen descongelado



Adición de 5 ml de activador de motilidad (Bicarbonato de sodio)



Enjuague con agua de estanque



Incubación por tratamiento



Ovas fertilizadas con semen descongelado



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TI; -80°C), día 1



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TII; -100°C), día 1



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TIII;  $-120^{\circ}\text{C}$ ), día 1



Incubadora de flujo descendente, día 1  
de incubación



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TI;  $-80^{\circ}\text{C}$ ), día 14



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TII;  $-100^{\circ}\text{C}$ ), día 14



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TIII; -120°C), día 14



Ovas no fertilizadas y muertas



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TI; -80°C), día 21



Ovas EN ESTADO DE OJO  
(Tratamiento TI; -80°C), día 21



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TII;  $-100^{\circ}\text{C}$ ), día 21



Ovas EN ESTADO DE OJO  
(Tratamiento TII;  $-100^{\circ}\text{C}$ ), día 21



Ovas fertilizadas con semen descongelado  
(Tratamiento TIII;  $-120^{\circ}\text{C}$ ), día 21



Ovas EN ESTADO DE OJO  
(Tratamiento TIII;  $-120^{\circ}\text{C}$ ), día 21



Larvas de trucha arcoíris (Tratamiento  
II;  $-80^{\circ}\text{C}$ ), día 31



Larvas de trucha arcoíris (Tratamiento  
III;  $-100^{\circ}\text{C}$ ), día 31



Larvas de trucha arcoíris (Tratamiento  
IIII;  $-120^{\circ}\text{C}$ ), día 31

Tabla 3

*Datos de parámetros macroscópicos y microscópicos de colección de semen en fresco y descongelado*

		PRECONGELACION										POSDESCONGELACION									
		OF1					OF2					OF3									
		MACROSCOPICOS					MICROSCOPICOS					MICROSCOPICOS					FERTILIDAD (%)				
N	PESO (KG)	VOLUMEN (ml)	COLOR	CONCENTRACION (10 <sup>9</sup> /ml)	TIEMPO		MOTILIDAD MASAL (%)	VITALIDAD (%)	ACTIVACION (s)	TIEMPO		MOTILIDAD (%)	VITALIDAD (%)	T°	REP 1	REP 2	REP 3	Promedio			
					ACTIVACION (s)	TIEMPO				ACTIVACION (s)	TIEMPO										
T1	1.5	5.1	Blanco	4.20	172	90	94.00	45	32.00	80°C	73.9	0.9	70.5								
T1	1.8	8.1	Blanco	4.66	162	90	87.00	39	30.00	80°C	86.3	90.2	70.2					68.9			
T1	1.3	5.3	Blanco	4.59	217	90	91.00	45	38.00	80°C	69.8	80.8	77.1								
T2	1.7	6.3	Blanco	4.69	155	95	94.00	40	28.00	100°C	22.6	76.1	86.1								
T2	1.4	5.2	Blanco	4.21	146	85	93.00	60	38.00	100°C	86.7	94.4	87.2					71.0			
T2	1.4	5.8	Blanco	4.89	182	90	92.00	54	33.00	100°C	76.0	44.2	65.4								
T3	2.1	7.2	Blanco	4.45	137	90	94.00	50	35.00	120°C	65.0	35.5	56.8								
T3	1.6	5.2	Blanco	4.47	135	90	90.00	45	35.00	120°C	71.2	79.4	90.0					64.3			
T3	1.7	6.1	Blanco	4.74	215	95	92.00	35	39.00	120°C	76.4	39.4	65.4								

Tabla 4

*Estadística descriptiva de peso vivo (PV) de truchas arcoíris (Oncorhynchus mykiss) y de los parámetros macroscópicos y microscópicos de semen fresco*

	<b>PV (kg)</b>	<b>Volum en (ml)</b>	<b>Concentrac ión (10<sup>9</sup>/ml)</b>	<b>Motilid ad (%)</b>	<b>Tiempo_activa cion (Segundos)</b>	<b>Vitalid ad (%)</b>
N	9	9	9	9	9	9
Missing	0	0	0	0	0	0
Mean	1.61	6.03	4.54	90.56	169.00	91.89
Std. error mean	0.08	0.34	0.08	1.00	10.24	0.77
Median	1.60	5.80	4.59	90	162	92
Standar d deviatio n	0.25	1.03	0.23	3.00	30.72	2.32
Varianc e	0.06	1.07	0.05	9.03	944.00	5.36
Minimu m	1.30	5.10	4.20	85	135	87
Maxim um	2.10	8.10	4.89	95	217	94
Shapiro -Wilk W	0.94	0.86	0.94	0.78	0.90	0.87
Shapiro -Wilk p	0.61 77	0.0891	0.6172	0.0122	0.2363	0.1220

Tabla 5

*Estadística descriptiva de los parámetros seminales del semen de trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss) post descongelación*

	Tratamiento	Tiempo_activación (segundos)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)
N	T1	3	3	3
	T2	3	3	3
	T3	3	3	3
Missing	T1	0	0	0
	T2	0	0	0
	T3	0	0	0
Mean	T1	43.00	33.33	33.33
	T2	51.33	33.00	35.33
	T3	43.33	36.33	32.00
Std. error mean	T1	2.00	2.40	2.03
	T2	5.93	2.89	2.19
	T3	4.41	1.33	3.06
Median	T1	45	32	33
	T2	54	33	37
	T3	45	35	30
Standard deviation	T1	3.46	4.16	3.51
	T2	10.26	5.00	3.79
	T3	7.64	2.31	5.29
Minimum	T1	39	30	30

	Tratamiento	Tiempo_activación (segundos)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)
	T2	40	28	31
	T3	35	35	28
Maximum	T1	45	38	37
	T2	60	38	38
	T3	50	39	38
Shapiro- Wilk W	T1	0.75	0.92	0.99
	T2	0.95	1.00	0.85
	T3	0.96	0.75	0.89
Shapiro- Wilk p	T1	< .0001	0.4633	0.8428
	T2	0.5665	1.0000	0.2530
	T3	0.6369	< .0001	0.3631

Tabla 6.

*ANOVA para tiempo de activación seminal y Post Hoc Comparación – Tratamiento*

#### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Tratamiento	133.56	2	66.78	1.14	0.3804
Residuals	351.33	6	58.56		

#### NORMALITY TESTS

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
	statistic	P			
Shapiro-Wilk	0.92	0.4024			
Kolmogorov-Smirnov	0.27	0.4695			
Anderson-Darling	0.40	0.2811			

Note. Additional results provided by *moretests*

POST HOC COMPARISONS – TRATAMIENTO

Comparison								
Tratamiento	Tratamiento	Mean Difference	SE	Df	t	p <sub>tukey</sub>	p <sub>bonferroni</sub>	
T1	- T2	-8.33	6.25	6.00	-1.33	0.4292	0.6920	
	- T3	-0.33	6.25	6.00	0.05	0.9984	1.0000	
T2	- T3	8.00	6.25	6.00	1.28	0.4549	0.7430	

Note. Comparisons are based on estimated marginal means

Tabla 7.

*ANOVA para motilidad seminal y Post Hoc Comparación – Tratamiento*

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Tratamiento	20.22	2	10.11	0.64	0.5615
Residuals	95.33	6	15.89		

NORMALITY TESTS

	statistic	p
Shapiro-Wilk	0.93	0.4527
Kolmogorov-Smirnov	0.21	0.8400
Anderson-Darling	0.35	0.3870

Note. Additional results provided by *moretests*

POST HOC COMPARISONS – TRATAMIENTO

Comparison		Mean Difference	SE	Df	t	p <sub>tukey</sub>	p <sub>bonferroni</sub>
T1	- T2	0.33	3.25	6.00	0.10	0.9942	1.0000
	- T3	-3.00	3.25	6.00	-0.92	0.6476	1.0000

POST HOC COMPARISONS – TRATAMIENTO

Comparison							
Tratamiento	Tratamiento	Mean Difference	SE	Df	t	p <sub>tukey</sub>	p <sub>bonferroni</sub>
T2	- T3	-3.33	3.25	6.00	-1.02	0.5900	1.0000

Note. Comparisons are based on estimated marginal means

Tabla 8.

*ANOVA para vitalidad y Post Hoc Comparación – Tratamiento*

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Tratamiento	16.89	2	8.44	0.46	0.6499
Residuals	109.33	6	18.22		

NORMALITY TESTS

	statistic	P
Shapiro-Wilk	0.93	0.5230
Kolmogorov-Smirnov	0.15	0.9691
Anderson-Darling	0.26	0.6017

NORMALITY TESTS

statistic	P
-----------	---

Note. Additional results provided by *moretests*

POST HOC COMPARISONS – TRATAMIENTO

Comparison		Mean Difference	SE	Df	T	P <sub>tukey</sub>	P <sub>bonferroni</sub>
T1	- T2	-2.00	3.49	6.00	-0.57	0.8385	1.0000
	- T3	1.33	3.49	6.00	0.38	0.9235	1.0000
T2	- T3	3.33	3.49	6.00	0.96	0.6280	1.0000

Note. Comparisons are based on estimated marginal means

Tabla 9.

*Estadística descriptiva de la fertilidad según tratamiento*

	<b>Tratamiento</b>	<b>Fertilidad (%)</b>
N	T1	9
	T2	9
	T3	9
Missing	T1	0
	T2	0
	T3	0
Mean	T1	68.86
	T2	70.97
	T3	64.34
Std. error mean	T1	8.83
	T2	7.84
	T3	6.00
Median	T1	73.90
	T2	76.10
	T3	65.40
Standard deviation	T1	26.50
	T2	23.53
	T3	17.99
Minimum	T1	0.90

	Tratamiento	Fertilidad (%)
	T2	22.60
	T3	35.50
Maximum	T1	90.20
	T2	94.40
	T3	90.00
Shapiro-Wilk W	T1	0.65
	T2	0.85
	T3	0.95
Shapiro-Wilk p	T1	0.0004
	T2	0.0769
	T3	0.6585

Tabla 10.

*ANOVA de fertilidad entre tratamientos*

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Tratamiento	205.98	2	102.99	0.20	0.8236
Residuals	12636.90	24	526.54		

Tabla 11.

*Correlación entre variables post descongelación*

Correlation Matrix

		<b>Tiempo_Ac t(s)</b>	<b>Motilidad( %)</b>	<b>Vitalidad( %)</b>	<b>Fertilidad( %)</b>
Tiempo_Ac t(s)	Pearson's r	—			
	p-value	—			
Motilidad( %)	Pearson's r	-0.54	—		
	p-value	0.6346	—		
Vitalidad( %)	Pearson's r	0.91	-0.85	—	
	p-value	0.2760	0.3585	—	
Fertilidad( %)	Pearson's r	0.72	-0.97	0.94	—
	p-value	0.4887	0.1459	0.2127	—

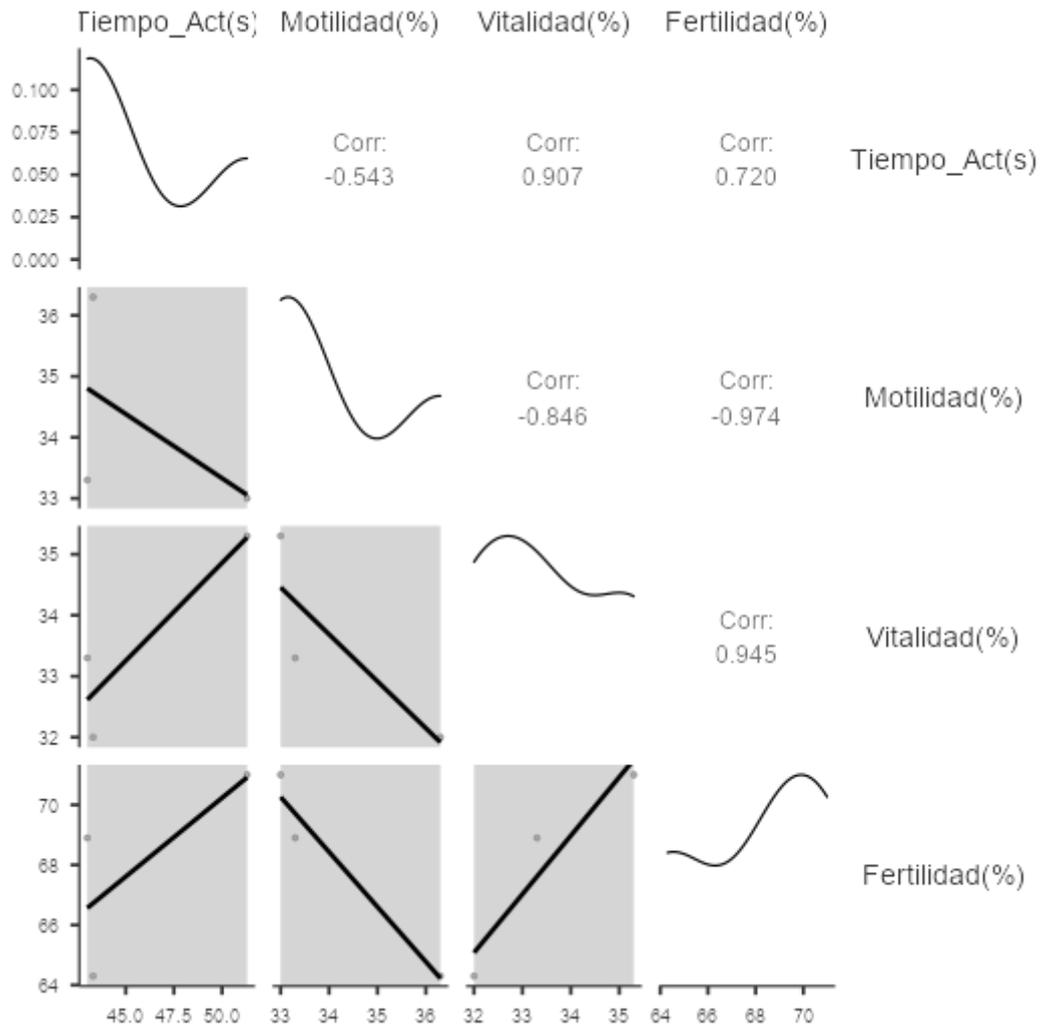


Figura 5. Plot de correlaciones entre parámetros seminales y la fertilidad post descongelación



## Anexo 2. Chi cuadrado para comparación de tasas de fertilidad TRATAMIENTOS - CONTROL

Table # Counts

columns

rows -80 -100 -120 Control

Fertil 68.9 71 64.3 85.3

No Fertil 31.1 29 35.7 14.7

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

```
> .Test
```

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 12.315, df = 3, p-value = 0.006377