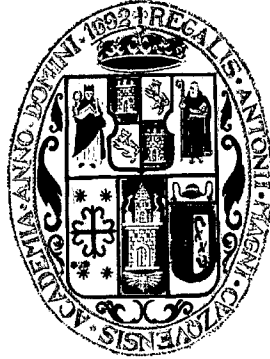


# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

## ***FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS***

CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**"CARACTERIZACION Y CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE TRUCHA ARCO IRIS  
(*Onchorynchus mykiss*) EN EL CENTRO EXPERIMENTAL LA RAYA - PROVINCIA DE CANCHIS"**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO.**

**PRESENTADA POR:**

Br. CHARLES OCON ARAUJO

Br. WILLINGTON LUQUE CARBAJAL

**ASESOR** : Blgo. ROLANDO POPI CANALES PEREZ

**COASESORES** : Ph. D. WALTER BRAVO MATHEUS.

: Med. Vet. VIRGILIO ALARCON

**CUSCO – PERÚ**

**2014**

## **DEDICATORIA**

A Dios, que gracias a su inmenso cariño y misericordia me permitió fortalecerme más en mi crecimiento espiritual y profesional a lo largo de este camino.

A mis padres Raúl la persona que me motivo y me dio su aliento hasta el final, a Chelita que está al lado de nuestro señor y que fue quien me dio toda la fuerza desde donde se encuentra, por su valioso e incondicional apoyo, aliento y total respaldo.

A Alcione, Soledad, Luz Delia y Raúl con quienes compartí satisfacciones y sinsabores, y por haberme dado su fuerza y apoyo incondicional, dándome todo el soporte para concretar esta tesis.

A Fabrizio, de quien espero que siga mis pasos y sea un gran profesional.

A Rosita, la persona con la que comparto mi vida, mis vivencias, mis alegrías y penas, la persona que siempre me dio ánimos y me dio la fortaleza para alcanzar el camino final.

A mis amigos de verdad en especial a Eduardo, el amigo que siempre está en los momentos más difíciles, quien siempre me brindó su apoyo y su gran amistad, a Milner a Boris y a mis demás amigos por su aliento y compañía en esta etapa final de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A Dios, que gracias a su inmenso cariño y misericordia me permitió fortalecerme más en mi crecimiento espiritual y profesional a lo largo de este camino.

A mis padres Donato y Dora, por su valioso e incondicional apoyo voz de aliento y respaldo en todas mis decisiones y actuaciones.

A mi esposa María y mis hijos Jordán, Liam y Melany, con quienes comparto mis satisfacciones y sinsabores, a quienes quiero y respeto.

A mis hermanos, Edith, Carla y Reynaldo, los cuales nunca me dejaron solo a pesar de la distancia.

A mis amigos Carlos, Hugo, quienes siempre me brindaron su apoyo y su gran amistad.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios porque fue gracias a su inmenso amor y cariño que pudimos vivir esta enriquecedora experiencia y conocer a personas maravillosas las cuales nos permitieron crecer tanto profesional como personalmente.

Al Biólogo Rolando Popí Canales Pérez, nuestro Asesor y gran guía y sobre todo un gran amigo, gracias a quien este proyecto se llevó acabo.

Al Doctor Walter Bravo Matheus, nuestro guía, gracias a quien nos brindó la metodología, quien le dio todo el interés, su esfuerzo y comprensión.

Al Doctor Virgilio Alarcón, por su comprensión, paciencia y sobre todo el apoyo incondicional en el desarrollo del presente proyecto.

A nuestros padres, quienes a lo largo de todo este ciclo han apoyado y motivado en nuestra formación académica, quienes creyeron en nosotros en todo momento y no dudaron de nuestras habilidades.

A nuestras parejas a Rosita y María, quienes nos brindaron todo el apoyo y comprensión durante la ejecución de este proyecto.

Así mismo agradecemos a todas aquellas personas, que hicieron posible la ejecución de este proyecto hasta su culminación, quienes pusieron su granito de arena.

A nuestros docentes a quienes les debemos gran parte de nuestros conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza.

Finalmente un eterno agradecimiento a nuestra prestigiosa universidad la cual nos abrió sus puertas y nos acogió, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

## INDICE

RESUMEN.....	I
INTRODUCCION .....	II
I.- GENERALIDADES SOBRE EL PROBLEMA .....	1
1.1.-Problema Objeto de Estudio .....	1
1.2.1.- JUSTIFICACIÓN .....	2
1.2.2.- OBJETIVOS .....	3
1.2.2.1.- OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2.2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
1.2.3.- HIPÓTESIS .....	4
II.- MARCO TEORICO.....	5
2.1.- MARCO CONCEPTUAL .....	5
2.2.- ANTECEDENTES .....	6
2.3.- REVISION BIBLIOGRAFICA (FUNDAMENTOS TEORICOS).....	9
2.3.1.- BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE TRUCHA ARCO IRIS ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	9
<b>2.3.2.- Posición Taxonómica</b> .....	10
2.3.3.- ETAPAS DEL CICLO VITAL DE LA TRUCHA.....	11
2.3.4.- CONTROL ENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN.....	12
2.3.7.- REPRODUCCIÓN .....	15
2.3.8.- BIOECOLOGIA DE REPRODUCCION EN PECES.....	15
2.3.10.- ANATOMIA, Y FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE TRUCHA ARCO IRIS ( <i>Onchorynchus mykiss</i> ).....	19
2.3.13.- FORMACIÓN DE LOS GAMETOS O GAMETOGÉNESIS .....	24
2.3.14.- ESPERMATOGENESIS Y ESPERMIOGENESIS .....	26
2.3.24.- ESTADIOS DE MADUREZ SEXUAL (Naier, De Buckmann, 1929).....	40
2.3.25.- FECUNDACION DIFERIDA EN PECES: TECNICAS EMPLEADAS.....	41
2.4.- BASES TEORICAS.....	44
2.4.1.- FECUNDACIONES DIFERIDAS: CRIOPRESERVACION Y SOLUCIONES ISOTONICAS .....	44
2.4.3.- DILUYENTES Y CRIOPROTECTORES .....	46

2.4.4.- CARACTERIZACION GENERAL DE LA BIOECOLOGIA DE TRUCHA ARCO IRIS ( <i>Onchorynchus mykiss</i> ) .....	50
2.4.5.- DIMORFISMO SEXUAL .....	50
III.- MATERIALES Y METODOS .....	52
3.1.- LUGAR DE EJECUCION.....	52
3.2.- MATERIAL BIOLÓGICO.....	54
3.3.- MATERIALES DE LABORATORIO Y CAMPO .....	55
3.3.1.- MATERIALES Y REACTIVOS DE LABORATORIO .....	55
3.3.2.- MATERIALES DE CAMPO.....	57
3.4.-METODOS .....	58
3.4.1.- FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE CRIOPRESERVACION .....	58
3.4.2.- DESOVE ARTIFICIAL.....	59
3.4.3.- OBSERVACION DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN.....	60
3.4.4.- CONCENTRACION ESPERMÁTICA.....	62
3.4.5.- APLICACIÓN DE DILUTORES.....	63
3.4.6.- PREPARACION DE CRIOPROTECTORES .....	64
3.4.7.- APLICACION DE CRIOPROTECTORES SOBRE EL SEMEN A PRESERVAR .....	66
3.4.8.- CONGELACION.....	67
3.4.9.- DESCONGELACION .....	68
3.4.10.- EVALUACION DE LA VITALIDAD DEL SEMEN PRESERVADO .....	68
3.4.11.- FECUNDACION CON EL SEMEN PRESERVADO.....	71
3.5.- ANALISIS DE DATOS.....	71
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	72
4.1.- RESULTADOS CUALITATIVOS .....	72
4.2.- RESULTADOS CUANTITATIVOS .....	73
4.3.- DISCUSIÓN .....	81
CONCLUSIONES .....	84
RECOMENDACIONES .....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	86
ANEXOS.....	95

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N° 01:</b> Caracterización sintética de los estadios del ciclo vital de trucha arco iris.....	11
<b>Cuadro N° 02:</b> Valores medios de concentración de espermatozoides por ml. En el semen de <i>Onchorynchus mykiss</i> .....	29
<b>Cuadro N° 03:</b> Espermatozoides recolectados durante el periodo de la reproducción y espermatozoides restantes en los testículos después del periodo de la reproducción.....	30
<b>Cuadro N° 04:</b> Composición Química del plasma seminal de <i>Salmo gairdneri</i> .....	32
<b>Cuadro N° 05:</b> Dimorfismo sexual en trucha arco iris.....	51
<b>Cuadro N° 06:</b> Calidad hídrica de la piscigranja La Raya.....	52
<b>Cuadro N° 07:</b> Aplicación de Dilutores.....	63
<b>Cuadro N° 08:</b> Los volúmenes de semen para cada diluyente fueron:.....	63
<b>Cuadro N° 09:</b> Preparación de crioprotectores.....	65
<b>Cuadro N°10:</b> Composición de crioprotectores sobre el semen a preservar.....	66
<b>Cuadro N° 11:</b> Congelación.....	67
<b>Cuadro N° 12:</b> Composición de crioprotectores y activador.....	69
<b>Cuadro N°13:</b> De la comprobación de la vitalidad del semen preservado.....	70
<b>Cuadro N°14:</b> Volumen de semen.....	73
<b>Cuadro N° 15:</b> Caracterización seminal.....	74
<b>Cuadro N°16:</b> Eficiencia de Dilutores para observación de sobrevivencia.....	74
<b>Cuadro N° 17:</b> Se obtuvo los siguientes resultados a 30 °C, para la descongelación.....	76
<b>Cuadro N° 18:</b> Se obtuvo los siguientes resultados a 18 °C, para la descongelación.....	77
<b>Cuadro N° 19:</b> Características típicas de los Géneros pertenecientes a la subfamilia Salmoninae.....	110

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N° 01.-</b> Interacción de algunas glándulas endocrinas de los peces.....	12
<b>Figura N° 02.-</b> Papel de la reproducción en la supervivencia y evolución de las especies...14	14
<b>Figura. N° 03.-</b> Aparato Urogenital de la Trucha.....	18
<b>Figura N° 04.-</b> La organización histológica y funcional del testículo.....	19
<b>Figura. N° 05.-</b> La capsula o envoltura externa del testículo.....	20
<b>Figura N° 06.-</b> Espermiogénesis o proceso de finalización .....	26
<b>Figura N° 07.-</b> Variaciones de la forma en espermatozoides (muy amplificados).....	32
<b>Figura N° 08.-</b> Estructura del ovulo.....	34
<b>Figura N° 09.- A.-</b> Ovulo (macrogameto de morfología esférica.....	35

## ÍNDICE DE HISTOGRAMAS

<b>Histograma 01:</b> Eficiencia de los Dilutores para observación de supervivencia.....	75
<b>Histograma 02:</b> Descongelación a 30 °C.....	77
<b>Histograma 02:</b> Descongelación a 18 °C.....	78



## RESUMEN

Caracterización y criopreservación de semen de trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*) en el centro experimental La Raya - Provincia de Canchis, estudio realizado de setiembre del 2013 a Julio 2014, con el objetivo principal, de caracterizar el semen de trucha arco iris y materializar su criopreservación, tomando como referente el protocolo seguido en el centro experimental la Raya, para la criopreservación de semen de Camélidos Sudamericanos. La metodología o secuenciación del proceso, observo las fases de colección de semen, observación de la motilidad y mortalidad, aplicación de Dilutores, preparación de crioprotectores, empaquetamiento en pajillas, congelación en Nitrógeno Líquido, transcurrido nueve meses en congelación, se procedió al descongelamiento a 18 °C y 30 °C. En términos cuantitativos el volumen promedio de semen es de 6.9 ml y una concentración cuantificada de  $5,494 \times 10^9$  espermatozoides/ ml., de semen. El semen descongelado fue observado al microscopio para verificar su motilidad y luego inmediatamente utilizado para la fecundación con ovas provenientes de dos Hembras maduras, obtenidas de los estanques de estabulación del Centro Experimental La Raya. Los prendimientos (fecundación), superaron el 90%, demostrando así que la técnica empleada fue altamente viable, confirmando así la hipótesis asumida. Este tipo de investigaciones debe de ser ampliada, con la finalidad de mejorar la técnica de Criopreservación de semen de peces.

**Palabras Claves:** *Onchorynchus mykiss*, criopreservación, endogamia, dilutores, crioprotectores.

## INTRODUCCION

La práctica de la piscicultura en su nivel intensivo, en nuestro país y como sucede en muchos otros, tropieza con el inconveniente de la no disponibilidad inmediata de alguno de los gametos que como tales intervienen en la reproducción sexual de peces; surge entonces la necesidad de conservar estas células sexuales para su ulterior utilización, a condición de que estos gametos conserven sus características naturales y que las hagan viables para la fecundación.

Para el caso puntual de la conservación de espermatozoides, la técnica que se muestra más viable o eficaz, es la criopreservación, que permite conservar sus características y potencialidad de fecundación por periodos relativamente prolongados, pudiendo ser almacenada por varios meses, permitiendo así la realización de fecundaciones diferidas, resultando igualmente útil, para fines de mejoramiento genético, (Billard, 1990).

Como herramienta biotecnológica, la criopreservación, ha sido practicada, aun esporádicamente, en diversos países como en Colombia en bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus 1766), Venezuela en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), Argentina en pejerrey bonaerense (*Odonstesthes bonariensis*), y en España en anguila europea (*Anguilla anguilla*) y obviamente, con resultados diversos, en el caso específico de (*Oncorhynchus mykiss*), considerando su marcada estacionalidad reproductiva, tales trabajos han abarcado un espacio temporal bastante corto. Por otra parte, los protocolos puestos en práctica, aún no han sido estandarizados, de manera que aún se carece de parámetros referenciales que impriman mejor consistencia a lo que se viene realizando, como parte de la producción intensiva y/o con orientación estrictamente investigativa, (Guarnizo, 2007).

En nuestro caso para materializar la investigación, tomamos como centro de operaciones el Centro Experimental La Raya – UNSAAC, para ello consideramos que es allí donde ya se tiene consolidado el protocolo para preservación de espermatozoides de camélidos sudamericanos, (Lacuta, 1996); entonces asumimos que esta experiencia, con las modificaciones del caso, podría resultar viable para la preservación, de semen de (*Oncorhynchus mykiss*), para lo que consideramos también que este centro experimental cuenta con alguna infraestructura donde se lleva a cabo la producción intensiva de este salmónido.

## **I.- GENERALIDADES SOBRE EL PROBLEMA**

### **1.1.-Problema Objeto de Estudio**

En la Región Cusco, donde la práctica de la producción intensiva de trucha arco iris se viene materializando desde hace varias décadas, no se ha realizado trabajo alguno relacionado con la criopreservación de semen de peces, no obstante que esta técnica es particularmente útil para optimizar la producción intensiva tanto cualitativa como cuantitativamente.

Esta omisión en la práctica de la criopreservación, de parte de entidades estatales así como de productores particulares, motiva la incursión, de nuestra parte, para iniciar con trabajos de esta naturaleza cuya finalidad primordial es optimizar la producción intensiva a través de la generación de semilla (alevinos), mejorada genéticamente y a cuyo efecto resulta, especialmente útil, la criopreservación que entre otros aspectos permite la realización de fecundaciones diferidas o cruzamientos entre reproductores de poblaciones distantes, superando así situaciones endogámicas que ocurren sobre todo en ambientes lenticos o en condiciones de estabulación cuando se realizan cruzamientos entre reproductores de la misma población, y cuyas proles se ven cada vez genéticamente erosionadas con el consiguiente déficit cualitativo y cuantitativo, que no coadyuva a la calidad del producto y su consiguiente apreciación comercial.

### 1.2.1.- JUSTIFICACIÓN

El estudio realizado pone en práctica una técnica que coadyuva a la optimización de la producción intensiva de trucha arco iris, toda vez que tal técnica, permite obtener proles de mejor calidad a través de cruzamientos de reproductores de poblaciones distantes, rompiendo así la endogamia de ocurrencia frecuente, particularmente en establecimientos de producción intensiva.

Entonces, la criopreservación tiene como utilidad inmediata la mejora de la producción, en lo cualitativo y cuantitativo, considerando que las proles mejoradas sirviéndose de esta técnica, resultan considerablemente ventajosas para el piscicultor en términos de tiempo de producción y calidad final comercializable.

En el entendido de que la criopreservación es una técnica de la que se sirve la piscicultura para realizar trabajos de fecundación diferida y mejoramiento genético, su aplicación en nuestro medio reviste particular interés habida cuenta de que la producción de Trucha "Arco Iris" (*Oncorhynchus mykiss*), extensiva e intensivamente, tiene cada vez más adeptos y resulta necesario transferirles esta tecnología a efecto de que se consigan resultados más satisfactorios.

## **1.2.2.- OBJETIVOS**

El trabajo efectuado estuvo orientado a la consecución de los siguientes objetivos.

### **1.2.2.1.- OBJETIVO GENERAL**

- Caracterizar el semen de Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*), y acometer en su criopreservación, en el Centro Experimental La Raya, UNSAAC.

### **1.2.2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar las características del semen de Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*), en sus aspectos de volumen, morfología, motilidad.
- Probar la eficacia de diferentes diluyentes y crioprotectores, empleados en la práctica de la criopreservación.
- Determinar, la viabilidad de los espermatozoides criopreservados, en su capacidad de fecundación.

### **1.2.3.- HIPÓTESIS**

El protocolo observado, para la criopreservación de semen de camélidos sudamericanos, es igualmente viable para la caracterización y preservación del semen de Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*).

## II.- MARCO TEORICO

### 2.1.- MARCO CONCEPTUAL

- **Criopreservación.-** Proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo, (Guarnizo, 2007).
- **Crioprotectores.-** Compuesto químico que permite el mantenimiento de un tejido o de células por mucho tiempo cuando se las mantiene a baja temperatura. Los crioprotectores, en la práctica de la criopreservación, se emplean, sobre todo, para asegurar la integridad de la membrana celular, (Billard, 1990).
- **Caracterización de Gametos.-** Se refiere a la observación y descripción, dentro del proceso de crío preservación, de los espermatozoides contenidos en el semen. Dicha caracterización implica, básicamente, la morfología, motilidad, cantidad de espermatozoides por volumen de semen (cantidad por ml. de semen), (Bastardo, 1982).
- **Fecundación diferida.-** Consiste en la unión o fusión de gametos, en este caso de peces, cuando alguna de las células sexuales no va intervenir de inmediato en la unión con el gameto opuesto, ese gameto, obtenido del reproductor, se preserva por alguna técnica especial, para ser utilizado después de que se disponga del otro gameto y así se materialice la fecundación. La fecundación diferida es una práctica usualmente utilizada en mejoramiento genético, (Morisawa *et al.*, 1985).
- **Psamofilo.-** Organismos que depositan sus productos sexuales sobre arena o grava, (Lagler, 1999).
- **Endogamia.-** Equivale a cruzamientos consanguíneos, vale decir entre reproductores de la misma población, que finalmente generan erosión genética con la consiguiente declinación cualitativa y cuantitativa de la población íctica, (Jiménez, 1994).

## 2.2.- ANTECEDENTES

- **Lacuta L. L. (1996):** en su trabajo de investigación de tesis intitulado “Evaluación de semen refrigerado de camélidos Lama pacos, con tres tipos de Dilutores”, determinan que los dilutores, yema citrato y leche ofrecen mejores condiciones de conservación de los espermatozoides, que el porcentaje de espermatozoides vivos encontrados en las distintas pruebas con diferentes dilutores y distintos tiempos presentan diferencia porcentual.
  
- **Espinoza, C. M. (2003):** en su trabajo de investigación de tesis intitulado “Alteraciones morfológicas y fisiológicas en espermatozoides criopreservados *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819), Concha de Abanico” determina que el efecto negativo que tiene el proceso de criopreservación sobre la motilidad y estructura espermática es causada exclusivamente por la congelación-descongelación y no por la toxicidad al crioprotector. Dicho efecto altera su motilidad pero no influye considerablemente sobre su capacidad fecundante post-descongelamiento.
  
- **Garzón, V.D. (2007):** en su trabajo de investigación de tesis intitulado “Inducción hormonal de la espermiación y criopreservación de esperma en anguila europea (*Anguilla anguilla*), determina que El DMSO es un crioprotector útil en el proceso de congelación de esperma de anguila europea. Sin embargo, el DMSO incrementa la osmolaridad del medio activando el movimiento de los espermatozoides, lo que reduce los tiempos de manipulación del esperma en los procesos de pre-congelación y post-congelación antes de que los espermatozoides consuman su energía.
  
- **Guarnizo, M. (2007):** en su trabajo de Investigación de tesis intitulado “caracterización seminal y ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus 1766), determina que los factores más críticos en la crioconservación de semen de peces que necesitan ser optimizados son la composición de los diluyentes, el tiempo de equilibrio y las



velocidades de congelación y descongelación para perfeccionar y establecer los protocolos específicos para cada especie.

- **Bastardo, H. et al. (2008):** En “Características del semen de trucha arco iris de diferentes edades bajo condiciones de cultivo en Mérida Venezuela”, establece una correlación positiva de  $r= 0,648$  entre las variables espermatocrito y la concentración de esperma y una concentración entre  $4,341 \times 10^9$  en adultos de 4 años y  $9,978 \times 10^9$  espermatozoides/ml. en los de dos años de edad.
- **Martínez, S. (2008):** en su trabajo de investigación de tesis intitulado “Bases para la elaboración de bancos de germoplasma de peces: aplicación a la trucha leonesa” determina que las alteraciones espermáticas provocadas por la criopreservación no constituyen una forma de selección gamética puesto que las descendencias obtenidas a partir de semen fresco y congelado, mostraron el mismo patrón genotípico en ambos casos en las dos poblaciones estudiadas. Por ello la congelación espermática se considera un método apropiado para preservar el potencial genético de los machos de trucha común, ya que permitió mantener la variabilidad en la descendencia y proporcionó tasas de fecundación suficientes para garantizar la recuperación de la población original debido a la gran prolificidad de esta especie.
- **Lichtenstein, G. (2009):** en su trabajo de investigación de tesis intitulado “Desarrollo e implementación de técnicas para la criopreservación de esperma de pejerrey bonaerense (*Odonstesthes bonariensis*), determina que es posible criopreservar esperma de pejerrey bonaerense (*Odonstesthes bonariensis*) utilizando diferentes métodos de congelamiento.
- **Aguilar, M. (2010):** en su trabajo de investigación de tesis intitulado “Inducción a la maduración gonádica y conservación del esperma de la trucha de san pedro mártir (*Oncorhynchus mykiss nelsoni* (evermann)), Indica que los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni* suspendidos en los diferentes agentes crioprotectantes presentaron una movilidad mayor cuando fueron mantenidos en metanol.

- **Toscano R. - Meza, A. (2011)** en “Conservación de semen de *Oncorhynchus mykiss*, mediante técnica de congelación”, informan en sus resultados con una concentración de  $3 \times 10^5$  espermatozoides por  $\text{mm}^3$ , empleando como dilutor Tris-Fructosa-Yema de Huevo, indicando igualmente con una temperatura de congelación a  $-196^\circ\text{C}$  y una temperatura de descongelación de 11 a  $12^\circ\text{C}$ .
  
- **Velezvia, J (2011)**: En la publicación “estudio experimental del proceso de criogenización de semen de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)”, con fines reproductivos en el CIPP - Chucuito, determino una concentración de  $5.3 \times 10^9$  espermatozoides por mililitro, donde informa también que se determinó una motilidad del 86% después de 71 segundos; igualmente indica un 87% de espermatozoides normales con un tamaño de 37 micras.

## **2.3.- REVISION BIBLIOGRAFICA (FUNDAMENTOS TEORICOS)**

### **2.3.1.- BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

Son peces poiquiloterms, lo que quiere decir que la temperatura del agua es la misma que tiene el pez, es oriunda de América del Norte.

Alcanza su madurez sexual (primer desove) alrededor de los dos años; los desove subsiguientes ocurren anualmente y en las temporadas de mayor frialdad de las aguas (Otoño - Invierno).

Para el desove son de hábito psamófilo.

En buenas condiciones tróficas del medio en que vive la hembra produce un promedio de 1000 óvulos por cada medio kilo de peso.

La temperatura óptima de incubación es de 10 °C y su duración de 30 a 31 días.

El dimorfismo sexual más evidente, a nivel de caracteres sexuales secundarios, se muestra en la mandíbula inferior terminada en gancho solo en machos, no así en hembras.

Como carácter sexual terciario, y solo en la estación reproductiva, los machos muestran la coloración nupcial o fanerica consistente en la mayor coloración rosado intensa en los flancos.

Tanto hembras como machos, se comportan como desovantes totales.

En condiciones de manejo intensivo una fecundación satisfactoria requiere de un macho para dos hembras.

Luego de la eclosión de los embriones, después de una incubación de 30 a 31 días a 10 °C, el estado larvario tiene una duración de cuatro semanas, (Cachafeiro, 1995).

### 2.3.2.- Posición Taxonómica

**Reino:** Animal

**Sub Reino:** Metazoa

**Phyllum:** Chordata

**Sub Phyllum:** Vertebrata

**Clase:** Osteichthyes

**Sub Clase:** Actinopterygii

**Orden:** Isospondyli

**Sub Orden:** Salmoneidei

**Familia:** Salomonidae

**Género:** *Oncorhynchus*

**Especie:** *Oncorhynchus mykiss*

**N.V:** “Trucha arco iris”,

**Fuente.** “Manual de Crianza de truchas” Ragash - Perú; 2009.

### 2.3.3.- ETAPAS DEL CICLO VITAL DE LA TRUCHA

**Ova.-** Son los huevos fecundados que luego de 30- 31 días de incubación, a 10 °C eclosionan al estado de larva.

**Larva.-** Estadio caracterizado por la presencia del saco vitelino en la región abdominal y de cuyo contenido nutritivo, vive la larva, este saco vitelino se absorbe en un tiempo promedio de cuatro semanas, entonces el individuo toma la condición de alevino e inicia su alimentación tomándolo desde el exterior

**Alevino.-** Estadio de una duración promedio de seis a ocho meses cuando cada ejemplar alcanza entre ocho a diez cm.

**Juvenil.-** Fase caracterizada entre las tallas de 10 a 20 cm., cuando el pez con esa longitud total de 20 cm. Llega a su primer desove lo que marca el final del periodo juvenil y el inicio del estado de adulto o reproductor.

**Adulto.-** Etapa final del ciclo vital se inicia con el primer desove y dura hasta que el animal perezca en el límite de su longevidad entre los doce a 15 años alcanzando tamaños diversos dependientes en gran medida del nivel trófico del ambiente acuático que habita.

**Cuadro N° 01: CARACTERIZACION SINTETICA DE LOS ESTADIOS DEL CICLO VITAL DE TRUCHA ARCO IRIS.**

<b>ESTADIO</b>	<b>TAMAÑO (cm)</b>	<b>PESO (gr)</b>	<b>DURACION (días)</b>
<b>Huevo</b>	<b>0.3 – 0.5</b>	<b>-</b>	<b>30 – 31</b>
<b>Larva</b>	<b>1-1.2</b>	<b>0,25</b>	<b>28-30</b>
<b>Alevino</b>	<b>2-10</b>	<b>1.2- 10</b>	<b>180-240</b>
<b>Juvenil</b>	<b>10-20</b>	<b>10-200</b>	<b>240-720</b>
<b>Adulto</b>	<b>+ 20</b>	<b>+ 200</b>	<b>Hasta 12 – 15 años</b>

**Elaboración: Fuente los autores, Biología – UNSAAC (2014)**

### 2.3.4.- CONTROL ENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

Como ocurre en todos los vertebrados y obviamente en los peces, el proceso de la reproducción está regulado, básicamente, por la glándula pituitaria o hipófisis, como puede apreciarse en el siguiente gráfico:

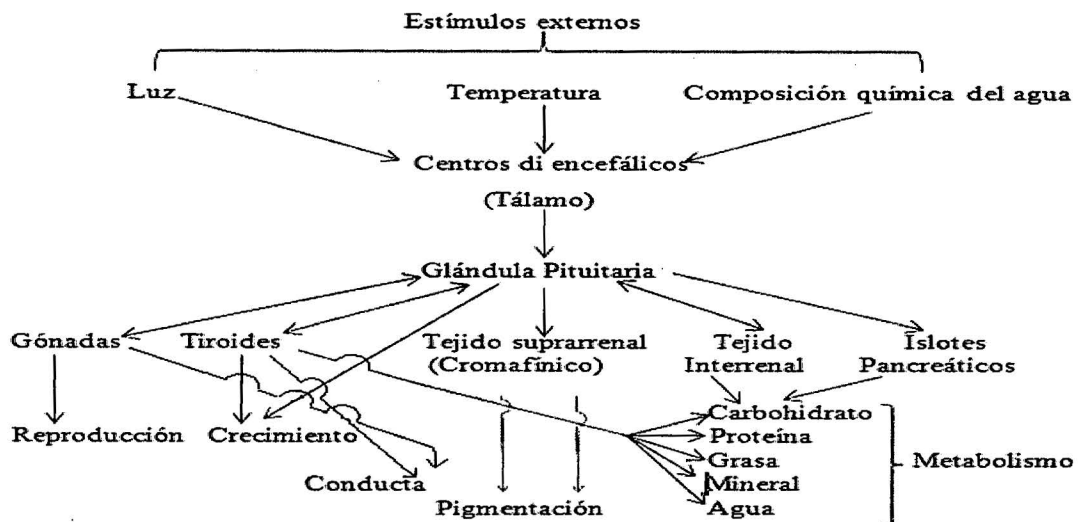


Figura N° 01.- Interacción de algunas glándulas endocrinas de los peces basado en Vivien en Grasse, 1958, tomado de Lagler *et al.* Ictiología.

### 2.3.5.- MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Como característica referida al movimiento de los espermatozoides, tal motilidad se manifiesta, cuando el semen es expulsado al exterior en el momento del desove. Y tal movimiento que inicialmente es bastante lento se activa, cuando ocurre la penetración en el ovulo. La motilidad de espermatozoides se activa por diversos factores físicos, químicos y fisiológicos que dependen de la especie y del medio donde habita. La característica señalada ocurre tanto en condiciones naturales, como en condiciones artificiales de desove y fecundación, (Valdebenito *et al.*, 2009).

Por otra parte, hay que considerar que la motilidad es prácticamente la principal evidencia de que el espermatozoide está vivo; siendo así la motilidad se hará evidente en el tiempo de vida que corresponde al espermatozoide ya fuera del cuerpo del animal. Téngase en cuenta que la supervivencia de este gameto masculino es de apenas 3 a 4 minutos desde el momento que sale al exterior. Es precisamente por esta cortísima duración de vitalidad, que

se prefiere preservar los espermatozoides, siendo una de las prácticas de mayor éxito para tal objetivo, la criopreservación, Entre los factores que desencadenan la motilidad se encuentran los cambios en la presión osmótica (Alavi y Cosson, 2006).

Si eso ocurre con el espermatozoide, igual situación se manifiesta con los óvulos; para ellos la técnica recomendada es su preservación en soluciones isotónicas.

Comparativamente, los tiempos de preservación y el consiguiente mantenimiento de la vitalidad, tanto de óvulos como de espermatozoides, ocurre en estos últimos en tiempo mucho más prolongado y no así en el caso de los óvulos, cuya apertura del micrópilo que lo viabiliza para la fecundación están solamente de 24 horas (caso que corresponde a salmónidos, con la solución de Inaba). Los cambios iónicos que ocurren entre el medio extra e intracelular (Kho et al., 2005; Ohtake, 2003),

La motilidad de los espermatozoides en todo caso, también ocurre en función de la densidad del semen, si tenemos en cuenta que en las diversas especies icticas el semen se muestra en algunos casos muy diluido y en otros muy concentrado o denso e incluso hasta tomar una consistencia cuasi pastosa. Se entiende que en este último caso la motilidad es sumamente débil y solo podrá ser advertido, cuando ese semen ya en el medio acuático se diluye y los espermatozoides, manifiestan una motilidad más evidente, (Cabrita et al., 2011).

Otro factor intrínseco, relacionado con la motilidad de los espermatozoides es la edad de los reproductores machos de los que proviene; en tal sentido, el semen de mejor calidad al igual que los espermatozoides también de buena calidad, en el caso particular de trucha arco iris ocurren en reproductores a partir de la segunda hasta la quinta reproducción, especialmente a partir de la tercera. En consecuencia, los mayores tamaños y los movimientos más veloces y continuos será posibles observarlos en ese rango de edad, (Schiavone et al., 2006).

Cuando de caracterizar el semen se trata, en cuanto a su motilidad, por muy rápido que sea la operación de ordeño, la capacidad de movimiento, observada al microscopio casi ocurre en un 100 por ciento, pudiendo considerarse como optimo si el movimiento se observa hasta en un 80 por ciento. Sirva aclarar que el porcentaje de motilidad dentro del proceso de criopreservación, también ocurre en función de los diluyentes empleados, entre los que son

de uso frecuente el, suero fisiológico y la glucosa a diferentes concentraciones. (Kime et al., 2001).

### **2.3.6.- VIABILIDAD ESPERMÁTICA**

La viabilidad se refiere a la integridad de la membrana espermática, este tipo de pruebas se basan en protocolos de doble tinción con la finalidad de diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (Rurangwa et al., 2004). Entre dichos protocolos cabe mencionar a la técnica dual con eosina y nigrosina, y la técnica con tintes fluorescentes. La primera evalúa la viabilidad en base a la absorción del colorante eosina por la cabeza del espermatozoide, donde los espermatozoides vivos no muestran una captación del colorante, mientras que en los espermatozoides muertos hay una captación parcial o completa (Vuthiphandchai et al., 2009). La segunda se basa en fluorocromos como el SYBR 14 que tiñe los ácidos nucleicos de los espermatozoides vivos y es permeable a la membrana a diferencia del yoduro de propidio que no es capaz de atravesar la membrana de las células vivas, pero es capaz de penetrar y teñir el ADN nuclear de los espermatozoides muertos o degenerados (Cabrita et al., 2005 y Paniagua et al., 2006).



### 2.3.7.- REPRODUCCIÓN

Proceso biológico por el cual las especies se perpetúan y en combinación con los cambios genéticos, aparecen por primera vez características para las nuevas especies.

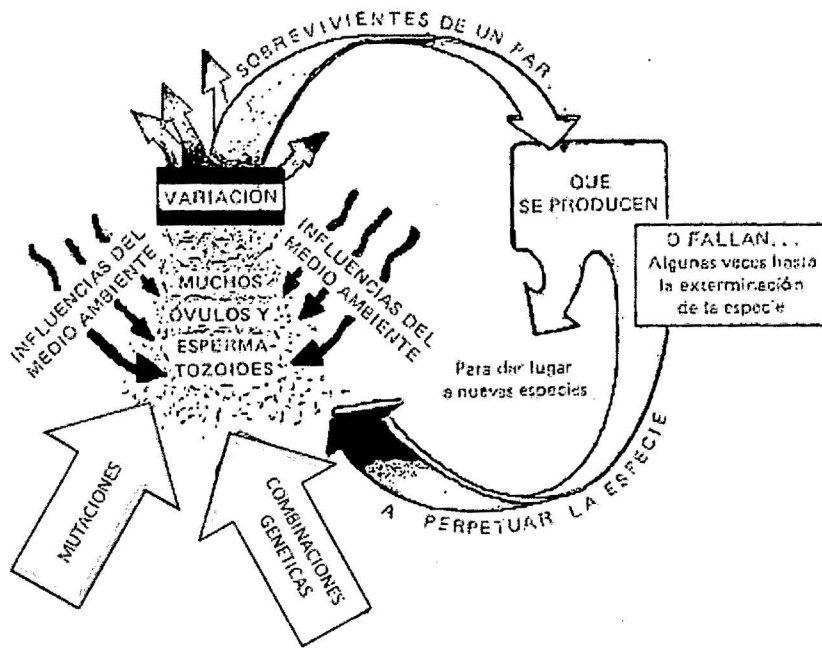


Figura N° 02.- Papel de la reproducción en la supervivencia y evolución de las especies, tomado de Lagler *et al.* Ictiología.

### 2.3.8.- BIOECOLOGIA DE REPRODUCCION EN PECES

En los peces ocurren prácticamente las 3 formas o modalidades de reproducción sexual heterosexuales, hermafrodita y partenogenética. La forma más generalizada corresponde a la heterosexuales; sin embargo las otras modalidades si bien poco frecuentes pero no dejan de manifestarse tanto en peces óseos como en cartilagosos.

Por otra parte se distinguen 2 formas de fecundación. Externa e Interna.

La fecundación externa siendo la más generalizada, requiere de diferentes tipos de sustratos para que ocurra el desove, como paso previo a la propia fecundación. En términos de

desove los hábitos vienen a ser de fitofilos, psamofilos y litofilos, según desoven sobre plantas, sobre sustratos de arena o grava o sobre piedras o rocas, respectivamente.

Ocurrida la fecundación, el suceso inmediatamente siguiente viene a ser la incubación la que puede transcurrir en el medio acuático donde ha ocurrido el desove y la consiguiente fecundación; pero excepcionalmente ocurren también las incubaciones de otro tipo, como son la bucal y la que se sirve de una bolsa incubatriz. La incubación bucal se advierte con frecuencia en diversas especies como la del género tilapia, cuyas hembras mantienen los huevos o cigotos en la cavidad bucal hasta que ocurra la eclosión, (Cachafeiro, 1995).

La presencia de la bolsa incubatriz como ocurre en el caballito de mar (*Hippocampus sp*), consiste en una estructura localizada en la región ventral de la hembra y que aparece como una especie de bolsa hasta donde son llevados por algunos de los reproductores, los óvulos inmediatamente después de su fecundación, (Lagler, 1999).

En términos de madurez sexual, las especies de aguas tropicales se muestran más precoces que los de aguas frías, después del primer desove las siguientes reproducciones se manifiestan con frecuencias anuales para los de aguas frías; después del primer desove las siguientes reproducciones se manifiestan con frecuencias anuales para los de aguas frías. A su vez las especies de aguas tropicales, varias de ellas, pueden reproducirse más de una vez al año, (Pillay, 2004).

En todo caso, trátase de peces de aguas frías o de aguas tropicales, la mejor calidad de gametos ocurre solamente a determinadas edades, así para el caso puntual de trucha arco iris la mejor calidad de óvulos y espermatozoides se dará entre la segunda y quinta reproducción, vale decir cuando los reproductores tengan entre 3 y 6 años, (Lagler, 1999).

La reproducción hermafroditica es poco frecuente y siendo así el individuo hermafrodita, dotado interiormente de ambas gónadas (testículos y ovarios), puede hacer gametogénesis simultáneamente o puede hacerlo sucesivamente; si primero madura y desova como hembra se la identifica como progenésico y si lo hace primero como macho se trata de un proandrico, (Pillay, 2004).

La reproducción partenogénica a la que se le atribuye la condición de reproducción sexual, se le considera así porque en esta reproducción es evidente la presencia de por lo

menos gametos de un solo sexo (hembras), todos ellas en condición haploide y generar descendencias igualmente haploides, toda vez que el sexo opuesto (machos), no exista, (Cachafeiro, 1995).

### **2.3.9.- CRECIMIENTO EN LONGITUD Y PESO**

En términos generales se entiende por crecimiento al incremento en tamaño. Sin embargo, para entender mejor el crecimiento se debe admitir que todo organismo, desde sus células, es una estructura tridimensional, largo, ancho, espesor y por consiguiente el crecimiento debería entenderse como el incremento en esas 3 dimensiones, (Pillay, 2004).

A su vez el peso es una expresión que indica o valora la masa corporal a través de alguna unidad de medida. En todo caso talla y peso son variables que se toman en cuenta para evaluar, entre otros, el desarrollo de los organismos, (Lagler, 1999).

En la evaluación del desarrollo de los peces, al igual que en otros organismos, usualmente admite la relación causa – efecto, admitiendo a la talla como la variable independiente y al peso como la variable dependiente. En términos estrictamente pesqueros los valores correspondientes a talla y peso permiten también determinar el factor de condición (K), como expresión del grado de bienestar de cada pez, (Cachafeiro, 1995).

Por otra parte talla y peso son resultantes del proceso de metabolismo y los valores que alcanzan trasuntan de todas maneras la calidad de los nutrientes que consumen.

Finalmente si la talla y peso dependen de la alimentación, este a su vez está supeditado a la influencia de ciertos factores externos, particularmente la temperatura con la que el nivel de apetito guarda relación directa, (Billard, 1990).

Con relación al factor temperatura, su incidencia sobre los peces en crianza se manifiesta en diversos aspectos como son: niveles de apetito, retraso o aceleración del proceso de maduración sexual, retraso o aceleración del proceso de crecimiento, aparición y propagación de enfermedades, entre otros. (Billard, 1990).

El proceso natural de emisión de los productos sexuales al exterior, recibe el nombre de ovoposición en la hembra y espermiación en el macho, designándose comúnmente a este proceso **freza**, puesta o desove, (Cachafeiro, 1995).

La hembra madura ejerce una gran atracción sexual sobre el sexo opuesto, lo mismo que los machos maduros la ejercen sobre las hembras. Son muy recientes los estudios que relacionan este comportamiento de atracción sexual, con la existencia de determinadas sustancias químicas, elaboradas por el ovario y testículos maduros, denominadas feromonas o señales químicas de acercamiento sexual. Estas feromonas tienen, por tanto, un papel muy importante, al orientar a los cogeneres y asegurar la sincronización física y fisiológica de los dos sexos en la reproducción, (Honda, 1980; Lley et al., 1983).

En los machos, la producción de espermatozoides es continua durante aproximadamente dos meses, pudiendo realizar extracciones cada tres o cuatro días, haciendo la salvedad de que la cantidad de semen y la concentración de espermatozoides es menor a medida que avanza el tiempo. Los machos de trucha arco iris son más precoces que las hembras y pueden adquirir la madurez sexual a los 15-18 meses, mientras que la hembra necesita un periodo mínimo de dos años, (Lagler, 1999).

El proceso de maduración se acompaña en los salmónidos de notables cambios morfológicos y de aspecto de tal forma, que en estas condiciones son fácilmente distinguibles los machos de las hembras. La papila genital se encuentra ingurgitada y prominente. Los machos sufren un proceso de prolongación del maxilar inferior, así como una cierta curvatura dorsal del cuerpo adquiriendo la piel un color oscuro brillante muy típico. Las hembras presentan un vientre prominente y ambos sexos, especialmente en la Trucha Arco Iris, muestran colores de piel muy llamativos a lo largo de los flancos, hecho del que toma su nombre, (Cachafeiro, 1995).

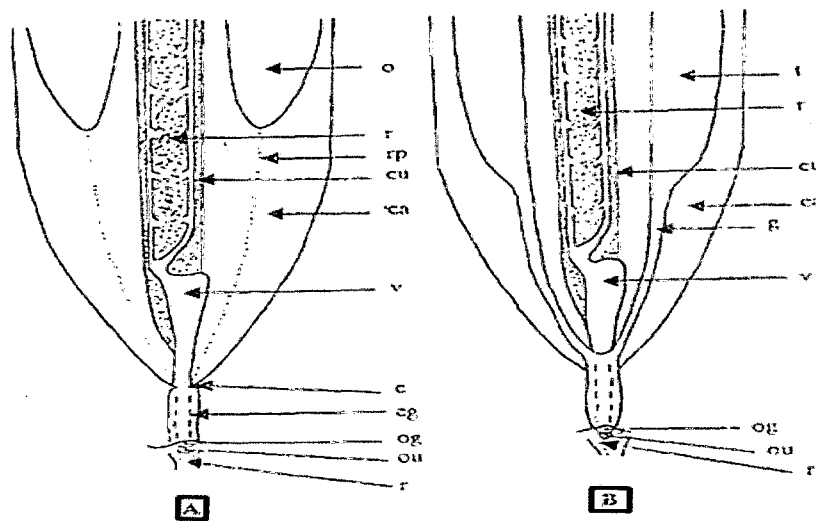
Este fenómeno de diferenciación recibe el nombre de **dimorfismo sexual** y son tales los cambios fisiológicos que se originan en el pez, que su vitalidad se resiente considerablemente. Son muy frecuentes, por no decir acompañantes constantes de estos peces en tal situación, las lesiones en la piel originadas por hongos y las lesiones físicas que se hacen los machos en su rivalidad por las hembras, (Pillay, 2004).

Los cambios en la piel son muy significativos en la época de la freza. El epitelio aumenta hasta tres veces su grosor, con gran proliferación de células mucosas responsables de la fluidez que presentan los reproductores a la manipulación. Se trata de una defensa natural del pez para protegerse de los daños externos acompañada de un aumento del número de linfocitos, (Cachafeiro, 1995).

### 2.3.10.- ANATOMIA, Y FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE TRUCHA ARCO IRIS (*Onchorynchus mykiss*)

#### 2.3.10.1.- ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR

La función reproductora en los peces corresponde a los componentes fundamentales de este aparato, es decir, a las glándulas sexuales o gónadas, representados en la hembra por los ovarios y por los testículos en el macho. Los ovarios y testículos son órganos esenciales a diferencia del resto de los componentes que constituyen el llamado tracto genital, como son los conductos de excreción de los productos sexuales (que reciben el nombre de gonoductos en el macho), así como los orificios de comunicación con el exterior, a través de los cuales se exteriorizan los productos sexuales elaborados.



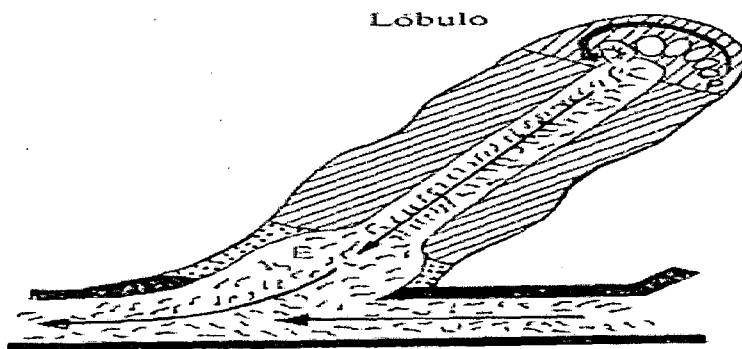
**Figura. Nº 03.- APARATO UROGENITAL DE LA TRUCHA A: Hembra, B: Macho;** ca: cavidad abdominal, v: vejiga, c: constricción genital, g: gonoducto, cg: cavidad genital formada por el estrechamiento posterior de las paredes abdominales, og: orificio genital, r: riñones, o: ovario, ep: envolturas peritoneales, r: recesos, t: testículos, cu: conducto urinario, ou: orificio urinario (Original Henderson 1967).

### 2.3.11.- LOS TESTÍCULOS

Desde el punto de vista anatómico e histológico, los testículos tienen una estructura que pudiéramos llamar básica, la cual sufre una serie de modificaciones dependientes de la periodicidad cíclica, en este sentido el testículo de los salmónidos tratando de correlacionar la estructura histológica con los distintos periodos del ciclo. Establece así cuatro estadios histológicos distintos: un primero que corresponde a testículos inmaduros que pudiéramos llamar *básico*, que continúa con un segundo de testículos en fase de maduración o pre maduración, un tercero con testículos maduros y un último con testículos en fase de regresión, (G. Weisel 1943).

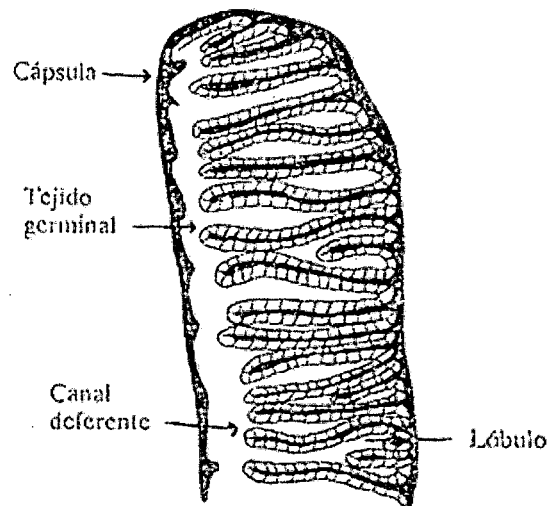
Los testículos se encuentran recubiertos o rodeados por una membrana denominada albugínea, constituida histológicamente por células fibrosas. Durante el ciclo sexual sufre modificaciones, siendo más delgada durante el proceso de maduración y más gruesa en fase de reposo.

Esta envoltura externa fibrosa emite tabiques laminares hacia el interior del testículo, dividiendo el parénquima en numerosos compartimentos o cavidades cuneiformes, que reciben el nombre de lobulillos seminales. La estructura parénquimal es pues, en los salmónidos, **lobular**, a diferencia de otros Teleósteos, que es tubular (Billard *et al.*, 1982,1990).



**Figura N° 04.-** La organización histológica y funcional del testículo es lobular. A medida que las células germinales se van diferenciando, se alejan de los lugares basales de procedencia y se aproximan a los conductos deferentes del testículo. (Original Billard, 1990).

Cada compartimento lobular se encuentra ocupado por estructuras que se denominan túbulos seminíferos, los cuales, observados al microscopio tienen forma de pirámide de base externa o superficial, rodeados de una membrana basal. En el revestimiento celular de estos túbulos seminíferos existen dos tipos de células, unas germinales precursoras de los espermatozoides, denominadas espermatogonias, y otras menos abundantes no germinativas, que se denominan **Células de Sertoli**, (Billard, 1990).



**Figura. Nº 05.-** La capsula o envoltura externa del testículo emite tabiques laminares que dividen al parénquima en lóbulos, cuyas paredes se encuentran recubiertas de células germinales (Original Billard. 1990).

Las espermatogonias son células grandes, con núcleo voluminoso que se multiplican por mitosis y se agrupan formando colecciones císticas. Estas colecciones o agrupaciones son el resultado de repetidas divisiones mitóticas experimentadas por una espermatogonia primitiva. Esta descripción histológica corresponde a la fase de reposo o inmadurez testicular, transformándose las espermatogonias, en el proceso de maduración, en otras células más evolucionadas, espermatoцитos, abandonada la posición inicial basal y aproximándose al lumen del túbulo, en estadios más avanzados, (Cachafeiro, 1995).

Estas transformaciones de las células germinales del parénquima se acompañan de notables modificaciones en el tejido intersticial, en donde la vascularización se va haciendo cada vez

más manifiesta. Al mismo tiempo se hacen bien visibles al microscopio las llamadas células de Leydig, de aspecto glandular, que ocupan los espacios interlobulares y cuya misión es la de segregar hormonas testiculares. Las células de Sertoli son células somáticas que forman parte del parénquima y se encuentran en estrecho contacto con los elementos germinales y se cree que concretamente en los salmónidos, tendrían una función de biosíntesis de hormonas testiculares, estimulación de la mitosis de las células germinales, así como funciones de fagocitosis de residuos citoplasmicos, (Cachafeiro, 1995).

En la fase de testículo maduro, las células germinales son ya células sexuales totalmente transformadas, es decir son espermatozoides, los cuales han abandonado los lugares de formación y se encuentran situadas en los conductos deferentes excretores. Los túbulos seminales se extienden desde la superficie, por debajo de la capsula, hasta la región central opuesta, en donde se encuentra el canal deferente, que se continua con los gonóductos, (Pillay, 2004).

El tamaño y peso del testículo es máximo en la maduración, llegando a alcanzar hasta el 20% del peso corporal, con aspecto granuloso y muy vascularizado. La última fase es de regresión o involución del testículo hacia la situación de reposo funcional, (Cachafeiro, 1995).

### **2.3.12.- LOS OVARIOS**

Los ovarios, como los testículos, sufren durante el largo proceso de elaboración de las células sexuales, modificaciones morfológicas e histológicas importantes, que afectan tanto al parénquima o tejido noble, como al tejido intersticial, (Lagler, 1999).

El parénquima ocupa el espacio más superficial o externo de la glándula y está representado por epitelio germinal derivado a una extensión del peritoneo, el cual suele variar de grosor con la actividad sexual. Este grosor es máximo durante la época de puesta y mínimo durante el reposo gonadal. Presenta una serie de invaginaciones hacia el interior de la glándula, llamadas plegamientos ováricos. De este epitelio derivan o de él se forman las llamadas ovogonias u oogonias, células madres cuyo desarrollo progresivo da lugar a las células sexuales maduras u ovocitos, (Cachafeiro, 1995).



El tejido intersticial ocupa la región más profunda de la glándula y está formado por una capa de tejido conjuntivo muy denso, tejido muscular de fibra lisa y vasos sanguíneos.

En la fase de reposo, al microscopio es manifiesta la presencia de células madres u ovogonias, de núcleo grande y escaso citoplasma, aisladas o formando agrupaciones quísticas.

En fases muy tempranas de premaduración se observa en el ovario los llamados folículos ováricos, constituidos por una célula, el ovocito, procedente de la división de las ovogonias, rodeado de una capa de células foliculares. En el proceso de crecimiento progresivo, el ovocito se rodea de una capa de tejido fibrilar, que lo envuelve denominada zona pelúcida. Las células foliculares se multiplican rodeando al ovocito a manera de capa unicelular, denominada zona granulosa, la cual, en proceso más avanzado, segrega material fluido. Paralelamente a este desarrollo folicular se van formando alrededor del folículo unas membranas externas a expensas del tejido intersticial, constituidas por tejido conjuntivo y vascular, que se denominan tecas. La misión de estas estructuras externas es la de nutrir y mantener el folículo, estando el componente celular representado por las denominadas células de Leydig, secretoras de hormonas ováricas, (Cachafeiro, 1995).

En situación evolutiva próxima a la maduración encontramos en los ovarios miles de folículos. Estos se disponen de la siguiente forma: periféricamente el folículo se encuentra rodeado de las tecas, en su interior encontramos un gran acumulo de material fluido (líquido folicular) y en un polo, precisamente el que se encuentra más próximo a la superficie del ovario, la célula precursora del ovulo, (Billard, 1990).

El ovocito primario inicial ha sufrido una serie de transformaciones intrínsecas referidas a divisiones de su núcleo, proceso denominado meiosis. Además su citoplasma se ha enriquecido con abundante material nutritivo, el vitelo, cuyo proceso de formación recibe el nombre de vitelogénesis y es el material a expensas del cual se va nutrir el futuro embrión, (Lagler, 1999).

La variación histológica siguiente, en el proceso de evolución, es el que corresponde a la maduración propiamente dicha. El núcleo o vesícula germinativa del ovocito, que hasta entonces ha ocupado el espacio central, emigra o desplaza desde el centro a un polo,

precisamente al polo animal, próximo al micrópilo, al mismo tiempo que el vitelo acumulado en su interior se clarifica o se hace transparente. Por contracciones de las fibras musculares lisas existentes en las envolturas externas del folículo, que hemos llamado tecas, el folículo se rompe y el ovocito cae libremente a la cavidad abdominal acompañado del líquido folicular, (Cachafeiro, 1995).

Después de este proceso, denominado ovulación, el ovario vacío, por así decirlo, entra en un proceso de atresia o regeneración, organizándose los espacios libres, ocupados anteriormente por los folículos, en estructuras histológicas denominadas cuerpos atrésicos (Szollosi et al., 1978).

Es necesario comentar que en la trucha, a diferencia del salmón del Pacífico, se producen anualmente dos ovulaciones, una de carácter masivo, seguida, en corto espacio de tiempo, por otra de mucho menor cuantía. Es por ello por lo que la examinar un ovario en fase de maduración se encuentran ovocitos en estadios distintos de maduración, (Cachafeiro, 1995).

### **2.3.13.- FORMACIÓN DE LOS GAMETOS O GAMETOGÉNESIS**

Se designa con el nombre de gametogénesis al proceso biológico mediante el cual las células sexuales adquieren, a partir de las células germinales primitivas, la madurez o capacidad fecundante, (Pillay, 2004).

Gametogénesis es un término genérico, que se utiliza cuando se trata designar al proceso de formación de los gametos, de una forma global o general. Su estudio requiere el establecer otros términos para designar las distintas fases o estadios de que consta, así como la propia diferencia que se establece entre sexos. Tiene lugar en el testículo en el macho y en el ovario en la hembra, con la participación y colaboración fisiológica de todo el organismo, (Billard, 1990).

Todas las células que forman parte de un organismo superior tienen un número de cromosomas, que llamamos diploide o "2n", constituida por dos dotaciones cromosómicas, pertenecientes cada una de ellas al progenitor paterno y materno. De la multiplicación de estas células corporales o somáticas depende el crecimiento del ser vivo, así como la

recuperación y reposición corporal. Esta multiplicación es continua y constante en cada organismo, a excepción de las células nerviosas y se realiza de tal forma que una célula madre da origen a dos células hijas idénticas a ella, mediante un proceso de división, que recibe el nombre de mitosis. Este proceso de división celular se realiza en cuatro fases sucesivas, que se denominan profase, metafase, anafase y telofase, (Cachafeiro, 1995).

Durante el proceso de formación de las células sexuales o gametos hay un tipo de división celular, que únicamente se realiza en las células sexuales del organismo, denominado meiosis, que reduce el número de cromosomas de los futuros gametos a la mitad del existente en las células somáticas. Se comprende fácilmente que si estas células maduras, es decir, el ovulo y el espermatozoide, tuvieran en su núcleo el mismo número de cromosomas que el resto de las células del organismo ( $2n$  o número diploide), al fusionarse para formar el huevo, el individuo resultante de él tendría un número de cromosomas doble del que es característico de la especie. Por ello, y a fin de mantener la constancia del número de cromosomas en las células del nuevo individuo, es necesario que el número de cromosomas de cada gameto sea reducido a la mitad, durante el proceso de su formación (" $n$ " o número haploide), (Valdebenito, 2008).

Estas células sexuales se diferencian pues, del resto de las células somáticas en que su reproducción es distinta y las células hijas son diferentes a la célula madre de la que inicialmente proceden. Su número de cromosomas es la mitad de la célula madre, lo cual se produce por un proceso especial de división celular que recibe el nombre de meiosis.

La meiosis es, pues, un proceso biológico reductor, que solamente se produce en las células precursoras de los gametos y se realiza por dos consecutivas mitosis, siendo la primera de ellas especialmente reductora. No obstante, es necesario hacer constar que la meiosis no es meramente una división reductora, pues durante este proceso, y esto es muy importante, tiene lugar una mezcla o intercambio del material genético entre los dos cromosomas que forman la pareja homóloga, de tal forma que los cromosomas resultantes son portadores de material genético procedente del padre y de la madre. Por ello, este proceso es el responsable del mantenimiento de la variabilidad genética que asegura la unicidad de cada individuo y probablemente, de la existencia continuada de la especie, (Cachafeiro, 1995).

### 2.3.14.- ESPERMATOGENESIS Y ESPERMIOGENESIS

Son procesos biológicos mediante las cuales las células germinales del testículo se transforman en células sexuales especializadas, con capacidad fecundante, es decir, en espermatozoides.

En el macho se denomina espermatogénesis al proceso que se inicia a partir de células germinales primitivas hasta alcanzar estas células, el estadio en el que su número de cromosomas es “n” o número haploide, es decir, ha finalizado la meiosis o mecanismo reductor del número de cromosomas. El proceso siguiente es el de perfeccionamiento o adquisición, por parte de estas células haploides, de una serie de características que permiten entonces, el ser denominado como espermatozoides, en un proceso de perfeccionamiento que conocemos con el nombre de espermiogénesis, (Cachafeiro, 1995).

Las células germinales del testículo reciben el nombre de espermatogonias y se encuentran en las proximidades basales de los lóbulos testiculares durante el periodo de reposo latencia. Su origen es el epitelio germinal que envuelve a los lóbulos testiculares, procedente, a su vez, de las envolturas peritoneales del testículo, aunque algunos investigadores afirman que las células germinales proceden del tejido intersticial.

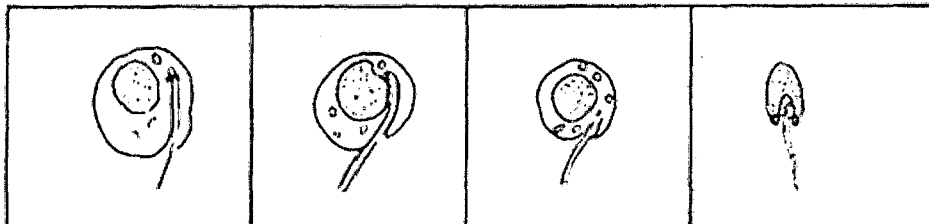
Los testículos entran en actividad precisamente cuando estas células primitivas comienzan a multiplicarse, lo cual realizan por división mitótica, de tal forma que de una espermatogonia primaria se originan las denominadas espermatogonias secundarias, sin que se conozca hoy en día, en los salmónidos, el número exacto de divisiones. Este proceso se inicia en Julio- Agosto y al observar al microscopio tejido testicular, se ve que los lobulillos testiculares se encuentran repletos de este tipo de células, provistas de un núcleo grande y que se disponen en agrupaciones, formando cistes, (Valdebenito, 2008).

Las espermatogonias tienen un número “2n” de cromosomas, es decir, 60 cromosomas en la Trucha Arco Iris, y en el proceso de evolución sufren transformaciones morfológicas, reduciendo su tamaño, denominándose espermatocitos de primer orden. Estas células sufren la primera fase de la meiosis y se transforman en espermatocitos de segundo orden finalizando la meiosis, siendo el resultado cuatro células hijas con un número “n” de

cromosomas cada una de ellas. Estas células reciben el nombre de espermatidas, finalizando aquí el proceso de la espermatogénesis propiamente dicha, que corresponde, a Octubre-Noviembre, (Billard, 1990).

Las espermatidas sufren un proceso lento de transformación, observándose al microscopio la pérdida de citoplasma, adquisición de un flagelo, condensación de la cromatina etc., proceso denominado espermiogénesis o finalización morfológica y funcional del espermatozoide, (Billard, *et al*, 1971).

Estas células en vías de finalización se encuentran situadas en la luz de los lobulillos testiculares, alejadas de las porciones basales, dispuestas a ocupar los conductos deferentes de excreción cuando estén totalmente finalizadas, lo que casi siempre ocurre en Noviembre – Diciembre.



**Figura N° 06.-** Espermiogénesis o proceso de finalización a través del cual el espermatozoide adquiere las características morfológicas y funcionales típicas (Original Billard, 1990, con modificaciones),

### **2.3.15.- PRODUCTOS DE EXCRECION SEXUAL**

Los productos sexuales elaborados por las gónadas y excretados al exterior están representados en la hembra por los óvulos, acompañadas de un líquido sonrosado, llamado líquido folicular. Ambos se encuentran contenidos en el interior del folículo ovárico, los cuales se liberan al romperse y caen libremente a la cavidad abdominal. En el macho están representados por el semen o esperma, líquido viscoso, de color blanquecino, que antes de ser emitido se encuentra ocupando los conductos deferentes del testículo, (Cachafeiro, 1995).

La emisión al exterior, de forma natural, recibe el nombre de oviposición en la hembra y espermiación en el macho, fenómeno que se realiza conjuntamente en la denominada puesta o freza.

En piscicultura, la obtención de estos productos, óvulos y semen, son obtenidos de forma manual mediante compresión abdominal, cuando ambos, macho y hembra se encuentran maduros, (Pillay, 2004).

### **2.3.16.- EL SEMEN O ESPERMA**

En el semen es necesario distinguir dos componentes fundamentales. Uno es el elemento celular, que son los espermatozoides, y el otro es el líquido mucoso, que sirve de vehículo a los anteriores y que es segregado por los testículos y por los conductos espermáticos, recibiendo el nombre de plasma seminal. La relación existente entre el número de células y volumen de plasma es el espermatocrito o valor de la concentración de espermatozoides por unidad de volumen, (Billard, 1990).

Desde que es habitual en las instalaciones industriales la práctica de la inseminación artificial, son muchos los trabajos científicos dirigidos a conocer y valorar las características del semen extraído periódicamente a lo largo del periodo de reproducción (Geiger, 1995; Bratanov y Dikov, 1961; Hamor, 1966; Cruea, 1969; Friborough y Soloff, 1976).

Los machos producen semen aproximadamente hasta dos meses después de iniciado el debut de maduración gonadal, lo que permite el realizar, durante este tiempo, varias extracciones para la práctica de la inseminación. Sin embargo, el factor más importante no es el volumen o cantidad de esperma conseguidos en la extracción, sino su riqueza o contenido en células ( $\text{ml}^{-1} \times 10^9$ ), es decir, la concentración o número de espermatozoides por mililitro cubico de semen (Cuadro N° 2).

Autores	Valores de concentración de espermatozoides por ml.
Schlenk y Kahmann (1938)	10 X 10 <sup>9</sup>
Bratanov Y Dikov (1961)	9 a 16 X 10 <sup>9</sup>
Clemens y Grant (1965)	20 X 10 <sup>9</sup>
Hamor (1966)	15 X 10 <sup>9</sup>
Billard et al. (1971)	15 X 10 <sup>9</sup>

**Cuadro N° 02:** Valores medios de concentración de espermatozoides por ml. En el semen de *Onchorhynchus mykiss o (Salmo gairdneri)*, según varios autores. (Original Scott et al., 1980). (10<sup>9</sup>= diez mil millones de espermatozoides).

La escuela francesa de reproducción de peces ha estudiado en la trucha las variaciones de la concentración de espermatozoides en el semen durante la reproducción y llega la conclusión que, en condiciones ambientales optimas, la cuantía de la recolección de espermatozoides está en función de varios factores.

Existe una indudable variación que depende fundamentalmente del momento y frecuencia con que se realizan las extracciones, durante el periodo de la maduración (Billard *et al.*, 1971).

La cantidad total de espermatozoides obtenidos de un lote de machos durante el periodo de freza es mayor cuanto mayor sea el número de extracciones realizadas y cuanto más próximas estén estas al inicio de la freza. Ello es muy interesante conocer, al objeto de realizar un manejo racional de los machos reproductores. En sus experiencias disponen estos investigadores de cuatro lotes de machos a los que se les practican extracciones cada 2, 7-15 y 30 días durante dos meses, desde el inicio de la freza, obteniendo los mejores resultados en el lote designado con el número 1 y 2 (Cuadro N° 3), (Cachafeiro, 1995).

Lote	Frecuencia de extracciones	Número total de extracciones	Cuantía media de espermatozoides (en 10 <sup>9</sup> )	
			Recolectados	Restantes en el tracto genital
1	Cada 2 días	20	249,54 ±108,47	879,12 ±320,95
2	Cada 7 días	6	265,72 ±143,32	983,76 ±587,40
3	Cada 15 días	3	119,32 ± 57,60	630,10 ±358,80
4	Cada 30 días	2	82,87 ±43,10	1012,97 ± 264,00

**Cuadro N° 03:** Espermatozoides recolectados durante el periodo de la reproducción y espermatozoides restantes en los testículos después del periodo de la reproducción, en función de la frecuencia de extracciones (Billard *et al.*, 1971).

La concentración de espermatozoides en el semen eyaculado es máxima en las primeras extracciones, disminuyendo bruscamente y hasta tal punto que las últimas extracciones están constituidas únicamente por líquido incoloro, desprovisto de espermatozoides. La concentración de espermatozoides decrece considerablemente en el lote número uno a partir de la séptima extracción (15 días); en el lote número 2 a partir de la cuarta extracción (31 días), en el número 3 en la segunda extracción (15 días) y el número 4 no se producen más espermatozoides que en la primera extracción realizada al principio de la maduración (Billard *et al.*, 1971).

Son numerosas las discusiones científicas sobre aquellos factores que en piscicultura industrial puedan modificar la producción natural de semen en los machos.

Existe una indudable variación entre unos u otros individuos, jugando la edad un papel importante. Los machos viejos producen proporcionalmente menos esperma.



La eyaculación provocada o extracción manual del semen produce rendimientos más bajos que los naturales, lo cual podría estar en relación con concentraciones bajas de gonadotrofinas hipofisarias en el momento impuesto de la extracción.

La utilización de fotoperiodos cortos o largos, la inyección de extractos hipofisarios, etc. Serían factores que actúan sobre la producción cuantitativa y cualitativa del semen.

Las temperaturas del agua superiores a 15°C, aunque estimulen y aceleren la primera fase de la gametogénesis, dan origen a una producción muy disminuida de la cantidad de espermatozoides, (Yamazaki y Donaldson, 1968; Billard *et al.*, 1970).

La producción espermatogénica de la trucha adulta es muy alta, del orden de  $58 \times 10^9$  espermatozoides por gramo de testículo y año. Sin embargo, en el mejor de los casos, es decir, en extracciones realizadas cada dos días, en el inicio de la freza, solamente se consigue recolectar el 22% de los espermatozoides producidos en el testículo. El resto de la producción, en condiciones normales, degenera durante los dos o tres meses que siguen a la reproducción en el interior del propio testículo y son reabsorbidos por la gran actividad fagocitaria desarrollada por las llamadas células de Sertoli, (Billard *et al.*, 1971).

La concentración de espermatozoides en las muestras tomadas a nivel de los conductos deferentes va disminuyendo a medida que estas se realizan en las porciones más distales de estos conductos, próximos al poro genital.

Ello es debido a fenómenos de hidratación, que se originan en el testículo en el momento de la espermiación y a una dilución de los espermatozoides en los canales deferentes, por la actividad secretora del epitelio (Clemens y Sneed, 1962; Billard *et al.*, 1971)

### **2.3.17.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SEMEN**

La temperatura es otro factor importante que incide en el metabolismo de los espermatozoides de peces modelando los patrones de motilidad después de su activación en la gran mayoría de las especies. En general, bajas temperaturas prolongan la motilidad a través del tiempo y reducen la velocidad de desplazamiento (Billard y Cosson 1986).

El plasma seminal ha sido así mismo muy estudiado, no sólo en lo que respecta a sus componentes químicos, sino desde un punto de vista fisiológico, especialmente en lo que se refiere a su metabolismo, al objeto de conocer posibilidades de conservación para una utilización posterior.

El plasma seminal tiene un gran contenido en proteínas, así como en iones, especialmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Ca}^{++}$ . Es conocido que los niveles de Sodio en sangre en la trucha se elevan gradualmente durante el periodo de la puesta, mientras que el Potasio permanece invariable (Sánchez Rodríguez, *et al.*, 1978). La concentración de este último en el plasma seminal es muy alto, jugando esta alta concentración un papel importante en la inmovilización del espermatozoide en los conductos deferentes, antes de salir al exterior. En este sentido actúa también, de forma importante el pH, que es de 7,4, así como ciertas sustancias cuya única función sería asegurar la inmovilización o inactivación dinámica del espermatozoide mientras se encuentre en los canales de excreción (Runstron *et al.*, 1944; Scott y Baynes, 1980).

Sodio ( $\text{Na}^+$ )	Potasio ( $\text{K}^+$ )	Magnesio ( $\text{Mg}^{++}$ )	Calcio ( $\text{Ca}^{++}$ )	Cloro (Cl)	pH	Autor
239	99	2,7	5,6	479	-	Holtz <i>et al.</i> , 1979
245	101	2,0	10,5	-	-	Holtz <i>et al.</i> , 1977
-	-	-	-	-	8,3	Nomura, 1964
306	78			462	7,3	Schlenk, 1938
-	-	-	-	611	-	Cruea, 1969
-	-	-	-	-	7,6	Bratanov, 1961

**Cuadro N° 04:** Composición Química del plasma seminal de *Salmo gairdneri* (mg 100 ml<sup>-1</sup>) según varios Autores. (Original de Scott *et al.*, 1980).

### 2.3.18.- COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DEL SEMEN DE PECES

#### ✓ DIÓXIDO DE CARBONO

Los niveles de CO<sub>2</sub> en los medios de almacenamiento y activación de los espermatozoides de peces se relacionan en forma inversa con los valores del pH y de la osmolaridad producto de la formación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Cosson *et al.* 1999). La mantención de espermatozoides de salmónidos *in vitro* a concentraciones altas de CO<sub>2</sub> inhibe la motilidad presumiblemente vía un efecto del CO<sub>2</sub> en el pH (Bencic *et al.* 2000). Por ejemplo, espermatozoides de trucha arco iris almacenados a presiones de CO<sub>2</sub> de 5,3 kPa no se activan al ser diluidos en agua desionizada. Se activan muy poco en agua o fluido ovárico, pero demuestran una alta actividad flagelar al ser diluidos en un activador con pH 8,5 (Woolsey *et al* 2006).

#### ✓ OXÍGENO

Como regla general; en peces la producción de energía realizada en las mitocondrias de la pieza media del espermatozoide requiere de un flujo permanente de oxígeno (Cosson *et al* 1999), por lo tanto, la disponibilidad de este comburente es esencial para la capacidad de movimiento del espermatozoide, estimándose requerimientos de entre 20-40 µl de oxígeno por 10<sup>6</sup> células por hora para especies como la trucha arcoiris, salmón del Atlántico y bacalao, los que son similares a los descritos para erizo e incluso humanos. Los requerimientos son máximos al inicio de la activación y disminuyen paulatinamente en la medida en que se reduce la actividad flagelar (Cosson *et al* 1999).

Una relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de al menos 16:1 permite una adecuada actividad flagelar en especies salmonídeas (Alavi y Cosson 2006). En la actualidad, es conocido que la presencia de Ca<sup>++</sup> y otros segundos mensajeros como AMPc son importantes para la iniciación de la motilidad espermática en salmónidos al contrarrestar el efecto inhibitor del K<sup>+</sup> (Billard y Cosson 1989, 1995, Darszon *et al* 1999, Cosson *et al* 1999).

### **2.3.19.- CÉLULAS SEXUALES O GAMETOS**

Tanto el espermatozoide como el óvulo tienen funciones dinámicas distintas, pero ambos son portadores del material cromosómico correspondiente a cada uno de ellos que en biología recibe el nombre de genoma, representado en el núcleo o pronúcleo celular. El ovulo es además, el receptáculo donde va a tener lugar la fusión de ambos núcleos y en donde, además, se va a desarrollar el embrión, (Cachafeiro, 1995).

### **2.3.20.- LOS ESPERMATOZOIDES**

Tienen por misión buscar y encontrar el orificio de entrada al óvulo, es decir, el micrópilo. Para esta función dinámica se encuentra dotado de cierta movilidad y para suplir eventualidades, actúan sobre los óvulos en cantidades infinitamente superiores; después, en su intento de fecundación, son muchos los que fracasan, asegurándose la fecundación con el sacrificio de la mayor parte de ellos. Su tamaño microscópico permite el que puedan ser producidos en cantidades ingentes, facilitando su tamaño la actividad dinámica.

La morfología estructural de los espermatozoides de la trucha Arco Iris ha sido estudiada, desde un punto de vista microscópico, por numerosos autores, tales como Scheuring, Cruca y Billard (Scheuring, 1928; Cruca, 1969; Billard 1978), y también desde un punto de vista de microscopia electrónica, por Fribourgh y Soloff (Fribourgh y Soloff 1976).

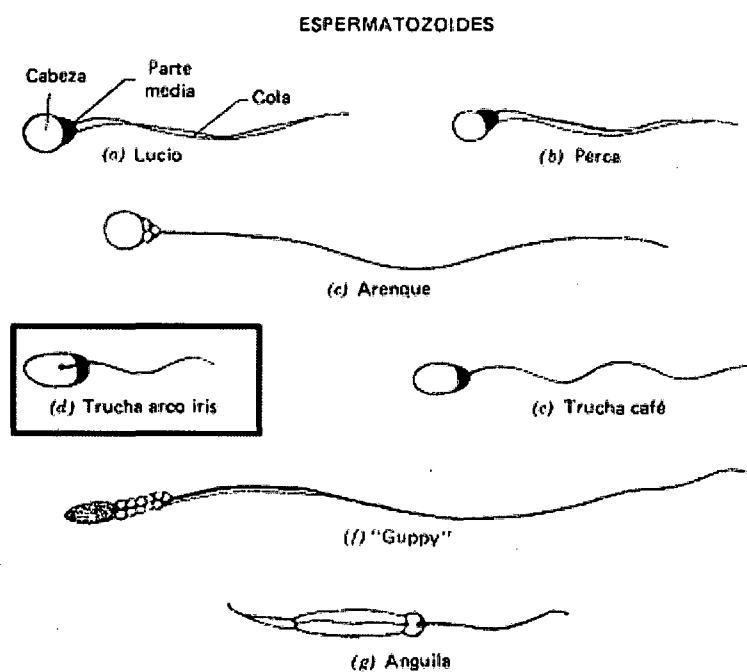
Tienen una morfología alargada, de 32  $\mu$  de longitud y se distinguen en él, tres estructuras una anterior o cabeza, una parte intermedia o citoplasma y una parte posterior o cola. La cabeza tiene forma cilíndrica alargada y aplanada de 3,1 $\mu$  de longitud media y es portadora del material cromosómico (numero "n" de cromosomas). En el polo anterior de la cabeza existe en algunas especies de peces, aunque no está presente en los salmónidos, el denominado acrosoma o condensación de material proteolítico, capaz de disolver la capsula ovular, al ponerse en contacto con ella y penetrar de esta forma en el óvulo, (Lagler, 1999).

La cabeza se continua con el citoplasma, parte intermedia o collar mitocondrial, de 0,8 $\mu$  de longitud, en donde se inserta el apéndice caudal, de 20-31 $\mu$  denominado cola o flagelo móvil, mediante el cual el espermatozoide se desplaza con movimientos reptantes y ondulares una vez que ha sido activado (Cohen, 1977).

El proceso de formación de los espermatozoides, como ya hemos repetido en muchas ocasiones, recibe el nombre de espermatogénesis hasta alcanzar un número “n” de cromosomas y espermiogénesis, el de acabado o adquisición de la morfología estructural que hemos descrito. En esta situación de cavado, el espermatozoide permanece inmóvil en los conductos excretores del testículo, por la acción inhibitoria de los componentes químicos del semen, esperando el momento de la espermiación o expulsión al exterior.

#### LOS ESPERMATOZOIDES Y SU FORMACIÓN

265



**Figura N° 07.-** Variaciones de la forma en espermatozoides (muy amplificados), de ciertos peces óseos: (a) lucio del Norte (*Esox lucius*); (b) perca europea (*Perca fluviatilis*); (c) arenque del Atlantico (*Clupea harengus*); (d) trucha arco iris (*Salmo gairdneri*); (e) trucha café (*Salmo trutta*); (f) "guppy" (*Lebistes reticulatus*), y (g) anguila europea (*Anguilla anguilla*), (Basado de Tuzet, Ballowitz, Fontaine y Vaupel en Grasse, 1958). Tomado de Lagler *et al.* Ictiología.

#### 2.3.21.- LOS ÓVULOS

El óvulo es de morfología esférica, de color sonrosado, en aquellos casos de alimentación rica en pigmentos, o bien incoloro. En algunos casos tiene aspecto blanquecino y corresponde generalmente a óvulos hipermaduros, no fértiles. Recién emitidos son flácidos

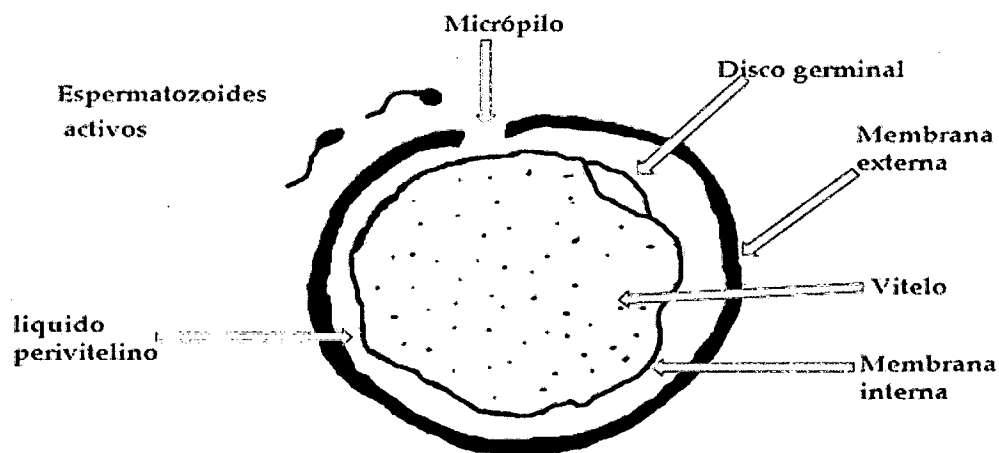
y translucidos, pudiéndose observar en uno de sus polos una formación puntiforme que corresponde al denominado disco germinal o macula germinativa, (Cachafeiro, 1995).

Desde un punto de vista estructural el óvulo emitido, cuya verdadera denominación sería la de ovocito de primer orden, se compone de las siguientes formaciones:

Externamente se encuentra recubierto de una cascara o corion, membrana translucida de carácter poroso, perforada por miles de poros microscópicos, delgada o fina, con una cierta elasticidad y dureza, que depende de las distintas variedades de truchas e incluso, de variedad individual. Microscópicamente se observa en esta membrana un gran poro o abertura, que es el denominado micrópilo, a través del cual va a penetrar uno o más espermatozoides en su camino de busca y encuentro del pronúcleo del ovocito. Su existencia es conocida desde 1896, gracias a los trabajos de un científico Alemán llamado Bruch, pero en los últimos años la aplicación de la Microscopia Electrónica ha permitido conocer detalles no solo de su morfología, sino también del comportamiento funcional (Szollosi y Billard, 1974).

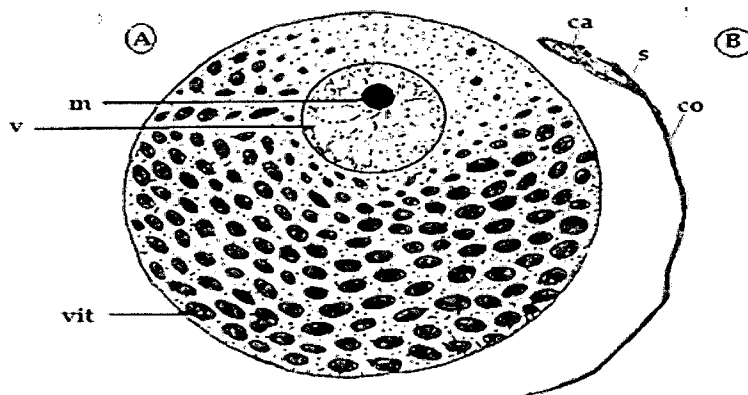
Por dentro del corion o membrana externa existe otra membrana, denominada perivitelina, que envuelve o rodea el citoplasma celular. El espacio comprendido entre ambas membranas es denominado espacio perivitelino, que en óvulos recién emitidos es casi virtual, pero cuando establecen contacto con el agua, por osmosis, a través del corion, se hace real, produciendo la turgencia del óvulo. El citoplasma está casi totalmente ocupado por el denominado vitelo, al cual debe su tamaño el óvulo, compuesto de globulinas y gotas de grasa, las cuales se disponen en un polo, precisamente donde se encuentra el pronúcleo o macula germinativa, (Cachafeiro, 1995).

Por todo ello, la denominación correcta del óvulo sería, antes de ser fecundado, la de ovocito de segundo orden, célula de gran tamaño, ocupada la mayor parte por el vitelo, distinguiéndose a simple vista, en uno de sus polos, una formación puntiforme que es el núcleo celular o macula germinativa.



**Figura N° 08.-** Estructura del óvulo. Tomado de Blanco Cachafeiro (1994)

En las especies ovíparas que concentran las puestas en lugares muy protegidos, los óvulos suelen ser de gran tamaño y producidos en pequeña cantidad, a diferencia de otras, que, por hacerlo en el medio libre, sin ninguna protección, estos son de pequeño tamaño y producido en mayor cantidad. El primer caso es el de los salmónidos, cuya descendencia se encuentra asegurada al ser facilitada la fecundación por el depósito de los óvulos de forma concentrada, sobre los que el macho derrama miles de millones de espermatozoides.



**Figura N° 09.-** A.- Óvulo (macrogameto de morfología esférica, de 3 a 6 mm de diámetro) v: núcleo, m: nucléolo, vit: vitelo o sustancias nutritivas de reserva. B.- espermatozoide (microgameto morfología alargada de 32  $\mu$  de longitud, móvil), ca: cabeza, s: segmento intermedio, co: cola o flagelo. Tomado de Blanco Cachafeiro. (1994).

### **2.3.22.- SUPERVIVENCIA Y CONSERVACIÓN DE LOS PRODUCTOS SEXUALES**

Toda la actividad que rodea a la inseminación artificial con fines industriales se encuentra muy influida por la natural delicadeza de los productos sexuales y muy especialmente por la supervivencia o duración en el tiempo de la capacidad fecundante de los gametos una vez extraídos.

Se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a conocer la supervivencia natural de los productos sexuales, no solamente como investigación pura, sino también para su aplicación en la industria, para facilitar y mejorar la actividad laboral de las explotaciones comerciales. Conocer el grado de supervivencia y, en último término, el manejo de los productos sexuales una vez extraídos permite planificar y mejorar los trabajos de extracción e inseminación, de por sí muy laboriosos, sobre todo en las explotaciones con un cierto nivel de producción. La mayoría de estos trabajos se han realizado en el semen, fundamentalmente por razones obvias, ya que pequeñas cantidades permiten almacenar miles de millones de espermatozoides, (Guarnizo, 2007).

### **2.3.23.- CONSERVACIÓN DEL ESPERMA**

El esperma producido por los testículos es almacenado por el propio pez en los conductos espermáticos, a la espera de ser expulsado al exterior o extraído por el piscicultor. Es una conservación que pudiéramos llamar *in vivo*, en donde la fertilidad de estos espermatozoides va perdiendo actividad a medida que transcurre el tiempo de almacenaje, a partir del momento de su maduración. En los machos sacrificados, la actividad del semen se mantiene hasta seis horas después, en ambientes a 4°C, lo que es, en cierta forma, una conservación *post mortem* (Billard *et al.*, 1981; Marcel *et al.*, 1982).

El tiempo de conservación del esperma, una vez extraído, varía mucho, dependiendo de las condiciones ambientales de mantenimiento. Scott y Baynes revisan últimamente estos problemas, confirmando que los factores más influyentes para la conservación del semen, en estado natural, está en función de la temperatura de conservación ambiental, que debe ser lo más baja posible (Scott y Baynes, 1980).



Con esta conservación *in vitro* lo que se pretende, a nivel de explotación, es almacenar el semen, como máximo, durante algún tiempo, para favorecer o mejorar las condiciones de trabajo. Los mejores resultados prácticos en cuanto a temperatura ambiente se refiere, es utilizando hielo, mejor que refrigeración. Los tubos en los que se recoge el semen se colocan entre hielo y deben estar abiertos para estar en contacto con el aire, pues se ha comprobado que el esperma depositado en tubos cerrados o sellados pierde su actividad en muy pocas horas (3 a 5h.). La conservación más prolongada requiere un mantenimiento con Oxígeno y en medio antibiótico, para impedir la proliferación de colonias de bacterias y hongos, (Guarnizo, 2007).

Scott *et al.*, han estudiado este problema de la duración de la conservación *in vitro* del esperma, obteniendo resultados variables, desde varias horas a algunos días, a temperaturas de 4°C. (Scott, 1980). Marcel consigue la conservación *in vitro* del esperma de trucha entre 54 y 126 horas, dependiendo de la variabilidad individual de los machos a temperaturas de 4°C en la oscuridad, almacenado en recipientes especiales, que albergan 20 cc de esperma no diluido y que ocupan una altura de 0,5 cm (Marcel *et al.*, 1981).

Para facilitar a conservación se han utilizado también los llamados dilutores de conservación, de composición química mineral similar al plasma seminal, que facilita la conservación en un tiempo que varía dependiendo de la temperatura y condiciones ambientales (Dorier, 1949; Billard y Jalabert, 1974; Stoss *et al.*, 1978).

En los últimos tiempos se han realizado numerosas investigaciones destinadas a conseguir la conservación prolongada, mediante técnicas de congelación del esperma de salmónidos y especialmente, de la Trucha Arco Iris, por su importancia industrial (Graybill y Horton, 1969; Ott y Horton, 1971; Stein y Bayrle, 1978; Stoss *et al.*, 1978). Estas técnicas de congelación están basadas en la dilución del semen mediante dilutores de conservación, utilizando además, protectores de congelación. La utilización de Nitrógeno líquido permite conseguir temperaturas de mantenimiento de hasta -196°C y comercializar en *pellets* de semen viable extraído un año antes (Mounib, 1978).

La utilización de esta técnica orienta el futuro hacia la especialización de las explotaciones. Ello permite que existan instalaciones productoras de huevos embrionados que mantengan

únicamente hembras, adquiriendo del exterior semen congelado, con lo que se evitan problemas consanguinidad, dimensión de la instalación, etc.

#### **2.3.24.- ESTADIOS DE MADUREZ SEXUAL (Naier, De Buckmann, 1929)**

**Etapa I Virgen:** Órganos sexuales muy pequeños cerca y debajo de la columna vertebral; Testículos y ovarios transparentes, incoloros, hasta grises. Huevos invisibles a simple vista.

**Etapa II Virgen en maduración y recuperación de puesta de huevos:** Testículos y ovarios traslucidos, rojo-grisáceo. Longitud: La mitad o poco más de la mitad de la longitud de la cavidad ventral. Los huevos pueden verse individualmente con la ayuda de una lupa.

**Etapa III En desarrollo:** Testículos y ovarios opacos, rojizos, con capilares sanguíneos, ocupan aproximadamente la mitad de la cavidad ventral. Los huevos son visibles a la vista en forma blanquecina y granular.

**Etapa IV Desarrollo:** Testículos blanco rojizos. No aparecen gotas de lechecillas haciendo presión: Ovarios anaranjados rojizos. Los huevos se observan claramente; opacos. Los testículos y ovarios ocupan las 2/3 partes de la cavidad ventral.

**Etapa V Gravidéz:** Los órganos sexuales llenan la cavidad ventral. Testículos blancos, gotas de lechecilla caen haciéndoles presión.

**Etapa VI Desove:** Huevas y lechecillas se desprenden con muy ligera presión. La mayoría de los huevos traslucidos, con algunos huevos opacos que todavía quedan en el ovario.

**Etapa VII Terminado:** No totalmente vacío aun. En el ovario no quedan huevos opacos.

**Etapa VIII Descanso:** Los testículos y el ovario vacíos y de color rojo. Unos pocos huevos en el estado de reabsorción.

### **2.3.25.- FECUNDACION DIFERIDA EN PECES: TECNICAS EMPLEADAS INSEMINACION ARTIFICIAL**

#### **2.3.25.1.- Prolegómenos de Inseminación**

La inseminación o fecundación artificial es una técnica sencilla, que exige, por parte del piscicultor, un indudable esmero y cuidado, no sólo en las maniobras de extracción y manipulación de los productos sexuales, sino también en la preparación de los reproductores durante el proceso de maduración, (Cachafeiro. 1995).

El proceso de inseminación materializado en la mezcla o puesta en contacto de los productos sexuales de ambos sexos, va precedido, de un conjunto de preparativos previos, referidos especialmente a la disposición de los reproductores en los estanques de instalación, y la vigilancia y detección de la maduración, a su manejo en condiciones de comodidad y eficacia, alimentación, etc.

El concepto de fertilidad es más amplio y considera el porcentaje de alevines que permanecen vivos hasta los cuatro meses de edad, después de la eclosión. Todo ello no solamente se encuentra ligado a la propia técnica de inseminación, sino muy especialmente a la calidad de los gametos, características del medio de incubación, consanguinidad, etc., reflejado más tarde en la calidad y fortaleza de los alevines resultantes, (Guarnizo, 2007).

#### **2.3.26.- CONCEPTO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

El proceso de mezclar en un recipiente el semen de un macho obtenido mediante la compresión abdominal con los óvulos y líquido folicular de una hembra, conseguido mediante el mismo procedimiento, recibe el nombre de inseminación artificial. Como consecuencia de la puesta en contacto de los gametos, los óvulos son fecundados por los espermatozoides, originándose una célula denominada huevo o cigoto, de cuyo desarrollo surgirá un nuevo ser. Como este proceso se realiza, a diferencia del que tiene lugar en la naturaleza, con el concurso del piscicultor, recibe el nombre de artificial, (Guarnizo, 2007).

### **2.3.24.- MÉTODOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

Si este proceso se realiza en un recipiente en presencia de agua, vertiendo los productos sexuales directamente en ella, recibe el nombre de “**Método húmedo**”. La mayoría de los autores conceden a un prusiano, llamado Sthepan Ludwig Jacobi (1711-1784), la prioridad de esta práctica en la trucha y salmón, hacia el año 1738, habiéndose publicado sus experiencias en 1763, en Hannoverchen Magazin. Tales hallazgos fueron recogidos por los naturalistas de la época, quienes las utilizaron para la investigación, sin entrever sus aplicaciones prácticas.

Años más tarde en 1842, según se recoge en los libros clásicos de la piscicultura, dos pescadores franceses del departamento de los Vosgos, llamados Remy y Gehin, consiguieron la fecundación de óvulos de trucha, con el subsiguiente desarrollo de alevines. Estas actividades fueron conocidas por la Academia Francesa en 1848 y comenzaron a ser estudiadas científicamente por el embriólogo Dr. Coste.

Si la mezcla del semen con los óvulos y líquido folicular se realiza en un recipiente en ausencia de agua, tiene también lugar la fecundación, recibiendo este proceder el nombre de “**Método seco**”. Los resultados, en lo que se refiere a porcentaje de óvulos fecundados, son mucho mejores con este método, ya que, en presencia de agua, tanto los espermatozoides como los óvulos se activan rápidamente, siendo las posibilidades de fecundación mucho menores. Este método de fertilización artificial en seco es conocido por primera vez desde su publicación de Soudakevic en 1874 y atribuido a un Ruso llamado V.P. Wraski (Soudakevic, 1874).

### **2.3.25.- ACTIVACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA**

Ocurre en respuesta a los cambios del medio externo, tales como: concentración de los iones, osmolaridad y pH (Morisawa y Susuki, 1980, Hamamah y Gatti, 1998). Los espermatozoides de los teleósteos marinos y de agua dulce permanecen inmóviles en soluciones con o sin electrolitos, cuando la osmolaridad es isotónica al plasma seminal. Entretanto, cuando el semen se encuentra diluido en una solución hiposmótica, para las especies de agua dulce, e hiperosmótica para especies marinas, los espermatozoides inician su movilidad (Morisawa, 1994).

Un incremento en la osmolaridad en torno a los espermatozoides provoca aumento en las concentraciones intracelulares de potasio, y que afecta el axonema flagelar, induciendo el inicio de la movilidad del flagelo, en espermatozoides de especies marinas. También se ha observado que el volumen celular es menor cuando los espermatozoides se encuentran en soluciones hipertónicas, esto quiere decir, que el aumento de potasio intracelular ocurre en repuesta del agua de la célula. En los espermatozoides de los teleósteos de agua dulce, el volumen celular aumenta en condiciones hipertónicas y posiblemente, ocurre disminución en la concentración de potasio intracelular (Morisawa *et. al.*, 1983). Cambios en la osmolaridad externa es ampliamente perjudicial en la estructura y función celular. En general la hiper e hipo osmolaridad provocan alteraciones en el tamaño de las células, aumentándolas o disminuyéndolas (Morisawa, 1994). Estas perturbaciones drásticas en la homeóstasis en las células espermáticas pueden modificar las propiedades mecánico-químicas del dispositivo móvil en el axonema flagelar conduciendo al inicio de la motilidad espermática (Morisawa, 1994). Hasta ahora no se conoce el mecanismo por el cual el aumento o la disminución de las concentraciones intracelulares de potasio inducen la cascada de eventos que inician la motilidad espermática, en peces de agua dulce o teleósteos marinos (Oda y Morisawa, 1993)

### **2.3.26.- CARACTERIZACIÓN SEMINAL**

Evaluar la calidad espermática es requisito indispensable para asegurar el éxito de la inseminación artificial y para monitorear los procedimientos de manipulación del material seminal, tales como su almacenamiento en fresco (Cruz-Casallas *et. al.*, 2004), junto con la movilidad y el tiempo de activación; la concentración espermática es una de las variable más utilizadas para determinar la calidad seminal en peces (Billard *et. al.*, 1995, Lahnsteiner y Patzner, 1998 y Honeyfield y Krise, 2000). Para la evaluación de la calidad seminal se ha realizado numerosos estudios y según Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría (2005) puede comprender las siguientes etapas:

- Obtención de la muestra de semen.
- Determinación de las características macroscópicas, (Volumen, Color, Olor, Aspecto).
- Evaluación de las características microscópicas, (Motilidad, Vitalidad, Morfología).

➤ Pruebas bioquímicas.

➤ Pruebas de fertilidad.

En el presente trabajo de investigación, se determinaran cuatro de estas pruebas, a excepción de las pruebas de fertilidad.

Para realizar un adecuado proceso de congelamiento de semen, es preciso obtener material fresco y de calidad, aliado a una técnica de criopreservación óptima. La calidad del semen puede ser afectada por condiciones adversas, tanto en el proceso de espermatogénesis, almacenamiento intratesticular, así mismo por el tiempo de permanencia de los espermatozoides en los testículos (Ciereszko *et. al.*, 2000). (Toth *et. al.* 1997) y (Lahnsteiner 2000), resaltan la importancia de conocer las características morfológicas y funcionales de los espermatozoides, para el estudio básico de la biología reproductiva y para la producción en cautiverio de cualquier especie íctica, así mismo, como para el desarrollo de la técnica dirigida hacia la conservación de las especies nativas. Suquet *et. al.* (1993) destaca que la descripción de las características físicas y químicas del plasma seminales un prerrequisito importante en la implementación de diluyentes para la inseminación y almacenamiento de los espermatozoides.

La calidad del semen se puede evaluar en diferentes niveles de complejidad: espermatocrito, viabilidad espermática, porcentaje de movilidad espermática, intensidad de movilidad espermática, ultra estructura de los espermatozoides, composición química del plasma seminal o la capacidad de fertilización que poseen los espermatozoides (Rurangwa *et. al.*, 2001). El objetivo es evaluar las características seminales, teniendo en cuenta, que los criterios utilizados para la evaluación de semen de los peces, hasta el momento, han sido basados en exámenes de movilidad, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Kavamoto *et. al.*, 1985).

## **2.4.- BASES TEORICAS**

### **2.4.1.- FECUNDACIONES DIFERIDAS: CRIOPRESERVACION Y SOLUCIONES ISOTONICAS**

**Solución Isotónica.-** La técnica de preservación en soluciones isotónicas se pone en práctica especialmente para el caso de los óvulos, cuando estos inmersos en la referida solución permanecen con el micrópilo abierto, por un tiempo relativamente prolongado,

permitiendo así una fecundación diferida, que usualmente se practica en trabajos de mejoramiento genético o simplemente para cruzamientos entre poblaciones icticas separadas geográficamente por distancias considerables, (Guarnizo, 2007).

No viene al caso, comentar la Criopreservación para óvulos toda vez que estos tienen otras técnicas o metodologías de preservación; sin embargo, debe de quedar claramente expuesto que de aplicarse la Criopreservación en óvulos los daños mecánicos serían de mayor magnitud por cuanto estos gametos (óvulos), en el caso de los peces son células macroscópicas con diámetros y/o tamaños más grandes y por consiguiente con mayor superficie para la formación de cristales de hielo, con el consiguiente peligro de ruptura de la membrana celular y por ende de la célula toda.

Para el caso puntual de los espermatozoides en general y particularmente en el de los peces aparte de su condición microscópica en alguna medida se ven protegidos por el fluido espermático que en alguna medida mitiga la acción del frío y contrarrestando también los posibles daños mecánicos. En definitiva los intentos de preservar los óvulos por Criopreservación o congelamiento han ocurrido con resultados negativos o en todos los casos poco satisfactorios, por lo que en la actualidad no se insiste en esta metodología quedando entonces la Criopreservación con aplicaciones exclusivas para los gametos masculinos, (Cruz-Casallas, 2006).

El medio o solución isotónica es aquel en el que la concentración de soluto está en igual equilibrio fuera y dentro de una célula.

Se puede definir como la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida, congelación lenta con descongelación lenta, congelación ultrarrápida y vitrificación (Boiso, 2001).

En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable.

La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño maría a 30°C, para evitar la recristalización (Boiso, 2001).

La congelación ultra-rápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson (1986). Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, seguida de la inmersión en nitrógeno líquido. La vitrificación, se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo, (Rall y Fahy, 1985).

#### **2.4.2.- CONDICIÓN TERMAL Y CRIOPRESERVACIÓN**

Los protocolos existentes para la preservación de gametos masculinos están referidos mayormente a organismos homotermos y dentro de ellos particularmente a mamíferos. En el caso de los peces, como organismos poiquilotermos y que como tales regulan su temperatura corporal a la del medio acuático, esta particularidad les significa alguna ventaja cuando se pone en práctica la preservación de los espermatozoides en condiciones sumamente bajas de temperatura.

Se entiende entonces que en los homotermos no habiendo esa capacidad para igualar su temperatura con la de su hábitat natural el impacto del frío debe de significarles, mayor daño estructural y mayores interferencias en términos fisiológicos en general y de manera particular en el comportamiento de las biomoléculas presentes en los gametos.

En los peces esa capacidad de nivelación de la temperatura corporal con la del medio acuático les imprime prácticamente una condición **euritermal**, característica que seguramente se advierte también a nivel celular de manera que el semen sometido a la acción de los criopreservadores se muestra en mejores condiciones para mitigar el frío en general y particularmente los cristales que se forman y que son en definitiva los que van a ocasionar daños mecánicos en la estructura celular especialmente a nivel de la membrana celular, (Cachafeiro, 1995).

#### **2.4.3.- DILUYENTES Y CRIOPROTECTORES**

**2.4.3.1.- Fines de la dilución del esperma.-** El uso de diluyentes está ampliamente difundido ya que permite la preservación de la muestra, el diluyente debe mejorar el poder fecundante del espermatozoide y poder alargarlo por un periodo de tiempo, su preparación debe de ser de fácil manejo y de bajo costo



**2.4.3.2.- Crioprotectores no permeables:** son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática de los espermatozoides protegiendo su estructura de la acción del frío. No atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular, además, previene el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Medina-Roble *et. al.*, 2005).

**a.- Yema de huevo:** los huevos han de ser frescos, no transcurrido más de cuatro días desde la postura hasta el momento de su utilización. La incorporación de la yema se realiza sobre el volumen final del diluyente base homogenizándose adecuadamente. Para eliminar las partículas gruesas se realiza centrifugación del diluyente. La yema de huevo posee acción termoprotectora, la cual es ejercida por la fracción lipídica compuesta por la lecitina y cefalina y una acción conservadora, dada por la acción de la lipoproteína (Ramos, 1986 y Medina-Robles, 2005). La adición de la yema de huevo como estabilizador de la membrana fue investigado por Cabrita *et. al.*, (1998), quienes observaron que esta proporcionó una mayor supervivencia post-descongelación. Otros estudios demuestran que la adición de huevo de gallina a la muestra congelada protege la membrana de la célula espermática durante los procesos de congelación y mejora significativamente los porcentajes de fertilización post-descongelación (Babiak *et. al.*, 1995)

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo, se adhieren a las membranas celulares durante la congelación y descongelación, han sido consideradas como el principal factor crioprotector en la crioconservación de espermatozoides en mamíferos (Babiak *et. al.*, 1999).

**b.- Suero Fisiológico.-** Es una solución acuosa de sustancias compatibles con los organismos vivos debido a sus características definidas de osmolaridad, pH y fuerza iónica. Solución salina que presenta una presión osmótica isotónica con la de la sangre, formada por agua destilada y cloruro sódico al 0,9%. Concentración electrolítica: Na<sup>+</sup> 154 mEq/l; Cl<sup>-</sup> 154 mEq/l, Osmolaridad: 308 mOsm/l , pH aproximado: 5,5. Se trata de agua a la que se ha añadido sal para que esté en una proporción “fisiológica”, es decir, para que se asemeje a los fluidos del organismo. Está compuesto de agua, electrolitos y, a veces, distintas sustancias, como la glucosa y de algunos polisacáridos expansores. Puede ser empleado como sustituto del líquido seminal. También sirve para evaluar la motilidad

progresiva, el semen se diluyó en suero fisiológico a diferentes concentraciones 0.07, 0.08 y 0.09%, para su observación en microscopio trinocular para el cálculo del porcentaje de espermatozoides con movimiento hacia delante. (Zurita, 2004).

**c.- Glucosa:** los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido al aporte energético al espermatozoide, ya que estos son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa, esta última por la vía oxidativa; y su acción como crioprotectores contribuye a mantener el equilibrio osmótico. Tal como afirma Ramos (1986), quien reafirma que los azúcares (fructosa y glucosa) suministran energía a los espermatozoides en los procesos vitales y aportan sustitutos de electrolitos para el mantenimiento de la presión osmótica.

**d.- Leche:** es muy utilizada la leche descremada, la cual también ejerce un efecto termoprotector y proporciona nutrientes a los espermatozoides. El uso de la leche descremada mejora la visibilidad de la movilidad espermática, lo cual no es posible en la leche entera, debido a la presencia de glóbulos de grasa (Bearden y Fuquay, 1982).

**2.4.3.3.- Crioprotectores permeables:** la elección del crioprotector ha sido asunto de ensayo y error en la mayoría de las investigaciones, quizá porque aún no existe una explicación satisfactoria para la acción de los mismos sobre la célula espermática (Holt, 2000). Aunque Shlafer (1981) afirma que los crioprotectores permeables como el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol (MET) son extensamente usados para disminuir el punto de congelación del medio extracelular, minimizando los efectos deletéreos (destruyentes), de los cristales de hielo y regulando la tasa de deshidratación celular. Estas sustancias protegen los espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación, por su alta solubilidad en el agua, lo cual permite la formación de enlaces de hidrógeno y agua, permitiendo mantenerse en solución a temperaturas en que se forman los primeros cristales de hielo; esta propiedad altera las condiciones físicas del hielo y las soluciones que rodean la células, favoreciendo la sobrevivencia celular al disminuir los daños electrolíticos causados en la membrana celular por la mayor concentración de iones en la fase líquida (Graham, 1978). Medina-Robles *et. al.*, (2005) aclara que los crioprotectores permeables

son aquellos que penetran al interior de la célula, evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos de medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en su interior. Son sustancias que poseen un bajo peso molecular y se destacan por su amplia utilización el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2 propanodiol, butenediol, acetamina, propilenglicol, etilenglicol (ETG), metanol (MET) y etanol. Sin embargo, la exposición del esperma a los crioprotectores por tiempos prolongados, y a altas concentraciones puede causar desnaturalización de las proteínas celulares (Shlafer, 1981).

**a.- Dimetilsulfóxido (DMSO):** el DMSO ha sido muy utilizado en el estudio de congelación de semen, en los cuales se reporta la observación de efectos positivos en la descongelación del semen (Neira *et. al.*, 1992); además, ha demostrado ser el crioprotector de elección en la conservación de semen en salmónidos usado a concentraciones de 5 a 15% (Munkittrick, (1984), citado por Gallant y Richardson, (1993)). La interacción del DMSO con la célula puede tener diferentes mecanismos y se ha sugerido que existe una interacción electrostática entre el grupo sulfóxido polar del DMSO y la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática (Anchordoguy, 1991). En estudios realizados por Yao *et. al.*, (1999), estos investigadores mencionan que el DMSO fue esencial para evitar la muerte del semen durante la crioconservación, utilizándolo al 20%, mostró la más alta movilidad (20-25%) después de la descongelación, además se demostró que la seminación artificial *in vitro* de óvulos frescos con semen crioconservado produjo una fertilidad del 33% vs 48% con semen fresco.

**b.- Metanol (MET):** El metanol suele ser menos tóxico en unas especies que en otras y su efecto suele ser atribuido a su capacidad de salir y entrar más rápidamente de la célula que otros crioprotectores, lo cual podría conducir a un menor daño de la membrana espermática por formación de cristales de hielo (Tiersch *et. al.*, 1998).

**c.- Glicerol (GL):** En los trabajos realizados con glicerol, tiene la capacidad de modificar la bicapa lipídica por su habilidad de insertarse entre los fosfolípidos, llegando a afectar las

vías de metabolismo intermedio; de igual manera se ha asociado su acción sobre el citoesqueleto y las proteínas microtubulares (Deppe *et. al.*, 2003).

**d.- Etilenglicol (ETG):** en los trabajos realizados con etilenglicol se evidencia que dentro de los crioprotectores evaluados (DMSO, Glicerol, MET), el ETG presenta un mayor efecto protector para la preservación del acrosoma, lo cual no es relevante para la crioconservación de semen de peces, ya que esta estructura está ausente en el espermatozoide de la mayoría de las especies, (Deppe *et. al.*, 2003).

#### **2.4.4.- CARACTERIZACION GENERAL DE LA BIOECOLOGIA DE TRUCHA ARCO IRIS (*Onchorynchus mykiss*)**

- Especie ictica de aguas frías, se encuentra en ríos, lago y lagunas en todo el Perú.
- De régimen carnívoro.
- Madurez sexual alrededor de los dos años (primer desove).
- Reproducción anual en temporada de secas, con temperaturas bajas.
- Desovante total.
- Longevidad 12-15 años.
- Dimorfismo sexual, machos con mandíbula inferior terminada en gancho.
- Óvulos libres. (Cachafeiro, 1995).

#### **2.4.5.- DIMORFISMO SEXUAL**

Establecido a través de caracteres sexuales secundarios, vale decir a partir de la observación del fenotipo, entre las diferencias que se tiene se encuentran:

Machos adultos de cuerpo alargado, cabeza de forma triangular, mandíbula inferior prominente en los machos en forma de pico, la hembra presenta la cabeza redondeada y el cuerpo más voluminoso que el macho, machos en plena madurez sexual, con coloración nupcial consistente en, un rosado intenso en los flancos. Las hembras no presentan esta característica.

Poros genitales en los machos de forma ovoide y de color pálido, en la hembra el poro genital es redondeado color rojizo turgente (prominente).

**Cuadro N° 05:** Dimorfismo sexual en trucha arco iris

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>MACHO</b>	<b>HEMBRA</b>
Boca y Mandíbula	Grande y puntiaguda	Pequeña y redondeada
Dientes	Agudos	No muy agudos
Musculatura	Dura	Suave
Abdomen	Duro	Más blando
Poros genital	No Prominente	Prominente
Color nupcial	Negrusco	Normal
Ancho del cuerpo	Angosta	Ancha
Forma del cuerpo	Delgada	Redondeada

**Fuente:** Contenido de la asignatura de Ictiología.

### III.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.- LUGAR DE EJECUCION

Centro Experimental La Raya – UNSAAC, de cuyas instalaciones piscícolas se tomaron los ejemplares machos y hembras de Trucha “Arco Iris”.

##### ✓ Infraestructura y calidad hídrica

En el centro experimental La Raya, su infraestructura de producción piscícola, consta de estanques semirústicos, empotrados en el suelo y empedrados en el piso y en sus paredes laterales. Son estanques alineados en paralelo y funcionan autónomamente toda vez que cada uno de ellos cuenta con su propio ingreso y salida de agua.

El recurso hídrico que utiliza esta piscigranja es el riachuelo Huaracconi, que se originan en deshielos de nevados ubicados a más de 4500 msnm, por lo que estas aguas son sumamente frías, particularmente en las estaciones de otoño e invierno. Entre los parámetros fisicoquímicos de estas aguas se han registrado los siguientes:

##### ✓ Cuadro N° 06: Calidad hídrica de la piscigranja La Raya

PARAMETROS	LA RAYA
Temperatura	9 °C
Oxígeno Disuelto (ppm)	6.47
Turbidez (TU)	1.44
pH	8.3
C.E. (S/cm)	107.00
Dureza ppm CaCO <sub>3</sub>	61.00
Calcio (ppm)	18.24
Magnesio (ppm)	5.61
Cloruros (ppm)	12.40
Sulfatos (ppm)	29.60
Bicarbonatos (ppm)	46.70
Carbonatos (ppm)	0.16
Sales solubles (ppm)	135.1

Fuente: Laboratorio

Es importante comentar la temperatura que caracteriza las aguas del río Huaracóni que en tiempo de heladas, llegan prácticamente al punto de congelación característica que repercuten en la madurez sexual de los ejemplares establecidos, los mismos que alcanzan su plenitud procreativa, prácticamente a los tres años cuando lo normal debiera ocurrir solo a los dos años, como que efectivamente se observa en piscigranjas de menor altitud y obviamente con aguas de temperaturas más benignas.

➤ **Ubicación geográfica:**

Localidad : Centro Experimental La Raya  
Distrito : Marangani  
Provincia : Canchis.  
Región : Cusco

**Coordenadas**

- 14° 00' – 15° 45' Lat. S
- 69° 45' - 75° 00' Long. O

**Altitud**

- 4200 msnm

**Precipitación Pluvial**

- 965 mm (Promedio Anual )

**Temperatura**

- 6,54° - 7,49°C (Promedio Anual)

**Acceso**

- Por carretera asfaltada Cusco – Puno, 172 Km

## Zona de Vida

### Páramo muy Húmedo-Subalpino Subtropical (pmh-SaS)

El promedio de precipitación total anual varía entre 700 mm y 800 mm y la biotemperatura media anual entre 6 °C. y 3 °C. Se ubica entre 3 900 y 4 500 msnm, es una zona de clima frío, que no permite la agricultura, pero que ofrece algunas buenas condiciones para la ganadería extensiva. La vegetación natural está constituida predominantemente por manojos dispersos de gramíneas como el “ichu” (*Stipa spp*), conformando los pajonales de puna. Según el diagrama de Holdridge esta zona de vida tiene una evapotranspiración potencial que varía entre la cuarta parte (0,25) y la mitad (0,5) del promedio de precipitación total por año, hecho que ubica esta zona de vida en la provincia de humedad *húmedo*.

### 3.2.- MATERIAL BIOLÓGICO

Para el presente trabajo se utilizó lo siguiente:

- Ejemplares Machos y Hembras Reproductores de *Onchorynchus mykiss*, estabulados en el Centro Experimental de La Raya.
- Quince machos con talla promedio de 45 cm y peso promedio de 1. 85 Kg.
- Dos hembras con talla promedio de 51 cm y peso promedio de 2.10 Kg. Se utilizaron dos hembras en el entendido que no todos los reproductores son de igual calidad, difieren, por ejemplo, en talla, peso y edad y por consiguiente la calidad de los gametos, también es diferente lo que finalmente se manifiesta en la viabilidad para la fecundación.



### **3.3.- MATERIALES DE LABORATORIO Y CAMPO**

#### **3.3.1.- MATERIALES Y REACTIVOS DE LABORATORIO**

##### **⚡ EQUIPOS**

- Microscopio trinocular de contraste de fases, Olympus 2G, para observación y caracterización de semen de trucha.
- Baño María
- Cocina Eléctrica
- Refrigerador
- Recipientes de nitrógeno líquido de 20 y 30 Litros

##### **⚡ REACTIVOS**

- **Dilutores:**
  - ✓ Agua de Estanque corriente
  - ✓ Yema de Huevo
  - ✓ Glucosa 5%
  - ✓ Leche descremada
  - ✓ Suero fisiológico al 0.07%, 0.08% y 0.09%
- **Crioprotectores**
  - ✓ Dimetilsulfoxido (DMSO) 5%
  - ✓ Glicerol 7%
  - ✓ Metanol 5%
  - ✓ Etilenglicol 5%

- Agua destilada
- Aceite de Inmersión
- Eosina – Nigrosina
- Antibiótico (Penicilina 1'000.000 UI)
- Bicarbonato de Sodio al 1%
- **MATERIAL DE VIDRIO**
  - Porta y cubre objetos
  - Tubos de ensayo graduados a 0.5 ml.
  - Cámara de Neubauer
  - Matraz 100 ml.
  - Vaso de precipitación

#### **OTROS**

- Micropipeta
- Gradilla
- Termómetro de canastilla con graduación de -10 °C a 30°C, con precisión de 0.5 °C
- Termómetro ambiental
- Homogenizador
- Guantes de látex
- Jeringas y Aguja hipodérmicas de diferentes capacidades
- Bandejas de plástico (2)

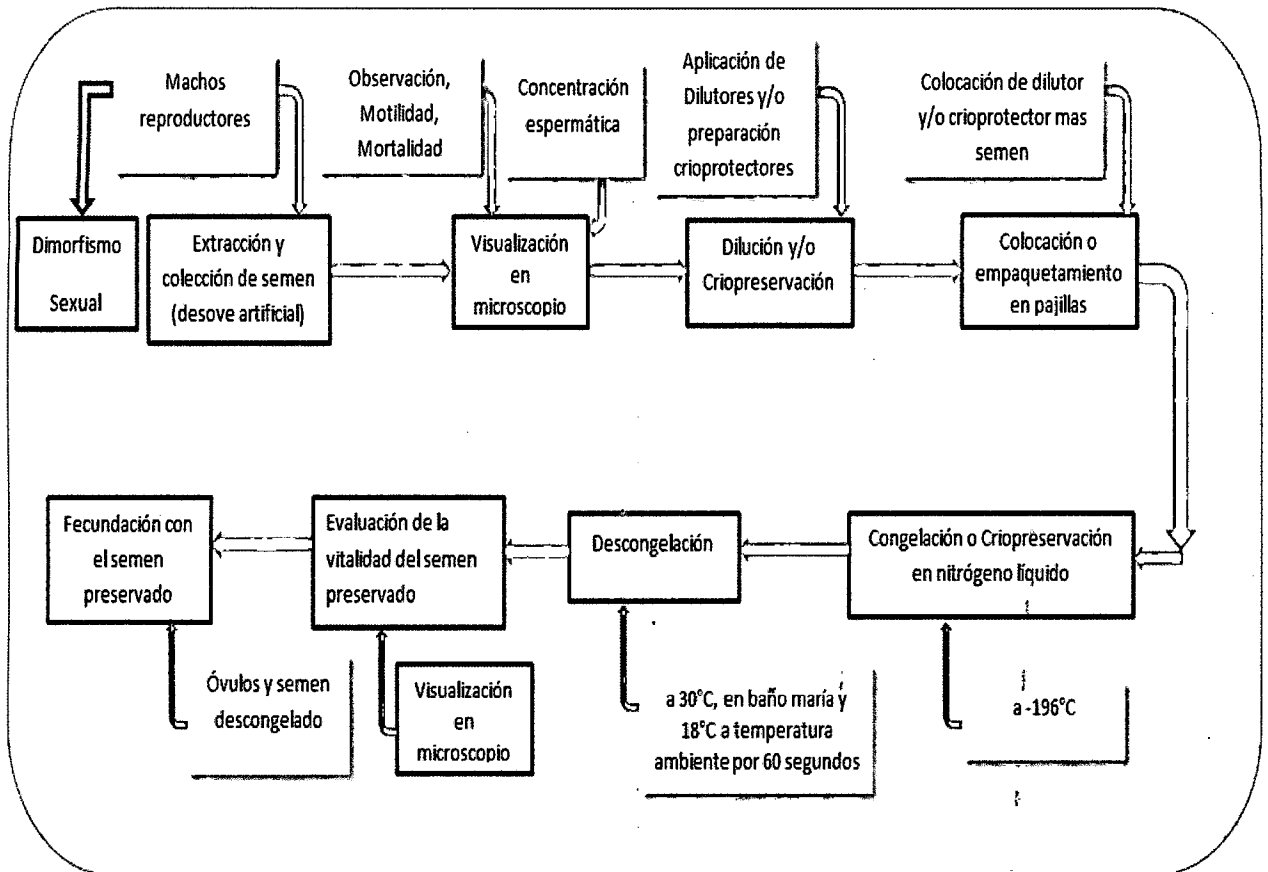
- Pajillas de 0.5 ml.
- Algodón
- Cinta Masking
- Gasa
- Extensiones
- Laptop
- Papel bond A4 de 80 gr.
- Impresora
- Cartuchos de Impresion
- Bibliografía especializada.

### **3.3.2.- MATERIALES DE CAMPO**

- Libreta de Campo y lapiceros
- Cámara fotográfica digital
- Tina para el traslado de peces

### 3.4.-METODOS

#### 3.4.1.- FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE CRIOPRESERVACION



**Figura N° 10.-**Flujograma para la criopreservación de semen de trucha Arco Iris

**Fuente:** Elaboración propia. Biología-UNSAAC (2014)

- La Extracción y colección de semen, fue realizado por masaje abdominal, previo reconocimiento del estado de plena madurez. El semen se recepción en tubos de ensayo de 10 ml.
- Como paso previo a la observación, inmediatamente después de la obtención del semen se aplicó, los dilutores y finalmente se procede a la observación microscópica todo este procedimiento no debe exceder de 4 – 5 minutos.
- La observación microscópica tiene la finalidad de determinar el porcentaje de sobrevivencia a diferentes tiempos (3-4 y 5 minutos), y se expresa porcentualmente.

- La criopreservación conocida como el proceso en el cual las células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas (-196 °C).
- El empaquetamiento fue el paso siguiente a la criopreservación donde se realiza el empaquetamiento en pajillas (semén y crioprotector).
- La descongelación, donde el descongelamiento fue realizado a diferentes temperaturas, en nuestro caso a 30°C (Baño María) y 18 °C (Temperatura Ambiente).
- La evaluación de la vitalidad del semén preservado, fue realizado después de la descongelación, donde se evaluó el semén preservado, añadiendo para este caso un activador bicarbonato de Sodio al 1%.
- La fecundación, es el proceso de criopreservación, donde fue homogenizado el semén previamente descongelado y los óvulos obtenidos de las dos hembras.

#### **3.4.2.- DESOVE ARTIFICIAL**

Se llevó a cabo por la técnica del masaje abdominal tanto en machos como en hembras habiéndose observado previamente que los reproductores estuvieran en el clímax de su madurez sexual. Por la naturaleza del trabajo, el ordeño de los machos se llevó a cabo con anterioridad al de las hembras, considerando que la parte sustancial de la investigación consiste en la preservación de los gametos masculinos cuya vitalidad y capacidad de fecundación van a ser probados posteriormente después de haber permanecido congelados durante un tiempo.

Como fechas puntuales, el ordeño de los machos se realizó el 29 de noviembre del 2013 y en la misma fecha se procedió a su criopreservación hasta el 25 de julio 2014, por nueve meses, cuando se procedió a la descongelación y su uso inmediato para la fecundación, el cuadro N° 07 permite observar los volúmenes de semén obtenidos por masaje abdominal.

En el caso de las hembras el desove también se realizó por masaje abdominal, el cual se realizó el 25 de Julio del 2014, habiéndose empleado dos hembras maduras, cuyos óvulos fueron fecundados por el semén descongelado.

Habiéndose procedido a tres ordeños con cinco ejemplares machos cada vez, se procedió de acuerdo al siguiente detalle:

- Primer ordeño 27 Setiembre del 2013, con 42.5 ml de semen provenientes de 5 ejemplares machos, el cual se utilizó para la observación del movimiento y vitalidad de los gametos contenidos en el semen, utilizando como diluyente agua proveniente del estanque y agua corriente.
- Segundo ordeño 25 de Octubre del 2013, 36 ml., de semen provenientes de cinco reproductores machos, los reactivos empleados como dilutores para la observación de vitalidad y movimiento fueron Glucosa al 5%, Yema de Huevo, Leche descremada, Suero Fisiológico al 0,07%, Suero Fisiológico al 0.08% y Suero Fisiológico al 0,09%.
- Tercer ordeño 29 de Noviembre del 2013, con 24,5 ml., de semen provenientes de cinco machos, el cual se utilizó para probar la eficiencia de los crioprotectores empleados.

Para la obtención del semen de truchas se realizó la selección de machos reproductores provenientes de los estanques, para luego ser trasladados a las instalaciones del Centro Experimental La Raya UNSAAC, donde el operador procedió a tomar la trucha de la cabeza y la cola, se apoya la parte dorsal de la trucha al cuerpo del operador y por la parte ventral o abdominal se procedió a presionar suavemente por los costados abdominales hasta el poro genital, hasta extraer la totalidad del semen de la trucha el cual fue obtenido en tubos de ensayo debidamente rotulados, obteniéndose en una primera muestra 9 ml de semen, en una segunda obtención se obtuvo un total de 7 m.l. y en una tercera obtención se obtuvo 5.5 m.l. de muestra.

### **3.4.3.- OBSERVACION DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN**

Paso siguiente a la obtención del semen; esta cualidad espermática se determinó usando un microscopio compuesto, binocular y de contraste de fases. Se pipeteo 50 microlitros de muestra y se puso en un portaobjetos de vidrio. Luego la muestra fue extendida con un cubreobjetos y la observación microscópica se hizo rápidamente. Se identificó un campo

microscópico con pocos espermatozoides y se calculó el número de espermatozoides que se mueven en el campo microscópico. Esta operación se repitió en dos campos microscópicos más. Se calculó el porcentaje de espermatozoides con movimiento. En todos los casos, la motilidad fue excelente, lo que equivale a 90 a 95% de espermatozoides motiles. Calculando el porcentaje de espermatozoides con movimiento en el ámbito de todo el campo observado.

Sirva la aclaración de que este aspecto requiere de suficiente experiencia, aspecto que no se ha descuidado, toda vez que quien observo y leyó los porcentajes de vitalidad fue un profesional de trayectoria suficiente en esta técnicas de Criopreservación. Empleando la siguiente fórmula para determinar la motilidad.

$$\text{Motilidad\%} = \frac{\text{Espermatozoides motiles}}{\text{Número total de espermatozoides}} \times 100$$

La vitalidad se evaluó en microscopio, donde se determinó mediante técnica de tinción que evalúa la integridad de la membrana celular, diferenciando células vivas de muertas.

Para determinar la viabilidad espermática, sobre una lámina portaobjeto se mezcló 10 µL de semen diluido, con 10 µL de solución Eosina - Nigrosina, se realizó un frotis a lo largo de la lámina portaobjeto y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min. La viabilidad espermática se evalúa en base a la tinción de la cabeza del espermatozoide. Los espermatozoides viables no muestran tinción y se visualizan brillantes sobre el fondo oscuro, mientras que los espermatozoides muertos tenían la cabeza teñida de rojo de forma parcial o total. Las muestras se evaluaron bajo un microscopio óptico a 400 ó 1000X de magnificación (Vuthiphandchai et al., 2009), (Fotografía 08).

Previamente a la observación y recuento en microscopio se procedió a diluir el semen empleando para tal efecto como diluyentes: Agua de estanque, yema de huevo, glucosa 5%, suero fisiológico al 0.07%, 0.08%.0.09% y leche descremada esta última fue utilizada en la fase de Criopreservación.

### 3.4.4.- CONCENTRACION ESPERMATICA

Para la determinación de la concentración de espermatozoides por ml., de semen, se procedió a la obtención de la muestra respectiva en un ejemplar macho de la raya; esta muestra preservada en frío fue trasladado en un cooler hasta la ciudad del Cusco, donde se procedió a su dilución en un dilutor cuya composición fue Bicarbonato de Sodio 5%, Formol al 40% (puro) y H<sub>2</sub>O destilada, el semen tratado así permitió una mayor claridad para proceder al conteo en una cámara de Neubauer.

En este procedimiento finalmente se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{Ec \times 10}{Ac \times Hc \times D}$$

**Dónde:**

**C**= Numero de espermatozoides por ml

**Ec**= Espermatozoides contados en dos cuadrantes

**Ac**= Área contada

**Hc**= Altura de la cámara

**D**= Dilución

Téngase en cuenta que los componentes de la fórmula toman en cuenta las características de una cámara de Neubauer.

$$N^{\circ} \text{ Esp. /ml} = \frac{\text{Espermatozoides contados (2 cuadrantes)} \times 10}{\text{Área contada} \times \text{altura de la cámara} \times \text{dilución}}$$

$$N^{\circ} \text{ Esp. /ml} = \frac{\# \text{ esperma contados} \times 1000}{2 \times 1/10 \times 1/20}$$

$$N^{\circ} \text{ Esp. /ml} = \text{espermatozoides contados} \times 100.000$$

Fuente: Dra. Zurita S. Manual de procedimientos de laboratorio - Espermatograma (MINSa, 2004).



### 3.4.5.- APLICACIÓN DE DILUTORES

Considerando que una mejor evaluación de la vitalidad de los espermatozoides se observa previa dilución del semen, se preparó previamente las siguientes combinaciones:

**Cuadro N° 07:** Aplicación de Dilutores

Diluyente	Componentes
Diluyente 1	Agua de Estanque
Diluyente 2	Glucosa al 5%
Diluyente 3	Suero fisiológico al 0.07%
Diluyente 4	Suero fisiológico al 0.08%
Diluyente 5	Suero fisiológico al 0.09%

**Fuente:** Elaboración propia, Biología – UNSAAC (2014)

**Cuadro N° 08:** Los volúmenes de semen para cada diluyente fueron:

Volumen de semen para cada diluyente	
N°	Cantidad
1	0.5 $\mu$ .l de semen
2	40 $\mu$ .l de semen
3	40 $\mu$ .l de semen
4	40 $\mu$ .l de semen
5	40 $\mu$ .l de semen

**Fuente:** Elaboración propia, Biología – UNSAAC (2014)

Para la aplicación de dilutores se empleó cinco tipos de diluyentes, entre los que se tiene:

En el primer experimento realizado se evaluó con los siguientes dilutores:

1) Dilutor A.- Agua proveniente del estanque cuya fracción fue: 9 ml agua corriente + 0.5  $\mu$ .l de semen.

2) Dilutor B.- Glucosa al 5% cuya fracción fue: 200 ml de Glucosa al 5% + 40 µl de semen.

3) Dilutor C.- Suero fisiológico al 0.07% cuya fracción fue: 100 ml de suero fisiológico al 0.07% + 40 µl de semen.

4) Dilutor D.- Suero fisiológico al 0.08% cuya fracción fue: 100 ml de suero fisiológico al 0.08% + 40 µl de semen.

5) Dilutor E.- Suero fisiológico al 0.09% cuya fracción fue: 100 ml de suero fisiológico al 0.09% + 40 µl de semen.

Para lo cual, se emplearon muestras obtenidas de las colecciones de eyaculados de semen procedentes de cinco machos, las cuales fueron divididas en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad.

### 3.4.6.- PREPARACION DE CRIOPROTECTORES

Aclaremos previamente el concepto de crioprotector:

**Crioprotector.**- Sustancia que se utiliza para proteger el tejido biológico del daño debido a la formación de hielo, dentro de los crioprotectores convencionales que vamos a utilizar se encuentran los glicoles (alcoholes que contengan al menos dos grupos hidroxilos), tales como el Etilenglicol, Propilenglicol, Glicerol y Dimetilsulfóxido (DMSO), es también considerado como un crioprotector convencional. El Glicerol y DMSO se han utilizado durante décadas para reducir la formación de hielo en el semen para su conservación en frío con nitrógeno líquido. La vinculación de hidrógeno en solución acuosa es importante para la correcta función de las proteínas y el ADN. Por lo tanto, como el crioprotector sustituye las moléculas de agua, el material biológico mantiene su estructura y función, a pesar de que ya no están inmersos en un medio acuoso. Dentro de los Crioprotectores a utilizar tenemos:

\* DMSO 5% (dimetilsulfóxido)

\* Etilenglicol 5%

\* Glicerol 7%

\* Metanol 5%

Obviamente, con el empleo de los crioprotectores se persigue la finalidad primordial de preservar la integridad celular particularmente la integridad de la membrana, se emplearon los siguientes crioprotectores:

**Cuadro N° 09: PREPARACION DE CRIOPROTECTORES**

N°	CRIOPROTECTOR	COMPONENTE 1	COMPONENTE 2	COMPONENTE 3	ANTIBIOTICO
1	METANOL 5%	Agua Destilada 100 ml.	Metanol 5% 5ml	-	-
2	DMSO 5%	Agua Destilada 100 ml.	Glucosa 5% 5 ml	DMSO 5% 5 ml	-
3	ETILENGLICOL 5%	Agua Destilada 100 ml.	Glucosa 5% 5 ml	ETG 5% 5 ml	Antibiótico (Penicilina 1'000.000 UI)
4	DMSO 5%	Agua Destilada 50 ml.	DMSO 5% 5 ml	-	-
5	DMSO 5% + YEMA DE HUEVO	Agua Destilada 50 ml.	Yema de Huevo 15 ml	DMSO	-
6	METANOL 5%	Agua Destilada 50 ml.	Metanol 5% 5 ml	Leche 50 ml	-
7	SUERO FISIOLÓGICO al 0.07%	Suero Fisiológico al 0.07% 50 ml.	-	-	-
8	SUERO FISIOLÓGICO al 0.08%	Suero Fisiológico al 0.08% 50 ml.	-	-	-
9	SUERO FISIOLÓGICO al 0.09%	Suero Fisiológico al 0.09% 50 ml.	-	-	Antibiótico (Penicilina 1'000.000 UI)
10	ETILENGLICOL 5%	Agua Destilada 100 ml.	ETG 8 ml.	Leche 50 ml	-
11	ETILENGLICOL 5%	Agua Destilada 100 ml.	ETG 8 ml	-	-
12	GLICEROL	Agua Destilada 100 ml.	Glicerol 5 ml	-	-

**Fuente:** Elaboración propia, Biología – UNSAAC (2014)

### 3.4.7.- APLICACION DE CRIOPROTECTORES SOBRE EL SEMEN A PRESERVAR

Los volúmenes de semen empleados para cada crioprotector fueron de 10 ml de crioprotector + 50  $\mu$ l de semen en cada uno de los casos y con las siguientes composiciones.

**Cuadro N° 10: COMPOSICION DE CRIOPROTECTORES SOBRE EL SEMEN A PRESERVAR**

N°	CRIOPROTECTOR	Cantidad de crioprotector	Cantidad de semen añadido	Total
1	METANOL 5%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
2	DMSO 5%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
3	ETILENGLICOL 5%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
4	DMSO 5%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
5	El crioprotector sufrió emulsión			
6	METANOL 5%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
7	SUERO FISIOLÓGICO al 0.07%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
8	SUERO FISIOLÓGICO al 0.08%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
9	SUERO FISIOLÓGICO al 0.09%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
10	ETILENGLICOL 5%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
11	ETILENGLICOL 5%	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml
12	GLICEROL	10 ml	50 $\mu$ l	10.05 ml

**Fuente:** Elaboración propia, Biología – UNSAAC (2014)

### 3.4.8.- CONGELACION

El semen ya mezclado con el crioprotector, fue vertido en las pajillas de 0.5 ml., (6 pajillas para cada crioprotector), cada pajilla fue sellada empleando como sellador alcohol polivinilico.

Las pajillas así selladas y dispuestas en canastillas metálicas (goblets), fueron introducidas en balones de Nitrógeno líquido a temperatura de -196 °C, donde permanecieron por un periodo de nueve meses. El proceso de congelamiento fue lento. El sumergimiento de las pajillas fue 1 cm por cada minuto. Una vez que la canastilla con su contenido de pajilla entraba en contacto con los vapores del nitrógeno líquido, la canastilla se dejó dentro del termo o balón de Nitrógeno líquido. El proceso de congelamiento duró de 8 a 10 minutos.

**Cuadro N° 11: CONGELACION**

N°	CRIOPROTECTOR	Cantidad de pajillas	Ubicación
1	METANOL 5%	06	Balón de Nitrógeno Líquido de 20 Litros de capacidad canastilla de color azul
2	DMSO 5%	06	
3	ETILENGLICOL 5%	06	
4	DMSO 5%	06	
5	Emulsión		
6	METANOL 5%	06	
7	S. FISIOLOGICO al 0.07%	06	Balón de Nitrógeno Líquido de 10 Litros de capacidad canastilla de color amarillo
8	S. FISIOLOGICO al 0.08%	06	
9	S. FISIOLOGICO al 0.09%	06	
10	ETILENGLICOL 5%	06	
11	ETILENGLICOL 5%	06	
12	GLICEROL	06	

**Fuente:** Elaboración propia, Biología – UNSAAC (2014)

### **3.4.9.- DESCONGELACION**

Previamente, al paso de la descongelación se procedió a preparar la solución activadora (Bicarbonato de Sodio al 1%, + Agua destilada 100 ml), el cual ayudara a prolongar el tiempo e intensidad de la motilidad del espermatozoide y con ello, su capacidad fecundante

- ✓ Las pajillas congeladas de acuerdo al procedimiento anterior fueron descongeladas en baño maría a una temperatura de 30 °C, en una operación sumamente rápida que consiste en la inmersión de la pajilla por un periodo de 30 segundos hasta 60 segundos.
- ✓ La descongelación también se realizó simplemente por inmersión en agua corriente a una temperatura 18 °C por tiempo similar al anterior.

Concluida la descongelación en cualquiera de las formas descritas, el semen contenido de cada pajilla fue vertido en una solución de 10 ml de bicarbonato de sodio al 1%, con la finalidad de activar la motilidad de los espermatozoides preservados

### **3.4.10.- EVALUACION DE LA VITALIDAD DEL SEMEN PRESERVADO**

El semen, vertido en el activador fue inmediatamente observado en el microscopio de contraste de fases, ósea el mismo que fue empleado para la sobrevivencia inicial.

La observación microscópica en este caso se realizó para evaluar o porcentualizar la sobrevivencia al final del proceso de criopreservación.

**Cuadro N° 12: COMPOSICION DE CRIOPROTECTORES Y ACTIVADOR**

La denominación y la forma de uso de activador y pajillas criopreservadas para una descongelación del semen criopreservado a 30 °C se muestra en el siguiente cuadro:

N°	Denominación del crioprotector	Contenido de la pajilla	Activador Bicarbonato al 1%	Numero de pajillas utilizadas
1	MET	0.5 ml	10 ml	2
2	DMSO + glucosa	0.5 ml	10 ml	2
3	ETG + glucosa	0.5 ml	10 ml	2
4	DMSO	0.5 ml	10 ml	2
5		Emulsión		
6	MET	0.5 ml	10 ml	2
7	S.F al 0.07%	0.5 ml	10 ml	2
8	S.F al 0.08%	0.5 ml	10 ml	2
9	S.F al 0.09%	0.5 ml	10 ml	2
10	ETG	2.5 ml	10 ml	2
11	ETG	0.5 ml	10 ml	2
12	GLI	0.5 ml	10 ml	2

**Fuente:** Elaboración propia, Biología – UNSAAC (2014)

**Cuadro N° 13: DE LA COMPROBACION DE LA VITALIDAD DEL SEMEN PRESERVADO**

La denominación y la forma de uso de activador y pajillas criopreservadas, para una descongelación en agua de manante a 18 °C, se muestra en el siguiente cuadro:

N°	Denominación del crioprotector	Contenido de la pajilla	Activador Bicarbonato al 1%	Numero de pajillas utilizadas
1	MET	0.5 ml	10 ml	2
2	DMSO + glucosa	0.5 ml	10 ml	2
3	ETG + glucosa	0.5 ml	10 ml	2
4	DMSO	0.5 ml	10 ml	2
5	Emulsión			
6	MET	0.5 ml	10 ml	2
7	S.F al 0.07%	0.5 ml	10 ml	2
8	S.F al 0.08%	0.5 ml	10 ml	2
9	S.F al 0.09%	0.5 ml	10 ml	2
10	ETG	2.5 ml	10 ml	2
11	ETG	0.5 ml	10 ml	2
12	GLI	0.5 ml	10 ml	2

**Fuente:** Elaboración propia, Biología – UNSAAC (2014)



### **3.4.11.- FECUNDACION CON EL SEMEN PRESERVADO**

Prueba realizada el 25 de Julio del 2014, para tal efecto se dispuso de dos hembras estabuladas en los estanques del Centro Experimental La Raya, que se encontraban a punto de desove.

Se procedió al desove de dichas hembras y simultáneamente al descongelamiento del semen criopreservado.

Los óvulos obtenidos por masaje abdominal fueron recepcionados en recipientes de material inoxidable e inmediatamente fecundados por el semen descongelado. Habiéndose empleado dos reproductores hembras, los óvulos provenientes de cada una de ellas fueron fecundadas, por un ml de semen criopreservado, en cada caso.

En ambos casos los óvulos fecundados, ya en condición de huevos o cigotos fueron extendidos en sus respectivos bastidores de incubación y acondicionados en las artesas hechas de madera con las que usualmente trabaja el personal del centro experimental.

### **3.5.- ANALISIS DE DATOS**

Por la naturaleza de la investigación y las limitaciones relacionadas además de las limitaciones con la disponibilidad de reproductores el tratamiento numérico está referido solamente a la porcentualización del preñamiento (fecundación).

## IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1.- RESULTADOS CUALITATIVOS

- Relacionando eficiencia de los crioprotectores con los niveles de preñamiento (fecundación), los mejores resultados corresponden a los del semen crio-preservedo con tratamiento previo de Glicerol como crioprotector.
- De las dos hembras utilizadas para la obtención de óvulos, si bien ambas presentaban similitud de talla y peso, sin embargo, los óvulos obtenidos por masaje abdominal fue sustancialmente diferente cualitativa y cuantitativamente.
- En lo cualitativo, una de ellas, de la que se obtuvo la menor cantidad de óvulos, estos gametos eran claramente más pequeños comparado con las de la otra hembra, e igualmente, la coloración de un amarillo tenue y poco brillante, características que permiten deducir que esos óvulos eran prácticamente los residuales del desove que ya habría ocurrido en esa hembra, cuyo proceso gameto genésico habría estado caracterizado por una maduración asincrónica.
- En la fecundación, entre óvulos obtenidos al momento y los espermatozoides criopreservados, la mejor viabilidad correspondió, al de la hembra con mayor cantidad de óvulos y mejor calidad de los mismos. En cambio en la otra el preñamiento (fecundación), fue menos eficiente, advertible por el blanqueamiento de los óvulos luego de unos minutos de haberse realizado la fecundación defeción que no se advirtió en la fecundación de la hembra de mejor rendimiento.
- Con los óvulos así diferenciados, obviamente, la fecundación no alcanzaría, los mismos niveles de preñamiento.
- A lo largo del tiempo de incubación, observado solo durante los primeros días, la menor mortalidad corresponde a las ovas provenientes a la hembra de mayor cantidad de óvulos y mejor calidad de los mismos.

#### 4.2.- RESULTADOS CUANTITATIVOS

En la evaluación del efecto de los dilutores sobre los porcentajes de motilidad progresiva y de espermatozoides vivos, se obtuvo los siguientes resultados.

##### Caracterización del semen

Con una muestra de quince ejemplares:

**Cuadro N°14:** Volumen de semen

Ejemplar	Volumen de semen ml (1ra muestra)
1	9
2	8.5
3	8
4	9
5	8
<b>Promedio</b>	<b>8.5</b>
	Volumen de semen ml (2da Muestra)
1	7
2	7.5
3	7
4	7.5
5	7
<b>Promedio</b>	<b>7.2</b>
	Volumen de semen ml (3ra muestra)
1	5.5
2	4.5
3	5
4	5
5	4.5
<b>Promedio</b>	<b>4.9</b>

**Promedio de Promedios= 6.9 ml**

**Fuente:** Elaboración propia; Biología –UNSAAC (2014)

**Cuadro N° 15:** Caracterización seminal

Características	Resultados
Aspecto	Lechoso denso
Motilidad	95%
Morfología Normales	92%
Defectos de la cabeza	2%
Defectos en la cola	4%
Supervivencia	96%

**Fuente:** Elaboración propia; Biología –UNSAAC (2014)

### CONCENTRACIÓN

Entendida como cantidad de espermatozoides por mililitro de semen donde se obtuvo un valor de  $5,494 \times 10^9$

### APLICACIÓN DE DILUTORES

En orden decreciente porcentualizado con relación a la supervivencia:

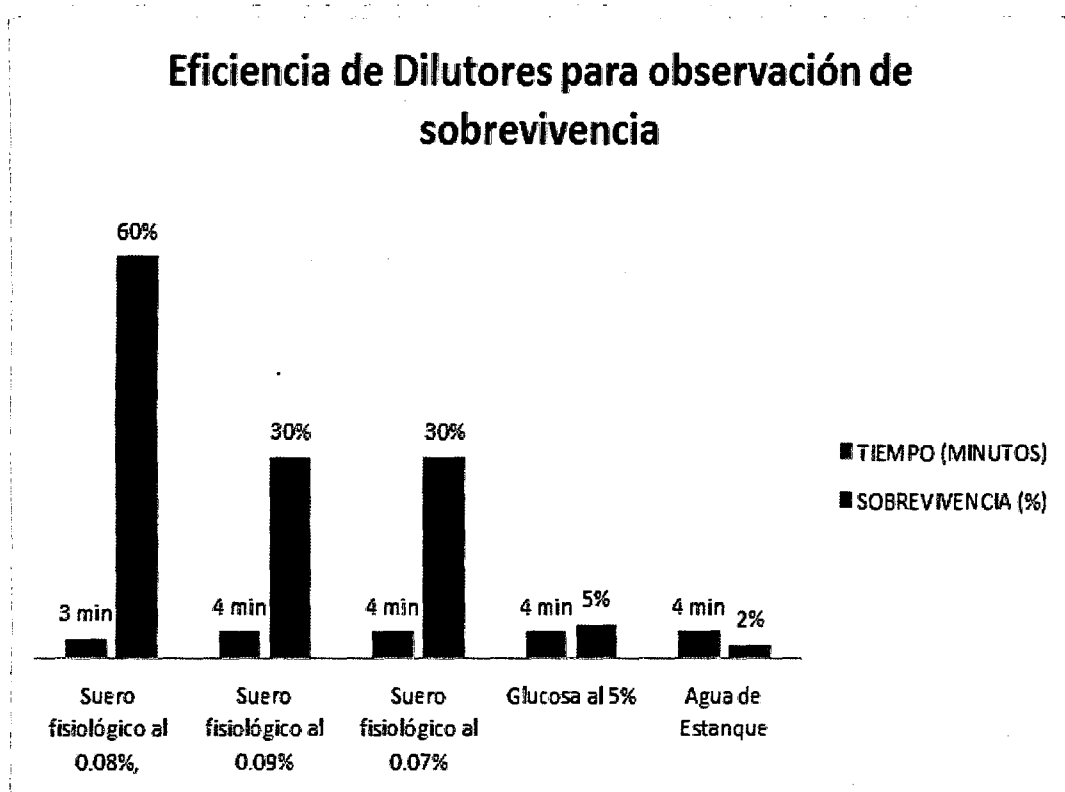
**Cuadro N°16:** Eficiencia de Dilutores para observación de sobrevivencia

Dilutor	Tiempo (minutos)	Sobrevivencia (%)
Suero fisiológico al 0.08%,	3	60
Suero fisiológico al 0.09%	4	30
Suero fisiológico al 0.07%	4	30
Glucosa al 5%	4	05
Agua de Estanque	4	02

**Fuente:** Elaboración propia; Biología –UNSAAC (2014)

La mayor eficiencia como dilutor, corresponde al suero fisiológico a diferentes concentraciones y dentro de ella a la de 0.08%, se entiende entonces que en términos de salinidad, el semen debe de mostrar similar valor, toda vez que la mejor dilución es aquella en que dilutor y el material diluido, en este caso el semen, sean iguales o similares en salinidad, conforme está expuesto en Dilutores Suero Fisiológico (Zurita 2004).

**Histograma N° 01:** Eficiencia de Dilutores para observación de sobrevivencia



**Fuente:** Elaboración propia; Biología –UNSAAC (2014)

### APLICACIÓN DE CRIOPROTECTORES SOBRE EL SEMEN A PRESERVAR

La dilución empleada entre el crioprotector y el semen fue de 1 en 200 (10 ml de crioprotector y 0,05 ml de semen).

\* Observación.- En la combinación del crioprotector número cinco este se emulsifico, lo que quiere decir que es una mezcla de líquidos inmiscibles, por lo que no pueden mezclarse, como en el caso del DMSO y la Yema de Huevo.

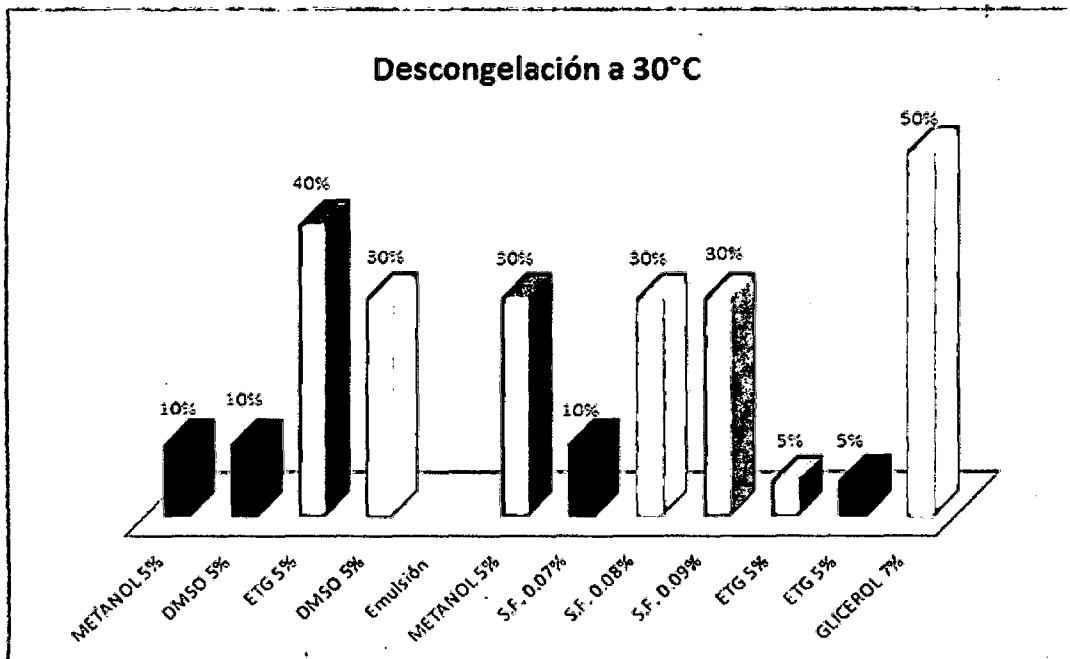
### EVALUACION DE LA VITALIDAD DEL SEMEN PRESERVADO

**Cuadro N° 17:** Se obtuvo los siguientes resultados a 30 °C, para la descongelación.

N°	CRIOPROTECTOR	%MOTILIDAD
1	METANOL 5%	10
2	DMSO 5%	10
3	ETG 5%	40
4	DMSO 5%	30
5	Emulsión	
6	METANOL 5%	30
7	S.F. 0.07%	10
8	S.F. 0.08%	30
9	S.F. 0.09%	30
10	ETG 5%	05
11	ETG 5%	05
12	GLICEROL 7%	50

**Fuente:** Elaboración propia; Biología –UNSAAC (2014)

Histograma N° 02: Descongelación a 30°C



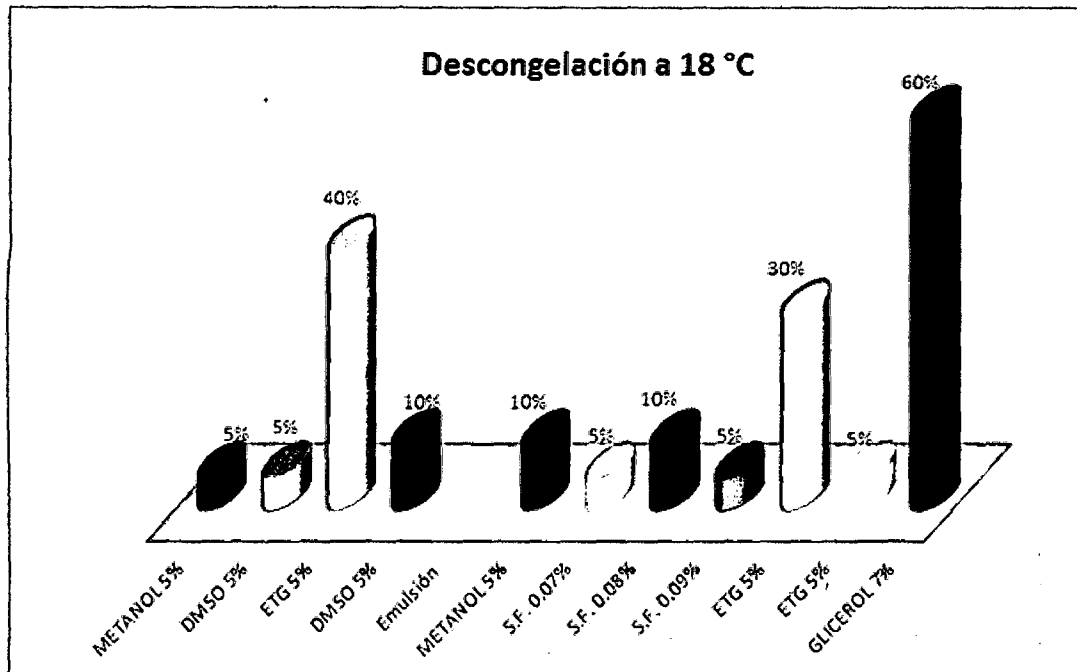
Fuente: Elaboración propia; Biología –UNSAAC (2014)

Cuadro N° 18: Se obtuvo los siguientes resultados a 18 °C, para la descongelación

N°	CRIOPROTECTOR	%MOTILIDAD
1	METANOL 5%	5
2	DMSO 5%	5
3	ETG 5%	40
4	DMSO 5%	10
5	Emulsión	
6	METANOL 5%	10
7	S.F. 0.07%	5
8	S.F. 0.08%	10
9	S.F. 0.09%	5
10	ETG 5%	30
11	ETG 5%	5
12	GLICEROL 7%	60

Fuente: Elaboración propia; Biología –UNSAAC (2014)

**Histograma N° 03: Descongelación a 18 °C**



Con relación al contenido de los cuadros 16 y 17, la vitalidad expresada a través del porcentaje de motilidad, se observa que corresponde al glicerol la mayor eficiencia, obsérvese que el glicerol en ambos casos está al 7% de concentración, sin embargo la motilidad alcanza porcentajes distintos, situación atribuible a la variable temperatura, que permite concluir que una relación directa entre esta y motilidad.

### **DE LA FECUNDACION**

Con 2500 óvulos, obtenidos de una hembra de 2.3 Kg de peso y con semen preservado en la siguiente combinación:

Componente 1	Componente 2	Cantidad de semen	Prendimiento
Agua destilada 100 ml	Glicerol 7% 5ml	50 µl de semen	100%

Con 436 óvulos, obtenidos de una hembra de 1.9 Kg de peso y con semen preservado en la siguiente combinación



Componente 1	Componente 2	Cantidad de semen	Prendimiento
Agua destilada 100 ml	Etilenglicol 5% 5 ml	50 µl de semen	91.5%

La diferencia en los porcentajes de prendimientos o fecundación, provienen de la calidad, de los reproductores hembras, puesto que la de 2.3 Kg de peso, mostraba el producto sexual (óvulos), en condiciones de plena madurez, mientras que en la otra hembra de 1.9 Kg de peso esos mismos gametos (óvulos); habrían sobrepasado el momento de mejor madurez observándose algunos iniciándose su reabsorción. En tal situación obviamente el mejor prendimiento ocurre con los óvulos a plena madurez y en mejor estado de vitalidad.

Con relación, a este mismo aspecto, sirva advertir que cuantitativamente la producción de óvulos en las dos hembras es altamente deficitaria, como se demuestra a continuación con la prueba de chi cuadrado, sin embargo en términos cualitativos los óvulos producidos por estas dos hembras con distintos grados de madurez, resultan viables en una más que en la otra, para la respectiva fecundación. Se consideró deficitario la producción de óvulos bajo el antecedente conocido por teoría y experiencia con relación a la fecundidad de la trucha arco iris que las hembras por cada 500 gr. de peso corporal deben de producir aproximadamente 1000 óvulos.

Chi -Cuadrado: Prueba de concordancia

$$X^2 = \sum (O_i - E_i)^2$$

Clases	O	E	D= (O-E)	D <sup>2</sup> /E
1	2500	4600	2100	958.69
2	436	3800	3364	2978.03
	$\bar{O} = 1468$	$\bar{E} = 4200$		$X^2 = 3937$

Dónde:

O= Observado

E= Esperado

D= Diferencia

Por lo que:

$$X^2_{0,01}(1) = 6.635$$

$$X^2 = 3937 > X^2_{0,01}(1) = 6.635 **$$

### 4.3.- DISCUSIÓN

Toscano R. – Meza, A. (2011), En Conservación de Semen de *Oncorhynchus mykiss*, mediante técnica de congelación, mencionan a Terner y Korsh (1986), que enfatizan un mínimo de retraso entre la dilución y la observación, antecedente que queda confirmado en nuestro trabajo, tal como puede observarse en el cuadro N° 15.

A partir del antecedente citado y confirmado en nuestra investigación, concluimos entonces, es que existe una relación inversa, entre la dilución y la observación; mas explícitamente cuanto más tiempo transcurre (minutos), la observación permite ver determinar, que disminuye el porcentaje de sobrevivencia evaluada a través de la motilidad.

La concentración espermática ( $5,494 \times 10^9$  ml), encontrados en el presente trabajo, fueron cercanos a los resultados obtenidos por Velezvia J. (2011), en la misma especie, con una concentración de  $5,300 \times 10^9$  ml.

Los resultados de movilidad post congelación, utilizando como crioprotector al metanol (10% de motilidad), determinados en el presente estudio, contrastan con otras especies en la cuales sean podido reportar motilidad post congelación, muy bajas como los reportados por Guarnizo M. (2007), en bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* – Linnaeus 1766), cuya motilidad post descongelación utilizando el metanol como crioprotector fue de 8 a 10%. Para ambos estudios se utilizó el bicarbonato como activador.

La eficiencia de los dilutores, evaluados a través de una mayor o menor dilución del semen y que guarda relación directa con la concentración del suero fisiológico, siendo así para nuestro caso la concentración de mejor rendimiento corresponde a 0.08% que podríamos admitirlo como optimo toda vez que a 0.07 y 0.09%, la dilución es de inferior calidad. Téngase en cuenta que la bondad de los dilutores, se mide también a través de la sobrevivencia de los gametos por un mayor espacio de tiempo; tal sobrevivencia en la concentración, 0.08% es del 60% en 3 minutos, más allá de este tiempo la sobrevivencia va disminuyendo notoriamente.

Sobre la eficiencia de los crioprotectores la mejor corresponde a la combinación Glicerol con agua destilada. Después de nueve meses de criopreservación, inmediatamente después

del descongelamiento se calculó un 60% de sobrevivencia y en el paso final, correspondiente a la fecundación esta llegó a un 100%, con el semen así preservado. Aquí hay que remarcar que no siempre los criopreservados constituidos por mayor cantidad de componentes aseguran los mejores rendimientos, como queda demostrado en el presente trabajo, donde la diferencia entre el primer y segundo crioprotector fue del 20%.

El mejor porcentaje de fecundación tiene que ver también con la calidad de los óvulos y estos a su vez, dependen del estado de vitalidad de la hembra; en este caso los óvulos de mejor calidad, corresponden a una hembra con mejor estado de vitalidad, cuyos gametos aparecen con características de mejor color y mayor diámetro. Esta mejor calidad de gametos el mayor porcentaje de fecundación se manifiestan también a lo largo de la incubación, donde los porcentajes de mortalidad son menores comparativamente.

El volumen promedio de semen es de 8.5 m.l. proveniente de la obtención de cinco machos maduros, no diferencia mucho de lo que con frecuencia se obtienen en trabajos de esta naturaleza en diversos centros piscícolas del Perú con un promedio que alcanza a 10 ml, que provienen de machos en mejor estado de vitalidad y mantenidos en mejores estados de temperatura.

El semen con las características anotadas corresponde prácticamente a un semen normal; las defeciones en la cabeza y en la cola de los espermatozoides, pueden ser atribuibles a la calidad del reproductor del cual provienen, el mismo que parece no haber recibido, el tratamiento adecuado en los meses inmediatamente anteriores al desove, como el referido a la alimentación con refuerzo de proteínas de origen animal. Por otra parte esas defeciones en cabeza y cola trasuntan también alguna manifestación de endogamia, toda vez que esa población estabulada en las instalaciones de La Raya no ha sido motivo de cruzamientos con otras poblaciones; en definitiva se debe admitir que ya viene ocurriendo una erosión genética.

La ocurrencia de la fertilidad con un 100% de efectividad (prendimiento), proviene por una parte de la calidad de los óvulos, particularmente en su aspecto de madurez, lo que en gran medida facilita la materialización de la fecundación, la misma que debe de considerarse

como tal una vez que ha ocurrido la unión de los dos núcleos inmediatamente después de la penetración del espermatozoide en el óvulo.

## CONCLUSIONES

- La criopreservación de semen de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*), siguiendo el protocolo observado para la criopreservación del semen de camélidos sudamericanos, permite la caracterización en sus aspectos de volumen, morfología y motilidad.
- La eficacia de los diversos diluyentes y crioprotectores, ocurren con diferentes niveles de eficacia, pero sí con la ventaja de que todos ellos, son accesibles en el mercado local.
- La motilidad y la viabilidad del semen criopreservado, se hacen evidentes, toda vez que se consiguió un alto porcentaje de fecundación sobrepasando el 90% de efectividad.
- Se demuestra la eficiencia, del protocolo seguido, toda vez que la capacidad de fecundación de los espermatozoides se manifiestan después de un largo periodo de congelamiento.

## RECOMENDACIONES

- Considerando que las diversas investigaciones llevadas a cabo sobre criopreservación, observan y/o ejecutan protocolos diversos, obteniéndose resultados por lo menos similares, **se recomienda estandarizar de manera puntual, el protocolo correspondiente para la criopreservación de semen de peces.**
- Para imprimir un nivel más técnico a la práctica de la piscicultura en nuestro medio resulta recomendable que se lleve a cabo fecundaciones de óvulos preservados en soluciones isotónicas y espermatozoides conservados por criopreservación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aguilar, M. 2010: "Inducción a la maduración gonádica y conservación del esperma de la trucha de san pedro mártir *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann)". Tesis para optar el título de Doctor en Ecología Molecular y Biotecnología, Universidad Autónoma de Baja California – D.F. México.
2. Alavi S.M.H. y J. Cosson. 2006: Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30: 1-14.
3. Anchordoguy T. 1991: "Insights into the cryoprotective mechanism of dimethylsulfoxide for phospholipid bilayers". *Cryobiology*. 28:467-473p.
4. Babiak J., Glogowski M., Luczynski D., Kucharczyk K. y Luczynski M. 1995: "Cryopreservation of the milt of the northern pike". *Journal of Fish Biology*. Department of Animal Biochemistry. Fisheries and Basic Fishery Sciences, Olsztyn. Poland. 819-828p.
5. Babiak J., Glogowski M., Luczynski M. y Demianowicz. 1999: "The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology*. 52:473- 479p. Poland.
6. Bastardo Hilda *et al.* 2008: "Características del semen de trucha arco iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida" – Venezuela.
7. Bearden H. y Fuquay J. 1982: "Reproducción animal aplicada. Ed. Manual Moderno. 167-185p.
8. Bencic DC, JG Cloud, RL Ingermann. 2000: Carbon dioxide reversibly inhibits sperm motility and fertilizing ability in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 23, 275-281.
9. Billard, R.: Burzawa, Gerard, E. 1970: "Regeneration de la spermatogenese du Cyprin hypophysectomise *Carasius auratus* L. par un facteur gonadotrope hautement purifie de carpe. C. R. Acad. Sci., 271, 1896-1899. Francia.



10. Billard, R.; Breton, B. 1971: "La production spermatogenetique chez la truite. Ann. Biol. Bioch. Biophys, 11(2) 199-212. Francia.
11. Billard, R. Jallabert, B. 1974: "Las células de Sertoli des poissons teleosteens. I. Etude ultrastructurale. Ann. Biol. Anim. Bioch. Bioph., 12, 19-32. Francia.
12. Billard, R. Szollosi, D. 1974: "Artificial insemination in trout using a sperm diluant, Symposium on the early life history of fish. Francia.
13. Billard, R. 1978: "Testicular feed back on the hypothalamo- pituitary axis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.), Ann. Biol. Bioch. Biophys, 18(4) 813-818. Francia.
14. Billard, R.; Marcel, J. 1981: "Survie post mortem des gametes de truite fario. *Salmo trutta fario*. Can. J. Zool., 59, 29-33.
15. Billard, R. Legendre, M. 1982: "Conservation a court terme des gametes de truite arc-en-ciel en condition in vitro sous atmosphre d'oxigene. Bull. Fr. Piscic. 284, 162-167. Francia.
16. Billard, R. 1990: "La discusión de algunos datos sobre la espermatogénesis de peces y las condiciones de fertilización de los espermatozoides y la adaptación en diversos ámbitos", *La piscicultura francesa*, Francia.
17. Billard R., Cosson J., Crim L.W. y Suquet M. 1995: "Sperm Physiology and Quality. in N.R. Bromage and R.J. Roberts, Editors. Broodstock management and eggs and larval quality". *Blackwell Science*, Cambridge UK. 25-52p.
18. Boiso, I. 2001: "Principios básicos criobiología". *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 18: 127 – 131.
19. Bratanov, C. Dikov, V. 1961:"Certaines particularites du sperma chez les poissons. In 4e Congress. *Reprod. Anim.*, 895-897. The Hague.
20. Buckmann, A. 1929: "De. Methodik fischereibiologischer Untersuchungen an Meeresfischen. *Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, 9 (6, 1). Berlin, Urban und Schwarzenberg. 194 p.

21. Cabrita E., F. Soares, J. Beirão, A. García-López, G. Martínez-Rodríguez y M.T. Dinis. 2011. Endocrine and milt response of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, males maintained in captivity. *Theriogenology*, 75(1): 1-9.
22. Cabrita E., Alvarez R., Anel L., Rona K. y Herraez M. 1998: "Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. Department of cellular biology and anatomy. Pathology Animal, University of Leon, Spain; and fisheries department, food and agriculture organization. Italy. 245-253p. España.
23. Cachafeiro, B. M. 1995: "La Trucha Cría Industrial", Madrid, Barcelona, Mexico.
24. Ciereszko A., Głógowski J. y Dabrowski K. 2000: "Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. Cryopreservation in Aquaculture Species". Tiersch T.R. and Mazik P.M. Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 20-48p.
25. Clemens, H., Blake Grant, F. 1965: "The seminal thinning response of carp and rainbow trout after injections of pituitary extracts. *Copeia*, 2. 174-177.
26. Cohen, J. 1977: "Reproduction", London & Boston.
27. Cosson J, R Billard, C Cibert, C Dreanno, M Suquet. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C (ed). *The Male Gamete: From basic knowledge to clinical applications*. Cache RiverPress, Paris, France, Pp 161-186.
28. Cruz-Casallas P.E., Medina-Robles V.M. y Velasco-Santamaría Y.M. 2006: "Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*)". *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 19. No 2. 152-159p.
29. Darszon A, P Labarca, N Takuya, F Espinoza. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 79, 486-502.
30. Deppe M., Ortloff C., Salinas G., Bravo D., y Sanchez R. 2003: "Effect of cryoprotectant substances on acrosome preservation". *International Journal of Morphology*. Universidad de la Frontera. Temuco (Chile). Vol. 21. No. 2.

31. Dorier, A. 1949: "Conservation de la vitalite et du pouvoir fecondant des spermatozoides des truites arc-en-ciel. Lab. Hydrobiol. Univ. Grenoble 75-85.
32. Espinoza, C. M. 2003: "Alteraciones morfológicas y fisiológicas en espermatozoides criopreservados *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) Concha de Abanico". Tesis para optar el título profesional de Biólogo. Universidad Mayor de San Marcos, Lima – Perú.
33. Friborough, J. Soloff, B. L. 1976: "Scanning electron microscopy of the rainbow trout spermatozoon". Proc. Ark. Acad. Sci., 30, 41-43.
34. Gallant R. y Richardson G. 1993: "Comparison of different extenders for the cryoprsvervation of Atlantic Salmon spermatozoa". Theriogenology. 40: 479-486p.
35. Garzón, V.D. 2007: "Inducción hormonal de la espermiación y criopreservación de esperma en anguila europea (*Anguilla anguilla*)". Tesis para optar el título de Doctor, Universidad Politecnica de Valencia – España.
36. Gieger, N. 1955: "Elektronenoptische untersuchungen am Salmonidsperma. Rev. Suisse. Zool., 62, 325-334, Germany.
37. Graybill, J. Horton, H. 1969: "Limited fertilisation of steelhead trout eggs with cryopreserved sperm". USA.
38. Graham E. 1978: "The integrity of frozen spermatozoa". 1-14p.
39. Guarnizo, M. 2007: "Caracterización seminal y ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* - Linnaeus 1766)". Tesis para optar el título de Zootecnista, Universidad Nacional de Colombia. Palmira – Colombia.
40. Hamamah S. y Gatti J.L. 1998: "Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. Hum. Rep. Vol. 13. Supl. 4. 20 -30p.
41. Henderson, N. E. 1967: "The urinary and genital systems of trout". J. Fish. Res. Bd. Canada, 24 (2), 447-449.

42. Hernández, S.R. Et Al. 2013: "Metodología de la Investigación para Bachillerato enfoque por competencias", Universidad de Celaya, D.F. México.
43. Holt W. 2000: "Basic aspects of frozen storage of semen". *Animal Reproduction Science*. 62: 3-22p.
44. Honda, H. 1980: "Female sex pheromone of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, involved in courtship behavior". *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1109-1112.
45. Honeyfield D.C. y Krise W.F. 2000: "Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. En: Tiersch T.R. y Mazik P.M. (Eds.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 49-58p.
46. Jiménez JA, Hughes KA, Alaks G, Graham L, Lacy RC. 1994: "An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat". *Science* 266 (5183): 271-3.
47. Kavamoto E.T., Fogli Da Silveira W., Rigolino M.G. y Carvalho Fihlo C. 1985: "Evaluación macro e microscópica do sêmen da truta Arco Iris, *Salmo irideus* Gibbons. Boletim do Institut de Pesca. 12(3): 73-81p. Brasil.
48. Kho K.H., M. Morisawa y K.S. Choi. 2005: "Cell signaling mechanisms of sperm motility in aquatic species". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(3): 665-671.
49. Kime D.E., K.J.W. Van Look, B.G. McAllister , G. Huyskens, E. Rurangwa y F. Ollevier. 2001: "Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130: 425-433.
50. Lacuta L. L. 1996: "Evaluación de semen refrigerado de camélidos *Lama pacos*, con tres tipos de Dilutores", UNSAAC-Cusco.
51. Lagler, *et Al.* 1999: "Ictiología", Madrid.
52. Lahnsteiner F. y Patzner R.A. 1998: "Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops* *Diplodus sargas*, *Mullus barbatus* and *trachurus*. USA.

53. Lahnsteiner F. 2000: "Introduction to the special issue on cryopreservation of gametes in aquatic species. *Aquacul. Res.* Vol. 31. 229p.
54. Lley, N. R. and Stacey, N. E. 1983: "Hormones, pheromones and reproductive physiology. Hoar, W. S. Vol. IX, 1-63, Academic Press, New York.
55. Lichtenstein, G. 2009: "Desarrollo e implementación de técnicas para la criopreservación de esperma de pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*)". Universidad de Belgrano – Argentina.
56. Marcel, J., Billard, R. 1982: "Conservation des gametes de truites arc-en-ciel et fario en conditions in vitro et post mortem. Francia.
57. Martínez, S. 2008: "Bases para la elaboración de bancos de germoplasma de peces: aplicación a la trucha leonesa". Tesis para optar el título de Doctora, Universidad de León – España.
58. Medina-Robles V.M., Velasco-Santamaría Y.M. y Cruz-Casallas P.E. 2005: "Aspectos generales de la crioconservación espermática es peces teleósteos". Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* Vol. 181. Villavicencio (Colombia). 34-48p.
59. Ministerio de la Producción. 2010: "Elaboración de Estudios de Mercado de la trucha en Arequipa, Cusco, Lima, Huancayo y Puno". Lima – Perú.
60. Morisawa M. y Susuki K. 1980: "Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts". *Science.* Vol. 210. 1145-1147p.
61. Morisawa M., susuki K., Morisawa S. y Yasuda K. 1983: "Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes". *J. Exp. Biol.* Vol. 107. 95-103p.
62. Morisawa M. 1985: "Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts". *Zool. Sci.* Vol. 2. 605-615p.

63. Morisawa M. 1994: "Cell signaling mechanism for sperm motility". Zoo. Sci. Vol. 11. 647-662p.
64. Mounib, M. 1978: "Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa.
65. Municipalidad Distrital de Ragash. 2009: "Manual de Crianza de truchas" Ragash – Perú.
66. Neira J., Cruz-Casallas P.E., Jiménez J. y Muños D. 1992: "Caracterización y congelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)" P 141-14. Programa Nacional de Ciencia y Tecnología del mar- Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura. 141-146p.
67. Oda S. y Morisawa M. 1993: "Rises of intracellular Ca<sup>2+</sup> and pH mediate the initiation of sperm motility by hypoosmolality in marine teleosts". Cell. Motil. Cytoskel. Vol. 25. 171-178p.
68. Oota J.; Yamamoto, K. 1966: "Interstitial cells in the immature testes of the rainbow trout", Japon.
69. Ott, A.; Horton H. 1971: "Fertilisation of steelhead trout eggs with cryopreserved sperm. Canada.
70. Paniagua C., J. Jenkins, M. Segovia y T. Tiersch. 2006: "Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use fluorescent dyes". Cryobiology, 53: 128-138.
71. Pillay, T. 2004: "Acuicultura Principios y Prácticas". D.F. México: Noriega.
72. Rall, W. F.; Fahy, G. M. 1985: "Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification". Nature. 313: 573- 575.
73. Ramos S. 1986: "Anotaciones sobre inseminación artificial". Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá.
74. Runstron et al. 1944: "Gametes from the sperm of sea-urchin and salmon. Nature, 153, 285-286. London.

75. Rurangwa E., Volckaert F.A.M., Huyskens Kime G.D.E. y Otlevier F. 2001: "Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*)", *Theriogenology*. 55:751-769p.
76. Sánchez - Rodríguez, H.; et Al. 1978: "The spermiation period in the rainbow trout. Plasma gonadotrophin and androgen levels, sperm production and biochemical changes in the seminal fluid. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys*, 18, 943-948.
77. Schiavone R., L. Zilli, S. Vilella y C. Fauvel. 2006: "Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1-year-old European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Assessment of sperm quality". *Aquaculture*, 255(1-4): 522-531.
78. Shlafer M. 1981: "Pharmacological considerations in cryopreservation. Organ Preservation for Transplantation". Segunda edición. 177-212p.
79. Scott, A. Baynes, S. 1980: "A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Biol.*, 707-739. London.
80. Soudakevic, T. 1874: "Report on the progress of pisciculture in Russia".
81. Stein, H.; Bayle, H. 1978: "Cryopreservation of the sperm of some fresh water teleost".
82. Stoss, J. et al. 1978: "Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.), sperm. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys*. 1077- 1082.
83. Suquet M., Dorange G., Omnes M.H., Normant Y., Le Roux A. y Fauvel C. 1993: "Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*)". *Journal of Fish Biology*. 42: 509- 516p.
84. Szollosi, D. et Al. 1978: "Postovulatory changes in the theca folliculi of the trout" *Ann. Biol. Anim Bioch. Biophys.*, 18 (4) 883-891.
85. Tiersch T. 1998: "Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker". *Trans. Am. Fish. Soc.* 127: 95-104p.

86. Toscano R. – Meza, A. 2011: "Conservación de Semen de *Oncorhynchus mikiss*, mediante técnica de congelación" Huancayo-Perú.
87. Toth G.P., Ciereszko A., Christ S.A. y Dabrowski K. 1997: "Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions". *Aquaculture* 154: 337-348p.
88. Trouson, A. 1986: "Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril.* 4: 1 –12.
89. Valdebenito *et al.* 2009: "Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados" Temuco – Chile.
90. Velezvia Díaz J. D. 2011: "Estudio experimental del proceso de criogenización de semen de trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*) con fines reproductivos en el CIPP-Chucuito"- Puno – Perú.
91. Weisel, G. F. 1943: "A Histological study of the testes of the Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*)". *J. Morphol.* Vol. 73 (2). 207-227. 1943.
92. Woolsey J, M Holcomb, J Cloud, R Ingermann. 2006: "Sperm motility in the steelhead *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): influence of the composition of the incubation and activation media". *Aquac Res* 37, 215-223.
93. Yamasaky, F.: Donaldson, E. M. 1968: "The spermiation of goldfish as a bio-assay for salmon gonadotropin". *Gen. Comp. Endocr.*, 10, 383-391.
94. Yao Z., Crim L., Richardson B. y Emerson C. 1999: "Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout *Macrozoarce americanus* L. Sperm after cryopreservation". Ocean Science Center and Department of Biology. Newfoundland (Canada). 361-375p.
95. Zurita, S. 2004: "Manual de procedimientos de laboratorio del instituto nacional de salud"- Ministerio de Salud- Perú.



ANEXOS  
FOTOGRAFIAS TOMADAS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA  
CRIOPRESERVACION



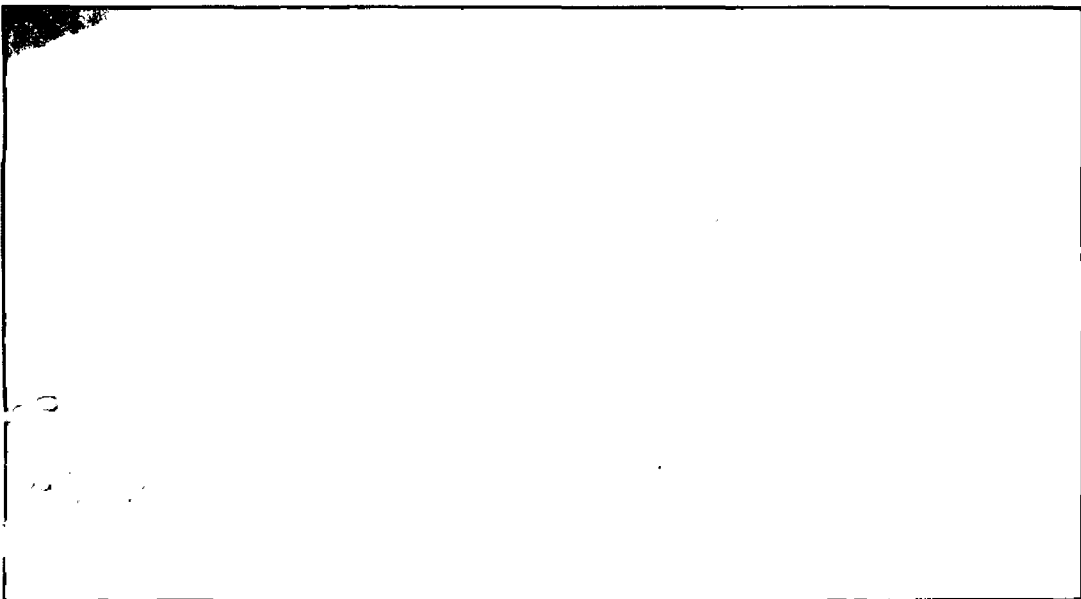
Fotografía 01.- Área de Estudio Centro Experimental La Raya - UNSAAC



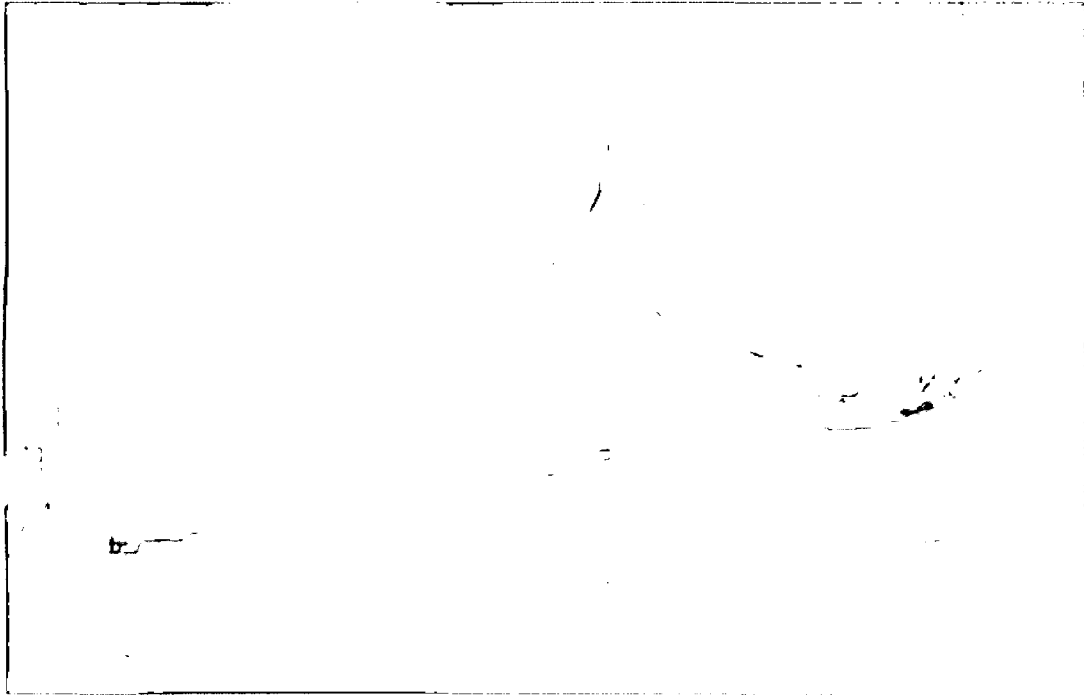
Fotografía 02.- Pesado de uno de los especímenes de Trucha arco iris



Fotografía 03.- Entallado de uno de los especímenes de Trucha arco iris



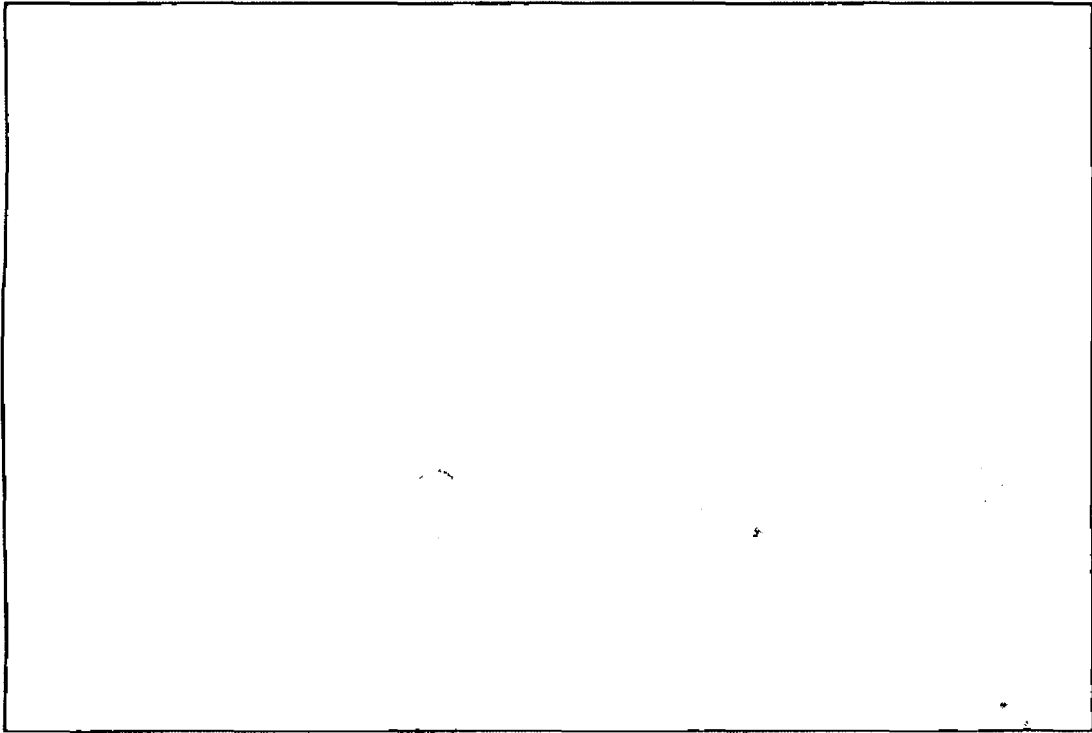
Fotografía 04.- Gónadas sexuales masculinas



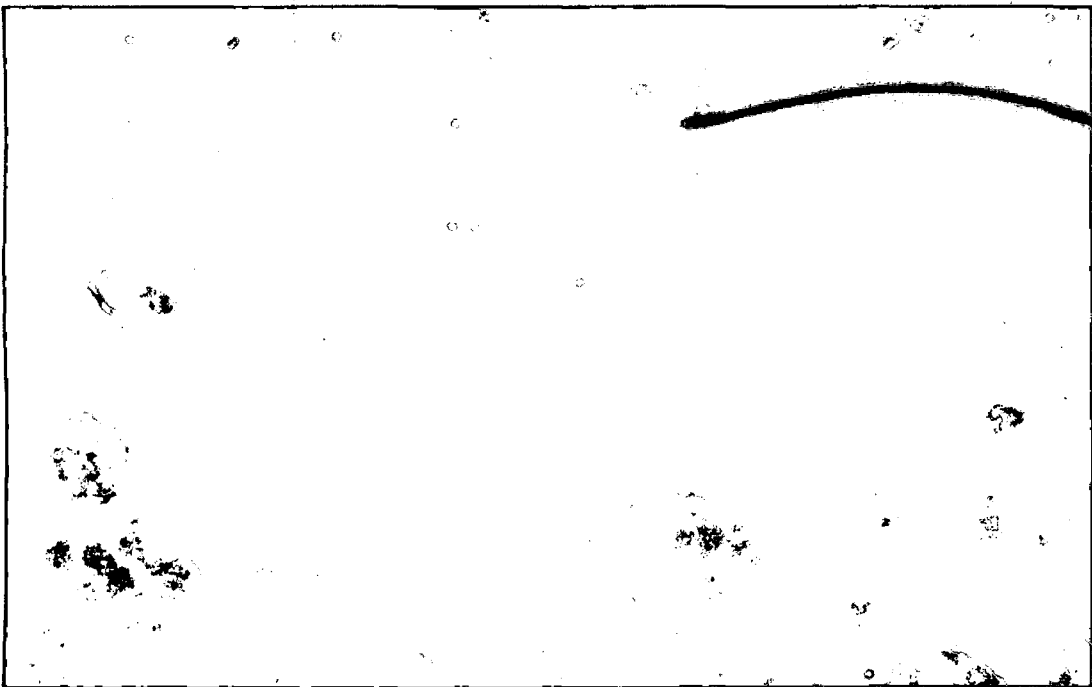
Fotografía 05.- Gónadas sexuales masculinas extraídas hacia el exterior.



Fotografía 06.- Disección de un espécimen hembra de trucha arco iris donde se observa el contenido de óvulos.



Fotografía 07.- Fotografía tomada en microscopio, donde se observa los espermatozoides



Fotografía N° 08.- Espermatozoides coloreados con colorante Eosina- Nigrosina.



Fotografía 09.- Crioprotectores y materiales utilizados en el proceso de Criopreservación.



Fotografía 10.- Preparación de Dilutores así como de Crioprotectores.



Fotografía 11.- Batería de Diluyentes y de Crioprotectores.



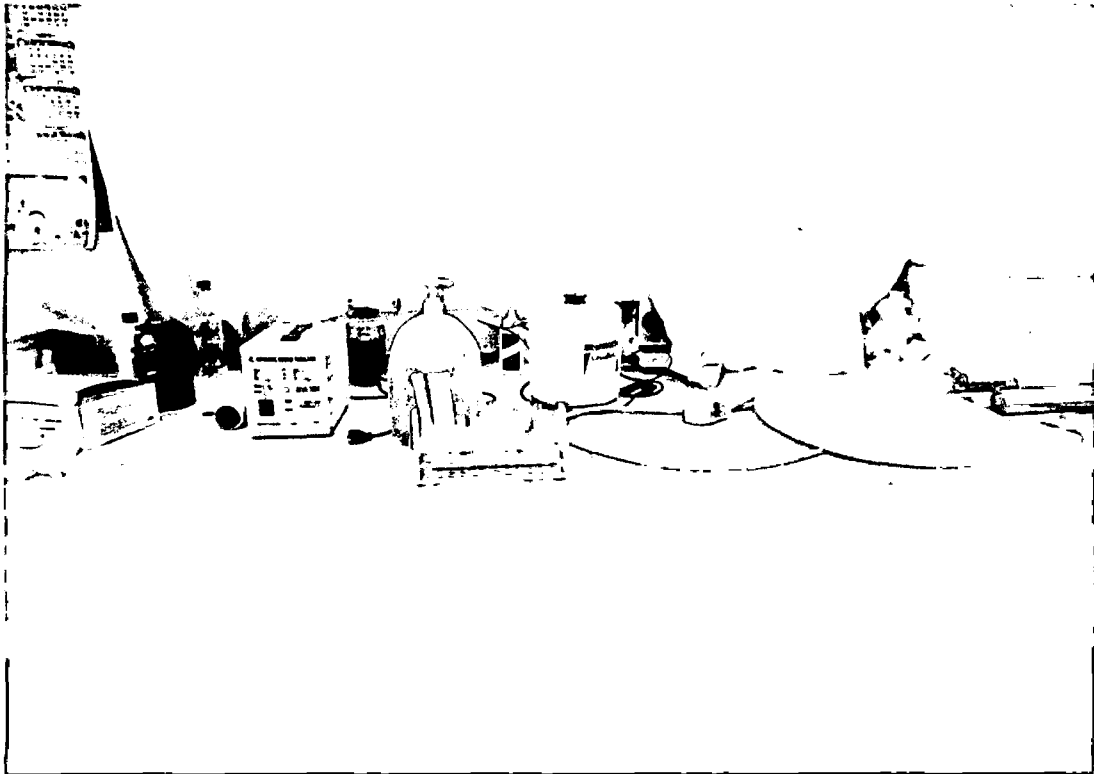
Fotografía 12.- Obtención de semen, por masaje abdominal



Fotografía 13.- Cargado de semen y diluyente en pipeta de glóbulos blancos, para el cargado en la Cámara de Neubauer. Paso para la caracterización seminal



Fotografía 14.- De la caracterización del semen, realizado en microscopio de contraste de fases



Fotografía 15.- Separación de diluyentes y crioprotectores en tubos de ensayo en 10 ml + el semen



Fotografía 16.- Paso previo para realizar la Criopreservación, preparación de pajillas y goblets





Fotografía 17.- Cargado del crioprotector con jeringa de 1 ml., hacia las pajillas, así mismo en el lado izquierdo se puede observar el termo de nitrógeno donde se almacenan las pajillas en sus respectivos goblets.



Fotografía 18.- Colocación de goblets, en forma lenta, dentro del termo de nitrógeno para su suspensión en vapores de Nitrógeno líquido.



Fotografía 19.- Selección de hembras para el proceso de fecundación en laboratorio



Fotografía 20.- Selección de hembras en las pozas donde crían, las truchas



Fotografía 21.- Traslado de hembras seleccionadas hacia la sala de incubación.



Fotografía 22.- Traslado del termo de refrigeración a la sala de incubación para realizar la prueba de fertilidad.



Fotografía 23.- Colección de óvulos en recipiente del primer ejemplar, para su combinación con las pajillas de semen criopreservado.



Fotografía 24.- Semen preservado en pajillas, durante nueve meses



Fotografía 25.- Recipiente conteniendo los óvulos, así mismo se puede apreciar que se viene descargando el contenido de pajillas criopreservadas dentro del recipiente, para ser mezcladas con la plumilla.



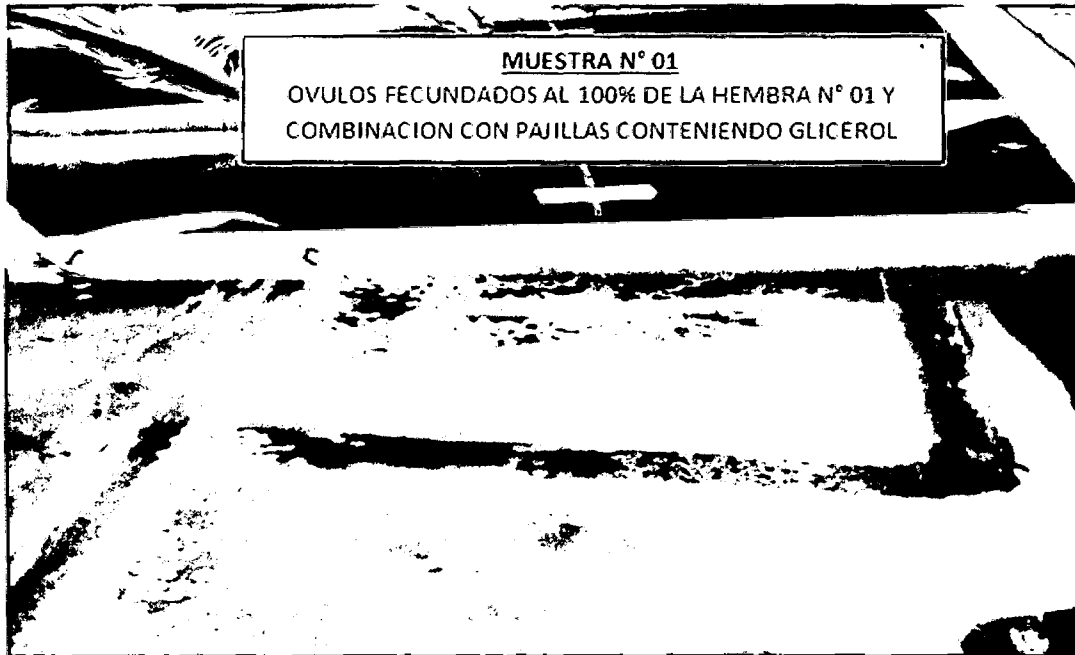
Fotografía 26.- Fecundación entre óvulos obtenidos al momento y el contenido de semen criopreservado.



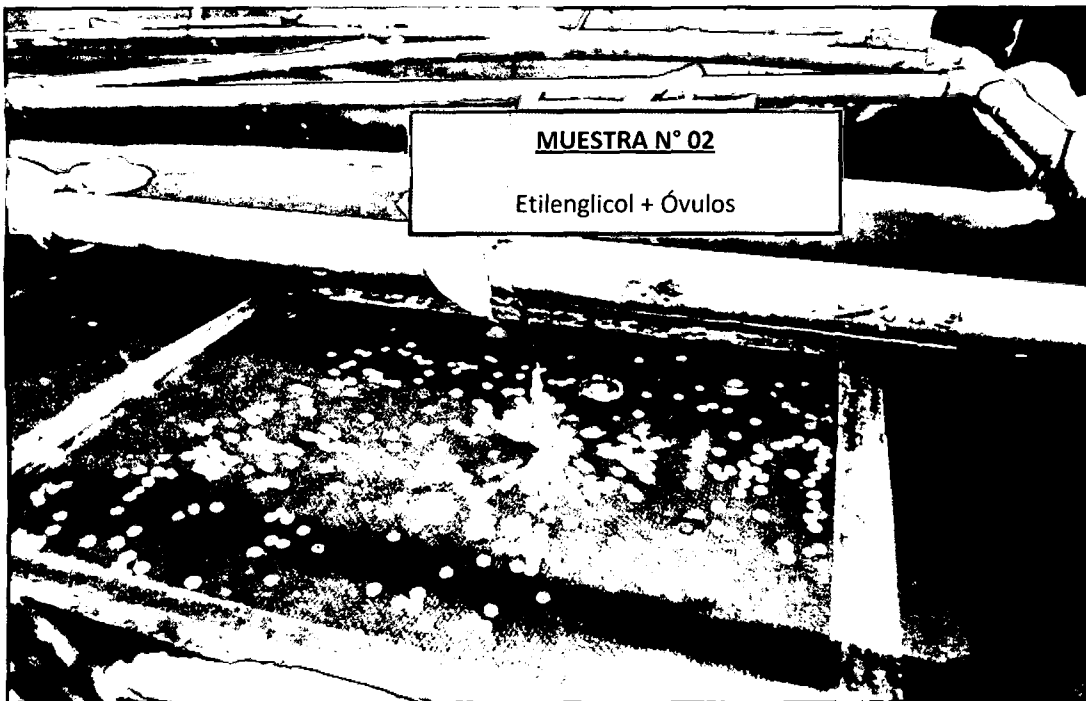
Fotografía 27.- Artesas de Incubación horizontal.



Fotografía 28.- Fecundación del primer ejemplar hembra



Fotografía 29.- Fecundación al 100%, con pajillas conteniendo glicerol.



Fotografía 30.- Óvulos fecundados provenientes de la segunda hembra en menor cantidad donde se aprecia en la parte superior el blanqueamiento de las mismas.

**Cuadro N° 19.- Características típicas de los Géneros pertenecientes a la subfamilia Salmoninae (Dorofeyeva et al., 1981)**

<b>Características</b>	<i>Brachymystax</i>	<i>Hucho</i>	<i>Salvelinus</i>	<i>Salmothymus</i>	<i>Salmo</i>	<i>Oncorhynchus</i>
<b>Boca</b>	Comparativamente pequeña	Grande	Grande	Comparativamente pequeña	Grande	Grande
<b>Huesos postorbitarios</b>	No alcanzan el preopérculo	No alcanzan el preopérculo	No alcanzan el preopérculo	No alcanzan el preopérculo	No alcanzan el preopérculo	No alcanzan el preopérculo
<b>Hocico cartilaginoso</b>	Recortado	Ligeramente recortado	Marcadamente recortado	Marcadamente recortado	Bifurcado	Puntiagudo
<b>Mesoetmoides</b>	Largo, redondeado con prolongación posterior	Corto y ancho con prolongaciones laterales	Comparativamente largo, redondeado en región anterior con procesos laterales	Comparativamente largo, bifurcación anterior con profusiones laterales	Comparativamente largo, redondeado en región anterior, protusiones laterales	Corto, puntiagudo. En región frontal bifurcación posterior no hay protusiones laterales
<b>Asta del vómer</b>	Sin Dientes	Sin Dientes	Sin Dientes	Con Dientes	Con Dientes	Con Dientes
<b>Placa basibraquial</b>	Presente sin Dientes	Presente solo en sub Genero Parasalmo	Presente con numerosos dientes	Presente con Dientes	Presente con Dientes	Ausente
<b>Dientes en el hueso lingual</b>	En dos hileras	En dos hileras y en línea media	En dos hileras y a veces en línea media	En dos hileras y en algunos en línea media	En dos hileras	En dos hileras
<b>Proceso ascendente del premaxilar</b>	De mediano tamaño prolongado hacia delante	De mediano tamaño prolongado hacia delante	Grande, prolongado hacia delante	De mediano tamaño prolongado hacia delante	De mediano tamaño prolongado hacia delante y detrás	Ausente, en algunas especies prolongación posterior
<b>Cromosomas</b>	2n=90-92	2n=84	2n=76-86	2n=82	2n=54-80	2n=52-74
<b>Numero de brazos</b>	NF=112	NF=102	NF=92-102	NF=94	NF=72-108	NF=102-106