

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES EN LA CRÍO
PRESERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCO IRIS
(*Oncorhynchus mykiss*)

ANA PATRICIA OBANDO RAMOS
LUIS FERNANDO PATIÑO BURBANO
LUIS ALBERTO RIASCOS PÉREZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2004

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES EN LA CRÍO
PRESERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCO IRIS
(Oncorhynchus mykiss)

ANA PATRICIA OBANDO RAMOS
LUIS FERNANDO PATIÑO BURBANO
LUIS ALBERTO RIASCOS PÉREZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
ingenieros en producción acuícola

Asesor:
DAVID ORLANDO PINEDA
Médico Veterinario

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2004

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Artículo 1°, Del acuerdo numero 324 de Octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

DAVID PINEDA SEPULVEDA
Presidente

CARLOS SOLARTE PORTILLA
Jurado Delegado

ARMANDO ARROYO
Jurado

San Juan de pasto, abril 30 del 2004

DEDICO A:

MI FAMILIA

ANA PATRICIA OBANDO RAMOS

DEDICO A:

MIS PADRES

MIS HERMANOS

MIS FAMILIARES

MIS AMIGOS

LUIS FERNANDO PATIÑO BURBANO

DEDICO A:

MI ESPOSA

MIS HIJAS

MIS COMPAÑEROS

LUIS ALBERTO RIASCOS PÉREZ

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

DAVID ORLANDO PINEDA . Médico Veterinario

MARCO ANTONIO IMUEZ. Zootecnista

CARLOS SOLARTE. Zootecnista M. Sc Dr.Sc

ARMANDO ARROYO. Zootecnista

ARTURO MUÑOZ – LILIANA BOLAÑOS. Directores de la fundación URDIMBRE .

AURA NELLY INSUASTY. ingeniera en producción acuícola

LILIANA PATIÑO BURBANO. Bacterióloga

Programa de Ingeniería en Producción Acuícola

Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño

Todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la realización y culminación del presente trabajo.

CONTENIDO

	pág.
GLOSARIO	
RESUMEN	
SUMARY	
INTRODUCCIÓN	1
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	2
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 OBJETIVO GENERAL	4
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4. MARCO TEORICO	5
4.1 GENERALIDADES DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	5
4.1.1 Clasificación Taxonómica	5
4.1.2 Características	5
4.1.3 Reproducción	6
4.1.4 Fecundación artificial	8
4.2 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	8
4.3 RECOLECCIÓN DE SEMEN	10
4.4 VALORACIÓN DEL SEMEN	11
4.4.1 Examen macroscópico.	12

4.4.2 Examen microscópico.	13
4.5 DILUCIÓN DEL SEMEN	16
4.6. CRIÓPRESERVACIÓN DEL SEMEN	18
5. DISEÑO METODOLÓGICO	20
5.1 LOCALIZACIÓN	20
5.2 INSTALACIONES	20
5.3 ANIMALES	20
5.4 EQUIPOS Y UTENSILIOS	20
5.4.1 Equipos.	20
5.4.2 Utensilios	21
5.4.3 Insumos	21
5.5 TÉCNICAS DE CAMPO Y LABORATORIO	21
5.5.1 Elaboración de Tratamientos	21
5.5.2 Tratamiento DMSO	22
5.5.3 Tratamiento metanol	22
5.5.4 Características macroscópicas	22
5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	23
5.6.1 Formulación de hipótesis.	23
5.7 VARIABLES EVALUADAS	23
5.7.1 Características Microscópicas	23
6. PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	24
6.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	24
6.1.1 Volumen	24

6.1.2 Color	24
6.1.3 Olor	24
6.1.4 Aspecto	24
6.1.5 pH	24
6.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	24
6.2.1 Tiempo de Motilidad	24
6.2.2 Porcentaje de motilidad	25
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	27
7.1 CONCLUSIONES	27
7.2 RECOMENDACIONES	28
BIBLIOGRAFIA	29
ANEXOS	30

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Escala de maduración sexual	7

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Características del eyaculado en varias especies de peces	11
Tabla 2. Escalas numéricas y descriptivas para determinar la motilidad microscópica de células espermáticas	14
Tabla 3. Porcentaje de motilidad y grados de movilidad de los espermatozoides	15
Tabla 4. Clasificación del semen según el movimiento de los espermatozoides	15

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Comportamiento del tiempo de motilidad del semen de trucha arco iris con tres tratamientos	25
Figura 2. Comportamiento del porcentaje de trucha arco iris con tres tratamientos	26

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Tabulación de datos por variables, replicas y tratamientos	32
Anexo B. Análisis de Varianza para la Variable pH	33
Anexo C. Análisis de varianza para la variable tiempo de motilidad	34
Anexo D. Prueba de Tukey tiempo de motilidad	35
Anexo E. Análisis de varianza para la variable porcentaje de motilidad	36
Anexo F. Prueba de Tukey porcentaje de motilidad	37

GLOSARIO

ACUICULTURA: cultivo de animales o plantas en agua dulce, salobre o salada.

ALEVÍNO: Estado de desarrollo en el cual se observa las características externas de un pez adulto.

ALMACENAMIENTO: guardar bajo estrictas medidas de calidad y pureza, con el fin de conservar y utilizarlo posteriormente.

CRIPRESERVACIÓN: partículas vivas que se exponen a una experiencia de congelamiento en líquidos químicos.

DESOVE: Expulsión de los productos sexuales al medio. También se le llama freza.

DMSO: dimetil-sulfoxido crioprotector

DILUYENTES: líquido químico que se añade para disolver un cuerpo

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL: introducción del esperma en las vías genitales de las hembras por medio de un procedimiento científico.

MACROSCÓPICO: partículas que son observadas a simple vista.

MICROSCÓPICO: partículas que solo son observadas a través de un microscopio.

MOTILIDAD – MOVILIDAD: cuerpos que tienen la desenvoltura y se mueven perfectamente en diferentes medios y cambian de posición o sitio.

MOVIMIENTO CIRCULAR: el espermatozoide se mueve en un círculo cuyo diámetro es igual a su longitud y no son aptos para la fecundación

MOVIMIENTO PROGRESIVO: es cuando los espermatozoides tienden a avanzar en línea recta, cuando son aptos para la fecundación

RESUMEN

La congelación en nitrógeno líquido es una nueva línea de investigación poco estudiada que puede no solo abrir insospechadas perspectivas al desarrollo de la acuicultura, sino que igualmente aportará importante información para los programas de preservación de especies.

En el presente trabajo se expone una experiencia de congelación en nitrógeno líquido del semen de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

El semen fue obtenido por estrujamiento y examinado microscópicamente para evaluar su motilidad, diluido en DMSO y Metanol utilizados como crioprotectores.

El semen diluido fue empacado en pajillas plásticas y sometidas a vapores de nitrógeno líquido e inmediatamente sumergido en nitrógeno líquido.

Las pajillas fueron descongeladas a temperatura ambiente y la activación espermática fue inducida con cloruro de sodio. El proceso de criopreservación en nitrógeno líquido mostró valores del 76 y 56 % de motilidad con los crioprotectores utilizados para desarrollar las pruebas como fueron DMSO y metanol.

ABSTRACT

The process of freezing with liquid nitrogen is a new research line that has not been extensively studied. Not only could it open unexpected perspectives to the development of the Aquaculture itself, but it might equally provide important information to the programs that have to do with the preservation of species.

In this research paper, an experience of the process of freezing with liquid nitrogen of Rainbow trout semen (*oncorhynchus mykiss*) is exposed.

The semen was obtained through squeezing and it was examined under the microscope to assess its mobility. The semen was diluted in DMSO and methane which were used as crio-protectors.

The diluted semen was packed into long plastic tubes which were submitted to vapors of liquid nitrogen and immediately after immersed in liquid nitrogen.

The plastic tubes were thawed to room temperature and the activation of the sperm was induced with Sodium Chloride. The process of crio-preservation with liquid nitrogen showed values of 76% and 56% of mobility with the crio-protectors used to develop the tests, namely the DMSO and the methane.

INTRODUCCIÓN

El Departamento de Nariño por su diversidad de climas presenta condiciones ideales para el cultivo y explotación de organismos hidrobiológicos, de diferentes pisos térmicos y especialmente de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), en el altiplano andino.

Una de las limitantes de la industria truchicola es la consecución de semilla de buena calidad, debido a la ausencia de programas tendientes a la selección de reproductores. Por esta razón, la evaluación y caracterización del semen provenientes de reproductores de excelentes condiciones fenotípicas y genotípicas podría almacenarse mediante sistemas de criopreservación, siendo así, una excelente alternativa para optimizar la reproducción artificial.

La criopreservación de semen de peces ha sido implementada en diversos países como forma de mantener esperma de buena calidad, es así como se han realizado las técnicas desarrolladas en bovinos equinos y otros animales homeotermos.

La caracterización del semen y los ensayos de criopreservación seminal en Colombia se ha llevado a cabo en varias especies como cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), bocachico (*Prochilodus magdalenae*), Yamu (*Brycon siebenthalae*) y tilapia (*Oreochromis mossambicus*), obteniendo los primeros resultados satisfactorios.

Con el propósito de seguir las investigaciones, el presente trabajo realizado en la universidad de Nariño permitio una evaluación del semen y aplicar una técnica de almacenamiento de semen congelado en trucha arco iris, luego de haber sido sometido al proceso de criopreservación en nitrógeno líquido a -196°C .

La ejecución de técnicas de conservación de semen de interés comercial como el de trucha arco iris, muestra interesantes perspectivas de desarrollo en Colombia.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las empresas productoras de ovas y alevinos para mantener una variabilidad genética en peces cultivados, es necesario mantener un gran número de reproductores, lo que genera costos de infraestructura y mantenimiento.

Por otra parte se pueden presentar problemas de endogamia, produciendo animales deformes, poco resistentes y de menor conversión.

El almacenamiento de semen ofrece a los cultivadores e investigadores mayor flexibilidad para lograr cruces genéticos dejando abierta la posibilidad de obtener un banco con material gonadal de calidad comprobada, que minimiza el problema de consanguinidad y por ende la degeneración de la especie, nos permite el transporte del material genético a grandes distancias, ampliando las áreas de cultivo, reduce el plantel de reproductores disminuyendo los costos de mantenimiento.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Hasta el momento en el Departamento de Nariño no se han realizado investigaciones, ni se han desarrollado las técnicas para el almacenamiento de semen criopreservado en nitrógeno líquido (N.L.) de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*.)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad crioprotectora de los diluyentes Dimetilsulfoxido (DMSO), y metanol en la conservación de semen de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las principales características macroscópicas tales como: Volumen, color, olor, pH, aspecto (cremosos, lechoso, acuoso).
- Realizar una evaluación del porcentaje y tiempo de motilidad del semen de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) después de haber sido sometido al proceso de criopreservación en nitrógeno líquido.
- Establecer una técnica de criopreservación de semen de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con el diluyente adecuado, que sea compatible con el plasma seminal de estos peces.

4. MARCO TEORICO

4.1 GENERALIDADES DE LA TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

4.1.1 Clasificación Taxonómica. Según el Instituto Nacional de Pesca Acuicultura INPA es el siguiente:

PHYLUM:	Cordata
SUBPTHYLUM:	Vertebrada
CLASE:	Osteichthyes
SUBCLASE:	Actinopterygii
SUBORDEN:	Teleosteica
ORDEN:	Cluperformes
FAMILIA:	Oncorhynchus
ESPECIE:	Oncorhynchus mykiss
NOMBRE COMÚN:	Trucha arco iris ¹ .

4.1.2 Características. Según Amaya y Anzola²:

La trucha arco iris es un pez de agua dulce, originaria de los ríos tributarios, del río Sacramento de Norteamérica, y que fue introducida en Colombia 1939, con las siguientes características físicas y morfológicas: tiene una forma aerodinámica, fusiforme, posee dos aletas dorsales y dos ventrales; una aleta adiposa, una dorsal y una anal. Su aleta adiposa se encuentra entre la caudal y la dorsal, las funciones son estabilizadoras y de propulsión, su columna vertebral posee de 28 a 29 vértebras unidas por un tejido conjuntivo.

Por su parte, Martínez³:

Da a conocer que la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) posee una vejiga natatoria situada en la cavidad abdominal, debajo de la columna vertebral y los riñones en forma de neumático, que cumple las funciones de hidrostática. La piel está constituida por la dermis y la epidermis, la dermis situada profundamente donde además de los nervios y vasos sanguíneos,

¹ INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. Seminario-Taller del Bocachico Prochilodus Magdalenae. Barrancabermeja : INPA, 1992. p 23.

² AMAYA, Rafael y ANZOLA, Eduardo. La trucha arco iris de aguas dulces. Bucaramanga : UJTL, 1988. p 5

³ MARTÍNEZ, Benito. Ecología y piscicultura de aguas dulces. 2 ed. Madrid : Mundi-prensa, 1984. p 105.

tienen células especiales llamadas cromatóforos, que contienen pigmentos de varios colores, la epidermis rica en glándulas mucosas que segregan sustancias mucosas y que hacen viscoso el cuerpo del animal. La piel está cubierta por escamas sutiles, laminillas óseas flexibles y transparentes; Estas escamas varían de tamaño de acuerdo a la nutrición del pez. El sistema muscular está representado en la trucha arco iris por 60% de peso total que constituye la parte comestible.

Según, López⁴:

El sistema digestivo de la trucha arco iris está formado por la boca, la cual posee dientes que no le sirven para masticar sino para capturar sus presas. El órgano de los sentidos de la trucha arco iris más importante es el de la vista posee ojos móviles, no tiene párpados pero posee corneas, iris pupila, cristalino y la línea lateral (prolongación de la columna vertebral), que va desde el opérculo hasta la aleta caudal. Los oídos son los que regulan el equilibrio del pez al igual que la línea lateral capta sus vibraciones que le permiten detectar sus presas.

4.1.3 Reproducción. García y Badelle⁵, afirman que la trucha Arco iris para reproducirse, busca el lugar donde nació u origen (río arriba); Por esto efectúa migraciones durante el periodo de fresa o reproducción, buscando temperaturas de agua óptimas para la postura o fecundación de sus ovas.

Así mismo, Amaya y Anzola⁶, comentan que:

En el medio natural, la temperatura del agua para la postura es de 5°C en una zona de grava. La hembra cava los surcos, deposita aproximadamente 2000 ovas de color anaranjado, en el fondo del surco, donde son fecundados por el macho y luego tapados. En la trucha arco iris los rasgos extremos de madurez se detectan en cambios morfológicos; los machos cuando están aptos, presentan una coloración más intensa en el dorso y en el vientre; ante una leve presión abdominal el macho descarga el líquido lechoso (semen), las hembras, el vientre blanquecino y abultado, la línea lateral presenta una coloración roja y algo dilatada y ante una leve presión abdominal expulsa las ovas.

⁴ LOPEZ, Daniel. Piscicultura y Pesca. Pasto : SENA, 1992, p 26.

⁵ GARCÍA. RODRÍGUEZ, GUERRA Y TELLO. Madurez Sexual del *Prochilodus nigricans*, Magdalena : s.n., 1.995. p. 12.

⁶ AMAYA, Op cit., p. 26.

Además, García et al⁷:

A través de sus investigaciones, dan a conocer que para la maduración de los gametos se produzca durante la migración reproductiva; los centros neuroendocrinos del hipotálamo estimulan la función de las células gonadotropinas de la hipófisis (adenohipófisis) esta última segrega constantemente pequeñas porciones de gonadotropina, la cual estimula las células foliculares tecaes de sertoli e intersticiales de las gónadas. A su vez las hormonas sexuales son secretadas y ellas garantizan la alimentación, crecimiento, vitogénesis y los demás complejos procesos de la diferenciación gonadal

Cuadro 1. Escala de maduración sexual

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS
I Virgen	Órganos sexuales pequeños. Ovarios transparentes o de color rozado pálido, ovas no visibles o simple vista.
II En desarrollo	Testículos con diferentes filamentos bien definidos de color blanco opaco, irrigación sanguínea leve en la gónada. Ovarios de color amarillo, ovas pequeñas visibles a simple vista.
III Desarrollo	Testículos de color blanco lechoso con irrigación sanguínea bien perceptible, sale esperma al presionar fuertemente la gónada. Ovas grandes definidas.
IV En desove	Testículo total mente blanco, sale esperma con leve presión, ovarios ocupan toda la cavidad abdominal. Ovas de color amarillo completamente redondas y grandes.
V Desovado	Órganos sexuales flácidos. Ovarios sanguinolentos
VI reposo	Testículos y ovarios más desarrollados que el estadio I. Testículo blanco rojizo y ovarios de color amarillento. Ovas no visibles.

Fuente: García et al (1995,203).

El mismo autor⁸ afirma que:

En las etapas de desarrollo y de desove se observa una sensible disminución de la función de la regulación de la gonadotropina por parte de la adenohipófisis. En este mismo tiempo llega una gran cantidad de impulsos a los centros neuroendocrinos provenientes de los receptores externos y ellos informan sobre los cambios en

⁷ GARCIA, Op cit., p203.

⁸ Ibíd., p.204.

el medio ambiente (temperatura, velocidad del agua, tipos de suelo, presencia de compañero.) Los centros neuroendocrinos se activan por las neurohormonas.

Según Erazo⁹, la vida útil de una hembra reproductora se estima en unos cuatro años contando desde que alcanza su primera madurez alrededor de su primer año de vida y son utilizados como reproductores hasta que alcanzan los cinco años de vida, debido que con la edad se da cierta retención del esperma en el momento del ordeño.

4.1.4 Fecundación artificial. Erazo¹⁰, manifiesta que existen dos métodos utilizados en la recolección de los huevos: el método húmedo y el método seco.

- **Método húmedo.** Consiste en la recolección de los huevos de una vasija con agua a la cual posteriormente se le añade el semen. Si este sistema se efectúa con rapidez, se obtiene altos porcentajes de fecundación, si este se realiza lentamente el índice puede ser bajo. Debido a que la motilidad del espermatozoide en medio acuoso es de 30 a 90 segundos; por otro lado la ova absorbe agua hidratándose y el micrópilo se cierra impidiendo la entrada de esperma.

- **Método seco.** Los huevos y el semen son mezclados con pluma de ave, se deja en reposo por 15 minutos y al cabo de ese tiempo las ovas están fecundadas; se procede a lavarlas perfectamente, esto se hace colocándolos en un cedazo plástico y añadiendo agua bastante limpia hasta que salgan los residuos espermáticos y ovárico, luego se depositan en los bastidores para luego ser llevados a la sala de incubación. Estos procesos deben efectuarse en un lugar protegido sin incidencia de la luz solar directa.

4.2 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Colé¹¹, manifiesta que:

El avance más importante en la fisiología de la reproducción ha consistido en la aparición de la inseminación artificial y su amplio uso en la cría animal. La aplicación de la inseminación artificial junto con las técnicas para conservar y transportar el

⁹ ERAZO, Andrés. Aspectos básicos de la trucha arco iris; Fundamentos de Acuicultura continental, Bogotá : UJTL, 1992. p.226.

¹⁰ *Ibíd.*, p.228

¹¹ COLE. H. Inseminación Artificial. Zaragoza : Acribia, 1974. p.412.

semen ha posibilitado la mejora de los animales domésticos mediante el uso de machos superiores. 1677 Johan Hamm, un estudiante y Antón Van Leeuwenhoek, su maestro descubrió los espermatozoides. Las diminutas y móviles células espermáticas fueron descritas como hombres en miniaturas o animaculos. Cien años más tarde, Lazzaro Spallanzini, un fisiólogo italiano inicia experimentos que lo llevan a realizar con éxito la inseminación artificial de varios reptiles y posteriormente presentó una camada de tres cachorros nacidos tras inseminar artificialmente una perra. Elías Ivanoff emprendió en Rusia el primer estudio serio de inseminación artificial y fue el primero en aplicar con éxito en el ganado vacuno y ovino.

Dierich y Franz¹², afirman que la inseminación artificial en los animales domésticos con fines de crianzas es un instrumento eficaz y versátil para la realización de proyectos de mejoramiento de las existencias de animales de interés zootécnicos.

El estudio del semen es un factor muy importante en la técnica de la inseminación artificial tal como lo sugiere Díaz¹³, quien sostiene que el proceso analítico se realiza inmediatamente, tanto si se va a usar semen fresco como si se va a utilizar refrigerado o congelado.

Para Hafez¹⁴, la inseminación artificial es la técnica individual más importante creada para el mejoramiento genético de los animales. Esto es posible debido a que unos pocos machos seleccionados producen suficiente espermatozoides para inseminar varias hembras.

Para Foning¹⁵:

La inseminación artificial es el requisito más importante para la creación de una tecnología que corresponda adecuadamente a la producción a escala industrial, por las siguientes razones:

- Aumento del progreso genético.

¹² DIERICH, Smidt y FRANZ, Ellendorff. Endocrinología y fisiología de la reproducción de los animales zootécnicos. Zaragoza : Acirbia, 1.972. p.110

¹³ DÍAZ, Mercedes.; GARCIA, Pilar y RODRÍGUEZ, Mario. Técnica de inseminación artificial en el conejo. En : Hojas divulgadas, Vol. 6, N 17.22-24 (junio, 1.989); p.10

¹⁴ HAFEZ. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. México : Interamericana, 1989. p.300.

¹⁵ FONING. Bases para la inseminación artificial. Buenos Aires : Troquel, 1979. p14.

- Aumenta en muchas veces la capacidad reproductora de los machos
- Posibilidad de una organización zootécnica a escala industrial.
- Disminución en los costos de producción.
- Reduce el peligro de transmisión de enfermedades.
- Permite obtener un número de descendientes de alto valor genético.
- Permite el uso generalizado de machos sobre salientes y la inseminación de material genético valioso, incluso en granjas pequeñas.
- Hace posible el uso del semen congelado, incluso después que ha muerto el donador, con lo que contribuye a la preservación de líneas seleccionadas.

4.3 RECOLECCIÓN DE SEMEN

Según Pineda y Donato¹⁶, la recolección de esperma constituye la primera operación que se va a realizar en técnica de la inseminación artificial; Se encuentra prácticamente resuelta en rumiantes, equinos, suidos y caninos; en otras especies como roedores, aves, animales salvajes, etc.

Todavía se están perfeccionando los métodos en la recolección. Influyen condiciones temporales, psicológicas y anatómicas, por lo que conviene seleccionar para cada especie el método ideal. Cualquiera que sea el método a seguir debe seguir las siguientes condiciones:

- Conseguir un eyaculado voluminoso.
- Que el esperma sea viable reproductivamente.
- Que los métodos de recogida no produzcan perturbaciones de tipo inhibitorio capaces de alterar el deseo sexual.

¹⁶ PINEDA, David y DONATO, Mario. Curso de Andrología. Pasto : Universidad de Nariño, 1996. p. 8

Según el INPA¹⁷:

El esperma de peces que generalmente permanece inactivo cuando esta dentro del organismo y su actividad se inicia inmediatamente cuando entra en contacto con el agua. Esta actividad generalmente es una motilidad frenética, y de corta duración (dependiendo de la especie), alrededor de un minuto luego del cual el esperma va a morir. En general el esperma para el almacenamiento no debe ser activado por lo tanto la colecta debe ser muy cuidadosa para evitar contaminación con el agua, orina o cualquier liquido que lo active.

Por otra parte Erazo¹⁸, sostiene que el mejor procedimiento para recolectar semen es por extracción. En los ejemplares completamente maduros los productos sexuales deberán fluir libremente.

Según boletín científico del INPA, reporta el volumen de eyaculado de varias especies, después del proceso de recolección del semen.

Tabla 1. Características del eyaculado en varias especies de peces

ESPECIE	VOLUMEN DE EYACULADO (ml)
Bocachico (<i>Prochilodus magdalenae</i>)	1.0
Bagre rayado (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>)	100.0 9.0 – 16.0
Cachama blanca (<i>Piaractus brachipomus</i>)	2.5 2.5
Tambaquí (<i>Colossoma macropomun</i>)	0.4 – 0.5
Pirapitinga (<i>Colosoma bidens</i>)	
Tilapia (<i>Sarotherodum mossambicus</i>)	

Fuente: INPA (1994,15)

4.4 VALORACIÓN DEL SEMEN

Hafez¹⁹, define al semen como líquido o suspensión gelatinosa que contiene gametos masculinos y secreciones producidas en el aparato reproductor del macho. La porción líquida de esta suspensión se denomina “plasma seminal”; Es

¹⁷ INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA, Op cit., p 9.

¹⁸ ERAZO, Op cit., p 130.

¹⁹ HAFEZ., p. 130.

esencial para los procesos reproductivos debidos a que cumple con la función de trasportados y protector de los espermatozoides.

Sorensen²⁰, sostiene que la evaluación espermática es un proceso fundamental para determinar la utilidad de un reproductor o de un eyaculado en particular. De esta manera, se anticipa el valor de un semental como pie de cría bajo condiciones naturales o en inseminación artificial.

Según Zenjais²¹, se debe tener en cuenta que la valoración del semen, se trabaja con células vivas, por tanto deben tomarse las medidas necesarias para evitar daños durante la recolección y el examen. Los errores mas comunes son; el retraso para iniciar las pruebas, en especial la motilidad; daño mecánico a las células durante el frotis; contaminación con agua y sustancias químicas.

4.4.1 Examen macroscópico.

- **Volumen.** Pérez²², recomienda la medición directa del semen dentro del recipiente de recolección. El volumen varía considerablemente entre individuos y especies dependiendo de la época del año, régimen alimenticio y grado de excitación sexual. No obstante, es necesario establecer cifras generales en las distintas especies icticas para disponer con patrones de referencia.

- **Color.** Según Pérez²³ el color del eyaculado constituye un dato importante en la valoración macroscópica del esperma, ya que un cambio de coloración puede significar contaminación o mezcla con la orina. El color depende de la concentración de los espermatozoides; cuando el semen es de buena calidad presenta una coloración blanco lechosa o cremosa y cuando es de baja calidad su color es similar al de la lecha aguada.

- **Olor.** El mismo autor²⁴ afirma que el olor del semen es propio de cada especie bajo condiciones normales. Un olor desagradable o fuerte es indicio de alguna enfermedad en los testículos u otra parte del aparato reproductor.

²⁰ SORENSEN, Armando. Reproducción animal; principios y práctica. México : Mc Grawl Hill, 1982. p.37.

²¹ ZENJANIS, Ricardo. Reproducción animal. Diagnostico y técnicas terapéuticas. México : Limusa, 1985. p.150.

²² PÉREZ, Fernando. Reproducción e inseminación artificial ganadera. Barcelona : científico- Medica, 1966, p.218

²³ *Ibíd.*, p. 220.

²⁴ *Ibíd.*, p.220.

- **Aspecto.** El mismo autor²⁵ lo define como la impresión general que objetivamente produce la masa total del eyaculado en el colector de vidrio o probeta respectiva. El aspecto depende de la concentración de espermatozoides y se mide por el mayor o menor grado de opacidad que presenta la muestra del semen.
- **pH.** El mismo autor²⁶ define el pH como la concentración de hidrógeniones en el medio espermático y debe determinarse inmediatamente después de la recolección del semen, debido a que el pH puede variar según las reacciones biológicas ocurridas en el propio medio y a consecuencia del metabolismo hidrocarbonado por parte de los espermatozoides.

Al mismo tiempo Sorensen²⁷ sostiene que la cualificación del grado de acidez o alcalinidad de una muestra de semen, aporta información respecto a la calidad del mismo. El pH se relaciona con actividad metabólica de los espermatozoides; conforme estos envejecen, se produce ácido láctico debido a la glucólisis. Por consiguiente, la acumulación de este ácido baja el pH disminuyendo la motilidad de los espermatozoides.

4.4.2 Examen microscópico.

- **Porcentaje de Motilidad.** De acuerdo con Sorensen²⁸:

La motilidad es un parámetro más importante dentro de la calificación de la calidad del semen. Se expresa como porcentaje de células vivas o móviles, las cuales pueden desplazarse en cualquier dirección, sin importar la velocidad con que lo hagan. La trayectoria del movimiento se incluye en la evaluación global de los aspectos morfológicos de las células, debido a que las anormales no se desplazan hacia delante como el resto.

El mismo autor²⁹ cita que algunas personas, prefieren colocar una gota de semen en un portaobjetos y observar el movimiento masivo de los espermatozoides. Es un método poco confiable, ya que no tiene en cuenta las células muertas desplazadas por las vivas. Es necesario considerar que él frío disminuye la motilidad, tanto que el calor la aumenta.

²⁵ *Ibíd.*, p.220

²⁶ *Ibíd.*, p.255

²⁷ SORENSEN., *Op cit.*, p. 38.

²⁸ *Ibíd.*, p.38

²⁹ *Ibíd.*, p.38

Es posible apreciar en cierto grado la movilidad si se observa con atención el tubo de ensayo. De esta manera se observa la actividad de arremolinamiento o “Ebullición “del esperma. Es muy difícil apreciar ese movimiento en muestras diluidas.

Zenjais³⁰ considera que:

La prueba de motilidad proporciona los datos más importantes acerca de la calidad del semen. Sin embargo esta sujeta a dos tipos de factores primero es una prueba subjetiva y segundo, comprende el manejo de células vivas que son extremadamente sensibles a influencias extrínsecas. Estas pueden destruir las células espermáticas o perjudicar y alterar su motilidad. En la tabla se muestra una escala basada en el porcentaje de células móviles usada comúnmente para clasificar el semen.

Tabla 2. Escalas numéricas y descriptivas para determinar la motilidad microscópica de células espermáticas

%CELULAS MOVILES	CLASIFICACION	MOTILIDAD DE MASAS	MOTILIDAD INDIVIDUAL	VALOR NUMERICO
80-100	Muy bueno	Arremolinamiento rápido	Línea Rápido	5
60-80	Bueno	Arremolinamiento lento	Línea mod-rápido	4
40-60	Regular	Oscilante	Línea lento o errático	3
20-40	Pobre	Vibración	Muy lento errático	2
0-20	Muy pobre			1

Fuente: Sorensen (1982) Zenjanis (1985) y Huertas (1991).

Pineda y donato³¹, el porcentaje de motilidad va de 0 a 100 las cifras citadas para cada caso se refiere al numero de espermatozoides que exhiben diversos grados de movilidad por cada 100.

³⁰ ZENJAIS, p.45

³¹ PINEDA, Op cit., p.64.

Tabla 3. Porcentaje de motilidad y grados de movilidad de los espermatozoides

Método de los quintos				
5 quintos	80 al 100%	Los espermatozoides	tienen	movimientos progresivos
4 quintos	60 al 80%	Los espermatozoides	tienen	movimientos progresivos
3 quintos	40 al 60%	Los espermatozoides	tienen	movimientos progresivos
2 quintos	20 al 40%	Los espermatozoides	tienen	movimientos progresivos
1 quinto	1 al 20%	Los espermatozoides	tienen	movimientos progresivos

Fuente: Pineda y Donato (1996, 93)

El tipo de motilidad se gradúa con una escala del 0 al 5. La calificación 5 indica que todos los espermatozoides móviles muestran un vigoroso desplazamiento en línea recta, la calificación 1 va sin desplazamiento hacia delante. Estos dos conceptos son subjetivos y cada técnica por separado establece sus propios estándares.

Tabla 4. Clasificación del semen según el movimiento de los espermatozoides

Clasificación del 0 al 5	
0	No hay espermatozoides presentes (Azoospermia)
1	Todos los espermatozoides inmóviles
2	Movimiento débil, oscilante y gran cantidad de inmóviles
3	Aproximadamente partes iguales con movimientos progresivos y movimiento oscilatorio y un 25% de inmóviles.
4	Casi todos los espermatozoides se mueven progresivamente
5	Casi todos los espermatozoides se mueven progresivamente y presentan gran actividad.

Fuente: Pineda y Donato (1996, 93)

El citado autor³², sostiene que muy pocas muestras de semen superan el 90 % de motilidad, las muestras con porcentajes inferiores al 50 % no deben dedicarse a la reproducción, de igual manera es importante realizar las evaluaciones de motilidad inmediatamente después de recogido el semen, ya que el porcentaje de espermatozoides dotados de movimientos decrece con bastante rapidez.

Tiempo de motilidad. Sorensen³³ sostiene que el mejor método para determinar el tiempo de motilidad, es utilizando un microscopio en el cual se hace la observación con un objetivo a 200 X. Un menor aumento 100 X permite observar un mayor campo, pero no basta para observar de forma individual a los espermatozoides.

4.5 DILUCIÓN DEL SEMEN

Salisbury y Vandemark³⁴, afirman que la mezcla de los espermatozoides con el diluyente permite la adición de muchos ingredientes que mantienen y protegen a los espermatozoides, con la cual conservan su fertilidad hasta que se utilizan para la inseminación.

En consecuencia, las dos funciones principales de los diluyentes del semen son conservar la fertilidad de las células espermáticas y aumentar el volumen total de forma que la dosis adecuada de células para la inseminación pueda ser envasada y utilizada convenientemente.

Según los mismos autores³⁵, afirma que un avance sensacional en los diluyentes de semen se produjo cuando Phillips en 1939, fue el primero en señalar que la yema de huevo unida con el tapón fosfato conservan la motilidad y fertilidad de los espermatozoides. En 1941 Salisbury indicaron que el citrato de sodio favorecía la viabilidad de los espermatozoides, igual fertilidad y mayor motilidad, cuando se adicionaba un volumen igual de yema de huevo.

Hafez³⁶, sostiene que la glucosa, fructuosa y lactosa son los principales azúcares que se añaden a los diluyentes. La acción principal de estos son las propiedades osmóticas y la criopreservación extracelular.

³² *Ibíd.*, p. 64

³³ SORENSEN, *Op cit.*, p.64.

³⁴ SALISBURY, GW y VALNDERMARK, N.L. fisiología de la reproducción e inseminación artificial en los bóvidos. Zaragoza : Acribia, 1964. p. 463

³⁵ *Ibíd.*, p. 464.

³⁶ HAFEZ, *Op cit.*, p.491.

El mismo autor³⁷, señala que a la mayor parte de los diluyentes se les adiciona proteínas y lipoproteínas, que se encuentran contenidas en la yema de huevo, esta misma contribuye a mantener los cromosomas normales. Los fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad son los componentes protectores de la yema de huevo, provocando la estabilidad de la membrana espermática durante la congelación.

De otro lado, Pineda y Donato³⁸ de acuerdo a sus experiencias, recomiendan:

Que el espermatozoide es sensible a la acción de diferentes factores externos por lo tanto deberá ser recogido con el máximo cuidado teniendo en cuenta:

- No utilizar nada más que recipientes esterilizados.
- Evitar los choques térmicos producidos por temperaturas muy elevadas o muy bajas.
- Impedir el contacto con el agua o diferentes agentes químicos.
- Guardar al abrigo de la acción de la luz o del aire.

La evaluación espermática deberá realizarse lo más pronto posible desde el momento de la recolección y la dilución se efectuará sin gran demora.

H Colé³⁹, señala que:

En la actualidad todos los diluyentes más empleados contienen uno o más productos biológicos tales como yema de huevo o leche, que ayudan en la protección del espermatozoide contra shock provocado por el frío y permiten enfriar el semen a temperaturas bajas logrando una excelente conservación de la vida celular. Los productos químicos con acción tampón se añaden a los diluyentes para evitar cambios nocivos en el pH del semen durante la utilización de nutrientes por los espermatozoides. Las sustancias tampón más comunes son el citrato sódico y el bicarbonato sódico. La mayoría de los diluyentes contienen pequeñas cantidades de azúcares tales como glucosa o fructosa para una acción nutritiva adicional. Al diluyente se le añaden normalmente antibióticos,

³⁷ *Ibíd.*, p 491.

³⁸ PINEDA, *Op cit.*, p 150.

³⁹ COLÉ, *Op cit.*, p. 512.

como penicilina y estreptomina, para reducir el crecimiento de microorganismos y evitar la difusión de enfermedades.

4.6 CRIÓPRESERVACIÓN DEL SEMEN

Según INPA⁴⁰:

La criopreservación es una técnica usada para almacenar esperma por largos periodos. Esta técnica consiste en una deshidratación que ocurre en la célula cuando un diluyente, que se congela más rápido que los líquidos celulares, da comienzo a un aumento de la concentración de electrolitos extracelulares causando así una salida de agua de la célula. De esta forma evita la formación de cristales de agua dentro de la célula, que generalmente resulta fatal.

Existen una serie de técnicas para la conservación de esperma de un pez por cortos y largos periodos de tiempo. No existen publicaciones comparando la efectividad de dichas técnicas pero de menor o mayor tiempo de almacenamiento tenemos lo siguiente:

- esperma no diluido en temperaturas ambiente (0.5 a 1.5 horas)
- esperma a temperatura + 0 – 4°C (3 hr a 3 d)
- esperma en atmósfera de oxígeno con antibióticos a 4°C (3 a 12 d)
- esperma con diluyente energético, protector y antibiótico a 4°C (máximo 30 d.)

Stevenson⁴¹ afirma que:

Existen muchos criopreservantes y algunos son mejores para una determinada especie de pez, sin embargo los más utilizados son: el metanol, Dimetil sulfoxido (DMSO), la glicerina etc. El éxito del congelamiento depende en gran parte de la calidad de las membranas del espermatozoide que por lo regular son permeables y mantienen muchas sales. En lo anterior se refleja la edad de los reproductores, su alimentación estrés etc. En lo posible es mejor congelar esperma de machos no inducidos con hormonas, si no capturados en el medio natural. El congelamiento del esperma se

⁴⁰ INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA, Op cit., p.10.

⁴¹ STEVENSON, Joseph. Manual de cría de la trucha. España : acribia, 1985.p 87.

debe hacer en forma lenta para evitar la formación de cristales internos y así romper la membrana. Si es muy lento entonces el agua se congela dentro de la célula y no en la parte de afuera, ocasionando una deshidratación.

Haciendo referencia a la conservación de semen a bajas temperaturas Derivaux⁴², dice que la congelación de semen ha marcado un progreso considerable en su conservación y el método debido a las numerosas ventajas que aporta hoy en día adoptado por la mayoría de centros de inseminación artificial.

El método de conservación de la refrigeración profunda según Dierich y Franz⁴³ tiene una gran importancia para el aprovechamiento zootécnico de la inseminación de los animales domésticos en cuyo curso se refrigera el esperma hasta temperaturas de -196°C .

H. Colé⁴⁴, afirma que después de congelado el semen, deberá ser mantenido a temperaturas iguales o inferiores a las del hielo seco -79°C para que sea notablemente más lenta la pérdida de capacidad fertilizante. Según los estudios dirigidos por Salisbury⁴⁵ en la universidad de Illinois, la supervivencia de los espermatozoides a -79°C , -88°C o incluso -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) sé amplio enormemente aunque no indefinidamente. La viabilidad de los espermatozoides comienza a descender tras unos ocho meses de almacenamiento y alcanza un punto muy bajo a los 30 meses.

Stevenson⁴⁶, sostiene que:

Es posible almacenar semen de peces en congelación a muy baja temperatura utilizando nitrógeno líquido. El método es similar al que se emplea para la congelación de semen de mamíferos. El problema principal radica en encontrar un agente adecuado para la dilución del esperma, compatible con el plasma seminal de los peces. Actualmente se dispone de una sustancia adecuada para este fin, por lo que puede congelar con seguridad siempre y cuando se añada dimetilsulfoxido (DMSO) para proteger los espermatozoides de los daños que se puedan producir durante la congelación y descongelación.

⁴² DERIVAUX, Jack. Reproducción de los animales domésticos. 2 ed. Zaragoza : Acribia, 1.982. p.29.

⁴³ DIERICH, Op cit., p. 238.

⁴⁴ COLÉ, Op cit., p. 417

⁴⁵ SALISBURY, Op cit., p.464.

⁴⁶ STEVENSON, Op cit., p.87.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

Para esta investigación las labores de campo se realizaron en San Antonio de Aranda, Municipio de Pasto, departamento de Nariño, zona sur occidental de Colombia con una latitud de 1° 11" y longitud de 77° 19" a 2.590msnm, a una temperatura promedio de 13°C, humedad relativa de 78% anual, y una precipitación pluvial de 193.1mm anual⁴⁷.

El trabajo de laboratorio se realizó en los laboratorios de la clínica veterinaria de la Universidad de Nariño de Toro bajo de la ciudad de Pasto, zona sur occidental de Colombia con una latitud de 01° 11" y una longitud 77° 18" Oeste a 2.580 msnm a una temperatura promedio de 13°C, con una humedad relativa del 78% anual y precipitación pluvial de 193.1 mm anual⁴⁸.

5.2 INSTALACIONES

Se construyó un estanque de 2.5 mts de ancho, por 4 mts de largo y 0.80 mts de profundidad, para alojamiento de los reproductores machos.

5.3 ANIMALES

Se evaluaron 10 reproductores machos de un año y medio de edad y un kilogramo de peso promedio por animal, seleccionados homogéneamente por sus características fenotípicas y estado de madurez sexual.

5.4 EQUIPOS Y UTENSILIOS

5.4.1 Equipos.

- ❖ Balanza gramera Ohaus, precisión 0,01.
- ❖ Bortex Termolyte.
- ❖ Microscopio Olimpos CH 30.
- ❖ Termo criogénico Colacteos.

⁴⁷ INSTITUTO DE HIDROLÓGICA, METEREOLOGIA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, Valores medios mensuales ambientales o sistema de formación hidrometeorológicas. Pasto : IDEAM, 1999, p.1.

⁴⁸ *Ibíd.*, p.2.

- ❖ Termo de vacunas IMUSA.
- ❖ Termómetro de punta Mengte.

5.4.2 Utensilios.

- ❖ Balón aforado
- ❖ Beakers
- ❖ Cubre-objetos
- ❖ Franelas y toallas
- ❖ Gradilla
- ❖ Gobelets
- ❖ Jeringas
- ❖ Separador de yema
- ❖ Pajillas
- ❖ Pipetas
- ❖ Recipientes plásticos
- ❖ Separador de yema
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Teteros de vidrio

5.4.3 Insumos. Dimetilsulfoxido (DMSO) al 10%, Cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), Cloruro de potasio (KCl), glucosa, yema de huevo, agua destilada, Metanol al 5%, Cloruro de calcio(CaCl_2), suero fisiológico al 0.9 % nitrógeno líquido.

5.5 TÉCNICAS DE CAMPO Y LABORATORIO

5.5.1 Elaboración de Tratamientos. La elaboración de los tratamientos se realizó el día anterior a la críopreservación del semen en el laboratorio de la universidad.

5.5.2 Tratamiento DMSO. Para el tratamiento experimental se utilizó: 10 ml Dimetilsulfoxido (DMSO) al 10% de concentración, 750mg de Cloruro de sodio (NaCl), 200 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 38 mg de Cloruro de Potasio (KCL), 100 mg de glucosa, 20 ml de yema de huevo del día ,100 ml de agua destilada. Una vez pesadas de acuerdo a la formulación, se colocaron en los teteros de vidrio graduados, posteriormente se procedió a mezclar durante cinco minutos para homogenizar.

5.5.3 Tratamiento metanol. Para el tratamiento experimental se utilizó: 5 ml de metanol, 20 mg de cloruro de calcio (Ca Cl₂), 750 mg de Cloruro de sodio (Na Cl), 20 mg de cloruro de potasio (K Cl), 20 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 15 gr, de leche en polvo y todo vaciado en 100 ml de agua destilada, colocados en el tetero graduado y mezclado muy bien.

El semen es obtenido por estrujamiento, inmediatamente después de su obtención, el semen es examinado macro y microscópicamente para evaluar el porcentaje de motilidad y tiempo de motilidad, posteriormente diluido en cada uno de los tratamientos, la proporción utilizada semen-diluyente fue de 1:3.

El preparado semen criopreservante es colocado en pajillas de material plástico de 13 cmts de largo por 3mm de diámetro y sometido a congelación de vapores de nitrógeno líquido durante un lapso de tiempo de 10 minutos e inmediatamente después sumergido en nitrógeno líquido.

Las pajillas son descongeladas a temperatura ambiente, la activación espermática es inducida con suero fisiológico al 0.9% y se procede a realizar los análisis correspondientes.

5.5.4 Características macroscópicas.

- **Volumen.** Se determinó en un tubo de ensayo graduado, por observación directa.
- **Color.** Se determina por observación directa, inmediatamente después de la colecta del semen.
- **Olor.** Se determina por medio del olfato
- **Aspecto.** Se determinó por observación directa y se clasificó en cremoso lechoso y acuoso.
- **pH.** Se determinó directamente mediante el uso de cinta colorimétrica.

5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (**D.I.A**) con tres tratamientos y por cada tratamiento cinco unidades experimentales, cada unidad experimental estuvo constituida por una pajilla, distribuido de la siguiente forma:

T0 : Testigo control absoluto.

T1 : DMSO.

T2 : Métanol.

Con los datos obtenidos se efectuó un análisis de varianza de acuerdo al siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = u + t_j + e_{ij}$$

Donde Y_{ij} = respuesta del i -ésima unidad experimental que recibe el j -ésimo tratamiento.

U = media.

T_j = efecto del j -ésimo tratamiento

J = tratamiento 1,2,3,4

E_{ij} = error experimental asociado a la i -ésima u que recibiera el j -ésimo tratamiento.

Si en el análisis de varianza existen diferencias significativas entre tratamientos se procede a aplicar la prueba de tukey.

5.6.1 Formulación de hipótesis.

- **Ho.** No existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.
- **H1.** Existe por lo menos un tratamiento que produce un efecto diferente.

5.7 VARIABLES EVALUADAS

5.7.1 Características Microscópicas.

- **Tiempo de Motilidad.** Se estimó tomando el tiempo en segundos a partir del momento en que era activado el esperma con suero fisiológico al 0.9%, hasta cuando el movimiento de los espermatozoides eran lentos y casi imperceptibles.
- **Porcentaje de Motilidad:** Se determinó activando el esperma con suero fisiológico al 0.9% y se observó la motilidad representada como el número total de células en movimiento teniendo en cuenta un rango subjetivo entre 0 y 100%.

6. PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Las características macroscópicas del semen se utilizan tan solo para determinar si el semen a sufrido o no contaminación en el momento de la colecta. Es así que cuando se detecta algún tipo de contaminación las características como son el olor, color y aspecto cobran vital importancia.

6.1.1 Volumen. Fue generalmente bajo sobrepasando en muy pocas ocasiones 1ml.

6.1.2 Color. El color del semen de trucha Arco Iris fue blanco en la totalidad de las muestras.

6.1.3 Olor. En todas las muestras se percibió el olor típico a pescado fresco denominado “sui géneris”.

6.1.4 Aspecto. De las muestras colectadas para los tratamientos se aprecio un aspecto lechoso.

6.1.5 pH. Efectuado el análisis de varianza para la variable pH (Anexo B) no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, con un valor medio de 7.2, apreciándose una tendencia al pH neutro de los tratamientos.

6.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

6.2.1 Tiempo de Motilidad. En el (Anexo A) aparecen los resultados obtenidos de los tiempos cronometrados al probar los tratamientos para la congelación del semen.

El tiempo de motilidad es importante ya que es una estimación del potencial de eficiencia de fertilización del esperma.

Se estimó tomando el tiempo en segundos a partir del momento en que era activado el esperma, hasta cuando el movimiento de los espermatozoides es lento y casi imperceptibles.

Efectuado el análisis de varianza (Anexo C), para esta variable, existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, con un nivel de significancia del 5% de probabilidad.

Mediante la prueba de Tukey (Anexo D); Media de los tratamientos seguidos por una misma letra, son estadísticamente iguales al nivel del 5% de probabilidad.

El tiempo medio de motilidad es de 38 segundos, coincide con CARSOL SFELD quien sostiene que una vez activado el semen su tiempo de motilidad es alrededor de un minuto, luego del cual el esperma va a morir.

Con un promedio de 38 segundos de motilidad se observa que es un tiempo relativamente bajo, con relación al semen de bocachico el cual según el informe del INPA⁴⁹, obtuvo un valor medio de 202.16 segundos y el semen de bagre rayado obtuvo 150 segundos.

La figura 1 muestra los resultados del tiempo de motilidad obtenido en diferentes tratamientos.

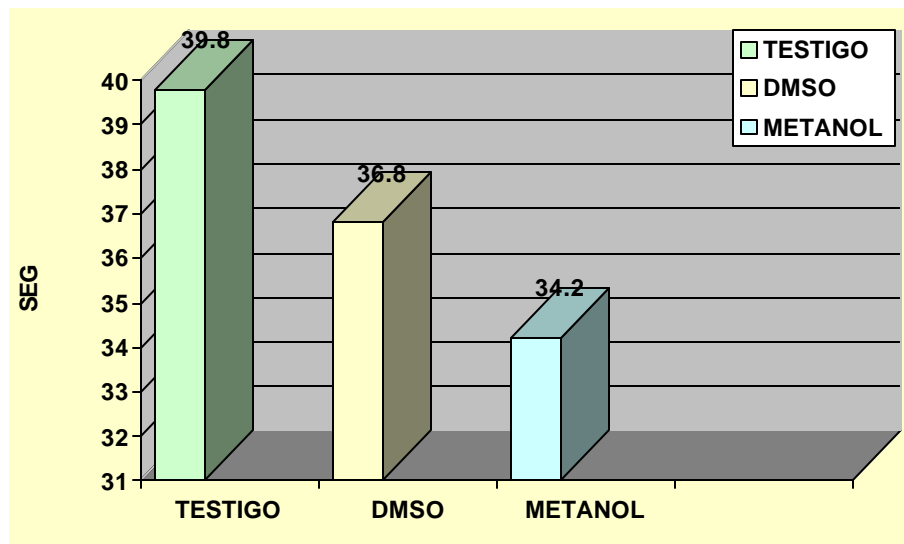


Figura 1. Comportamiento del tiempo de motilidad del semen de trucha arco iris con tres tratamientos

6.2.2 Porcentaje de motilidad. El (Anexo A), muestra los valores obtenidos postdescongelación de los tres tratamientos.

El análisis del porcentaje de motilidad a pesar de ser una estimación subjetiva es la manera más simple para evaluar el semen. El porcentaje medio de motilidad inicial fue del 90%, luego del proceso de criopreservación con DMSO se mantuvo

⁴⁹ INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA, Op cit., p.11.

una media del 76%, con el metanol el valor medio postdescongelación fue del 56% de motilidad.

Entre los resultados el porcentaje de motilidad sometido a la conservación en nitrógeno líquido sufrió una reducción significativa pretratamiento y postratamiento debido al proceso de enfriamiento, congelación y descongelación del semen.

Efectuado el análisis de varianza (Anexo D), para la variable porcentaje de motilidad con un 95% de confiabilidad se asegura que existe diferencias significativas entre los tratamientos, por lo tanto se procede a aplicar la prueba de Tukey.

En cuanto al análisis estadístico la prueba de Tukey (Anexo F), indica que existen diferencias altamente significativas entre los porcentajes de motilidad, teniendo en cuenta que de los tres tratamientos el que mejor media registró fue el T1, que involucra al DMSO como crioprotector.

La figura 2 muestra los resultados de motilidad obtenida postdescongelamiento para los tratamientos T0, T1 y T2 en una proporción 1:3.

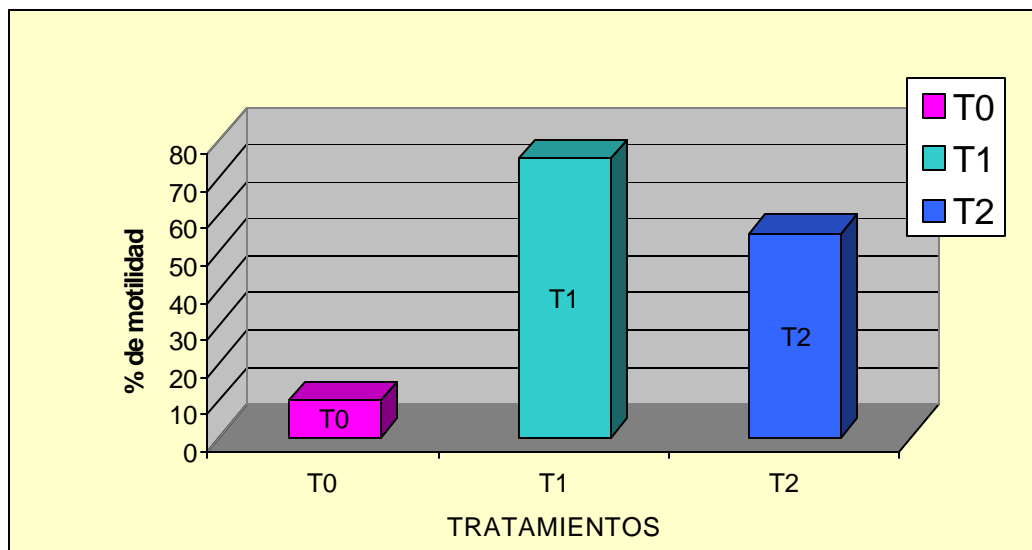


Figura 2. Comportamiento del semen, expresado en porcentaje de motilidad, de trucha arco iris con tres tratamientos post-descongelamiento

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que los porcentajes tanto del DMSO con 76% de motilidad postdescongelamiento como el metanol con 56%, demuestran su capacidad protectora del esperma de trucha arco iris.

Los resultados del 76 y 56% de motilidad, permiten realizar pruebas de fecundación, ya que porcentajes inferiores al 50% no deben utilizarse para fertilización.

El esperma para dilución y almacenamiento; su colecta debe ser muy cuidadosa, evitando su contaminación con agua, orina o materia fecal, para prevenir la difusión de enfermedades y activación.

Es importante señalar que los espermatozoides no tienen movilidad hasta que no entran en contacto con el agua. Este proceso de adquisición de la motilidad se denomina activación y su duración es de 30 a 60 segundos.

Un diluyente apropiado debe mantener vivos pero inactivos a los espermatozoides antes de la congelación.

7.2 RECOMENDACIONES

Utilizar el DMSO como crioprotector para el congelamiento del semen de trucha arco iris ya que se obtuvieron mejores resultados

Trabajar diferentes proporciones con relación semen-diluyente, lo cual también debe determinarse experimentalmente.

Cualquiera que sea la proporción, el diluyente y la esperma deben ser isotérmicos antes de mezclarlos.

Realizar pruebas de fecundación para determinar la respuesta de los tratamientos.

Ya que la motilidad de los espermatozoides descongelados y activados dura apenas unos segundos, se aconseja que la fecundación se haga rápidamente durante el primer minuto, en los trabajos de reproducción artificial.

En lo posible es mejor congelar esperma de machos no inducidos con hormonas, sino capturados en el medio natural.

Cabe señalar que la criopreservación de la esperma se efectúa de manera rutinaria en los centros de inseminación artificial para ganado, en donde generalmente se puede adquirir el nitrógeno líquido. Es por ello que debe fomentarse la vinculación entre los criadores de peces y de ganado.

BIBLIOGRAFIA

AMAYA, Rafael y ANZOLA, Eduardo. La trucha arco iris de aguas dulces. Bucaramanga : UJTL, 1988. 59 p.

COLE. H. Inseminación Artificial. Zaragoza : Acribia, 1974.618 p.

DERIVAUX, Jack. Reproducción de los animales domésticos. 2 ed. Zaragoza : Acribia, 1.982. 482 p.

DÍAZ, Mercedes.; GARCIA, Pilar y RODRÍGUEZ, Mario. Técnica de inseminación artificial en el conejo. En : Hojas divulgadas, Vol. 6, N 17.22-24 (junio, 1.989); 24 p.

DIERICH, Smidt y FRANZ, Ellendorff. Endocrinología y fisiología de la reproducción de los animales zootécnicos. Zaragoza : Acribia, 1.972. 395 p.

ERAZO, Andrés. Aspectos básicos de la trucha arco iris; Fundamentos de Acuicultura continental, Bogotá : UJTL, 1992. 248 p.

GARCÍA. RODRÍGUEZ, GUERRA Y TELLO. Madurez Sexual del Prochilodus nigricans, Magdalena : s.n., 1.995. 250 p.

HAFEZ. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. México : Interamericana, 1989.694 p.

INSTITUTO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA, Seminario taller del bocachico Prochilodus magdalenae, Barrancabermeja : INPA, 1.992, 73p.

INSTITUTO DE HIDROLÓGICA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES. Valores medios mensuales ambientales o sistema de formación hidrometeorológicas Pasto : IDEAM, 1999, 4 p.

LÓPEZ, Daniel. Piscicultura y pesca. Pasto : SENA, 1992. 224 p.

MARTÍNEZ, Benito. Ecología y piscicultura de aguas dulces. Madrid : Mundi prensa, 1984, 305 p.

PÉREZ, Fernando. Reproducción e inseminación artificial ganadera. Barcelona : científico- Medica, 1966, 614 p.

PINEDA, David y DONATO, Mario. Curso de Andrológia. Pasto : Universidad de Nariño, 1996. 162 p.

SORENSEN, Armando. Reproducción animal; principios y práctica. México : Mc Graw Hill, 1982. 61 p.

STEVENSON, Joseph. Manual de cría de la trucha. España : acribia, 1985. 219 p.

SALISBURY, GW y VALNDERMARK, N.L. fisiología de la reproducción e inseminación artificial en los bóvidos. Zaragoza : Acribia, 1964. 707 p.

ZENJANIS, Ricardo. Reproducción animal. Diagnostico y técnicas terapéuticas. México : Limusa, 1985. 253 p.

ANEXOS

Anexo A. Tabulación de datos por variables, replicas y tratamientos

Variable	Tratamiento		
	To	T1	T2
pH	7.0	7.5	7.5
	7.0	7.0	7.5
	7.0	7.0	7.0
	7.0	7.5	7.5
	7.0	7.0	7.0
Promedio	7.0	7.2	7.3
Tiempo de motilidad	40	38	35
	42	35	32
	38	37	34
	39	36	38
	40	38	32
Promedio	39.8	36.8	34.2
% de Motilidad	10	80	60
	10	75	55
	10	75	55
	10	80	50
	10	70	60
Promedio	10	76	56

Anexo B. Análisis de Varianza para la Variable pH

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.c.
Tratamientos	2	0,234	0,117	2.34
Error	12	0,6	0,05	
Total	14	0,834		

F 5% 3.89

$F_c < F_t$

No Existe diferencia estadística entre los tratamientos.

Anexo C. Análisis de varianza para la variable tiempo de motilidad

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.c.
Tratamientos	2	78,54	39,27	11,66
Error	12	40,4	3,366	
Total	14	118,94		

F 5% 3.89

$F_c > F_t$

Existe diferencia estadística entre los tratamientos.

Anexo D. Prueba de Tukey tiempo de motilidad

Tratamientos	Promedio	Grupo	A
T0	39.8	a	3.093
T1 (DMSO)	36.8	a b	
T2 (METANOL)	34.2	b	
Contraste de medias:		Diferencia estadística Significativa.	
Mo – M1		ns	
Mo – M2		*	
M 1 – M2		ns	

Medias de los tratamientos seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales al nivel del 5% de probabilidad.

Anexo E. Análisis de varianza para la variable porcentaje de motilidad

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.c.
Tratamientos	2	11453.334	5726.667	490.88
Error	12	140	11.666	
Total	14	118,94		

F 5% 3.89

$F_c > F_t$

Existe diferencia altamente significativas entre los tratamientos.

Anexo F. Prueba de Tukey porcentaje de motilidad

Tratamientos	Promedio	Tratamiento homogéneo	A
T1 (DMSO)	76	a	5.75
T2 (Metanol)	56	b	
T0 (Testigo)	10	c	
Contraste de medias:		Diferencia estadística Significativa.	
M1 – M2		*	
M1 – M0		*	
M2 – M0		*	

Medias de los tratamientos seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales al nivel del 5% de probabilidad.