



## Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>†</sup>

**R**evista  
Colombiana de  
Ciencias  
Pecuarias

*Standardization of handling and freezing sperm from masculinized females  
of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*

*Padronizar a gestão ea criopreservação de sêmen de fêmeas de truta arco-íris  
(*Oncorhynchus mykiss*) sob masculinização*

James J Betancur L<sup>1,2</sup>, Zoot; Andrés F Montoya<sup>1,2\*</sup>; Tatiana Mira<sup>1,2</sup>, Zoot; Francy A Rojas<sup>2</sup>, Zoot; Martha Olivera Ángel<sup>1</sup>, MV, Dr. Sci. Agr.

<sup>1</sup>Grupo Biogénesis, Facultad Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Asociación Colombiana de Acuicultores (Asoacuícola), Medellín, Colombia.

(Recibido: 21 febrero, 2008; aceptado: 22 agosto, 2008)

### Resumen

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

**Palabras clave:** *espermatozoide de trucha, maduración sexual, neomachos de trucha, reversión sexual*

### Summary

*The demand of monosex female stocks in production of trout has significantly increased during the past years, which has led to develop new technologies to standardize this process. The usage of semen of genetic females submitted to sexual reversion is a good choice. The objective of this research was to develop a methodology to mature in vitro and cryopreserved semen of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) females as strategy to produce lineage 100% Colombian trout female. The semen was directly obtained from the gonads after its surgical extraction of the slaughtered individuals, later it was submitted*

<sup>†</sup> Para citar este artículo: Betancur JJ, Montoya AF, Mira T, Rojas FA, Olivera Ángel M. Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Rev Colomb Cienc Pecu 2008; 21:340-350.

\* Autor para el envío de la correspondencia y la solicitud de separatas: Grupo Biogénesis, Laboratorio 46-233, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, A.A. 1226 Medellín, Colombia. E-mail: [asineronix@gmail.com](mailto:asineronix@gmail.com) Tel (+574) 219 91 49 Fax (+574) 219 91 49

to maturation process implementing seminal plasma of normal males and artificial plasma. The semen was cryopreserved in two extender dimethyl sulfoxide 10% and methanol 10%. Postmaturation, postcriopreservation motility and sperm fertility were evaluated. Maturation process had a significant effect on motility, the highest motility was obtained with artificial seminal plasma ( $55 \pm 10.4\%$ ). Highest post cryopreservation motility ( $29.9 \pm 13.3\%$ ) and highest fertility rates ( $26.33 \pm 7.53\%$ ) were obtained with dimethyl sulfoxide 10%.

**Key words:** rainbow trout new male, rainbow trout spermatozoa, sexual maturity, sexual reversion

### Resumo

A procura de linhas monosexo fêmeas na produção de trutas tem aumentado significativamente nos últimos anos, de modo que tecnologias foram desenvolvidas com a finalidade de padronizar este processo como o uso do esperma de genética feminina submetido a reversão sexual. O objectivo do presente inquérito foi para uniformizar a maturação *in vitro* e criopreservação de sêmen masculinização de fêmeas (neomachos XX) trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) como uma estratégia para produzir descendentes de 100% do sexo feminino dos jogadores colombianos. Para a obtenção do esperma neomachos foram mortas e sêmen foi recuperado submetida a maturação processo normal de plasma seminal plasma masculina ou artificiais. Para a criopreservação de sêmen foi testado crioprotectores dimethylsulphoxide 10% e 10% de metanol. O experimento foi avaluon mobilidade pós maturação e pós descongelamento e fertilidade do sêmen. O processo de maturação teve um efeito significativo sobre a porcentagem de mobilidade ( $p < 0.05$ ), para obter os melhores valores com artificial seminal plasma ( $55 \pm 10.4\%$  esperma). Os maiores valores de mobilidade postdescongelación ( $29.9 \pm 13.3\%$ ), bem como a melhor fertilidade ( $26.33 \pm 7.53\%$ ), foram registrados com o protocolo de dimethylsulphoxide a 10%.

**Palavras chave:** espermatozoides de trutas, maturidade sexual, novo trutas do sexo masculino, reversão sexual

## Introducción

La piscicultura en Colombia reúne a múltiples agentes económicos participes en las diferentes actividades de la producción y comercialización de productos intermedios y finales de la cadena. Estas corresponden a: 1) producción de alevinos, 2) levante y engorde, 3) procesamiento o transformación y 4) canales de comercialización (27). La truchicultura nacional en su primer el primer eslabón presenta limitantes tecnológicos, ya que en la actualidad no se poseen estrategias para establecer programas de producción continua de poblaciones monosexo. La producción de Salmónidos utiliza con base para el engorde lotes monosexo hembras, y en el país se importan ovas embrionadas monosexo hembras; las cuales finalizan incubación para posteriormente ser comercializado como alevino (34). Ello ha implicado que las centrales de reproducción nacionales vean limitada su producción de semilla incapacitados por no proveer semilla monosexo. Ello hace necesario se implementen estrategias para desarrollar programas tecnológicos que hagan frente a esta problemática en el sector acuícola.

El sexo fenotípico de los peces teleósteos puede ser alterado experimentalmente, habilidad que se les confiere a muchas especies principalmente debido a su característica de gonocorísticos indiferenciados (33). La gónada de embriones de peces teleósteos es bipotencial, y subsecuentemente sus vías de diferenciación sexual pueden ser orientadas a un desarrollo final en ovario o testículo, tratamientos con hormonas sexuales exógenas tienen la capacidad de dirigir la orientación del desarrollo (6).

El uso de neomachos para obtener descendencias 100% hembra es un método ampliamente utilizado para controlar el sexo en sistemas de producción acuícola (12, 17, 33), lo que es fundamental para optimizar los resultados económicos de las explotaciones (16). La masculinización se obtiene suministrando  $17\alpha$ -metiltestosterona durante los primeros días de alimentación. En la mayoría de los animales sometidos al tratamiento el ducto espermático está ausente o incompleto y el semen debe ser colectado tras la extracción quirúrgica

de las gónadas (33). La extracción directa de espermatozoides desde el testículo implica que estos no sufran modificaciones que tiene lugar en el tránsito por el ducto espermático de los machos normales, como: regulación iónica del plasma seminal (21), secreción de hormonas (29), reabsorción de espermatozoides, y aumento de niveles de AMPc en el interior del espermatozoide (26).

Los espermatozoides extraídos directamente de testículo pueden no haber completado su madurez metabólica (28, 21). En condiciones experimentales, los espermatozoides de peces teleósteos han mostrado su capacidad de producir energía durante el episodio de movilidad y durante su almacenamiento inmóvil y utilizan la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la fosforilación oxidativa, el catabolismo de lípidos, y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (25, 28), como las rutas bioquímicas para la obtención de dicha energía; por lo tanto, las condiciones aeróbicas y anaeróbicas determinarán la eficiencia y el uso de una ruta específica. Diversos autores han determinado los efectos benéficos de las atmósferas de oxígeno y condiciones de hiperoxia, sobre la movilidad y viabilidad espermática en *Oncorhynchus mykiss* (35, 5), *Clarias gariepinus* (28), e *Hippoglossus hippoglossus* (4). Mientras que modelos desarrollados en condiciones anaeróbicas afectan negativamente estas variables espermáticas (14, 22).

Los espermatozoides de neomachos (XX) son en la mayoría de los casos inmóviles cuando son extraídos de los testículos y requieren de maduración exógena antes de la activación (30). La pérdida de los ductos espermáticos hace que sea necesario mantener un gran número de reproductores en los centros de reproducción, para poder lograr reproducción a lo largo de todo el año. El inconveniente para determinar el grado de madurez gonadal por apariencia externa implica que al momento de la extracción se obtengan gónadas en diferentes estadios de madurez, que presentan variabilidad en la respuesta a los procesos de maduración y criopreservación. Por consiguiente, el presente trabajo tuvo como objetivo la estandarización de un protocolo de manejo para la maduración espermática *in vitro* bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y la implementación de

dos protocolos de criopreservación de semen de neomachos de trucha arco iris como herramienta para la producción de poblaciones 100% hembras nacionales.

## Materiales y métodos

### *Aval de comité de ética*

Este estudio contó para su ejecución con el aval del Comité de ética para la experimentación con animales (CEEAA), de la Universidad de Antioquia (Acta n° 22 del 26 de mayo del 2005)

### *Área de estudio*

El trabajo experimental fue llevado a cabo en la Estación Piscícola, Truchas los Alpes, ubicada a 2600 m.s.n.m, con una temperatura ambiente promedio de 14 °C y temperatura promedio del agua de 12 °C, en el departamento de Caldas, Colombia.

### *Selección de neomachos (XX)*

Poblaciones 100% hembras fueron sometidas a reversión con 17 $\alpha$ - metiltestosterona (3 mg/Kg de alimento), según lo descrito por Robles *et al* (33). Los individuos con una edad superior a los 18 meses fueron evaluados por presión abdominal. Las hembras que expulsaron ovas fueron descartadas, mientras que los machos con la capacidad de expulsar semen a través del poro urogenital fueron separados para una futura identificación del genotipo. Todos los animales restantes fueron sexados por examen visual de las gónadas después del sacrificio.

### *Obtención y almacenamiento del plasma seminal de machos (XY)*

Reproductores machos (XY) sexualmente maduros fueron seleccionados, a los cuales se les realizó masaje abdominal cráneo-caudal para la obtención del semen. El eyaculado se centrifugó a 300 x g/10 min/4 °C, luego se obtuvo el sobrenadante y se centrifugó nuevamente bajo las condiciones descritas anteriormente; esta doble extracción del plasma se realizó con el fin de eliminar la mayor cantidad de material celular. El plasma seminal se almacenó en tubos de 10 ml a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente se implementó en pruebas de maduración del semen proveniente de neomachos (XX).

### *Semen de neomachos (XX)*

Antes de proceder a la obtención del semen se realizó una valoración fenotípica de los individuos: para definir los machos, se tuvo en cuenta el desarrollo del belfo en la maxila inferior y la coloración iridiscente en los flancos; en tanto que aquellos peces sin estas características fueron definidos como fenotípicamente hembras. Para la obtención del semen de neomacho los individuos se sacrificaron mediante decapitación, se retiró la mayor cantidad de sangre y las gónadas fueron extraídas evitando en todo momento romperlas. El área de irrigación sanguínea de las gónadas fue retirada y fueron lavadas con plasma seminal artificial (NaCl 103 mM, KCl 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mM y Hepes 2 mM, ajustada a pH 7.8) según lo descrito en Lahnsteiner *et al* (24). La obtención del semen se realizó por las técnicas de goteo y homogenizado. La primera de ellas consistió en realizar cortes longitudinales y transversales en el testículo para luego obtener el semen por goteo en un tubo colector. En otro caso todo el testículo era homogenizado en cajas petri y vehiculizado en plasma seminal artificial, determinando la cantidad de semen en el suspendido, partiendo de la cantidad de plasma utilizado en su vehiculización; luego se registró el porcentaje de movilidad por muestra (movilidad inicial).

### *Proceso de maduración seminal*

El proceso de maduración se realizó siguiendo el protocolo descrito por Robles *et al* (33), donde se modificó el uso de solución de maduración comercial por plasma seminal de macho normal (XY) y plasma seminal artificial. El resto del proceso de maduración se realizó siguiendo el protocolo: las muestras se dispusieron a 4 °C/2 h en cajas de Petri en bolsas Ziploc (18 x 20 cms) selladas. Para estandarizar el proceso de maduración se probó adicionalmente el efecto del medio de maduración (plasma seminal y plasma seminal artificial) y la relación semen:medio de maduración (relaciones 1:0, 1:3, 1:6, 1:9). En estos dos últimos experimentos sólo se utilizó plasma seminal artificial. Finalizado el proceso se registró nuevamente el porcentaje de movilidad (post-maduración). El efecto del oxígeno fue probado en un experimento usando plasma seminal artificial (en relación 1:3)

y los experimentos de efecto de la relación fueron llevados a cabo bajo atmósferas de oxígeno. Para el desarrollo de los experimentos de medio de maduración se emplearon 10 muestras individuales y para determinar el efecto del oxígeno se emplearon cinco muestras individuales. En los experimentos para determinar el efecto de la relación semen: medio de maduración, se empleó una mezcla de semen de cinco individuos. Para todos los casos los experimentos fueron realizados por triplicado.

### *Evaluación seminal*

El porcentaje de movilidad y tiempo de activación se registró mediante dilución del semen en plasma seminal artificial en relación 1:20 semen: plasma seminal artificial. Se tomó una alícuota de 1µl de esta dilución y se adicionó 20 µl de solución activadora (NaHCO<sub>3</sub> 60 mM; Tris 50 mM; pH 9.0), acorde con lo descrito en (24). Se registró el porcentaje de espermatozoides móviles y se tomó el tiempo hasta que el 90% de los espermatozoides que presentaron movimiento perdieron su actividad. La evaluación fue llevada a cabo empleando un microscopio con aumento de 100X (10X ocular x 10X objetivo). La concentración espermática (Esp/ml) se determinó realizando un doble conteo en cámara de Neubauer, donde el semen fue diluido en una relación 1:5000 (semen:NaCl 0.07%) (11).

### *Criopreservación*

Dos protocolos de criopreservación fueron empleados: el primero de ellos, fue con dimetilsulfóxido (DMSO) (10 ml), glucosa (5.4 g), yema de huevo (10 ml), y agua destilada (80 ml) (30); el segundo estuvo constituido por metanol (10%), Albúmina de suero bovino 81.5%), yema de huevo (7%), y sacarosa (0.5%), ajustando el volumen final con plasma seminal artificial (20). El semen fue diluido en ambos diluyentes refrigerados a 4°C en una proporción semen:diluyente de 1:3. Después de la dilución, el semen fue empacado en pajillas de 0.5 ml. Posteriormente fueron transferidas a un termo seco de nitrógeno a -180 °C/10 min. Después de la congelación las pajillas fueron almacenadas en un termo húmedo para su criopreservación a -195 °C (tasa de congelación 63 °C/min). El semen empleado para este proceso fue obtenido por la técnica de macerado gonadal, este material fue previamente fue

diluido (1:3) para el proceso de maduración antes de ser diluido en el crioprotector; la concentración espermática fue evaluada después de vehiculizar el macerado y posteriormente se determinó por factores de dilución. En los experimentos se probaron una mezcla de de semen de cinco individuos, con cuatro repeticiones.

### Descongelación

Las pajillas fueron descongeladas a 70 °C/3 seg para el protocolo de dimetilsulfóxido (tasa de descongelación de 66 °C/min) (30), y a 25 °C/30 seg para el protocolo de metanol (tasa de descongelación de 58 °C/min) (20). El porcentaje de espermatozoides que presentaban movilidad post-descongelamiento se determinó siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para semen fresco.

### Pruebas de fertilidad

Las pruebas de fertilidad fueron llevadas a cabo usando la técnica de desove en seco. En el grupo control y los tratamientos se probaron las concentraciones espermáticas de 2, 4, y 8 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/móvil/ova. Las pajillas descongeladas fueron depositadas de inmediato sobre ovas ubicadas en cajas de petri (200 ovas/réplica) y después de una rápida y suave mezcla con una pluma fueron mezclados con solución activadora a razón de 6 ml/200 ovas. Después de la fertilización las ovas fueron depositadas en incubadoras de flujo descendente (tipo californiana) (24). El porcentaje de fertilidad se estableció mediante la proporción de huevos en estado de ojo (fértil).

### Análisis estadístico

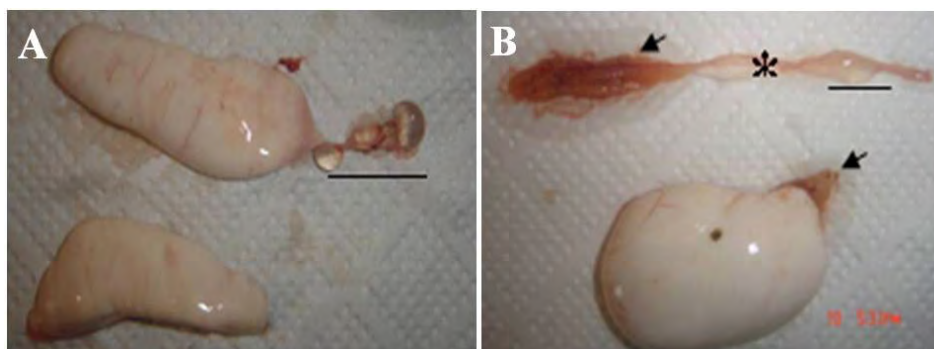
Los experimentos tuvieron un diseño completamente aleatorizado de efecto fijo balanceado,

donde cada tratamiento fue replicado tres veces. Para las pruebas de fertilidad se bloqueó por dosis y tratamiento. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar. Para las variables expresadas en porcentaje se aplicó transformación angular arcoseno y se determinaron diferencias entre tratamientos por experimentos a partir de ANOVA, seguidos por pruebas de Tukey con base en un nivel de significancia del 5 % y se realizaron correlaciones de Spermán para determinar la asociación entre el porcentaje de movilidad en fresco y post descongelación, estos análisis se efectuaron mediante el programa SAS ver 8.1. Además, se realizó una prueba de ji-cuadrado ( $\chi^2$ ) para establecer la asociación entre los fenotipos hallados en los neomachos y el éxito en la extracción de semen mediante el programa Statgraphics Centurion.

## Resultados

### Morfología gonadal neomachos

No se encontró asociación entre los diferentes fenotipos observados en el lote de neomachos con el éxito en la extracción de semen ( $\chi^2 = 4.14$ ,  $p < 0.05$ ). Por otra parte, se observó alta variación en la morfología testicular entre individuos, algunos mostraron gónadas atrofiadas o subdesarrolladas en las que no fue posible determinar sexo gonadal, ciertos individuos desarrollaron gónadas con combinación de tejido testicular y ovárico, otros mostraron desarrollo de un testículo y un ovario completos, pero la morfología más frecuente fue el desarrollo del testículo izquierdo en forma de saco ciego acompañado de un testículo derecho de menor tamaño, con una o múltiples vesículas en la región caudal de la gónada (véase Figura 1).

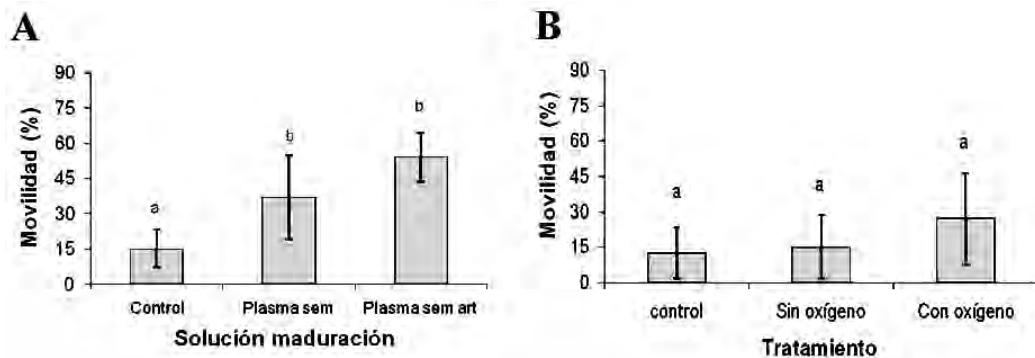


**Figura 1.** Variación morfológica de las gónadas de neomachos de trucha arcoiris. A: neomacho con testículos en forma de sacos ciegos, la línea señala la posición de la vesícula con líquido; B: macho con gónada intersex, las flechas muestran el tejido ovárico, la línea señala la posición de la vesícula con líquido y el asterisco el tejido testicular de la gónada derecha.

### Maduración seminal

En las pruebas de movilidad post-maduración se hallaron diferencias significativas entre el grupo control (semen fresco) y las soluciones de maduración empleadas ( $p < 0.05$ ), pero no se hallaron diferencias entre relaciones de semen y medio de maduración probadas, los valores medios fueron

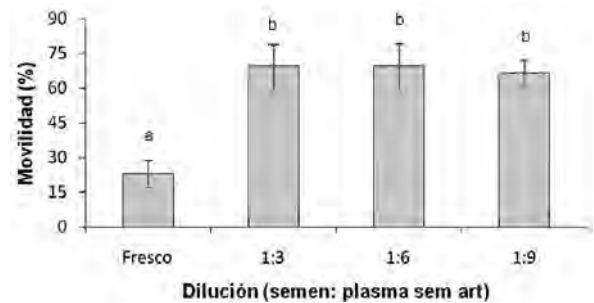
$15.1 \pm 8.2$ ,  $36.9 \pm 17.9$ , y  $54.1 \pm 10.5\%$  para el grupo control, plasma seminal y plasma seminal artificial, respectivamente; los tratamientos con plasma seminal artificial presentaron porcentajes de movilidad medios superiores y menor variación que el grupo tratado con plasma seminal (véase Figura 2).



**Figura 2.** A: efecto de medio de maduración ( $n = 30$ ), y B: efecto de la suplementación con oxígeno ( $n = 15$ ), sobre el porcentaje de movilidad postmaduración. Plasma sem art: plasma seminal artificial. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

El efecto de la adición de oxígeno al proceso de maduración no presentó diferencias significativas entre el grupo control (semen fresco) y los tratamientos; los valores medios fueron  $12.5 \pm 10.8$ ,  $15.2 \pm 13.4$ , y  $27.0 \pm 19.2\%$  para el control, la ausencia y la presencia de oxígeno, respectivamente. Sin embargo, los valores medios fueron superiores en las muestras suplementadas con oxígeno, cuando se encontró un alto coeficiente de variación entre los tratamientos (véase Figura 2). Los valores medios para el grupo control fueron  $22.9 \pm 5.8$ ,  $69.5 \pm 10$ ,  $69.5 \pm 10$ , y  $66.5 \pm 6.8\%$  en las relaciones 1:3, 1:6 y 1:9, respectivamente. Las diferentes relaciones de semen:plasma seminal artificial no presentaron diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ), pero lo hicieron con el grupo control (semen fresco pre-maduración) ( $p < 0.05$ ) (véase Figura 3).

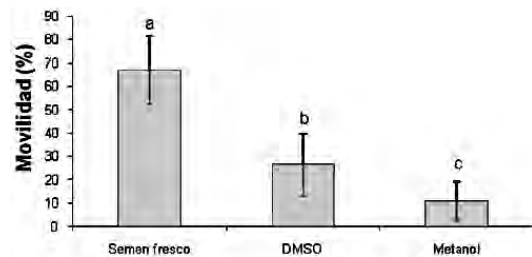
Una correlación directa ( $r = 0.971$ ) fue hallada entre la movilidad del semen fresco y la movilidad postdescongelación en el protocolo de DMSO, por otro lado la movilidad post-descongelación con el protocolo de metanol mostró una correlación directa baja ( $r = 0.162$ ) con la movilidad del semen fresco (véase Figura 5).



**Figura 3.** Efecto de la relación semen: plasma seminal artificial en el proceso de maduración ( $n = 3$ ). Plasma sem art: plasma seminal artificial. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

### Criopreservación

Los valores medios de la movilidad fueron  $68.5 \pm 14.5$ ,  $29.9 \pm 13.3$  y  $12.8 \pm 8.2\%$ , en semen fresco, criopreservado con DMSO y metanol, respectivamente. La movilidad postdescongelación presentó diferencias significativas entre el semen fresco y los protocolos evaluados, además se hallaron diferencias significativas entre los protocolos de DMSO y metanol ( $p < 0.05$ ) (véase Figura 4).



**Figura 4.** Efecto de diferentes crioprotectores sobre el porcentaje de movilidad post-descongelación ( $n = 4$ ). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

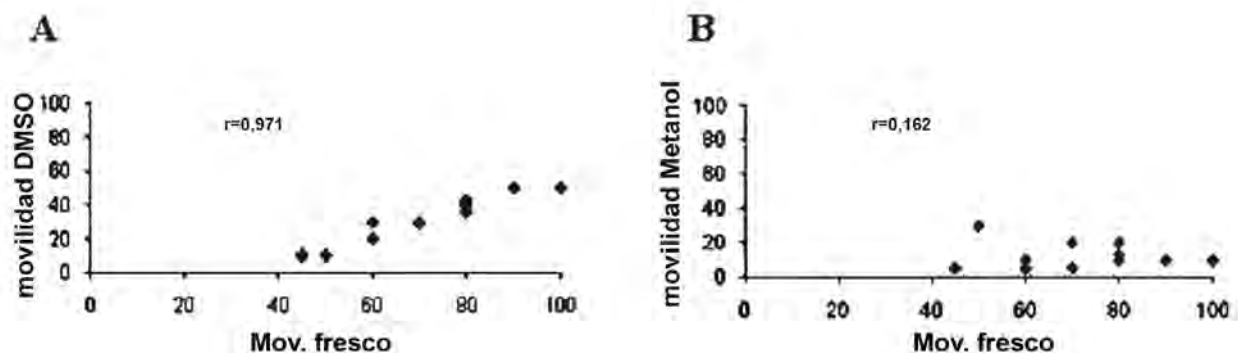


Figura 5. Correlación entre el porcentaje de movilidad en semen fresco y la movilidad post descongelación con DMSO (A) y metanol (B) (n = 10).

#### Fertilidad semen fresco y criopreservado

El semen fresco presentó valores medios de fertilidad del  $24.3 \pm 7.9\%$ , el DMSO  $26.33 \pm 7.53\%$  y el metanol  $16.55 \pm 8.48\%$ . La fertilidad del semen fresco y el criopreservado con DMSO no presentó diferencias estadísticas significativas, como sí ocurrió al comparar estos dos grupos con el protocolo de metanol (véase Figura 6). Los valores medios de fertilidad para el análisis en bloque de las dosis espermáticas implementadas fueron  $17.0 \pm 5.83$ ,  $21.44 \pm 8.42$ , y  $28.7 \pm 8.16$ , para 2, 4, y 8 millones de espermatozoides/móviles/ova, respectivamente.

Los valores de fertilidad entre dosis mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre la dosis  $2 \times 10^6$  y  $8 \times 10^6$  esp/mov/ova, pero no hubo diferencia estadística significativa entre estos con el tratamiento  $4 \times 10^6$  esp/mov/ova. Los valores medio para el análisis de la fertilidad cuando se hizo el bloqueo por tratamiento fueron  $24.3 \pm 7.9$  y  $26.3 \pm 8.48\%$  para el grupo control y el tratamiento DMSO, los cuales no presentaron diferencias entre ellos, pero ambos difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento metanol ( $16.5 \pm 7.53\%$ ) (véase Figura 6).

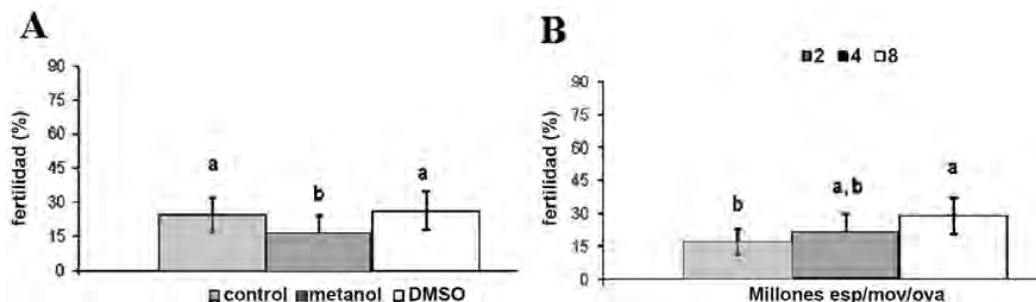


Figura 6. Porcentaje de fertilidad: A, con semen fresco o criopreservado con DMSO o metanol; o B, a diferentes dosis espermáticas (esp/mov/ova) implementando (n = 12). Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

#### Discusión

La obtención del semen en peces directamente desde el testículo evita la contaminación con heces y orina, pero por otra parte no evita la contaminación con sangre, mucus y tejido testicular propio de las muestras de neomacho; cualquier tipo de contaminación en semen de salmónidos afecta la calidad inicial de las muestras y la aptitud de las mismas para ser criopreservadas (31). En el presente estudio las técnicas de goteo y homogenizado fueron adecuadas

para la extracción de semen de neomachos y el uso de cada uno de ellos dependerá del estado de desarrollo gonadal de los individuos. Sin embargo, el proceso de homogenizado tiene como desventaja la recuperación de células inmaduras de la línea germinal y tejido testicular no espermático.

El paso de los espermatozoides a través del ducto testicular eferente juega un papel importante en la maduración y nutrición espermática (19), donde la maduración iónica a expensas de la

formación del plasma seminal es uno de los eventos más importantes de este proceso (33), en el cual también tienen lugar la síntesis de esteroides como la principal actividad hormonal (29), actividad heterofagocítica y reabsorción de formas espermáticas inmaduras (7) y regulación del contenido de AMPc, importante en el metabolismo energético del espermatozoide (26). En el presente trabajo el proceso de maduración tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de movilidad. El plasma seminal artificial, cuya composición aporta los componentes iónicos al proceso de maduración, puede ser implementado de manera exitosa como medio de maduración para semen de neomachos.

De ahí que, el uso de plasma seminal proveniente de diferentes machos y usado en la mezcla implica variación en los constituyentes plasmáticos, lo que podría explicar la alta variación en la respuesta de las muestras maduras con este tratamiento. Adicionalmente, la implementación del plasma seminal como medio de maduración posee inconvenientes: presupone tener en campo equipos de alto costo y la obtención de altos volúmenes es dependiente de la cantidad de machos normales con semen, hecho que no tiene incidencia para la preparación del plasma artificial, cuya composición es de reactivos utilizados de rutina en los laboratorios, fácil preparación, almacenamiento y mayor estabilidad del pH y la osmolaridad.

En nuestros experimentos el suministro de oxígeno no tuvo un efecto significativo sobre la movilidad post-maduración, pero su adición aumenta los valores medios para la variable movilidad. En el pez *Atlantic halibut* reportaron el efecto significativo de la atmósfera gaseosa sobre la movilidad espermática. Además, el análisis comparativo entre la maduración en atmósferas con y sin oxígeno, mostro una rápida y drástica reducción de la movilidad en las muestras almacenadas sin oxígeno (4). Las condiciones de hiperoxia favorecen la movilidad espermática y como el almacenamiento bajo condiciones anaeróbicas induce la rápida pérdida de la viabilidad espermática (32), mientras que el almacenamiento del semen en atmósferas saturadas de oxígeno retuvo significativamente la habilidad de fertilizar del semen de *Oncorhynchus mykiss* (35).

En los espermatozoides de *Chalcalburnus chalcoides* y *Oncorhynchus mykiss*, los niveles de glucosa disminuyeron durante la movilidad y durante el almacenamiento inmóvil (4, 22), en tanto que en *Clarias gariepinus* se halló que la glicólisis no tiene importancia durante el almacenamiento inmóvil, tomando como referencia los niveles constantes de lactato, los cuales disminuyen notablemente en el episodio de movilidad (28). La glicólisis y el catabolismo de algunos aminoácidos forman como producto final el piruvato, pero cuando la actividad respiratoria es inhibida, los niveles de lactato incrementan, por la actividad de la isoenzima lactato deshidrogenasa (14, 22). Al momento de la activación espermática la glucosa disminuye notablemente, debido a que la tasa de respiración y glicólisis incrementan significativamente (14, 28). Una pérdida de glucosa durante el almacenamiento inmóvil dada las condiciones anaeróbicas, dará como resultado una ineficiente producción de piruvato, el cual produce malato por acción de la enzima málico y produce acetyl-CoA por acción del complejo piruvato deshidrogenasa, los cuales soportan el ciclo de los ácidos tricarbónicos; este produce electrones y coenzimas que van a formar parte de la cadena respiratoria, donde la energía liberada es conservada en forma de ATP, por el proceso de fosforilación oxidativa (5, 21, 28). La producción de ATP es esencial para la movilidad espermática de *Oncorhynchus mykiss* y la disminución en la producción de ATP equivale al descenso de la movilidad espermática (22). Además, el almacenamiento de semen en ausencia de oxígeno reduce el contenido de ATP aproximadamente un 10% de los valores iniciales (5).

El ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa están activos durante el almacenamiento inmóvil de los espermatozoides (28). También se reporta la disminución en los niveles de fosfolípidos y ácidos grasos esterificados y una ligera tendencia a incrementar el catabolismo de los lípidos con una subsecuente  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos; todo ello asociado al consumo de oxígeno, el cual también es detectado en el metabolismo espermático basal (21, 22, 28). Lo anterior podría sugerir que estas vías son esenciales en la producción de energía en espermatozoides inmóviles y que la presencia de oxígeno es un factor determinante en la producción eficiente de energía.



Sin embargo, el metabolismo espermático presenta diferencias específicas de especie y por lo tanto no es un proceso uniforme en los peces teleosteos. Además, probablemente existan discrepancias en los resultados, dado las diferencias en la relación espermatozoides-oxígeno, lo cual es un factor altamente variable en los reportes existentes; como también posibles diferencias en el contenido de  $\text{CO}_2$  en el recipiente de almacenamiento, dato no tenido en cuenta en los reportes (5, 28). El stress oxidativo de las membranas espermáticas al mismo tiempo que una baja tasa de metabolismo podría ser otra razón para implementar oxígeno (4, 21).

Los datos del presente estudio no mostraron un efecto significativo entre la relación semen: solución de maduración sobre el porcentaje de movilidad post-maduración, podría implementarse bajo condiciones de campo el menor factor de dilución, lo que permitiría obtener pajillas con mayor concentración espermática, como estrategia para optimizar la técnica de fertilización de grandes lotes de ovas (9, 23). Babiak *et al* (4) reportaron que bajo atmósferas gaseosas, el semen almacenado sin diluir puede llegar a deshidratarse en el curso del almacenamiento a causa de la evaporación del agua. Por otro lado, almacenar semen sin diluir y sin atmósfera de aire causa pérdida de la viabilidad celular debido a una drástica pérdida de oxígeno. En esta misma investigación se comparó el factor de dilución 1:9, que fue significativamente mejor que la dilución 1:1, con resultados superiores para la atmósferas gaseosas que para aquellas almacenadas sin oxígeno. Los resultados podrían sugerir que la baja dilución probablemente inducida por las condiciones de hipoxia, afectan los parámetros de movilidad, mientras altas diluciones podrían hacer perder las propiedades protectoras de los compuestos del plasma seminal, lo que afectaría los valores de los diferentes parámetros de movilidad (5, 4). Las condiciones óptimas de dilución neutralizan los productos de la lisis celular y reducen suficientemente la actividad de las enzimas líticas del plasma seminal; también provee condiciones aeróbicas para las propiedades protectoras aun estables de los compuestos del plasma seminal (24, 28).

Muchos factores y procesos biológicos afectan la eficiencia de la criopreservación en espermatozoides

de trucha arco iris. Por lo tanto, se le considera un proceso multifactorial donde se debe tener en cuenta el efecto individual (13), la temperatura de manejo de los animales (33), la dieta y el grado de endogamia de los donantes (3); además de los eventos inherentes al animal y propios de la técnica que debe ser tenidos en cuenta como: componentes y proporción en del crioprotector, relación semen:extensor, tiempo de equilibrio, descenso de temperatura, sistema y volumen de empaque (9, 23) y temperatura de descongelación (2, 20, 30).

La criopreservación en general tuvo efectos negativos sobre la movilidad espermática, con diferencias significativas entre los crioprotectores empleados, lo que sugiere que el DMSO es más eficiente que el metanol para ser utilizado en semen de neomachos de trucha arco iris. El enfriamiento y la posterior descongelación causaron una pérdida significativa de la calidad espermática. Con el uso de metanol sólo el 3.9% de las células post descongelación eran viables comparado con el 17.3 y 17.7 % obtenido con  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  y DMA, donde solo se obtuvo una fertilidad de 10.4% con  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ , mientras que los otros tratamientos no reportaron fertilidad, todos a una dosis seminantes de  $10 \times 10^6$  células vivas/ova (8). La implementación de DMSO 10% ha demostrado ser eficiente para criopreservar semen de machos normales XY y neomachos XX de trucha arco iris (2), donde se reportan movilidades post descongelación del 30% con porcentajes de fertilidad entre el 20 y 65% a dosis inseminantes de  $8.5 \times 10^6$  esp/mov/ova (33), y fertilidades del 60% a dosis de  $2.7 \times 10^7$  esp/mov/ova (30). Estos datos de movilidad y fertilidad son similares a los obtenidos en nuestros experimentos, donde se muestra una relación directa entre las dosis inseminante y el porcentaje de fertilidad.

Los datos de dosis espermáticas reportadas para semen de neomacho de trucha arco iris presentan rangos muy amplios, lo que sugiere que es necesario determinar la dosis espermática más adecuada para cada centro de reproducción hasta alcanzar valores de fertilidad cercanos al 90%, debido principalmente a que el semen obtenido directamente desde los testículos y en animales bajo condiciones de manejo diferentes, tienen características especiales que hacen que los protocolos de criopreservación sean más específicos.

Una posible explicación a las bajas tasas de fertilidad obtenidas con semen criopreservado puede ser el daño de la membrana espermática (15), involucrada en el intercambio iónico que desencadena el proceso de activación. La desestabilización de la membrana espermática es causada por cambios abruptos de temperatura durante el enfriamiento y descongelación, en la transición de este evento se postula la hipótesis que tal daño se genera por la peroxidación de los lípidos de membrana y desacople de aminoácidos que desestabilizan las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y lípidos de membrana (1, 8, 12). Además, existe evidencia que sugieren que el proceso de criopreservación pueden generar daños significativos al genoma espermático, criodaños subletales que en muchos casos no pueden ser detectados por procedimientos estándar de evaluación espermática; la utilización de este material seminal daría como resultados individuos haploides y aneuploides, en algunos casos se daría la fertilización pero las divisiones posteriormente se suspenden y por otro lado individuos que llegan al estadio de embrión en fase de ojo pero no puedan sobrevivir (8, 10, 18).

En conclusión, la maduración *in vitro* favorece la variable movilidad espermática, el plasma seminal de macho normal y plasma seminal artificial pueden ser implementados con medios de maduración. En este estudio la atmósfera de oxígeno no presentó diferencias estadísticas significativas al usarla como

estrategia para mejorar los datos de movilidad en el proceso de maduración, a diferencia de otros autores que han reportado un efecto favorable. El protocolo de DMSO es el más viable para ser utilizado en la criopreservación de semen de hembras masculinizadas, al ser significativamente superior en los porcentajes de movilidad pos descongelación y su movilidad post tratamiento puede ser predicha por su correlación positiva alta ( $r = 0.971$ ) con la movilidad del semen fresco. El porcentaje de fertilidad está directamente relacionado con la dosis espermática empleada, el tratamiento metanol a las mismas dosis espermáticas (esp/mov/ova) difirió significativamente, lo que podría sugerir que pueden estar ocurriendo eventos celulares que disminuyen la habilidad de fertilizar en este tratamiento, que no pueden ser detectados a través del estudio de la variable movilidad.

### Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero de Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA y el Instituto Colombiano para el Desarrollo de las Ciencias y la Tecnología "Francisco José de Caldas" Colciencias. Los autores agradecen la inmensa colaboración durante el desarrollo del proyecto al profesor Alexandre Ninhaus-Silveira, docente del Departamento de Biología y Zootecnia; UNESP; Ilha Solteira - São Paulo - Brasil.

### Referencias

1. Álvarez JG, Storey BT. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl* 1993; 14:199-209.
2. Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H, et al. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 2001; 56:177-192.
3. Babiak I, Glogowski J, Dobosz S, Kuzminski H, Goryczko K. Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation. *J Fish Biol* 2002; 60:561-570.
4. Babiak I, Ottesen O, Rudolfson G, Johnsen S. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. I: Optimizing the protocol. *Theriogenology* 2006; 66:2025-2035.
5. Bencic DC, Krisfalusi M, Cloud JG, Ingermann RL. Maintenance of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm at different *in vitro* oxygen tension alters ATP levels and cell functional characteristics. *Fish Physiol Biochem* 1999; 21: 193-200.
6. Bhandari RK, Nakamura M, Kobayashi T, Nagahama Y. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 2006; 145:20-24.
7. Billard R, Takashima F. Reabsorption of spermatozoa in the sperm duct of rainbow trout during the postspawning period. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1983; 43:387-392.
8. Cabrita E, Alvarez R, Anel L, Rana K, Herraez P. Sublethal damage during cryopreservation of Rainbow trout Sperm. *Cryobiology* 1998; 37:245-253.

9. Cabrita E, Robles V, Alvarez R, Herráez M. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 2001; 201:301-314.
10. Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez M. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005; 50:144-154.
11. Ciereszko A, Dabrowski K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using an spectrophotometric technique. *Aquaculture* 1993; 109:367-373.
12. Feist G, Yeoh C, Fitzpatrick M, Schreck C. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 $\alpha$ -methyltestosterone and 11 $\beta$ -hydroxyandrotenedione. *Aquaculture* 1995; 131:145-152.
13. Glogowski J, Babiak I, Kucharczyk D, Luczynski M. The effect of individual male variability on cryopreservation on bream (*Abramis brama*) sperm. *Polskie Arc Hydrobiologii* 1997; 44: 279-283.
14. Gronczewska J, Zie tara M, Biegiewska A, Skorkowski E. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring *Clupea harengus*. *Comp Biochem Physiol Part B* 2003; 134:399-406.
15. Herraéz P, Mediavilla M, Alvarez R, Manso A, de Paz P. Cellular damage by cryopreservation in trout sperm. *Proc Int Meet Refrig Aquacult. Bordeaux* 1996: 57-64.
16. INCODER. Análisis de coyuntura, Piscicultura en Colombia. Boletín semanal 52. Sistema de información de precios y mercados para la producción Acuícola y pesquera. Bogotá-Colombia. 2006; 16-22.
17. Johnstone R, Simpson T, Youngson A. Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture* 1978; 13:115-134.
18. Labbe C, Maise G. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the seminal plasma. *Aquaculture* 1996; 145:281-294.
19. Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maise G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Dev* 200; 60:397-404.
20. Lahnsteiner F. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Res* 2000; 31:245-258.
21. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA. Physiological and biochemical determination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (pisces Teleostei). *Reprod Nutr Dev* 1996; 33:349-360.
22. Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T. Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *J Exp Zool* 1999; 284:454-465.
23. Lahnsteiner F, Mansour N, Weismann T. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. *Aquaculture* 2002; 209:359-367
24. Lahnsteiner F, Weismann T and Patzner R. Aging processes of rainbow trout semen during storage. *Prog Fish Culturist* 1997; 59:272-279.
25. Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner, RA. Evaluation of the semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* 1998; 163:163-181.
26. Le Lay S, Ogier de Baulny B, Maise G, Labbe C. 1999. Cellular ATP content before freeze-thawing and rainbow trout sperm fitness to cryopreservation. 36th Ann Meet Soc Cryobiol-Marseille; 12-15 July 1999. p. 210.
27. Martínez H, González F, Espinal C. La Cadena de la Piscicultura en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia. 2005.
28. Mansour N, Lahnsteiner F, Berger B. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Comp Biochem Physiol Part B* 2003; 135: 285-296.
29. Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J Exp Zool* 1992; 261:359-363.
30. Ninhaus-Silveira A, Foresti F, Aiko TY, Rigolino MG, Verissimo R. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Braz Arch Biol Technol* 2006; 49:73-77.
31. Rana KJ, Gupta SD, McAndrew BJ,. The relevance of collection techniques on the quality of manually stripped atlantic salmon (*Salmo salar*) milt. Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organism. International workshop on the storage and cryopreservation of gametes and embryos of aquatic organisms. *Aquac News* 1992; 14:4.
32. Rana K. Preservation of gametes. In: Bromage NR, Roberts RJ (eds). *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 53-76.
33. Robles V, Cabrita E, Cuñado S, Herráez MP. Sperm cryopreservation of sex reserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture* 2003; 224:203-212.
34. Rosado R. Manejo reproductivo en cautiverio de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). En *Reproducción de peces en el trópico*. INCODER, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2005; 123 -146.
35. Stoss J, Holtz W. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture* 1983; 31:269-74.