

## INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE CONGELACION EN LA CALIDAD DE SEMEN DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

### Influence of freezing temperature on semen quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Yan Manrique Quispe<sup>1</sup>, Carlos Bustamante Quispe<sup>1</sup>, Francisco Rodríguez Huanca<sup>2</sup>,  
Domingo Ruelas Calloapaza<sup>3</sup>, Uri Perez Guerra<sup>4\*</sup>, Marcelino Aranibar Aranibar<sup>5</sup>, Manuel Pérez Durand<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Post  
Grado en Ciencia  
Animal, Facultad de  
Medicina Veterinaria  
y Zootecnia,  
Universidad Nacional  
del Altiplano, Perú

<sup>2</sup> Lab. de Mejoramiento  
Genético Animal,  
Facultad de Medicina  
Veterinaria y  
Zootecnia,  
Universidad Nacional  
del Altiplano, Perú

<sup>3</sup> Lab. de Patología  
Veterinaria, Facultad  
de Medicina  
Veterinaria y  
Zootecnia,  
Universidad Nacional  
del Altiplano, Perú

<sup>4</sup> Lab. de Reproducción  
Animal, Facultad de  
Medicina Veterinaria  
y Zootecnia,  
Universidad Nacional  
del Altiplano, Perú

<sup>5</sup> Lab. de Nutrición y  
Alimentación Animal,  
Facultad de Medicina  
Veterinaria y  
Zootecnia,  
Universidad Nacional  
del Altiplano, Perú

\* Corresponding author:  
Uri Perez Guerra  
E-mail:  
[uperez@unap.edu.pe](mailto:uperez@unap.edu.pe)

Recibido: 29/09/2021

Aceptado: 25/12/2021

Publicado: 31/12/2021

#### ABSTRACT

Trout production in Peru has export potential. However, there are no fry available to maintain production throughout the year and there is also a lack of egg production at certain times of the year. Therefore, the alternative is to cryopreserve semen for the non-reproductive season. The objective of the study was to determine the influence of freezing temperature on the quality of rainbow trout semen. The semen of 12 reproductive males was collected in the facilities of the Chucuito Research and Production Center of the National University of the Altiplano of Puno, which underwent a macroscopic, microscopic pre and post thaw seminal evaluation and the fertility rate was measured. Due to the effect of three freezing temperatures (-80 °C, -100 °C, -120 °C), cryopreservation had a decline curve of -20 °C / min. The fresh seminal parameters were similar to those reported by other researchers. While freezing had unfavorable effects on semen quality, the best results for activation time (51.33 sec) and vitality (35.33%) were obtained with -100 °C, but the higher motility was obtained with -120 °C (36.33%). Regarding fertility, the higher rate was obtained with -100 °C (70.97%), followed by -80 °C and -120 °C in which 68.86% and 64.34% were obtained, respectively. In conclusion, the results suggest that the tolerable freezing temperature of rainbow trout semen is around -100 °C, which is shown as a favorable alternative for the reproductive management of rainbow trout under natural hypobaric conditions of the Peruvian highlands.

**Keywords:** Eggs, fertility, fish, freezing, sperm quality.

#### RESUMEN

En el Perú la producción de truchas tiene potencial de exportación. Sin embargo, no se dispone de alevinos para mantener la producción durante todo el año y además la falta de producción de ovas en algunas épocas del año. Por ello, se tiene la alternativa de crioconservar semen para la época no reproductiva. El objetivo del estudio fue determinar la influencia de la temperatura de congelación en la calidad de semen de truchas arcoiris. Se colectó el semen de 12 machos reproductores en las instalaciones del Centro de Investigación y Producción Chucuito de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, a los cuales se les hizo una evaluación seminal macroscópica, microscópica pre y post descongelación y se midió la tasa de fertilidad por efecto de tres temperaturas de congelación (-80 °C, -100 °C, -120 °C), la crioconservación tuvo una curva de descenso de -20 °C/min. Los parámetros seminales en fresco fueron similares a reportados por otros investigadores. Mientras que la congelación tuvo efectos desfavorables sobre la calidad seminal, es así que los mejores resultados para tiempo de activación (51.33 seg) y vitalidad (35.33%) fueron obtenidos con -100 °C, pero la mejor motilidad se obtuvo con -120 °C (36.33%). Respecto a la fertilidad, la mayor tasa se obtuvo con -100 °C (70.97%), seguido de -80 °C y -120 °C en los que se obtuvieron 68.86% y 64.34%, respectivamente. En conclusión, los resultados sugieren que la temperatura tolerable de congelación de semen de truchas arcoiris se encuentra alrededor de -100 °C lo cual se muestra como una alternativa favorable para el manejo reproductivo en trucha arcoiris bajo condiciones hipobáricas naturales del altiplano peruano.

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

## INTRODUCCIÓN

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es una especie muy prolífica, pero viene disminuyendo la diversidad genética en las granjas acuícolas destinadas a la producción de alevinos (Torres et al., 2014). En condiciones naturales desovan según su estacionalidad reproductiva (Bustamante-González et al., 2018; Castro-Castellón et al., 2017) y con limitaciones en la producción de alevinos (Betancur et al., 2008).

Estas limitantes en la producción, propicia la conservación de semen para reproducción en época no reproductiva para lo cual existen métodos como la vitrificación (Cuevas-uribe et al., 2013) que se aplica en peces con semen de poco volumen (Xin et al., 2017). Otro método es la refrigeración a 4°C, pero se restringe por el corto tiempo de conservación (10 d), lo que es poco atractivo para conservar semen por largos periodos (Merino et al., 2020; Ulloa-Rodríguez et al., 2018; Trigo et al., 2015) ambas técnicas ofrecen pocas ventajas sobre la congelación lenta (Cuevas-uribe et al., 2017) como bajos costos, fácil mantenimiento y transporte (Martínez-Páramo et al., 2008) facilitando la reproducción artificial en salmónidos (Judycka et al., 2019; Restrepo-Betancur et al., 2017).

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

A pesar de que se tienen estudios en conservación de semen, continúa la búsqueda de métodos e insumos que puedan hacer más viables a los espermatozoides (Pereira et al., 2020; Hezavehei et al., 2018). La mayoría de las investigaciones se centran en la utilización de crioprotectores ideales, y dejan de lado otros factores como la velocidad y temperatura de congelación que son críticas en la formación de cristales de hielo y afectan la calidad de semen (Stornelli et al., 2005). Debido a que no se cuenta con reportes de crioconservación seminal de trucha bajo condiciones hipobáricas naturales del altiplano peruano, en el presente estudio se pretende determinar la influencia de tres temperaturas de congelación sobre la calidad seminal de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

## MATERIAL Y METODOS

### Animales experimentales

La investigación se realizó en el Centro de Investigación y Producción Pesquera (CIP), en el distrito de Chucuito, Provincia y Departamento de Puno a una altitud de 3850 m y en las coordenadas 15°53'48.59" S y 69°53'45.08" O, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano. Se utilizó 15 reproductores: 12 machos mayores a un año (3 control, 9 para el experimento) y 3 reproductoras hembras de dos años, con peso promedio  $1.61 \pm 0.08$  kg, luego fueron llevados a pozas por 24 h antes de iniciar la colecta y durante este tiempo

fueron mantenidos sin suministro de alimento (Cruz-casallas et al., 2006). La temperatura promedio del agua osciló entre 10°C a 12°C en cada poza durante todo el proceso.

### Colecta de gametos

Tanto la obtención de espermias como la de ovas se realizó mediante masajes manuales ventrales en dirección opérculo-caudal de las truchas. La colección de semen se realizó en un vaso colector de plástico de 50 ml, estéril y seco, evitando contacto con agua, orina y heces en cuyo caso fue descartado. Mientras que para obtener las ovas se utilizó un recipiente de plástico seco y limpio, que luego sirvió para homogenizar la colecta (Necmettin et al., 2003).

### Evaluación de la calidad seminal

Tras la colecta, el producto seminal fue depositado en un recipiente a temperatura del estanque (10°C a 12°C) para ser evaluado. Las características macroscópicas como el volumen, se realizó en un vaso colector de plástico de 50 ml de capacidad, estéril y se hizo su evaluación visual en mililitros (ml). La determinación del color se realizó mediante observación subjetiva del vaso colector. Para analizar las características microscópicas como la concentración se usó la cámara Neubauer contabilizando cinco cuadrantes observados en un microscopio óptico a 40x de aumento, en dilución con NaCl (1:200). Mientras que para determinar la motilidad masal, el método aplicado fue subjetivo y para ello se utilizó un microscopio óptico a 10x en un lamina portaobjeto con 1 µl de semen y activado con 20 µl de bicarbonato de sodio al 1% y se consideró a las muestras con más de 80% de motilidad para la congelación. Para el tiempo de activación se utilizó una gota 1 µl de semen y 20 µl de bicarbonato de sodio al 1% expresado en segundos hasta que el 100% de los espermatozoides perdieron su actividad (Di Iorio et al., 2019). Para determinar la vitalidad se usó la tinción eosina nigrosina considerando las células muertas teñidas y las vivas sin coloración (Peralta-Martínez et al., 2018).

### Crioprotectores y congelación

Como diluyente se usó DMSO (Dimetilsulfoxido) 10%, Glucosa 5.4%, yema de huevo 10%. Se llevó a 100 ml de agua destilada (Betancur et al., 2008; Ninhaus-Silveira et al., 2006) y fue centrifugado a 2500 rpm/15 minutos usándose solo el sobrenadante. Tras la colecta se bajó la temperatura del semen y dilutor desde la temperatura de colección (10°C a 12°C) hasta 4°C en el lapso de 20 minutos; momento en el cual se realizó la dilución en una relación de 1:3 (semen:dilutor) (Lahnsteiner et al., 1996) sin tiempo de equilibrio. 29. Enseguida se envasó en pajillas de 0.5cc y se procedió a la congelación con una tasa de congelación de -20°C/min 30 y como variación del protocolo fueron congeladas a tres temperaturas Tratamiento I -80°C (TI), Tratamiento II -100°C (TII) y Tratamiento III -120 °C (TIII) (Cryologic CL 3300, Australia) a la que fueron sumergidas al nitrógeno líquido (NL) hasta su uso (Iaffaldano et al., 2015; Conget et al., 1996; Lahnsteiner et al., 1996; con algunas modificaciones). Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

### Descongelación y fertilidad

La pajilla de 0.5cc fue descongelada a 25°C por 30 segundos y fue colocada a 5 g de ovas por réplica (9 réplicas por tratamiento), mezclándolo con una pluma suavemente (Necmettin et al., 2003) y adicionando 5 ml de solución

activadora (Bicarbonato de sodio) (Iaffaldano et al., 2015) por 2 min, luego se adicionó agua del estanque para enjuagarlo y seguidamente las ovas fueron depositadas en incubadoras de flujo descendente. El porcentaje de fertilidad fue evaluado mediante la proporción de huevos en estado de ojo (fértil) a los 21 días.

#### Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados en un Diseño de bloques completamente al azar. Las variables fueron expresadas en promedios con sus respectivos errores estándar. Para la comparación de medias se utilizó la Prueba múltiple de significación de Tukey ( $p < 0.05$ ). Mientras que para determinar el grado de asociación entre variables se utilizó la matriz de correlación y para la comparación de las tasas de fertilidad se utilizó la prueba de Chi cuadrado. Todos los datos fueron analizados con la ayuda del programa The Jamovi Project (2021). Jamovi, v1.6, Computer Software.

## RESULTADOS

### Parámetros del semen fresco

Los datos obtenidos de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen fresco de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se muestran en promedio y su error estándar (EE) en la tabla 1.

Los parámetros seminales obtenidos para el semen fresco de trucha fueron de  $6.03 \pm 0.34$  ml de volumen, de color blanco

lechoso, con una concentración de  $4.54 \pm 0.08$  (10<sup>9</sup>/ml), un tiempo de activación de  $169.00 \pm 10.24$  seg, una motilidad de  $90.56 \pm 1.00$  % y una vitalidad de  $91.89 \pm 0.77$  %.

### Parámetros del semen descongelado

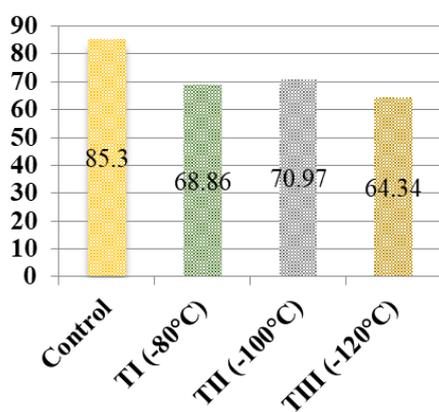
Respecto a los parámetros microscópicos obtenidos del semen pos-descongelación por influencia de las temperaturas de congelación (Tabla 2), no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, cabe indicar que el tiempo de activación y la vitalidad fueron numéricamente superiores en el TII (-100 °C) con 51.33 seg y 35.33 %, respectivamente. Mientras que para la tasa de motilidad masal fue mayor en el TIII (-120 °C) con 36.33%.

**Tabla 1.** Parámetros espermáticos macroscópicos y microscópicos de semen fresco de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Parámetros seminales	Media $\pm$ EE	Min - Max
Volumen (ml)	$6.03 \pm 0.34$	5.1 - 8.10
Color	Blanco Lechoso	-
Concentración (10 <sup>9</sup> /ml)	$4.54 \pm 0.08$	4.2 - 4.89
Tiempo de activación (s)	$169.00 \pm 10.24$	135 - 217
Motilidad (%)	$90.56 \pm 1.00$	85 - 95
Vitalidad (%)	$91.89 \pm 0.77$	87 - 94

**Tabla 2.** Parámetros espermáticos microscópicos de semen de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) post descongelación por influencia de la temperatura de congelación.

	Temperatura de congelación			p - valor
	T I (-80°C) Media $\pm$ EE	T II (-100°C) Media $\pm$ EE	T III (-120°C) Media $\pm$ EE	
Tiempo de activación (s)	$43.00 \pm 2.00$ a	$51.33 \pm 5.93$ a	$43.33 \pm 4.41$ a	0.380
Motilidad masal (%)	$33.33 \pm 2.40$ a	$33.00 \pm 2.89$ a	$36.33 \pm 1.33$ a	0.562
Vitalidad (%)	$33.33 \pm 2.03$ a	$35.33 \pm 2.19$ a	$32.00 \pm 3.06$ a	0.650



**Figura 1.** Porcentaje de fertilidad en semen fresco (control) y semen descongelado de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) por influencia de las temperaturas de congelación.

### Porcentaje de fertilidad

En relación con las pruebas de fertilidad de semen descongelado de trucha (Figura 1), los promedios obtenidos de

los tratamientos experimentales no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, cabe indicar que con el TII se tuvo una ligera superioridad numérica ( $70.97 \pm 7.84$ ) respecto al TI ( $68.86 \pm 8.83$ ) y al TIII ( $64.34 \pm 6.00$ ). Cuando se compara la fertilidad del tratamiento control (semen fresco) con los tratamientos experimentales (TI, TII y TIII) se observa una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ).

## DISCUSIÓN

Con respecto a las características macroscópicas de volumen, Bustamante-González et al., (2018); Torres et al., (2014); Castro-Castellón et al., (2017) y Necmettin et al., (2003); tuvieron mayores volúmenes seminales, mientras que Fogli Da Silveira et al., (1994) tuvo parecido volumen (8 mL). Respecto al color reportaron blanco lechoso al igual que nosotros (Tabla 1), lo cual está relacionado con la alta concentración espermática (Bustamante-González et al., 2018).

Para la característica microscópica de concentración, Bustamante-González et al., (2018); Castro-Castellón et al., (2017); Nynca et al., (2017); Ciereszko et al., (2015) y Necmettin et al., (2003) tuvieron mejores resultados que el

presente estudio, mientras que Peralta-Martínez et al., (2018), Ninhaus-Silveira et al., (2006) y Lahnsteiner et al., (1996) reportaron menores concentraciones que los reportados. Respecto al tiempo de activación nuestros resultados fueron superiores a los reportados por laffaldano et al., (2015), Berrios et al., (2010) y Necmettin et al., (2003), pero semejante al reporte de Secer et al., (2004). Para la motilidad masal presentamos resultados semejantes a los reportes de Bustamante-González et al., (2018); Nynca et al., (2017); Trigo et al., (2015) y Fogli Da Silveira et al., (1994), pero fue superior a los reportes de Castro-Castellón et al., (2017), Ciereszko et al., (2015), laffaldano et al., (2015), Necmettin et al., (2003), Lahnsteiner, F. et al., (1996) y Conget et al., (1996). Para la tasa de vitalidad Fogli Da Silveira et al., (1994) mostró mejores resultados que el presente estudio, mientras que laffaldano et al., (2015) mostró resultados menores y Nynca et al., (2017) mostro resultados similares (Tabla 1). Las diferencias de los resultados de los autores respecto a los presentes resultados se deben a factores como edad, peso de los reproductores, manejo, alimentación (Cabrina et al., 2010), calidad de agua (Necmettin et al., 2003), sexo invertido (Ciereszko et al., 2015), especie (laffaldano et al. 2015), tipo de colecta, época reproductiva, calidad de agua (Secer et al., 2004), fotoperiodo (Félix et al., 2021) y temperatura; los dos últimos relacionados con la latitud y altitud (Bustamante-González et al., 2018); por lo que al considerar que nuestro trabajo se realizó a una altitud de 3875 m quizá pudo tener influencia en nuestros resultados, que deberán ser corroborados en futuras investigaciones.

Respecto a las características post descongelación (Tabla 2) en el tiempo de activación fue similar al reporte de Di lorio et al., (2019); mientras que las investigaciones de laffaldano et al., (2015) y Necmettin et al., (2003) reportaron valores superiores comparado al presente estudio. Para el caso de motilidad Di lorio et al., (2019), Judycka et al., (2016), Ciereszko et al., (2015), Ciereszko et al., (2014) y Necmettin et al., (2003) mostraron mejores resultados, mientras que laffaldano et al., (2015), Nynca et al., (2015), Betancur et al., (2008) y Salte et al., (2004) tuvieron parecidos resultados. Para la tasa de vitalidad fueron similares a los reportes de Di lorio et al., (2019) y laffaldano et al., (2015), estas diferencias podrían deberse al volumen de la pajilla, concentración seminal final 35, tecnología de congelación, diluyentes o crioprotectores (Nynca et al., 2014, Ciereszko et al., 2014), tiempo de equilibrio (Babiak et al., 2001) y temporada reproductiva 1.

El tratamiento TII mostro una mejor respuesta para el tiempo de activación y vitalidad respecto a los tratamientos TI y TIII, lo que sugiere una mejor protección al espermatozoide en la criopreservación, asumimos que a esta temperatura de inmersión se podría estar generando menor daño celular 47. Nuestros protocolos de congelación (-20°C/min) no fueron demasiado lentos por lo que es probable que no se haya generado exposición adicional a los solutos intracelulares, osmolaridad extracelular, contracción celular y formación de cristales de hielo con posible daño celular (Benson et al., 2012; Di Santo et al., 2012; Fowler & Toner, 2005), se sabe que al congelar semen de truchas arcoíris con curvas de descenso lentas (-1 a -10°C/min) hasta llegar a -60 o -80°C para su inmersión en el NL pueden llegar a tener parámetros seminales nulos. Tampoco se utilizó la congelación rápida de -30°C/min o menos hasta llegar a -60 o -80°C 31 podría ocasionar que la deshidratación de las células no sea adecuada sin alcanzar

el equilibrio osmótico y formación de hielo intracelular que pudiera dañar la membrana del espermatozoide (Kumar et al., 2019; Lahnsteiner et al., 2000) disminuyendo la calidad seminal.

La vitalidad fue mejor en el TII pero disminuyó en comparación con el semen fresco; pues la criopreservación tiene consecuencias fatales en las células espermática específicamente produciendo fragmentación del ADN (Pérez-Cerezales et al., 2010), disminución en la integridad de la membrana espermática (Figueroa et al., 2016) por formación de especies reactivas de oxígeno (Pérez-Cerezales et al., 2010), menor actividad de las enzimas antioxidantes (Aitken et al., 2012) cambios en la morfología (Galo et al., 2019) y daños subletales no detectados en los parámetros seminales (Nynca et al., 2015). Respecto a la motilidad y tiempo de activación pudo ser afectado por la congelación por el efecto negativo sobre la mitocondria disminuyendo la cantidad de ATP por lo que no se tendría ATP para la activación y por ende, disminución de la motilidad; como fue demostrado por otros autores (Figueroa et al., 2016; Nynca et al., 2015; Martínez & Carrasco, 2010). Estos efectos fueron pudieron ser menores en el TII para el tiempo de activación y en el TIII para la motilidad.

Algunos autores reportaron resultados semejantes respecto a las tasas de fertilidad (Ninhaus-Silveira et al., 2006; Salte et al., 2004). Mientras que otros reportan mejores resultados (Judycka et al., 2016; Ciereszko et al., 2015; Ciereszko et al., 2014; Lahnsteiner et al., 1996) y otros menores (Di lorio et al., 2019; Yang et al., 2018; laffaldano et al., 2015), estos resultados difieren a los nuestros en su mayoría debido a que usaron formas de congelación basada en centímetros por encima del nivel del NL lo cual dificulta controlar la tasa de congelación afectando la fertilidad (Judycka et al., 2019; Ninhaus-Silveira et al., 2006).

El TII tuvo mejores tasas de fertilidad lo que sugiere que podría ser la mejor temperatura de congelación, estos resultados concuerdan con los reportado por Lahnsteiner et al. (1996) y Cabrera et al. (2001) en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), debido a que la fertilidad fue mayor cuando se congeló a 1,5 cm (-110 °C) por encima del nivel de nitrógeno líquido y disminuyó cuando se congeló a 1 cm (-130 °C) o a 2 cm (-100 °C), lo cual demuestra que las temperaturas de congelación por encima o por debajo del rango de congelación disminuyen la calidad seminal y fertilidad 48. Este mismo tratamiento no tuvo la mejor motilidad esto indicaría que no necesariamente la motilidad define la tasa de fertilidad 56. Por otro lado, Glogowski et al., (2002) en Esturiones siberianos (*Acipenser baeri*) demostró que la motilidad pos descongelación podría no correlacionarse con la fecundación, sino también con la vitalidad 55 y con el tiempo de activación, ya que el TII mostro mayor correlación entre la vitalidad ( $r = 0.94$ ), tiempo de activación ( $r = 0.72$ ) con la fertilidad, lo cual concuerda con diferentes investigadores (Galo et al., 2019; Merino et al., 2011; Cabrera et al., 2010; Martínez & Carrasco, 2010).

También se puede considerar que a pesar de que la congelación disminuyó la motilidad; tal vez el TII generó menores cambios en los patrones de la velocidad en línea recta y curva (Labbe et al., 2001) o sobre el vigor espermático (Galo et al., 2019), lo que generó mayor fertilidad; pues en el Salmon Atlántico se demostró que a pesar de la baja motilidad

total se tuvo una correlación positiva entre la fertilidad y velocidad en línea curva y recta (Kommisrud et al., 2020; Figueroa et al., 2016); también se tiene la hipótesis de que los espermatozoides alrededor de la ova cercano al micrópilo necesitan un corto tiempo de activación 59 aun con poca motilidad masal para asegurar la fertilidad, este mismo efecto pudieron haber ocurrido en el TII debido a su mejor tiempo de activación; lo que sugiere más investigación respecto motilidad y velocidad.

### CONCLUSIÓN

La temperatura de congelación disminuyó los parámetros microscópicos, pero se obtuvo mejores resultados post descongelación para el nivel intermedio de temperatura reflejado en el tiempo de activación, vitalidad espermática y fertilidad. Esto sugiere que la temperatura de congelación óptima para el semen de truchas arcoiris en condiciones hipobáricas naturales esta alrededor de  $-100^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, más investigaciones son necesarias para confirmar estos hallazgos.

### CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa descrita en la página web: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm).

### CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

### CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: MY, PU, BC, RH. Desarrollo de la metodología: PM, AJ, RD, MY, Concepción y diseño: PU, PM, RH, CB, RD. Edición del artículo: PM, RD, AJ. Supervisión del estudio: PM, BC, MY.

### AGRADECIMIENTO

Al equipo técnico y administrativo de Centro de Investigación y Producción de Bienes y servicios Chucuito – UNAP, por las facilidades y el apoyo en la realización de la investigación.

### REFERENCES

- Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function-in sickness and in health. *J Androl.* 2012;33(6):1096-1106. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>
- Asturiano JF, Cabrita E, Horváth. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. *Gen Comp Endocrinol.* 2017;245:69-76. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.019>
- Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, et al. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology.* 2001;56(01):177-192. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00553-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00553-2)
- Berríos O, Valdebenito I, Treulén F, Ubilla A. Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial. *Arch Med Vet.* 2010;42(3):179-186. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2010000300009>
- Betancur JJ, Montoya AF, Mira T, Rojas FA, Ángel MO. Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Rev Colomb Ciencias Pecu.* 2008;21(3):340-350.
- Bustamante-González J, Dámaso, Cortés-García A, Rodríguez-Gutiérrez M. Growth and sperm quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei: Salmonidae) during the reproductive season. *Hidrobiológica.* 2018;28(2):163-170. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbshidro/2018v28n2/bustamante>
- Bustamante-gonzález JD, Rodríguez-gutiérrez M, Cortés-garcía A, Arenas-Ríos E, Figueroa-Lucero G, Ávalos-Rodríguez A. Fisiología y criopreservación del espermatozoide en teleosteos. *AquaTIC.* 2019;53:1-17.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, et al. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *J Appl Ichthyol.* 2010;26(5):623-635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
- Castro-Castellón A, González-Villaverde P, Cortés-García A, Martínez-Regalado D, Jiménez-Valencia J. Calidad del semen en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) lote Michoacano, a finales de su periodo reproductivo. *Rev Digit del Dep el hombre y su Ambient - E - BIOS.* 2017;1(13):1-9.
- Ciereszko A, Dietrich GJ, Nynca J, Dobosz S, Zalewski T. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture.* 2014;420-421:275-281. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.014>
- Ciereszko A, Dietrich GJ, Nynca J, Krom J, Dobosz S. Semen from sex-reversed rainbow trout of spring strain can be successfully cryopreserved and used for fertilization of elevated number of eggs. *Aquaculture.* 2015;448:564-568. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.039>
- Conget P, Ferrhdez M, Herrera G, Minguell JJ. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) spermatozoa using Programmable Freezing. *Aquaculture.* 1996;143(96):319-329.
- Cruz Casallas P, Medina Robles V, Velasco Santamaría Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Rev colombienc pecu.* 2006;19(2):152-159.
- Cruz-casallas PE, Mauricio V, Robles M. Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). *Rev Colomb Ciencias Pecu.* 2006;19(2):146-151.
- Cuevas-uribe R, Chesney EJ, Daly J, Tiersch TR. Vitrification of Sperm from Marine Fishes: Effect on Motility and Membrane Integrity. *Aquac Res.* 2013;46(7):1770-1784. <https://doi.org/10.1111/are.12337>

- Cuevas-uribe R, Hu E, Daniels H, Gill AO, Tiersch TR. Vitrification as an Alternative Approach for Sperm Cryopreservation in Marine Fishes. *N Am J Aquac.* 2017;79(2):187-196. <https://doi.org/10.1080/15222055.2017.1281855>
- Di Iorio M, Esposito S, Rusco G, et al. Semen cryopreservation for the Mediterranean brown trout of the Biferno River (Molise-Italy): comparative study on the effects of basic extenders and cryoprotectants. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45006-4>
- Félix F, Oliveira CCV, Cabrita E. Antioxidants in fish sperm and the potential role of melatonin. *Antioxidants.* 2021;10(1):1-29. <https://doi.org/10.3390/antiox10010036>
- Figueroa E, Valdebenito I, Merino O, Ubilla A, Risopatrón J, Fariás JG. Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *J Fish Biol.* 2016;89(3):1537-1550. doi:10.1111/jfb.13052
- Fogli Da Silveira W, Kavamoto ET, Rigolino MG, Tabata YA, Silveira AN, Verissimo R. Congelamento do semen da truta arco iris *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. *B Inst Pesca.* 1994;21(1):55-60.
- Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1066:119-135. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>
- Galo M, Streit-Junior D, Oliveira C, et al. Quality of fresh and cryopreserved semen and their influence on the rates of fertilization, hatching and quality of the larvae of *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian J Biol.* 2019;9(3):438-445.
- Glogowski J, Kolman R, Szczepkowski M, et al. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture.* 2002;211(1-4):367-373. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00003-0)
- Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(3):327-339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Huang C, Dong Q, Walter R, Tiersch TR. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. *Cryobiology.* 2004;48(3):295-308. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.02.004>
- Judycka S, Cierieszko A, Dobos S, Zalewski T, Dietrich GJ. Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol.* 2016;245:89-93. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.016>
- Judycka S, Nynca J, Cierieszko A. Opportunities and challenges related to the implementation of sperm cryopreservation into breeding of salmonid fishes. *Theriogenology.* 2019;132:12-21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.022>
- Kommisrud E, Myromslien FD, Stenseth EB, et al. Viability, motility, ATP content and fertilizing potential of sperm from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in milt stored before cryopreservation. *Theriogenology.* 2020;151:58-65. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.008>
- Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreserv Biobank.* 2019;17(6):603-612. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- 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.* 2001;60(3):397-404. <https://doi.org/10.1002/mrd.1102>
- Laffaldano N, Di Iorio M, Manchisi A, Esposito S, Gibertoni PP. Effective freezing rate for semen cryopreservation in endangered Mediterranean brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) inhabiting the Biferno river (South Italy). *Zygote.* 2015;24(5):668-675. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000647>
- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology.* 2000;54:1477-1498. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00469-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00469-6)
- Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner R. Physiological and Biochemical Determination of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Semen Quality for Cryopreservation. *J Appl Aquac.* 1996;6(4):47-73. [https://doi.org/10.1300/J028v06n04\\_05](https://doi.org/10.1300/J028v06n04_05)
- Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T. Semen cryopreservation of salmonid fishes: Influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquac Res.* 1996;27(9):659-671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1996.tb01301.x>
- Lopes T da S, Romagosa E, Streit DP, Ribeiro RP, Digmayer M. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology.* 2011;75(3):570-576. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.030>
- Martínez JG, Carrasco SP. Crioconservación de semen en peces: Efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biol Colomb.* 2010;15(2):3-24.
- Martínez-Páramo S, Pérez-Cereales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez JA, Herráez MP. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology.* 2009;71(4):594-604. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.034>
- Merino O, Dumorné K, Leidy SV, et al. Short-term storage sperm of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at 4 °C: Effect of sperm: Extender dilution ratios and antioxidant butylhydroxytoluene (BHT) on sperm function. *Cryobiology.* 2020;95:44-50. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.06.007>
- Necmettin T, Selçuk S, Yusuf B, Ergun A. Cryopreservation Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Semen. *Isr J Aquac - Bamidgeh.* 2003;55(3):208-212. <https://doi.org/10.46989/001c.20345>
- Ninhaus-Silveira A, Foresti F, Tabata YA, Rigolino MG, Verissimo-Silveira R. Cryopreservation of semen from

- functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Brazilian Arch Biol Technol. 2006;49(1):73-77. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000100009>
- Nynca J, Arnold GJ, Fröhlich T, Ciereszko A. Cryopreservation-induced alterations in protein composition of rainbow trout semen. Proteomics. 2015;15(15):2643-2654. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400525>
  - Nynca J, Dietrich GJ, Dobosz S, Grudniewska J, Ciereszko A. Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen. Aquaculture. 2014;433:62-65. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.037>
  - Nynca J, Judycka S, Liszewska E, Dobosz S, Ciereszko A. Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. Aquaculture. 2017;477:23-27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.036>
  - Peralta-Martínez M de los Á, García SR, Kjelland ME, González-Márquez H. Effect of pH on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm motility using five extender solutions. Hidrobiologica. 2018;28(2):171-178. doi:10.24275/uam/izt/dcb/hidro/2018v28n2/paralta
  - Pereira VA, de Alencar DB, Araújo IWF de, et al. Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (*Characiformes: Serrasalminidae*) semen. Aquaculture. 2020;528(May):735553. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735553>
  - Pérez-Cereales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez MP. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. Reproduction. 2010;139(6):989-997. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0037>
  - Ramírez-Merlano J, Medina Robles V, Cruz Casallas P. Crioconservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. Orinoquía. 2010;14(1):59-71. <https://doi.org/10.22579/20112629.128>
  - Restrepo-Betancur G, Páez JDM, Chacón LA. Evaluación de dos crioprotectores y tres curvas de congelación programable en la criopreservación de semen de brycon henni (*Pisces: Characidae*). Rev Investig Vet del Peru. 2017;28(3):597-605. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13349>
  - Rusco G, Iorio M Di, Iampietro R, Esposito S, Gibertoni PP. A Simple and Efficient Semen Cryopreservation Method to Increase the Genetic Variability of Endangered Mediterranean Brown Trout Inhabiting Molise Rivers. Animals. 2020;10(3):403. <https://doi.org/10.3390/ani10030403>
  - Salte R, Galli A, Falaschi U, Fjalestad KT, Aleandri R. A protocol for the on-site use of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) applied to the production of progeny groups: Comparing males from different populations. Aquaculture. 2004;231(1-4):337-345. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.037>
  - Sanches EA, Marcos RM, Baggio DM, Tessaro L, Balen RE, Bombardelli RA. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. Rev Bras Zootec. 2011;40(6):1163-1167. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600001>
  - Secer S, Tekin N, Bozkurt Y, Bukan N, Akcay E. Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. Isr J Aquac - Bamidgeh. 2004;56(4):274-280. <https://doi.org/10.46989/001c.20390>
  - Stornelli, M. C; Tittarelli, C. M; Savignone, C. A; Stornelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Analecta Vet. 2005;25(2):28-35.
  - Torres JMG, Maíz Padrón RA, Castellano Rangel J de J. Aspectos de la producción anual de semen de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en los andes venezolanos. Mundo Pecu. 2014;10(1):9-14.
  - Trigo P, Merino O, Figueroa E, Valdebenito I, Sánchez R, Risopatrón J. Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. Andrologia. 2015;47(4):407-411. <https://doi.org/10.1111/and.12276>
  - Ulloa-Rodríguez P, Contreras P, Dumorné K, et al. Patagonian blenny (*Eleginops maclovinus*) spermatozoa quality after storage at 4 °C in Cortland medium. Anim Reprod Sci. 2018;197(August):117-125. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.019>
  - Viveiros ATM, Lock EJ, Woelders H, Komen J. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. Cryobiology. 2001;43(3):276-287. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2362>
  - Xin M, Siddique MAM, Dzyuba B, Cuevas-Urbe R, Shaliutina-Kolešová A, Linhart O. Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. Theriogenology. 2017;98:16-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.043>
  - Yang H, Hu E, Buchanan JT, Tiersch TR. A Strategy for Sperm Cryopreservation of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, for Remote Commercial-scale High-throughput Processing. J World Aquac Soc. 2018;49(1):96-112. <https://doi.org/10.1111/jwas.12431>