

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA DE ICA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**DETERMINACIÓN DEL PROTOCOLO ÓPTIMO PARA
LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATÓFOROS Y
MASA ESPERMÁTICA DE *Litopenaeus vannamei*,
TUMBES, 2016 - 2017.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. Luz Fernanda Domínguez Mendoza

ICA, PERÚ

2018

A Dios, a mi familia y demás personas con las que tuve el placer de coincidir durante el desarrollo de la tesis. Gracias!

AGRADECIMIENTO

A mi asesora de tesis Mg. María Isabel Solís Loza docente adscrita a la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica por el apoyo brindado y los consejos que me llevaron a culminar este trabajo.

A mi co-asesor de tesis M.Sc. Max Salvatierra Alor de la empresa biotecnológica INCABIOTEC SAC, por el apoyo incondicional en la realización de este trabajo de tesis y sobre todo por la confianza depositada.

A Eric Louis Mialhe Matonnier PhD., Emmerik Motte Darricau Ph.D, Max Salvatierra Alor M.Sc., César Augusto Solano Curay M.Sc. y Técn., César Santos Chanta integrantes del Proyecto N°211-2015-FONDECYT: "Implementación y optimización de las tecnologías de criopreservación y transfección de gametos masculino del langostino *Litopenaeus vannamei*", por sus enseñanzas y apoyo durante la realización de la tesis.

A la empresa Marinasol S.A por permitirme desarrollar la tesis dentro de sus instalaciones y brindarme todo el material necesario para llevarla a cabo en especial a Blgo. Juan Luzardo Solís, M.Sc. Yovani Luzmila Rosales Maceda y Blgo. Efraín Cayra Huanca del Laboratorio de Biología Molecular y a la Ing. Kathy Araujo del área de Líneas Puras por las enseñanzas, consejos y facilidades brindadas. A mis amigos y colegas quienes fueron de gran apoyo durante este periodo.

A la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica y a todos los profesores que me brindaron una enseñanza sólida, en especial a los revisores de ésta tesis, quienes atendieron mis dudas y me apoyaron con sus correcciones, sugerencias y comentarios.

ÍNDICE:

	<i>Pág.</i>
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
III. Materiales y métodos.....	9
3.1. Material.....	9
3.1.1. Material biológico.....	9
3.1.2. Área de estudio.....	11
3.2. Métodos.....	12
3.2.1. Mantenimiento de reproductores.....	12
3.2.2. Obtención de espermátóforos y masa espermática.....	12
3.2.3. Determinación de la tasa y rango de congelamiento óptimo para la criopreservación de espermátóforos y masa espermática.....	12
3.2.4. Determinación de la temperatura optima de descongelamiento post criopreservación de espermátóforos y masa espermáticas.....	20
3.2.5. Ensayos preliminares de inseminación artificial a los 11 días de almacenamiento en nitrógeno líquido.....	23
3.2.6. Análisis estadístico.....	26
IV. Resultados.....	27
V. Discusión.....	36
VI. Conclusiones.....	39
VII. Recomendaciones.....	40
VIII. Referencias bibliográficas.....	41
IX. Anexos.....	46

RESUMEN

La criopreservación cumple un rol fundamental en la conservación de cepas selectas de especies de importancia económica como el langostino *Litopenaeus vannamei*, por ello surge la necesidad de su implementación para el mantenimiento de líneas puras y el desarrollo de programas de mejoramiento genético. En la presente investigación se determinó la tasa óptima de congelamiento y descongelamiento para la criopreservación de espermatozoides y masa espermática evaluando la viabilidad espermática mediante una tinción eosina-nigrosina y la tasa de eclosión mediante inseminación artificial. Los resultados indicaron que la tasa óptima de congelamiento para espermatozoides y masa espermática fue $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 25°C hasta -35°C con un 87.60% y 85.73% de viabilidad espermática respectivamente, éstos valores no difieren del control ($p>0.05$). Así mismo se encontró que la mejor temperatura de descongelamiento para espermatozoides y masa espermática fue 35°C , alcanzando un porcentaje de viabilidad espermática de 77.70% y 86.00% respectivamente, valores similares a los obtenidos en el control ($p>0.05$). Además, utilizando espermatozoides almacenados en nitrógeno líquido durante 11 días se obtuvo una viabilidad espermática de 93.40% y alrededor del 50 % de la tasa promedio de eclosión post inseminación artificial. Considerando la alta viabilidad espermática obtenida hasta el momento se podría indicar que los protocolos de congelamiento y descongelamiento determinados son eficientes para la criopreservación de ambas estructuras reproductivas.

Palabras clave: Criopreservación, espermatozoides, tasa de congelamiento, inseminación artificial, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

Cryopreservation plays a fundamental role in the conservation of selected strains of economically important species such as the shrimp *Litopenaeus vannamei*, so the need arises for its implementation for the maintenance of pure lines and the development of breeding programs. In the present study, the optimal rate of freezing and thawing was determined for the cryopreservation of spermatophores and sperm mass, evaluating the sperm viability through an eosin-nigrosin stain and the hatching rate by artificial insemination. The results indicated that the optimal freezing rate for spermatophore and sperm mass was $-1\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ from $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 87.60% and 85.73% sperm viability respectively, which means different values of control ($p > 0.05$). Likewise, the optimal thawing temperature for spermatophore and sperm mass was $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, reaching a percentage of sperm viability of 77.7% and 86% respectively, values similar to those obtained in the control ($p > 0.05$). In addition, using spermatophores stored in liquid nitrogen for 11 days a sperm viability of 93.40% was obtained and around 50% of the hatching rate post artificial insemination. Considering the high sperm viability so far, it could be indicated that the freezing and thawing protocols are suitable for the cryopreservation of both reproductive structures.

Key words: Cryopreservation, spermatophores, freezing rate, artificial insemination, *Litopenaeus vannamei*.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de langostinos peneidos constituye una de las actividades acuícolas de mayor importancia a nivel mundial, llegando a generar cerca de 14 billones de dólares anuales (FAO, 2014).

El Perú es uno de los principales países productores de *Litopenaeus vannamei* “langostino blanco” (FAO, 2006) especie de gran importancia económica cultivada en la región norte del país, especialmente en Tumbes. Por ello surge la necesidad de implementar tecnologías que permitan potenciar la productividad de esta especie. Las biotecnologías de reproducción tienen como objetivo principal optimizar el aprovechamiento de los gametos masculinos y femeninos, en la producción de individuos de origen conocido, priorizando las cualidades genéticas y parentales (Uberti, Vieira, Salência, Vieira, & Vinatea, 2014).

La criopreservación de gametos masculinos se presenta como una tecnología con importantes aplicaciones en las prácticas reproductivas de especies cultivadas marinas y continentales debido a que permite realizar diversos procesos como la hibridación, domesticación, conservación de poblaciones y selección genética (Uberti *et al.*, 2014), favoreciendo así programas de mejoramiento genético en especies de interés económico y simplificando el manejo del stock, constituye una técnica para garantizar el uso seguro del material biológico (Martínez-Páramo *et al.*, 2017), facilita el transporte de gametos, reduce los costos de mantenimiento de reproductores y permite la conservación de la variabilidad genética (Suquet, Dreanno, Fauvel, Cosson & Billard, 2000).

El propósito fundamental de la criopreservación es permitir el almacenamiento de las células espermáticas durante periodos prolongados para su

posterior uso mediante inseminación artificial, por lo cual tiene una importancia potencial en el mantenimiento de líneas selectas de una amplia gama de especies (Medina-Robles, Velasco-Santamaría, & Cruz-Casallas, 2005).

La criopreservación es un método para conservar las células a temperaturas muy bajas tales como en nitrógeno líquido (-196°C), donde la velocidad de las reacciones bioquímicas y fisiológicas de las células disminuye casi a cero, si el proceso es llevado adecuadamente las células pueden mantener su estructura y función a temperaturas bajas, siendo poco probable que se produzcan cambios en las células durante el almacenamiento a largo plazo (Xu, 2011).

Éste proceso incluye las siguientes etapas; la elección del medio diluyente y agente crioprotector (Sieme, Oldenhof & Wolkers, 2016), la determinación de la tasa de congelamiento y descongelamiento, y la eliminación de la solución crioprotectora (enjuague). Éstas son necesarias para llevar a cabo la criopreservación de las células y varían según la especie y tipo de célula (Ávila-Portillo, Madero, & López, 2006). Todas las etapas constituyen aspectos críticos que deben ser evaluados para evitar el daño o muerte de las células lo que conlleva a una pérdida total de la viabilidad del material biológico (Xu, 2011; Uberti *et al.*, 2014).

En este contexto el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal; determinar la tasa de congelamiento y descongelamiento óptimo para la criopreservación de esperma de *Litopenaeus vannamei* y evaluar la fertilidad del esperma criopreservado mediante ensayos preliminares de inseminación artificial; con la finalidad de brindar una herramienta biotecnológica indispensable en el desarrollo de programas de obtención de líneas selectas de langostino, obteniendo beneficios en la productividad de éste recurso hidrobiológico.

II. ANTECEDENTES

Se cuenta con los siguientes antecedentes:

2.1. Antecedentes internacionales:

Chow S., Tam Y. & Ogasawara Y. (1985), en Tokio, Japón, criopreservaron espermatozoides del langostino *Macrobrachium rosenbergii* estos espermatozoides fueron expuestos a tres medios básicos (agua dulce, agua dulce con 10% de glicerol, y solución salina fisiológica con 10% de glicerol) durante 180 min y luego pre-congelados en vapor de nitrógeno líquido (LN₂) y sumergidos en LN₂. Los espermatozoides fueron descongelados colocándolos directamente en el agua a 30°C y realizaron una inseminación artificial usando los espermatozoides descongelados. Se observó una fertilización exitosa en los casos de los espermatozoides expuestos a agua dulce durante 15 - 30 minutos.

Anchoroguy T., Crowe J. H., Griffin F. J. & Clark W. H (1988), en California, EE.UU, criopreservaron el espermatozoides del camarón marino *Sicyonia ingentis* usando DMSO al 5% en el medio de congelación y pre congelando la muestras en dos fases; desde temperatura ambiente hasta 0°C a una velocidad de congelamiento de -5°C/min y de 0° a -30°C a una velocidad de 1°C/min (velocidad que resultó en la mínima rotura celular). La viabilidad de los espermatozoides se evaluó mediante la técnica de reacción del acrosoma *in vitro*. Los resultados muestran una supervivencia de 56 % y no se observó disminución de la viabilidad en muestras de espermatozoides almacenados en nitrógeno líquido (-196°C) durante 1 mes.

Diwan A.D. (1999), en Cochin, India, criopreservaron espermatozoides del langostino marino *Penaeus indicus*. Las muestras fueron expuestas a una combinación de agentes crioprotectores; a) DMSO (5%) y glicerol (5%) en razón de 1:1 y b) DMSO

(5%) y trehalosa (0,25 M) en razón de 1:1 antes del congelamiento. Las muestras fueron congeladas en un criocongelador programable desde temperatura ambiente hasta -35°C a -1°C/min y luego expuestas a vapores de nitrógeno líquido por 5 min. Las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido durante 60 días. Después del periodo de almacenamiento las muestras fueron descongeladas a 20°C y determinaron la viabilidad espermática mediante reacción acrosomal resultando el 67,16% y 69,97% de viabilidad espermática.

Golberg R., Tenorio de Albuquerque, Miyako L. (2000), en Rio de Janeiro, Brasil, evaluaron la eficiencia de dos formas de criopreservación del esperma de *Macrobrachium rosenbergii* en nitrógeno líquido (-196°C) y en congelador a -13°C durante un periodo de 12 semanas. Las muestras fueron en una solución compuesta de 20% de yema de huevo, 2,94% citrato y 0,01% ampicilina y almacenados a 5°C por 24 horas, transcurrido este tiempo se añadió DMSO 5%. Las muestras fueron congeladas a vapores de nitrógeno (3 cm por 10 min) y luego sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) por 60 días. La viabilidad fue evaluada por tinción vital eosina – citrato obteniendo una viabilidad de 64,8 y 79,2% respectivamente para ambos protocolos de prueba.

Akarasanon K., Damrongphoi P. & Poolsanguan W. (2004), en Bangkok, Tailandia, criopreservaron espermátóforos de *Macrobrachium rosenbergii*, utilizando glicerol (Gly) y etilenglicol (EG) como agentes crioprotectores (ACP). La tolerancia del esperma para la criopreservación se evaluó en base a la capacidad de supervivencia del esperma y la fertilización. La supervivencia el esperma se determinó por tinción con azul de tripano, mientras que la capacidad fertilización se evaluó mediante inseminación artificial con los espermátóforos criopreservados. Los autores indican que la preservación a -196 °C con 20% EG constituye un

procedimiento adecuado de almacenamiento de espermatozoides por 150 días con una supervivencia de 40%.

Bart A.N., Choosuk S. & Thakur D.P. (2006), en Athumthani, Tailandia, desarrollaron un protocolo de criopreservación de espermatozoides del camarón tigre negro *Penaeus monodon*, para ello evaluaron tres crioprotectores; dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH) y etilenglicol (EG) a dos concentraciones 5% y 10%. La congelación se realizó usando dos tasas de congelamiento : de 25°C hasta -10°C a -15°C/min y de -10°C hasta -80°C a -2°C/min, luego las muestras fueron sumergidas en nitrógeno líquido por 48 horas. Los espermatozoides se descongelaron en baño maría a 30°C por 2 min. La capacidad de fertilización fue evaluada por inseminación artificial. La tasa de fertilización media para inseminación con espermatozoides después de la descongelación fue de 79,9 +/- 3,7%. Los autores indican que la tasa media de eclosión de los espermatozoides congelados-descongelados fue de 87,8% ± 0,4% no habiendo diferencia significativa con los controles (espermatozoides frescos).

Vuthiphandchai V., Nimrat S., Kotcharat S., & Bart A. N. (2007), en Tailandia, determinaron el efecto de crioprotectores sobre la viabilidad de los espermatozoides y desarrollaron un protocolo de congelación de almacenamiento a largo plazo de *Penaeus monodon* espermatozoides, para ello evaluaron cinco ACP a distintas concentraciones resultando el DMSO al 5% con mayor viabilidad, la viabilidad fue evaluada por tinción vital eosina-nigrosina. Se probaron tres protocolos de congelamiento a ocho velocidades de congelamiento. Se observó una criopreservación exitosa congelando las muestras de 25°C hasta -80°C a -2°C/min y almacenadas en nitrógeno líquido durante 210 días. Así mismo probaron cuatro temperaturas de descongelamiento, resultando el más exitoso en baño de agua a

30°C por 2 minutos. No hubo diferencia significativa entre la viabilidad promedio de espermatozoides frescos (97,8±2,9%) y espermatozoides criopreservados a 60 días (87,3±4,1%). Los espermatozoides descongelados a los 62 días tuvieron una tasa de fertilización y eclosión de 71.6–72.2% y 63.6–64.1% respectivamente (tasas similares a los espermatozoides frescos (70.8-78.2% y 66.3-67.8%, respectivamente)).

Lezcano M., Granja C., & Salazar M. (2004), en Bogotá, Colombia, los autores probaron dos protocolos de congelamiento de espermatozoides, masa espermática y células espermáticas de *Litopenaeus vannamei*; protocolo de congelamiento rápido y protocolo de congelamiento lento. La viabilidad fue evaluada por microscopía óptica y citometría de flujo. Teniendo en cuenta el morfotipo se obtuvo el mejor resultado mediante el congelamiento lento de la masa espermática en presencia de metanol (61,6%).

Memon A., et al. (2012), en Terengganu, Malasia, realizaron la optimización de un protocolo de criopreservación de espermatozoides del langostino *Penaeus merguianus* determinando los efectos de diferentes crioprotectores seleccionando MgCl₂ al 15% y evaluando doce protocolos de congelamiento siendo el protocolo seleccionado; 25,20,16,4, 2,-4,-20, -80,-150°C/ 10 min. y almacenados en nitrógeno líquido por 180 días. La viabilidad fue evaluada usando la técnica modificada de tinción eosin-nigrosin. La viabilidad de los espermatozoides frescos fue de 93,8 % y la viabilidad de los espermatozoides criopreservados almacenados por 24 horas y 60 días fue de 83,5 % y 61% respectivamente, no encontrándose diferencias significativas. La tasa de fertilización de las hembras inseminadas artificialmente con espermatozoides criopreservados de 67,3 % a 64,1%, mientras que la tasa de fertilización con espermatozoides frescos fue de 88,2%. La tasa de eclosión de los

huevos fertilizados con los espermátóforos criopreservados fue de 81,5 % - 62,5 % mientras que con espermátóforos frescos fue de 76,2 %. En conclusión la criopreservación de espermátóforos almacenados en nitrógeno líquido por un periodo menor a 90 días mantiene alta viabilidad, para periodos largos la viabilidad declina (180 días)

Uberti M., et al. (2014), en Brasil, realizaron una evaluación de la viabilidad de células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* provenientes de criopreservación, en el estudio evaluaron previamente la toxicidad de dos agentes crioprotectores a tres concentraciones, resultando la concentración final de 10% como la concentración óptima. Las muestras fueron colocadas en crioviales y expuestas a 3 cm del tanque de nitrógeno líquido (vapores) durante 5 minutos y luego sumergidas en nitrógeno líquido por 90 días y descongeladas en baño maría a 20-25°C por 40 segundos. Aplicando la técnica de tinción vital eosin nigrosin se observó que la baja y alta mortalidad para DMSO fue de 23.17 y 82.11% y para EG fue de 29,94 y 83,72%, mientras que por citometría de flujo se registraron mortalidades de 2,42 y 55,13% para DMSO y 0,90 y 55,56% para EG. Los autores indican una correlación positiva entre las dos técnicas usadas y que la viabilidad de las células criopreservadas decrece en el tiempo.

Castelo-Branco T., Batista A.M., Guerra M.M.P., Soares R. & Peixoto S. (2015), en Brasil, evaluaron el método de vitrificación para la criopreservación de *Litopenaeus vannamei* mediante el uso de lecitina de soya como crioprotector externo. La viabilidad se evaluó mediante tinción vital eosin-nigrosin. Los mejores resultados se obtuvieron usando MeOH al 30% y 120 minutos de tiempo de equilibrio. Las masa espermáticas fueron sumergidas en seis diferentes soluciones crioprotectoras y sumergidas directamente en nitrógeno líquido durante 120 días.

La viabilidad fue evaluada por microcopia de fluorescencia. Los autores determinaron que la trehalosa combinada con o sin soya lecitina es un eficiente crioprotector extracelular en el protocolo de vitrificación ya que mantuvo una viabilidad estable a lo largo de 120 días (en promedio $88 \pm 1,6\%$). Teniendo en cuenta los altos índices de integridad de la membrana espermática, el método de vitrificación resultó ser eficiente para la criopreservación de masa espermática de *Litopenaeus vannamei*.

2.2. Antecedentes nacionales:

A nivel nacional no se han encontrado trabajos de investigación sobre criopreservación de esperma de langostinos, sin embargo se han realizado estudios similares en otras especies como *Paralichthys adspersus* “lenguado” (Montes, 2012).

La presente investigación constituye el primer trabajo realizado a nivel nacional, en el Departamento de Tumbes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material biológico

El material de estudio estuvo constituido por espermátóforos de langostinos machos sexualmente maduros de la especie *Litopenaeus vannamei* provenientes de la empresa Marinasol S.A.



Figura 1. Langostino blanco *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931.

- **Biología del langostino blanco *Litopenaeus vannamei***

El langostino blanco *Litopenaeus vannamei* es un artrópodo nativo de la costa oriental del Océano Pacífico desde Sonora en México hasta Tumbes en Perú (Figura 1). Ésta especie se encuentra en hábitats marinos tropicales en aguas cuyas temperaturas son normalmente superior a 20 °C durante todo el año (FAO, 2006).

El ciclo de vida del langostino blanco puede ser dividido en una primera fase marina y una segunda fase estuarina. La reproducción del langostino comienza en aguas alejadas de la costa, cuando el macho deposita en el télico de la hembra un paquete de esperma denominado espermátóforo que fertiliza los huevos a medida

que son puestos. Los huevos maduran y pasan a través de una serie de estadios larvales: nauplio, zoea y mysis. Posteriormente alcanzan el estadio de post larva que morfológicamente se asemeja a un langostino adulto. Después de sucesivas mudas, las post larvas se transforman en juveniles manteniéndose en los estuarios de los ríos durante un lapso de 3 a 4 meses, posteriormente comienzan a migrar al mar donde su crecimiento es más rápido (G.Remoissenet-FAO, 1988).

En cuanto al sistema reproductivo, en las hembras consiste en un par de ovarios multilobulados con sus respectivos oviductos y el télico (Alfaro, Komen, & Huisman, 2001). Los ovarios están localizados en la región dorsal, de manera que cuando las hembras están grávidas pueden ser reconocidas fácilmente ya que los ovarios se tornan de color verde y se hacen visibles a través del caparazón (King, 1948). Los oviductos son simples y abiertos hacia el exterior de la coxa del tercer par de pereópodos (Chao, Chen, Shieh, & Lin, 2009).

Por otro lado, en los machos el sistema reproductivo consiste en un par de testículos con sus respectivos vasos deferentes, dos ámpulas terminales y un petasma. Los testículos son lobulados y cada par posee 8 lóbulos (Chow *et al.*, 1985) aunque este número puede variar de un individuo a otro dependiendo de la edad (De Peralta Martínez, Morales, Unzueta Bustamante, Montaldo, & Castillo-Juárez, 2013).

Los lóbulos testiculares están unidos por el vaso deferente proximal el cual se continúa a través de otros conductos hasta el ámpula terminal, lugar donde se da la formación del espermátforo, cuya parte distal termina en un gonópodo que se abre hacia el exterior en la base del quinto par de períopodos (King, 1948). Los espermátforos son las estructuras que contienen a las células espermáticas y que son transferidos de macho a hembra (De Peralta Martínez *et al.*, 2013).

En cuanto a la espermatogénesis, ésta tiene lugar en los testículos donde las células espermáticas son inmaduras y se denominan espermátidas (Ro, Talbot, Leung-Trujillo & Lawrence, 1990). Las espermátidas son transportadas desde el testículo hasta el saco ciego donde son retenidos por un periodo corto hasta formar una masa espermática que es transportada a través del vaso deferente medio y (Alfaro *et al.*, 2001).

En el vaso deferente medio el ducto espermatofórico secreta las capas primarias y secundarias que envuelven la masa espermática en el espermatóforo, posteriormente es transportado por el vaso deferente distal hacia el ámpula terminal, en el cual se da el montaje de las subunidades adicionales de los espermátóforos; placa dorsal, soporte y masa glutinosa-adhesiva (Alfaro-Montoya, 2010).

En la especie *Litopenaeus vannamei* las células espermáticas no son móviles ya que carecen de flagelo y en lugar de éste poseen una estructura denominada spike que significa “espina”. Entonces, las células espermáticas constan de una espina, una cápsula hemisférica, un núcleo, una malla filamentosa entre el núcleo y la capsula hemisférica, y un borde hemisférico de partículas citoplasmáticas (Rojas & Alfaro, 2007; Alfaro-Montoya, 2010).

3.1.2. Área de estudio

El estudio fue realizado en las instalaciones del laboratorio de producción de larvas de *Litopenaeus vannamei* (coordenadas Latitud: -3.89528 y Longitud: -80.8581) ubicado en Punta Mero (Tumbes) perteneciente a la empresa Marinasol S.A (Ver en Anexos, Figura 7)

3.2. Métodos

3.2.1. Mantenimiento de reproductores

Los langostinos reproductores de *L. vannamei* con madurez sexual alcanzada fueron provistos por la langostinera Marinasol S.A. ubicada en la región Tumbes, Perú. Para los ensayos se utilizaron langostinos saludables acondicionados en un estanque rectangular de 2 toneladas de agua de mar tratada, los animales se mantuvieron bajo parámetros óptimos (ver en Anexos, Tabla 6). El alimento utilizado fue pellet Vitalis (Skretting), el cual se suministró tres veces al día, en complemento con alimento fresco. El peso promedio de los langostinos machos utilizados en este estudio fue 33.35 g.

3.2.2. Obtención de espermatozoides y masa espermática

Los espermatozoides maduros (color crema) fueron obtenidos mediante una pequeña presión en la base del quinto par de pereópodos extrayendo el espermatozoides con ayuda de unas pinzas curvas (Arce, Moss, & Argue, 2000) descartándose los espermatozoides melanizados.

La masa espermática fue obtenida por presión en la región posterior del espermatozoides (Lezcano *et al.*, 2004). Los espermatozoides y masa espermática fueron colocados en microtubos con 250 ul de solución salina libre de Ca⁺⁺ (grupo control) o en crioviales con 250 uL de solución crioprotectora (grupo tratamiento).

3.2.3. Determinación de la tasa y rango de congelamiento óptimo para la criopreservación de espermatozoides y masa espermática

3.2.3.1. Protocolos de congelamiento

En base a los antecedentes en estudios de criopreservación de gametos en especies relacionadas a *L. vannamei* se desarrollaron 9 protocolos de

congelamiento para la criopreservación de espermatoforos y masa espermática, de los cuales 8 fueron programados en el criocongelador programable (Asymptote - Via freeze TM Research) y 1 fue desarrollado sin el uso de dicho equipo ya que corresponde a un congelamiento directo en vapores de nitrógeno líquido.

A continuación se presentan y se describen los protocolos de congelamiento de prueba utilizados:

- **PROTOCOLO A:**

La tasa de congelamiento fue de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -35°C manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min, inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C (Lezcano *et al.*, 2004).

- **PROTOCOLO B:**

La tasa de congelamiento fue de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -100°C manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min, inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C (Basado en el protocolo de Lezcano *et al.*, 2004).

- **PROTOCOLO C:**

La tasa de congelamiento fue de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -35°C (Anchordoguy *et al.*, 1988) manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min, inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C (Diwan, 1999).

- **PROTOCOLO D:**

La tasa de congelamiento fue de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -80°C , manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min, inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C . (Basado en el protocolo de Diwan, 1999).

- **PROTOCOLO E:**

La tasa de congelamiento fue de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -100°C , manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min, inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C (Basado en el protocolo de Diwan, 1999).

- **PROTOCOLO F:**

La tasa de congelamiento fue de $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -35°C , manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min, inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C (Basado en el protocolo de Bart et al., 2006)

- **PROTOCOLO G:**

La tasa de congelamiento fue de $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -80°C (Bart *et al.*, 2006) manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min, inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C (Vuthiphandchai *et al.*, 2007).

- **PROTOCOLO H:**

La tasa de congelamiento fue de $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el rango de temperatura fue desde 25°C hasta -100°C , manteniéndose en esta última temperatura durante 5 min,

inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C (Basado en el protocolo de Bart et al., 2006).

- **PROTOCOLO I:**

Las muestras fueron congeladas manteniéndolas a 3 cm por encima de la cámara de LN_2 durante 5 min resultando en una tasa de congelamiento de aproximadamente $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Uberti *et al.*, 2014) y a una temperatura de aprox. -110°C (Goldberg , Tenório de Albuquerque, Miyako. 2000). Inmediatamente las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C .

3.2.3.2. Diseño experimental

Se probaron 9 protocolos de congelamiento para lo cual se recolectaron 120 espermatozoides que fueron distribuidos de la siguiente manera:

PROTOCOLO DE CONGELAMIENTO	N° DE ESPERMATOFOROS	N° DE MASA ESPERMATICA	N° TOTAL POR PRUEBA
A	6	6	12
B	6	6	12
C	6	6	12
D	6	6	12
E	6	6	12
F	6	6	12
G	6	6	12
H	6	6	12
I	6	6	12
CONTROL Espermatozoides frescos	6	6	12
TOTAL DE ESPERMATOFOROS			120

3.2.3.3. Determinación de la tasa y rango de congelamiento óptimo

Los espermatozoides y masa espermática fueron colocados directamente en crioviales con 250 uL de medio base (250 uL EY10% +sucrosa 0,2M) durante 4 min, luego se agregó 125 uL de $MgCl_2$ al 15% con un tiempo de exposición de 10 min., transcurrido este tiempo se adicionó 125 ul de $MgCl_2$ al 15% llegando a una concentración final de 7,5% (Ver en Anexos, Tabla 7).

Los crioviales conteniendo las muestras con la solución crioprotectora completa fueron homogenizados y congelados según el protocolo de prueba a evaluar. Luego del congelamiento las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido por 24 horas.

Transcurrido este tiempo los crioviales conteniendo las muestras fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido e inmediatamente descongelados en baño maría a 20°C durante 4 min, observando el descongelamiento total de las muestras. Inmediatamente los crioviales con las muestras descongeladas fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 min .En el caso de la masa espermática se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet directamente en 200 uL de sucrosa 0,2M dejando un tiempo de hidratación celular de 10 min. Para el caso de espermatozoides luego de retirar el sobrenadante se adicionó 200 ul de sucrosa 0,2 M se dejó reposar por 1 min, luego se extrajo la masa espermática y se resuspendió en la misma solución dejando un tiempo de hidratación celular de 10 min (Figura 2).

Luego del tiempo de hidratación celular, se procedió a realizar las pruebas de viabilidad espermática utilizando la tinción Eosina Nigrosina. Se colocó 10 uL de suspensión espermática sobre una lámina de vidrio y se agregó 5 uL de eosina Y

acuosa comercial al 5% y 5 uL de Nigrosina al 10% (Ver en Anexos, Tabla 8), se homogenizó y se realizó un frotis en la lámina. Las lecturas se realizaron en microscopio óptico a 400X (Figura 3).

El cálculo de la viabilidad espermática (%) se realizó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad espermática (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viables}}{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas}} \times 100.$$



Figura 2. Flujograma del proceso de criopreservación de espermátóforos y masa espermática de *Litopenaeus vannamei*.

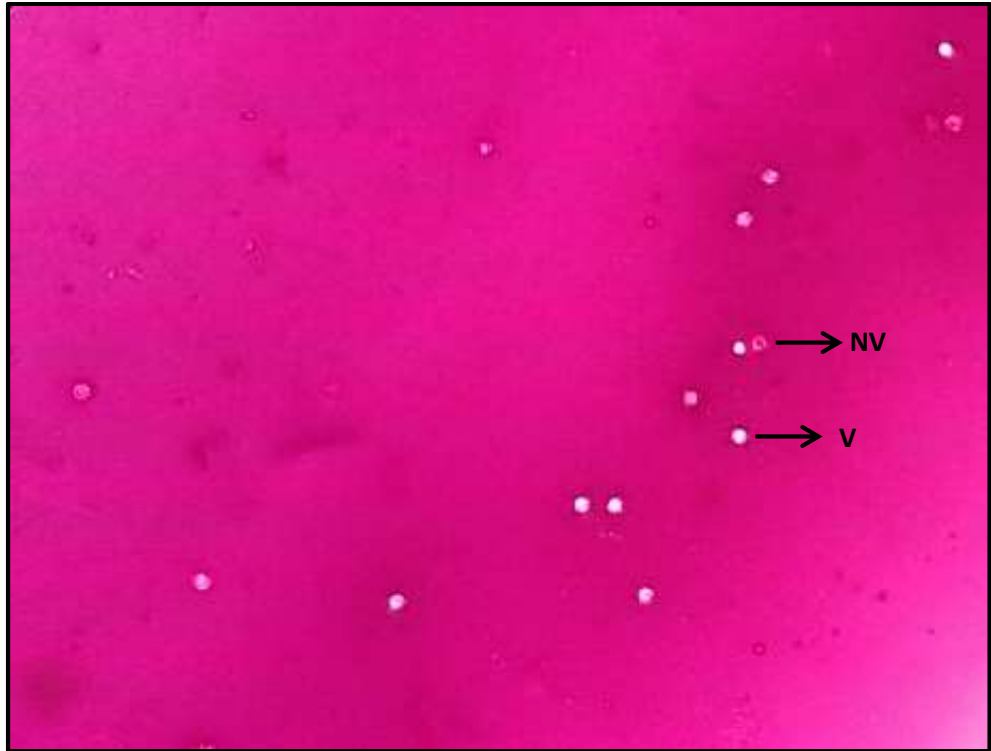


Figura 3. Tinción Eosina-Nigrosina, células espermáticas viables (V) y no viables (NV) de *Litopenaeus vannamei*.

3.2.4. Determinación de la temperatura óptima de descongelamiento post criopreservación de espermatoforos y masa espermática

3.2.4.1. Diseño experimental

Se probaron cinco temperaturas de descongelamiento en baño maría; 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C. Para las pruebas se recolectaron 48 espermatoforos los cuales fueron distribuidos de la siguiente manera:

TEMPERATURAS DE DESCONGELAMIENTO	N° DE ESPERMATOFOROS	N° DE MASA ESPERMATICA	N° TOTAL POR PRUEBA
20 °C	4	4	8
25 °C	4	4	8
30 °C	4	4	8
35 °C	4	4	8
40 °C	4	4	8
CONTROL Espermatoforos frescos	4	4	8
N° TOTAL DE ESPERMATOFOROS			48

3.2.4.2. Determinación de la temperatura óptima de descongelamiento

Los espermatoforos y masa espermática fueron colocados directamente en crioviales con 250 uL de solución EY 10% + sucrosa 0,2 M durante 4 min, luego se agregó 125 ul de MgCl₂ al 15% con un tiempo de exposición de 10 min., transcurrido este tiempo se adicionó 125 ul de MgCl₂ al 15% llegando a una concentración final de 7,5% de MgCl₂. Los crioviales conteniendo las muestras con la solución crioprotectora completa fueron homogenizados y colocados en el criocongelador programable marca Asymptote modelo Via freeze TM Research donde fueron congeladas a -1°C/min desde 25°C hasta -35°C y sumergidas

inmediatamente en nitrógeno líquido por 24 horas (Protocolo C). Transcurrido el tiempo de almacenamiento los crioviales conteniendo las muestras fueron retirados e inmediatamente descongelados en baño maría a 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C durante 4 min (Figura 4).

Inmediatamente los crioviales conteniendo las muestras descongeladas fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 min y se procedió según lo señalado anteriormente. Luego se procedió a realizar las pruebas de viabilidad espermática utilizando la tinción Eosina Nigrosina. Las lecturas se realizaron en microscopio óptico a 400X.

El cálculo de la viabilidad espermática (%) se realizó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad espermática (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viables}}{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas}} \times 100.$$



Figura 4. Flujograma del proceso de descongelamiento de muestras criopreservadas de *Litopenaeus vannamei*.

3.2.5. Ensayos preliminares de inseminación artificial a los 11 días de almacenamiento en nitrógeno líquido

Para esta prueba preliminar se obtuvo 4 hembras sexualmente maduras, de las cuales 2 fueron inseminadas usando espermatozoides criopreservados y almacenados en nitrógeno líquido durante 11 días y las dos restantes se inseminaron usando espermatozoides frescos. El ensayo se realizó en el área de Líneas Puras de la empresa MARINASOL S.A. Para la inseminación artificial se colectaron hembras maduras copuladas provenientes del Área de Maduración a las cuales se les retiró completamente los espermatozoides. La razón de utilizar hembras copuladas es que estas se encuentran en la fase exponencial de reproducción, por lo que tienen mayor probabilidad de desovar que las hembras maduras no copuladas.

Con sumo cuidado se expuso el tégico de la hembra ubicado entre el tercer y cuarto par de pereópodos, con ayuda de una pinza curva se colocó solo la masa espermática en el tégico presionando ligeramente para que se adhiriera a éste. Después de que la masa espermática está correctamente colocada, los pereópodos fueron dispuestos en posición normal, lo que ayuda a "bloquear" la masa espermática. Durante el proceso de inseminación la hembra fue irrigada continuamente con la misma agua del estanque y tratando que el proceso sea completado lo más rápido posible para reducir el estrés en la hembra. Se procedió del mismo modo en el caso de los controles (espermatozoides frescos).

Luego de asegurar la masa espermática en el tégico de las hembras, estas fueron enjuagadas en agua dulce para reducir la carga microbiana, después de aprox. 10 s fueron colocadas de manera individual en tanques de 150 L con agua de mar filtrada, tratada con EDTA y atemperada a 28 °C con una salinidad de 31

ppm. Se colocó un termostato para mantener la sala y el agua a dicha temperatura (Figura 5).

3.2.5.1. Desove y cosecha de huevos:

Luego de 8 o 9 horas post inseminación artificial las hembras fueron retiradas para facilitar la cosecha de huevos. Se utilizó un balde colector (con malla de aprox. 100 μm) el cual fue colocado en una tina con agua para amortiguar físicamente la caída de los huevos, luego se dejó drenar el agua del tanque de desove recuperando así los huevos en el balde colector.

Después de la cosecha los huevos fueron tratados con 0,5 ml de Yodopor (desinfectante comercial) durante 1 min. Luego se realizó el proceso de enjuague y aclimatación de huevos de 15 a 20 min con reflujo de agua atemperada a 33°C y se dejó reposando con aireación.

Terminado este proceso se realizó el recuento de huevos/ml con ayuda de una pipeta de 1 ml. Se procedió de la siguiente manera: se midió con la pipeta 1 mL de agua con huevos y se expuso a una fuente de luz y se identificó y contó los huevos presentes en la pipeta, este procedimiento se realizó por duplicado.

Así mismo los datos de desove se extrapolaron multiplicando el número de huevos contados por el factor 15 000 (volumen en ml del tanque de desove).



Figura 5. Flujograma del proceso de inseminación artificial de *Litopenaeus vannamei*.

3.2.5.2. Eclosión y cosecha de nauplios:

Posteriormente los huevos fueron colocados en tanques de 150 L con agua atemperada a 33°C. Luego de aprox. 14 horas se realizó el recuento de nauplios para el cual se procedió del mismo modo de la cosecha de huevos y se estimó el número de nauplios/ml.

Así mismo los datos de eclosión de nauplios se extrapolaron multiplicando por el factor de “15 000” (volumen en ml del tanque de eclosión).

El porcentaje de eclosión (%) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eclosión (\%)} = (\text{N}^\circ \text{ total de nauplios} / \text{N}^\circ \text{ Total de huevos}) \times 100.$$

3.2.6. Análisis estadístico:

La viabilidad espermática de las pruebas fue calculada en el programa Microsoft Excel 2013.

Para determinar las diferencias significativas entre las variaciones de las medias de cada ensayo se utilizó el estadístico ANOVA de un factor y las pruebas post hoc de Tukey y Duncan usando el programa IBM SPSS statistics 21.

Se consideró un nivel de significancia de 0,05 para todas las pruebas estadísticas aplicadas.

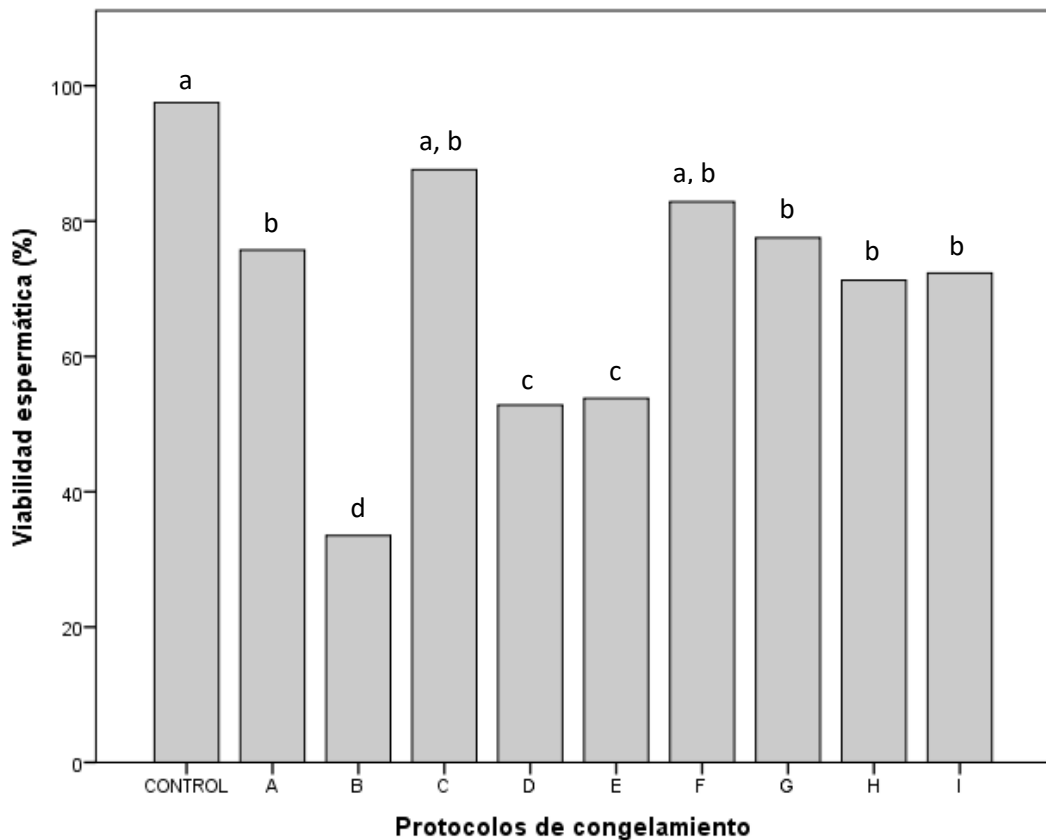
IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en base al análisis estadístico (Ver en anexo, Tabla 9-Tabla 16) fueron los siguientes:

4.1. Determinación de la tasa y rango de temperatura de congelación óptima para la criopreservación de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* (Tabla 1 y Gráfico 1):

Tabla 1. Viabilidad espermática de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* después del congelamiento según protocolos de prueba y almacenamiento en nitrógeno líquido por 24 horas.

Protocolo de congelamiento	Tasa y rango de temperatura	N	Viabilidad espermática (%)		
			Mínimo	Máximo	Media
A	-0.5°C/min, 25°C a -35°C	6	70,43	81,03	75,73
B	-0.5°C/min, 25°C a -100°C	6	22,96	44,10	33,53
C	-1°C/min, 25°C a -35°C	6	80,73	94,47	87,60
D	-1°C/min, 25°C a -80°C	6	39,09	66,51	52,80
E	-1°C/min, 25°C a -100°C	6	33,73	73,87	53,80
F	-2°C/min, 25°C a -35°C	6	79,30	86,43	82,87
G	-2°C/min, 25°C a -80°C	6	72,94	82,13	77,53
H	-2°C/min, 25°C a -100°C	6	61,36	81,18	71,27
I	Aprox. -10°C/min, 25°C a -110°C	6	67,07	77,59	72,33
Control (Espermatozoides frescos)	-	6	95,42	99,65	97,53
Total		60	-	-	-



a,b,c = diferencias significativas entre los protocolos ($p < 0,05$).

Gráfico 1. Efecto de diferentes protocolos de congelamiento sobre la viabilidad espermática de espermatozoides (N= 60).

El análisis estadístico ANOVA de un factor, confirma que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la viabilidad espermática de los protocolos de prueba.

El análisis por subconjuntos homogéneos usando la prueba honestamente significativa de Tukey indica que los protocolos C y F podrían ser eficientes para el congelamiento de espermatozoides.

El análisis usando el test de Duncan indica que únicamente el protocolo C no difiere significativamente del grupo control por lo que ambos forman un

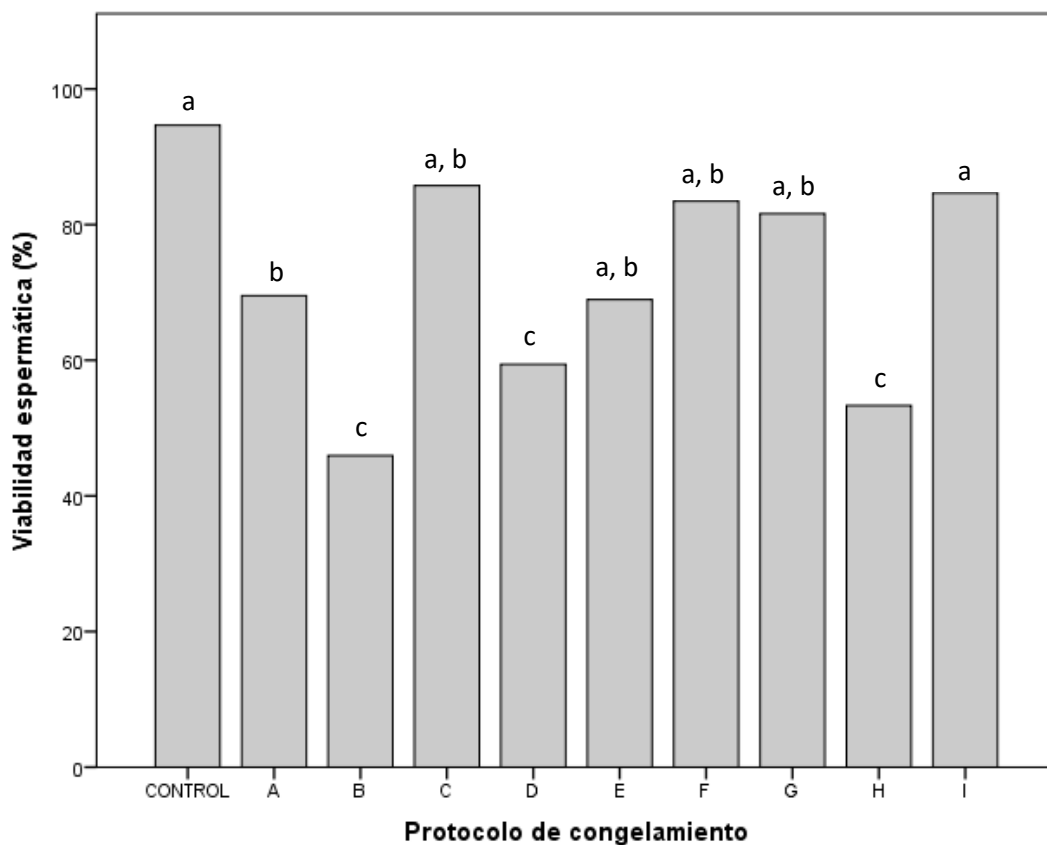
subconjunto homogéneo, es decir, que estadísticamente el protocolo C resulta con mayor porcentaje de viabilidad espermática.

Teniendo en cuenta que el test de Duncan posee mayor capacidad de encontrar diferencias entre las medias comparadas que el test de Tukey, se determinó que el protocolo óptimo para el congelamiento de espermátóforos es el protocolo C.

4.2. Determinación de la tasa y rango de temperatura de congelación óptima para la criopreservación de masa espermática de *Litopenaeus vannamei* (Tabla 2 y Gráfico 2):

Tabla 2. Porcentaje promedio de viabilidad espermática de la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* después del congelamiento según protocolos de prueba y almacenamiento en nitrógeno líquido por 24 horas.

Protocolo de congelamiento	Tasa y rango de temperatura	N	Viabilidad espermática (%)		
			Mínimo	Máximo	Media
A	-0.5°C/min, 25°C a -35°C	6	55,94	83,13	69,53
B	-0.5°C/min, 25°C a -100°C	6	23,58	68,28	45,93
C	-1°C/min, 25°C a -35°C	6	77,98	93,49	85,73
D	-1°C/min, 25°C a -80°C	6	49,70	69,10	59,40
E	-1°C/min, 25°C a -100°C	6	63,28	74,59	68,93
F	-2°C/min, 25°C a -35°C	6	78,53	88,40	83,47
G	-2°C/min, 25°C a -80°C	6	75,63	87,57	81,60
H	-2°C/min, 25°C a -100°C	6	35,56	71,11	53,33
I	Aprox. -10°C/min, 25°C a -110°C	6	76,55	92,79	84,67
Control (Masa espermática fresca)	-	6	90,32	99,01	94,67
Total		60	-	-	-



a,b,c = diferencias significativas entre los protocolos ($p < 0,05$).

Gráfico 2. Efecto de diferentes protocolos de congelamiento sobre la viabilidad de la masa espermática (N= 60).

El análisis estadístico ANOVA de un factor confirma que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la viabilidad espermática de los protocolos de prueba.

El análisis por subconjuntos homogéneo utilizando la prueba honestamente significativa de Tukey y el test de Duncan confirman estos resultados, puesto que los protocolos C, F, G, I y el grupo control forman un subconjunto homogéneo, es

decir, que estadísticamente estos protocolos podrían ser usados para el congelamiento de masa espermática.

4.3. Determinación de la temperatura de descongelamiento óptima post criopreservación de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* (Tabla 3 y Gráfico 3)

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad espermática de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* según temperaturas post descongelamiento.

Temperatura de descongelamiento	N	Viabilidad espermática (%)		
		Mínimo	Máximo	Media
20°C	4	61,21	88,19	74,70
25°C	4	65,68	81,32	73,50
30°C	4	63,08	82,32	72,70
35°C	4	68,68	86,72	77,70
40°C	4	28,57	99,43	64,00
Control (Espermatozoides frescos)	4	94,48	99,72	97,10
Total	24	-	-	-

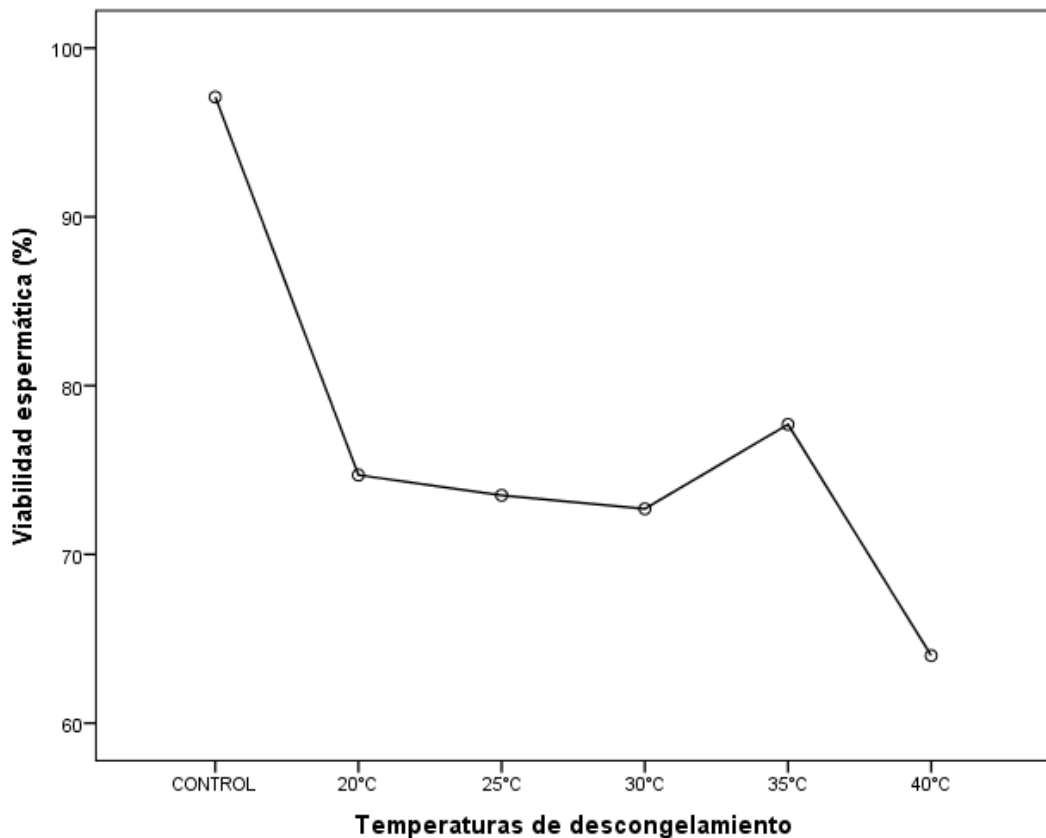


Gráfico 3. Efecto de diferentes temperaturas de descongelamiento sobre la viabilidad de la masa espermática (N= 24).

El análisis ANOVA de un factor confirma que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la viabilidad espermática de las temperaturas de descongelamiento.

El análisis por subconjuntos homogéneos usando el test de Tukey y test de Duncan confirman estos resultados de manera que únicamente la temperatura de 35°C se asemeja al grupo control por lo que ambos forman un subconjunto homogéneo, es decir, que estadísticamente esta temperatura resulta con mayor porcentaje de viabilidad respecto a las demás temperaturas (Ver en Anexos, Figura 8).

4.4. Determinación de la temperatura de descongelación óptima post criopreservación de masa espermática de *Litopenaeus vannamei* (Tabla 4 y Gráfico 4)

Tabla 4. Viabilidad espermática de la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* según temperaturas post descongelamiento.

Temperatura de descongelamiento	N	Viabilidad espermática (%)		
		Mínimo	Máximo	Media
20°C	4	63,13	90,47	76,80
25°C	4	58,93	82,27	70,60
30°C	4	68,56	88,84	78,70
35°C	4	74,89	97,11	86,00
40°C	4	55,15	80,65	67,90
Control (Masa espermática fresca)	4	94,48	99,72	97,10
Total	24	-	-	-

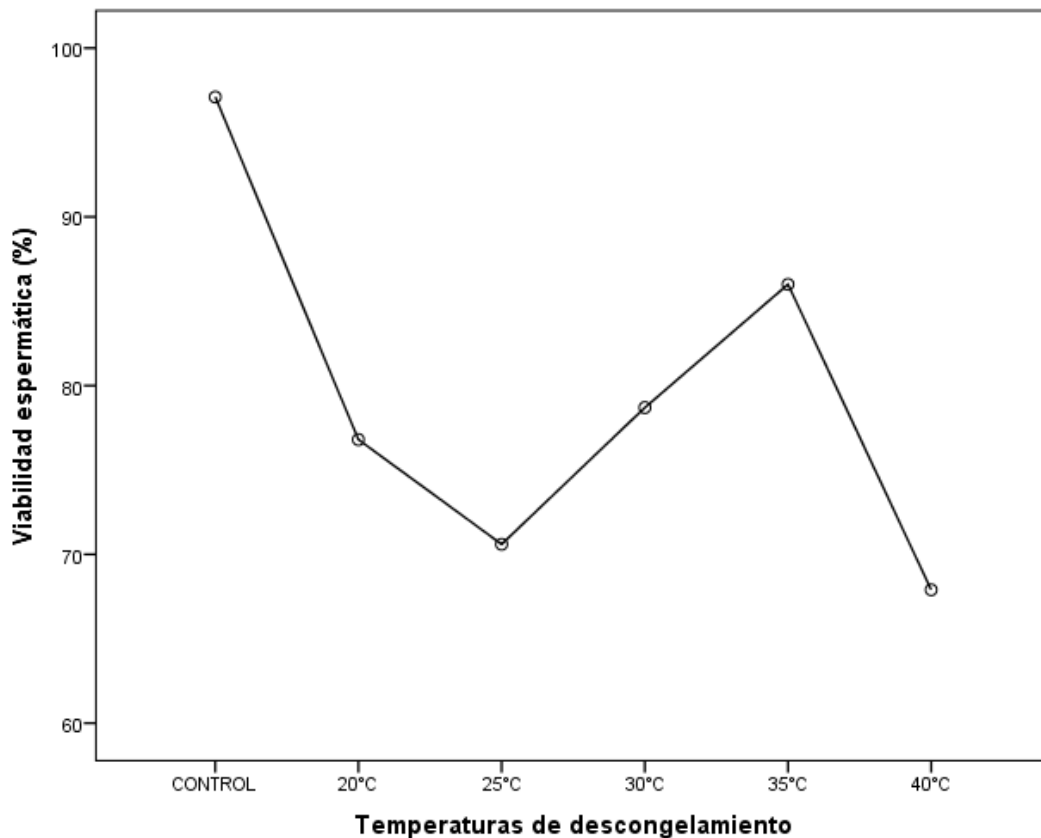


Gráfico 4. Efecto de diferentes temperaturas de descongelamiento sobre la viabilidad de la masa espermática (N= 24).

El análisis estadístico ANOVA de un factor confirma que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las temperaturas de descongelamiento.

El análisis por subconjuntos homogéneos usando el test de Tukey y el test de Duncan confirman estos resultados de manera que únicamente la temperatura de 35°C se asemeja al grupo control por lo que ambos forman un subconjunto homogéneo, es decir, que estadísticamente esta temperatura resulta con mayor porcentaje de viabilidad respecto a las demás temperaturas.

4.5. Ensayos preliminares de inseminación artificial (Tabla 5 y Figura 6)

Tabla 5. Viabilidad espermática, número de huevos, número de nauplios y porcentaje de eclosión post inseminación artificial con espermátóforos criopreservados y almacenados en nitrógeno líquido por 11 días.

Muestra	Viabilidad espermática (%)	N° de huevos	N° de nauplios	Eclosión (%)
Esperma criopreservado (11 días)	85.60	330000	37500	11.36
CONTROL	97.40	570000	120000	21.05

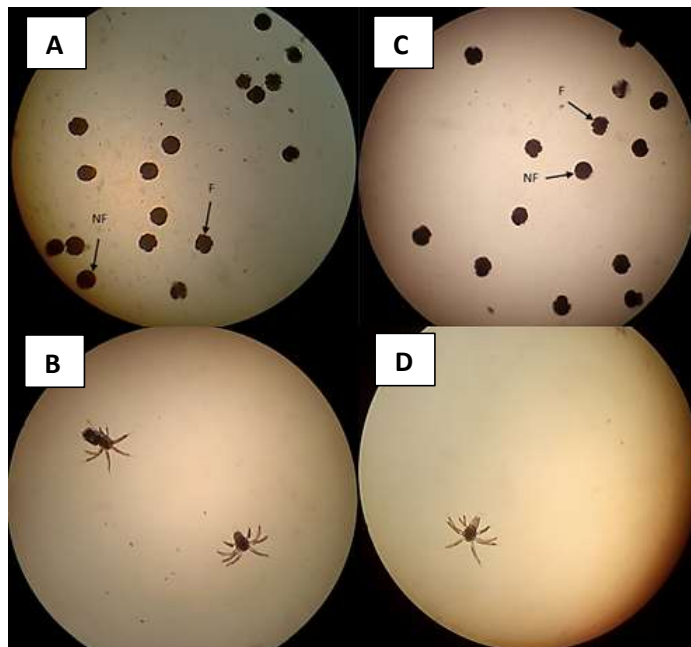


Figura 6. Observaciones microscópicas de huevos y nauplios de *Litopenaeus vannamei*. **A** y **B** imágenes de huevos y nauplios obtenidos en el control (inseminación artificial con esperma fresco), **C** y **D** huevos y nauplios obtenidos post inseminación artificial con espermátóforos criopreservados y almacenados en nitrógeno líquido por 11 días. (*F*: Huevos Fértiles.; *NF*: Huevos No Fértiles).

V. DISCUSIÓN

La criopreservación de espermatozoides y masa espermática en langostinos no es un tema nuevo, muchos autores han probado protocolos de criopreservación variados dependiendo de la especie de estudio.

Durante el desarrollo de un protocolo de criopreservación por lo general muchos autores toman como parámetro principal la determinación del agente crioprotector óptimo, tal es el caso de Chow *et al.* (1985) y Akarasanon *et al.* (2004) quienes criopreservaron espermatozoides de *Macrobrachium rosenbergii* utilizando glicerol 10%, DMSO 5% y/o etilenglicol como agentes crioprotectores. Luego de evaluaciones previas se determinó que la solución de compuesta por yema de Huevo al 10%, sucrosa 0.2M y MgCl₂ 15% era la más óptima para la investigación. Estos agentes crioprotectores han sido utilizados en la criopreservación de espermatozoides en *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus merguensis* (Salazar *et al.*, 2011; Memon *et al.*, 2012).

Las tasas de congelamiento y de descongelamiento también son parámetros muy sensibles y críticos, ya que la combinación de tiempos y temperaturas, pueden ayudar a disminuir el efecto de la cristalización y por ende el criodañó en la célula espermática. El rango de temperaturas para ambos parámetros es muy amplio (Anchordoguy *et al.*, 1988; Medina-Robles *et al.*, 2005; Bart *et al.*, 2006).

Golberg *et al.* (2000) evaluaron la eficiencia de dos formas de criopreservación de espermatozoides de *Macrobrachium rosenbergii* en congelador a -13 °C y en nitrógeno líquido (-196°C) obteniendo una viabilidad de 64.8% y 79.2%. En la presente investigación se han diseñado los protocolos de congelamiento siguiendo

ésta dirección. El análisis por subconjuntos homogéneos utilizando la prueba honestamente significativa de Tukey indicó que los protocolos C (-1°C/min, 25°C a -35°C) y F (-2°C/min, 25°C a -35°C) presentaron mayor porcentaje de viabilidad espermática para espermátóforos y masa espermática asemejándose a lo obtenido en el control ($p > 0,05$). Estos resultados coinciden con los resultados de Diwan (1999) y Vuthiphandchai *et al.* (2007) que han optado por una criopreservación programada en especies relacionadas como *Penaeus indicus* y *Penaeus monodon* cuyas tasas óptimas de congelamiento determinadas varían entre -1°C/min y -2°C/min obteniendo una viabilidad de 69.23% y 87.30% respectivamente.

Luego del análisis aplicando el test de Duncan se observó que únicamente el protocolo C forma un subconjunto homogéneo con el control, es decir, que estadísticamente el protocolo C resulta con mayor porcentaje de viabilidad espermática respecto a los demás protocolos probados. Teniendo en cuenta que el test de Duncan posee mayor capacidad de encontrar diferencias entre las medias comparadas que el test de Tukey, se determinó que el protocolo óptimo para el congelamiento de espermátóforos y masa espermática es el protocolo C (-1°C/min de 25°C a -35°C) con un porcentaje de viabilidad espermática de 87.60% y 85.73% para espermátóforos y masa espermática respectivamente asemejándose al grupo control ($p > 0.05$).

En cuanto a la evaluación de las temperaturas de descongelamiento se obtuvo un porcentaje de viabilidad espermática mayor al 70% en todas las pruebas a excepción de la temperatura de 40°C (64.00%). Memon *et al.* (2012) reportó una viabilidad espermática menor al 39% descongelando espermátóforos de *Penaeus merguensis* a temperaturas entre 25°C y 33°C por 4 min, mientras que en el presente estudio el mayor valor encontrado fue a 35°C (77.77%) por 4 min, valor similar al control ($p > 0.05$).

Autores como Lezcano *et al.* (2004), Salazar *et al.* (2011) y Uberti *et al.* (2014) señalan que el tipo de muestra puede influir en la viabilidad espermática post criopreservación y que la masa espermática soporta mejor los tratamientos de congelación. Una posible explicación mencionada es estos estudios se basa en el grado de exposición a las propiedades tóxicas de la solución crioprotectora frente a las células, así en una suspensión espermática hay una mayor exposición a diferencia de la masa espermática que posee una capa gelatinosa de protección, por el contrario, en las estructuras como los espermatóforos, el ingreso del agente crioprotector a las células puede ser poco homogéneo debido a que están demasiado protegidas. En el presente estudio no hay diferencia significativa en la viabilidad espermática obtenida entre el grupo de espermatóforo y de masas espermáticas, indicando así que las soluciones de criopreservación utilizadas y las curvas de congelación afectaron de la misma manera en ambos tipos de muestras.

Respecto a los ensayos preliminares de inseminación artificial los resultados confirman lo señalado por Morales y Montaldo (2009), que una viabilidad espermática alta no necesariamente significa obtener altos valores en la tasa de eclosión debido a los múltiples factores involucrados durante la inseminación artificial. Además, uno de los objetivos de la criopreservación en la acuicultura es obtener una población de futuros reproductores suficiente en número y con capacidad de dar origen a una nueva generación de la línea selecta preservada (Morales, Montaldo, Ortega, Paniagua & Castillo, 2013).

VI. CONCLUSIONES

1. La tasa y rango de temperatura de congelación óptima para la criopreservación de espermátóforos y masa espermática de *Litopenaeus vannamei* es a -1°C/min desde 25°C hasta -35°C (protocolo C), usando una solución crioprotectora compuesta por yema de huevo 10%, sucrosa 0,2 M y MgCl₂ al 15%.
2. La temperatura de descongelamiento óptima post criopreservación de espermátóforos y masa espermática de *Litopenaeus vannamei* es 35°C en baño maría.
3. El porcentaje de eclosión obtenido mediante inseminación artificial con espermátóforos criopreservados durante 11 días en nitrógeno líquido representa aprox. 50% respecto al control, siendo suficiente para dar origen a una nueva generación de la línea selecta preservada.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la variación temporal en la calidad espermática de *Litopenaeus vannamei* según estaciones del año y el efecto en la viabilidad espermática obtenida post criopreservación.
- Evaluar la variación del porcentaje de viabilidad espermática y la tasa de fertilidad y eclosión a largo plazo (30, 60,90 y 180 días).
- Evaluar mediante técnicas moleculares el criodaño de las células espermáticas post criopreservación y su influencia a nivel larval.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Akarasanon K., Damrongphol P. & Poolsanguan W. Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* [Internet]. 2004 [citado 15 Abr 2017]; 35(15), 1415–1420. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2004.01163.x>
2. Alfaro J., Komen J., & Huisman E. A. Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae. *Aquaculture* [Internet]. 2001 [citado 05 Abr 2017]; 195(3–4), 353–366. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848600005573?via%3Dihub>
3. Alfaro-Montoya J. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture* [Internet]. 2010 [citado 05 Abr 2017]; 300(1–4), 1–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848609009764?via%3Dihub>
4. Anchoroguy T., Crowe J. H., Griffin F. J. & Clark W. H. Cryopreservation of Sperm From the Marine Shrimp *Sicyonia-Ingentis*. *Cryobiology* [Internet]. 1988 [citado 10 Feb 2017]; 25(3), 238–243. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0011224088900314?via%3Dihub>
5. Arce S. M., Moss S. M., & Argue B. J. Artificial Insemination and Spawning of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Implications for a Selective

- Breeding Program. UJNR Technical Report No. 28 [Internet]. 2000 [citado 21 May 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/228466828_Artificial_insemination_and_spawning_of_Pacific_white_shrimp_Litopenaeus_vannamei_Implications_for_a_selective_breeding_program
6. Ávila-Portillo L. M., Madero J. I., & López C. Basic points in cryopreservation. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología [Internet]. 2006 [citado 21 May 2017]; 57(4), 291–300. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008
7. Bart A. N., Choosuk S. & Thakur D. P. Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture Research [Internet]. 2006 [citado 23 Jun 2017]; 37(5), 523–528. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2006.01460.x>
8. Castelo-Branco T., Batista A. M., Guerra M. M. P., Soares R., & Peixoto S. Sperm vitrification in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture [Internet]. 2015 [citado 23 Jun 2017]; 436, 110–113. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848614005638?via%3Dihub>
9. Chao N., Chen Y., Shieh W. Y., & Lin K. Cryopreservation of Spermatophores in the White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Taiwan Fisheries Research [Internet]. 2009 [citado 17 Jun 2017]; 17(2), 67–76. Disponible en: <https://www.tfrin.gov.tw/ct.asp?xItem=251699&ctNode=835&mp=3>

10. Chow S, Tam Y, and Ogasawara Y. Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. The biological bulletin [Internet]. 1985 [citado 13 Abr 2017]; 168 (3), 471 - 475. Disponible en: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.2307/1541526>
11. De Peralta Martínez M. L. Á., Morales I. M., Unzueta Bustamante M. L., Montaldo H. H., & Castillo-Juárez H. Morfología del sistema reproductor y del espermatóforo de *Litopenaeus vannamei*, camarón blanco del Pacífico. Hidrobiologica [Internet] 2013 [citado 5 Abr 2017]; 23(3), 313–319. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972013000300004
12. Diwan, A. D. Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp , *Penaeus indicus* H Milne Edwards. Indian Journal of Fisheries [Internet]. 1999 [citado 05 Abr 2017]; 46(2), 159–166. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/266040223_Cryopreservation_of_spermatophores_of_the_marine_shrimp_Penaeus_indicus_H_Milne_Edwards
13. FAO.org [Internet]. Roma: FAO; The State of Food Insecurity in the World. 2006 [actualizado 2006; citado 4 Abr 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a0750e/a0750e00.htm>
14. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. [Internet]. 2014 [actualizado 2014; citado 4 Abr 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/search/en/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=El+estado+mundial+de+la+pesca+y+la+acuicultura.+%5BInternet%5D.+2014+&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2Fhome%2Fen%2F&ref=&ss=>

15. G.Remoissenet. Consultoria en maduración de camarones peneidos (*P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. schmitti*): 14/12/87 - 08/01/88. Informe técnico. (np) ; 1988 [actualizado 1988; citado 5 abr 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/AC408S/AC408S00.htm>
16. Goldberg R, Tenório de Albuquerque, Miyako L. Criopreservação de Material Genético do Camarão-de-Água-Doce *Macrobrachium rosenbergii*. Rev. bras. Zootec [Internet]. 2000 [citado 18 Jul 2017]; 29(6):2157-2161. Disponible en: <http://livrozilla.com/doc/1103940/criopreserva%C3%A7%C3%A3o-de-material-gen%C3%A9tico-do-camar%C3%A3o-de-%C3%A1gua>
17. King J.E. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Biol. Bull. [Internet]. 1948 [citado 23 Jun 2017]; 94, 244–262. Disponible en: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdfplus/10.2307/1538251>
18. Lezcano M., Granja C., & Salazar M. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Cryobiology [Internet]. 2004 [citado 23 Jun 2017]; 48(3), 349–356. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224004000549?via%3Dihub>
19. Martínez-Páramo S., Horváth Á., Labbé C., Zhang T., Robles V., Herráez P., et al. Cryobanking of aquatic species. Aquaculture [Internet]. 2017 [citado 23 Jun 2017]; 472, 156–177. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484861630299X>
20. Medina-Robles V. M., Velasco-Santamaría Y. M. & Cruz-Casallas P. E. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias [Internet]. 2005

- [citado 15 Jul 2017]; 18(1), 34–48. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902005000100005&lng=es&nrm=iso
21. Memon A. J., Talpur A. D., Khan M. I., Fariddudin M. O., Safiah J., Abol-Munafi A. B., & Ikhwanuddin M. Optimization of spermatophores cryopreservation protocol of banana shrimp (*Penaeus merguensis*)(De Man, 1888). Journal of Animal and Veterinary Advances [Internet]. 2012 [citado 15 Jul 2017];11(10), 1688-1704. Disponible en: <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2012.1688.1704>
22. Montes M. M. Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en Criopreservación de espermatozoides de lenguado *Paralichthys Adspersus* [Internet]. Cybertesis, Tesis pre grado; 2012 [actualizado 2013; citado 5 Abr 2017]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/575>
23. Morales K y Montaldo H. Evaluación de un extensor para el esperma del camarón blanco del pacífico *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* para su almacenamiento a corto plazo [Internet]. Biblioteca Central de la Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis Magistral; 2009 [actualizado 1 Ene 2009; citado 5 Abr 2017]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2010/enero/0652768/Index.html>
24. Morales-Ueno K., Montaldo H. H., Ortega A. M., Paniagua-Chávez C. G., & Castillo-Juárez H. An extender solution for the short-term storage of *Litopenaeus vannamei* sperm to be used in artificial insemination. Aquaculture Research [Internet]. 2013 [citado 13 Jul 2017]; 44(8), 1254–1258. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2012.03126.x>

25. Ro Sarah, P. Talbot, J. Leung-Trujillo and A. L. Lawrence. Structure and Function of the Vas Deferens in the Shrimp *Penaeus setiferus*: Segments 1-3. Journal of Crustacean Biology [Internet]. 1990 [citado 13 Jul 2017]; 10 (3), pp. 455-468. Disponible en: <https://academic.oup.com/jcb/article-abstract/10/3/455/2327565?redirectedFrom=fulltext>
26. Rojas E. & Alfaro J. In vitro manipulation of egg activation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus*. Aquaculture [Internet]. 2007 [citado 18 Abr 2017]; 264(1-4), 469-474. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848606009227?via%3Dihub>
27. Salazar J. L., Teague S. R., Love C. C., Brinsko S. P., Blanchard T. L., & Varner D. D. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. Theriogenology [Internet]. 2011 [citado 18 Abr 2017]; 76(3), 409-418. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X11000963?via%3Dihub>
28. Sieme H., Oldenhof H., & Wolkers W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. Animal Reproduction Science [Internet]. 2016 [citado 6 Abr 2017]; 169, 2-5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432016300343?via%3Dihub>
29. Suquet M., C. Dreanno C. Fauvel J. Cosson & R. Billard. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Research [Internet]. 2000 [citado 18 May 2017]; 31: 231-243. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x>

30. Uberti, M. F., Vieira, F. D. N., Salência, H. R., Vieira, G. D. S., & Vinatea, L. A. Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. Brazilian Archives of Biology and Technology [Internet]. 2014 [citado 23 Ago 2017]; 57(3), 374–380. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132014000300010&lng=en&tlng=en
31. Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S., & Bart, A. N. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. Theriogenology [Internet]. 2007 [citado 23 Ago 2017]; 68(8), 1192–1199. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07005274?via%3Dihub>
32. Xu, X. Cryopreservation of Stem Cells. Comprehensive Biotechnology [Internet]. 2011 [citado 13 Set 2017]; 5 (2) , 481–488. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080885049004670?via%3Dihub>

IX. ANEXOS:

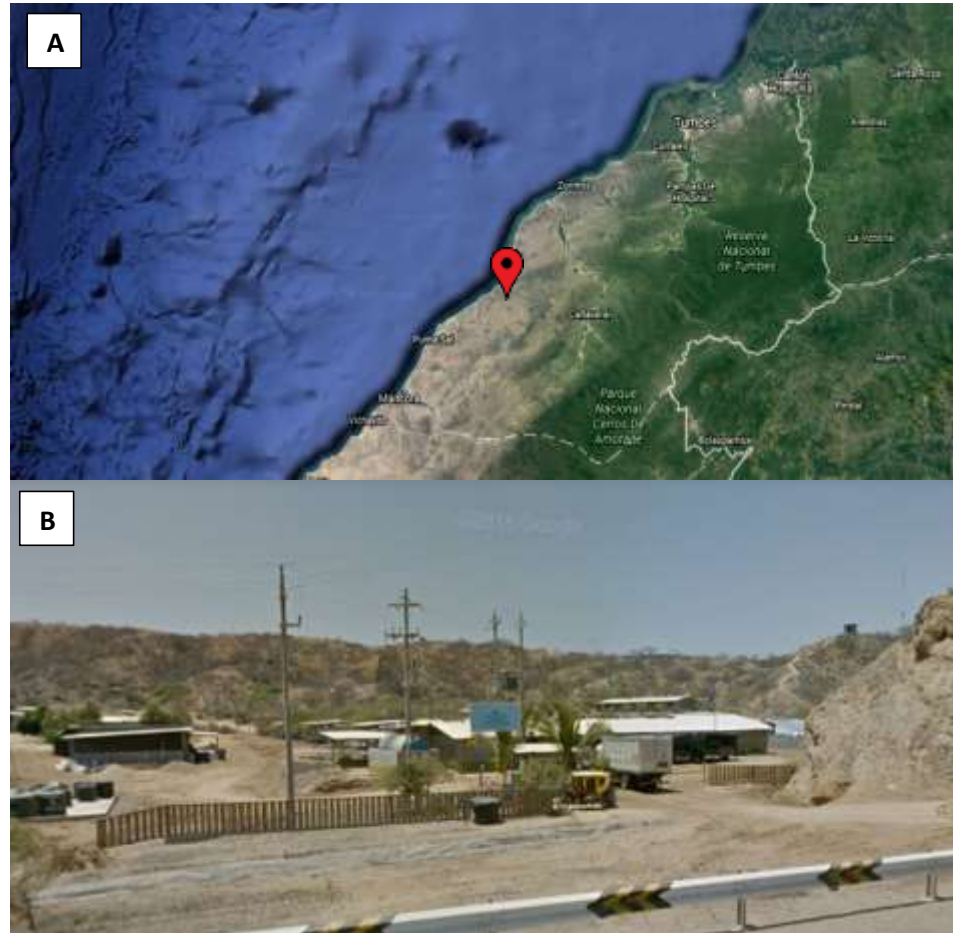


Figura 7. A.- Ubicación geográfica del laboratorio de producción de larvas de *Litopenaeus vannamei*, Punta Mero, Tumbes. **B.-** Entrada del Laboratorio de producción de larvas de la empresa Marinasol S.A.

Tabla 6. Parámetros ambientales del mantenimiento de los reproductores durante la experimentación.

Parámetros	Rango
Oxígeno disuelto	5 – 7 mg/L
Temperatura	30-33 °C
Salinidad	30-35 ppt
pH	7.5 – 8.5

Tabla 7. Composición y preparación de las soluciones crioprotectoras

A) Buffer libre de calcio suplementado con Vitamina C	
Cloruro de sodio	21,63 g
Cloruro de potasio	1,12 g
Ácido bórico	0,53 g
Hidróxido de sodio	0,19 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	4,93 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7,40 +/- 0,1	

Preparación: Pesar cada componente y diluir en 1000 mL de agua destilada, ajustar el pH y esterilizar en autoclave a 125°C por 15 min. Dejar enfriar y agregar 0,88 g de vitamina C, diluir y almacenar en refrigeración.

B) Solución Yema de Huevo al 10% + sucrosa 0,2 M

Yema de huevo de gallina	10 mL
Sucrosa	6,846 g
Buffer libre de calcio suplementado con vitamina C	100 mL

Preparación: Medir 10 mL de yema de huevo y pesar 6,846 g de sucrosa. Diluir ambos componentes en 100 mL de buffer libre de calcio suplementado con vitamina C. Almacenar en tubos forrados con papel aluminio y en refrigeración.

C) Solución Dicloruro de magnesio hexahidratado al 15%

Dicloruro de magnesio	15 g
Buffer libre de calcio suplementado con vitamina C	100 mL

Preparación: Pesar 15 g de dicloruro de magnesio hexahidratado y diluir en 100 mL de buffer libre de calcio suplementado con vitamina C. Almacenar en tubos forrados con papel aluminio y en refrigeración.

Tabla 8. Composición y preparación de la solución de nigrosina al 10%

Solución de nigrosina al 10%	
Nigrosina en polvo	10g
Formalina	0.5 mL
Agua destilada	100 mL

Preparación: Pesar 10 g de nigrosina en polvo y diluir en 100 mL de agua destilada. Sumergir el tubo con la solución en agua hirviendo por 30 minutos. Luego dejar enfriar y agregar 0,5 ml de formalina por cada 100 ml de solución, diluir y filtrar.

Tabla 9. Resultados del análisis ANOVA de los porcentajes de viabilidad espermática de espermátóforos de *Litopenaeus vannamei* después del congelamiento según protocolos de prueba y almacenamiento en nitrógeno líquido por 24 horas.

Descriptivos								
Viabilidad espermática (%)								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
A	6	75,73	5,051	2,062	70,43	81,03	70	81
B	6	33,53	10,073	4,112	22,96	44,10	18	48
C	6	87,60	6,548	2,673	80,73	94,47	76	94
D	6	52,80	13,062	5,333	39,09	66,51	36	73
E	6	57,71	20,296	7,671	38,94	76,49	20	81
F	6	83,20	3,688	1,649	78,62	87,78	77	86
G	6	77,53	4,378	1,787	72,94	82,13	73	84
H	6	71,27	9,443	3,855	61,36	81,18	58	82
I	6	72,33	5,011	2,046	67,07	77,59	64	78
CONTROL	6	97,53	2,015	,822	95,42	99,65	94	99
Total	60	70,50	19,987	2,580	65,34	75,66	18	99

ANOVA de un factor					
Viabilidad espermática (%)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	18653,811	9	2072,646	21,081	,000
Intra-grupos	4915,989	50	98,320		
Total	23569,800	59			

Tabla 10. Análisis por subconjuntos homogéneos de la viabilidad espermática de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* después del congelamiento según protocolos de prueba y almacenamiento en nitrógeno líquido por 24 horas.

Viabilidad espermática (%)							
	Protocolo de congelamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
HSD de Tukey ^a	B	6	33,53				
	D	6		52,80			
	E	6		57,71	57,71		
	H	6		71,27	71,27	71,27	
	I	6			72,33	72,33	
	A	6			75,73	75,73	
	G	6				77,53	
	F	5				83,20	83,20
	C	6				87,60	87,60
	CONTROL	6					97,53
	Sig.			1,000	,063	,077	,150
Duncan ^a	B	6	33,53				
	D	6		52,80			
	E	6		57,71			
	H	6			71,27		
	I	6			72,33		
	A	6			75,73	75,73	
	G	6			77,53	77,53	
	F	5			83,20	83,20	
	C	6				87,60	87,60
	CONTROL	6					97,53
	Sig.			1,000	,396	,068	,063

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Tabla 11. Resultados del análisis ANOVA de las medias de los porcentajes de viabilidad espermática de masa espermática de *Litopenaeus vannamei* después del congelamiento según protocolos de prueba y almacenamiento en nitrógeno líquido por 24 horas.

Descriptivos								
Viabilidad espermática (%)								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
A	6	69,53	12,955	5,289	55,94	83,13	46	84
B	6	45,93	21,296	8,694	23,58	68,28	20	70
C	6	85,73	7,392	3,018	77,98	93,49	72	93
D	6	59,40	9,246	3,775	49,70	69,10	46	70
E	6	68,93	5,388	2,200	63,28	74,59	60	75
F	6	83,47	4,703	1,920	78,53	88,40	78	92
G	6	81,60	5,691	2,323	75,63	87,57	73	89
H	6	53,33	16,936	6,914	35,56	71,11	29	72
I	6	84,67	7,738	3,159	76,55	92,79	75	96
CONTROL	6	94,67	4,139	1,690	90,32	99,01	88	99
Total	60	72,73	18,294	2,362	68,00	77,45	20	99

ANOVA de un factor					
Viabilidad espermática (%)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13700,131	9	1522,237	12,592	,000
Intra-grupos	6044,347	50	120,887		
Total	19744,477	59			

Tabla 12. Análisis por subconjuntos homogéneos de la viabilidad espermática de masa espermática de *Litopenaeus vannamei* después del congelamiento según protocolos de prueba y almacenamiento en nitrógeno líquido por 24 horas.

Viabilidad espermática (%)							
	Protocolo de congelamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
HSD de Tukey ^a	B	6	45,93				
	H	6	53,33	53,33			
	D	6	59,40	59,40			
	E	6		68,93	68,93		
	A	6		69,53	69,53		
	G	6			81,60	81,60	
	F	6			83,47	83,47	
	I	6			84,67	84,67	
	C	6			85,73	85,73	
	CONTROL	6				94,67	
	Sig.			,522	,267	,224	,564
Duncan ^a	B	6	45,93				
	H	6	53,33	53,33			
	D	6		59,40	59,40		
	E	6			68,93	68,93	
	A	6			69,53	69,53	
	G	6				81,60	81,60
	F	6					83,47
	I	6					84,67
	C	6					85,73
	CONTROL	6					94,67
	Sig.			,249	,344	,138	,064

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Tabla 13. Resultados del análisis ANOVA de los porcentajes de viabilidad espermática de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* según temperaturas post descongelamiento.

Descriptivos								
Viabilidad espermática (%)								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
20°C	4	74,70	8,475	4,238	61,21	88,19	64	84
25°C	4	73,50	4,914	2,457	65,68	81,32	67	79
30°C	4	72,70	6,043	3,022	63,08	82,32	68	81
35°C	4	77,70	5,670	2,835	68,68	86,72	71	84
40°C	4	64,00	22,269	11,134	28,57	99,43	32	83
CONTROL	4	97,10	1,645	,823	94,48	99,72	95	99
Total	24	76,62	13,869	2,831	70,76	82,47	32	99

ANOVA de un factor					
Viabilidad espermática (%)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2434,593	5	486,919	4,405	,009
Intra-grupos	1989,720	18	110,540		
Total	4424,313	23			

Tabla 14. Análisis por subconjuntos homogéneos de la viabilidad espermática de espermatozoides de *Litopenaeus vannamei* según temperaturas post descongelamiento.

Viabilidad espermática (%)				
	Temperatura de descongelamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	40°C	4	64,00	
	30°C	4	72,70	
	25°C	4	73,50	73,50
	20°C	4	74,70	74,70
	35°C	4	77,70	77,70
	CONTROL	4		97,10
	Sig.			,465
Duncan ^a	40°C	4	64,00	
	30°C	4	72,70	
	25°C	4	73,50	
	20°C	4	74,70	
	35°C	4	77,70	
	CONTROL	4		97,10
	Sig.			,113

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

Tabla 15. Resultados del análisis ANOVA de los porcentajes de viabilidad espermática de la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* según temperaturas post descongelamiento.

Descriptivos								
Viabilidad espermática (%)								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
20°C	4	76,80	8,591	4,296	63,13	90,47	68	88
25°C	4	70,60	7,336	3,668	58,93	82,27	62	78
30°C	4	78,70	6,370	3,185	68,56	88,84	71	86
35°C	4	86,00	6,982	3,491	74,89	97,11	76	92
40°C	4	67,90	8,016	4,008	55,15	80,65	60	75
CONTROL	4	97,10	1,645	,823	94,48	99,72	95	99
Total	24	79,52	11,696	2,388	74,58	84,46	60	99

ANOVA de un factor					
Viabilidad espermática (%)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2294,833	5	458,967	9,700	,000
Intra-grupos	851,720	18	47,318		
Total	3146,553	23			

Tabla 16. Análisis por subconjuntos homogéneos de viabilidad espermática de la masa espermática de *Litopenaeus vannamei* según temperaturas post descongelamiento.

Viabilidad espermática (%)					
	Temperatura de descongelamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	40°C	4	67,90		
	25°C	4	70,60	70,60	
	20°C	4	76,80	76,80	
	30°C	4	78,70	78,70	
	35°C	4		86,00	86,00
	CONTROL	4			97,10
	Sig.			,276	,051
Duncan ^a	40°C	4	67,90		
	25°C	4	70,60		
	20°C	4	76,80	76,80	
	30°C	4	78,70	78,70	
	35°C	4		86,00	
	CONTROL	4			97,10
	Sig.			,055	,089
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,000.					

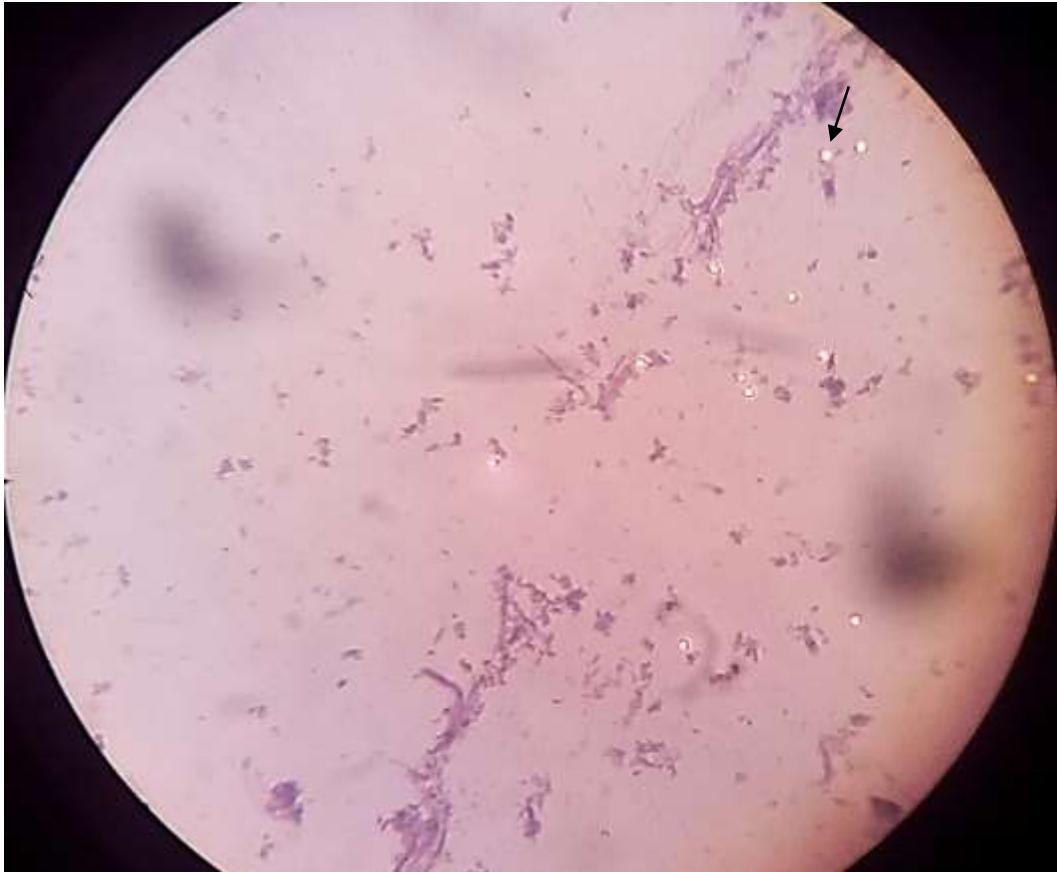


Figura 8. Células espermáticas viables previamente criopreservadas usando el protocolo seleccionado (protocolo C; $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 25°C hasta -35°C) y post descongelamiento en baño maría a 35°C . Tinción eosina nigrosina. Aumento 400X.