



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ESPIRULINA (*Arthrospira  
platensis*), VITAMINA C Y E EN DIETAS PARA TRUCHA ARCO  
IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA  
DE MACHOS ADULTOS**

**AUTOR: BRAVO QUELAL, JAQUELINE VERENICE**

**DIRECTOR: PhD, ORTIZ TIRADO, JUAN CRISTOBAL**

**SANGOLQUÍ**

**2018**



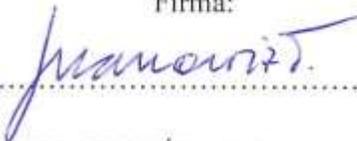
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, *“EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ESPIRULINA (Arthrospira platensis) , VITAMINA C Y E EN DIETAS PARA TRUCHA ARCO IRIS (Oncorhynchus mykiss) SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE MACHOS ADULTOS”*, fue realizado por la señorita *Bravo Quelal, Jaqueline Verenice* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, diciembre del 2018

Firma:

  
.....

DR. JUAN CRISTÓBAL ORTIZ TIRADO

CC..... 170999816-3 .....



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, *Bravo Quelal, Jaqueline Verenice*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Efecto de la inclusión de espirulina (*Arthrospira platensis*), vitamina c y e en dietas para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre la calidad espermática de machos adultos”*, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecido por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

**Sangolquí, diciembre del 2018**

Firma:

JAQUELINE VERENICE BRAVO QUELAL

C.C. 0401741525



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

*Yo, Bravo Quelal, Jaqueline Verenice autorizó a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, publicar el trabajo de titulación “Efecto de la inclusión de espirulina (*Arthrospira platensis*), vitamina c y e en dietas para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre la calidad espermática de machos adultos”, en el Repositorio Institucional cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

Sangolquí, diciembre del 2018

Firma:

JAQUELINE VERENICE BRAVO QUELAL.

C.C. 0401741525

## **DEDICATORIA**

A Dios, su guía en cada momento de esta etapa fue fundamental para superar todos los obstáculos, a mi familia Edwin, Elizabeth y Andrea por su infinito amor, confianza y apoyo incondicional durante mi formación académica. A mi abuelita Chavi, que desde el cielo me cuida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Instituto Agropecuario Superior Andino - IASA a todos los profesores que con dedicación aportaron sus conocimientos y experiencias para mi formación profesional

Agradezco al Doctor Juan Ortiz por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de titulación que en conjunto con la Ingeniera Daysi, me abrieron las puertas del Laboratorio de Recursos Acuáticos.

Al CENIAC y su personal, por su colaboración y disposición hacia la investigación.

A mi familia por su constante apoyo e interés de que cada día aprendiera más, su motivación para siempre continuar. Los amo, gracias.

A mis amigos, Mauricio, Magali, Jhoana y Doris, por todas las experiencias y estos años en los que en conjunto fuimos aprendiendo y formándonos, gracias amigos por todo su apoyo.

Jaqueline Verenice Bravo Quelal

**ÍNDICE DE CONTENIDO****CARÁTULA**

<b>CERTIFICADO DEL DIRECTOR</b> .....	i
<b>AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD</b> .....	ii
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	iii
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii

**CAPÍTULO I****INTRODUCCIÓN**

1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Justificación .....	3
1.3 Planteamiento del problema.....	4
1.3.1 Problema .....	4
1.3.2 Las causas .....	5
1.3.3 Los efectos .....	5
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo general:.....	5
1.4.2 Objetivos específicos: .....	6

**CAPÍTULO II****REVISIÓN DE LA LITERATURA**

2.1 Generalidades .....	7
2.2 Descripción taxonómica.....	7
2.2.1 Hábitat .....	8
2.2.2 Morfología.....	8
2.3 Fisiología de la reproducción .....	9

2.4	Madurez sexual .....	10
2.4.1	Factores reguladores de la reproducción .....	11
2.4.2	Control neuroendocrino de la reproducción en machos adultos .....	15
2.5	Testículos .....	16
2.5.1	Fases de desarrollo testicular.....	18
2.6	Generalidades el semen de trucha arco iris .....	19
2.6.1	Volumen seminal.....	20
2.6.2	Movilidad .....	20
2.6.3	Concentración espermática .....	21
2.6.4	Morfología.....	21
2.6.5	Viabilidad espermática.....	22
2.6.6	Fertilización.....	23
2.7	Microorganismos algales y cianobacterias en la acuicultura .....	24
2.7.1	Espirulina .....	24

### **CAPÍTULO III**

#### **METODOLOGÍA**

3.1	Ubicación del lugar de investigación .....	31
3.1.1	Ubicación política .....	31
3.1.2	Ubicación geográfica.....	31
3.1.3	Ubicación ecológica .....	32
3.2	Materiales .....	32
3.2.1	Insumos biológicos.....	32
3.2.2	Insumos de campo .....	32
3.2.3	Equipos.....	33
3.2.4	Reactivos .....	34
3.3	Métodos.....	34
3.3.1	Instalación de ensayo .....	34
3.3.2	Identificación .....	34
3.3.3	Inclusión de espirulina, vitamina C y E en el alimento.....	34

3.3.4 Métodos para determinar la calidad de semen .....	35
3.3.5 Métodos para la determinación de testosterona .....	38
3.3.6 Determinación de parámetros zootécnicos.....	42
3.3 Toma de parámetros fisicoquímicos del agua .....	42
3.4 Diseño experimental.....	42
3.4.1 Factores .....	42
3.4.2 Tratamientos .....	42
3.4.3 Tipo de diseño .....	43
3.4.4 Repeticiones .....	44
3.4.5 Unidades experimentales.....	44
3.4.6 Croquis del diseño .....	44
3.4.7 Variables del estudio .....	45
3.4.8 Análisis estadístico.....	46
3.5 Análisis funcional.....	47

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1 Resultados .....	48
4.1.1 Variables morfométricas .....	48
4.1.2 Variables reproductivas.....	49
4.1.3 Variables hormonales .....	55
4.2 Discusión.....	58
4.2.1 Variables morfométricas .....	58
4.2.2 Variables reproductivas.....	59
4.2.3 Variables hormonales .....	62

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

5.1 Conclusiones .....	64
5.2 Recomendaciones.....	65
5.3 Bibliografía.....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<i>Dimorfismo sexual en trucha arco iris</i> .....	11
<b>Tabla 2</b>	<i>Requerimientos nutricionales de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) durante la etapa reproductiva</i> .....	12
<b>Tabla 3</b>	<i>Requerimientos de vitaminas en la fase de reproducción de trucha arco iris</i> .....	13
<b>Tabla 4</b>	<i>Características del semen de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)</i> .....	19
<b>Tabla 5</b>	<i>Composición química de espirulina</i> .....	27
<b>Tabla 6</b>	<i>Contenido de minerales de espirulina (Arthrospira platensis)</i> .....	27
<b>Tabla 7</b>	<i>Contenido de vitaminas de espirulina (Arthrospira platensis)</i> .....	28
<b>Tabla 8</b>	<i>Contenido de otras sustancias de Arthrospira platensis</i> .....	28
<b>Tabla 9</b>	<i>Composición del medio Zarrouk para un litro de solución</i> .....	30
<b>Tabla 10</b>	<i>Descripción de los tratamientos experimentales</i> .....	43
<b>Tabla 11</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar del peso e índice corporal de trucha arco iris</i> .....	48
<b>Tabla 12</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar de volumen seminal de reproductores de Oncorhynchus mykiss durante la ejecución del proyecto</i> .....	50
<b>Tabla 13</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar de la concentración espermática de reproductores de Oncorhynchus mykiss durante la ejecución del proyecto</i> .....	51
<b>Tabla 14</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar de la mortalidad espermática de reproductores de Oncorhynchus mykiss durante la ejecución del proyecto</i> .....	52
<b>Tabla 15</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar del tiempo de actividad y movimiento progresivo de reproductores de Oncorhynchus mykiss en interacción fecha tratamiento</i> .....	53
<b>Tabla 16</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar del tiempo de actividad y movimiento progresivo de reproductores de Oncorhynchus mykiss bajo el efecto de 4 tratamientos</i> .....	53

<b>Tabla 17</b> <i>Categorización de motilidad de acuerdo al tratamiento del total de datos analizados</i> .....	54
<b>Tabla 18</b> <i>Descripción del semen de acuerdo a: color, textura y apariencia</i> .....	55
<b>Tabla 19</b> <i>Valores medios <math>\pm</math> desviación estándar de la concentración de testosterona e interacción del tratamiento con la fase del ciclo espermático</i> .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Clasificación taxónomica de trucha arco íris .....	9
<b>Figura 2</b>	Niveles de control en la regulación endocrina.....	10
<b>Figura 3</b>	Interacciones de las células de Leydig (línea-línea) y las células de Sertoli (Punto-Línea) en los diferentes niveles de la cascada endocrina de machos. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona luteinizante (LH), hormona estimuladora del folículo (FSH) y proteína fijadora de andrógenos (ABP).....	19
<b>Figura 4</b>	Morfología del espermatozoide .....	22
<b>Figura 5</b>	Prueba de mortalidad espermática con tinción de eosina .....	23
<b>Figura 6</b>	Ilustración de la fecundación mediante microscopía electrónica .....	24
<b>Figura 7</b>	Centro de Investigaciones Acuícolas.....	31
<b>Figura 8</b>	Tipos de movimiento espermático.....	37
<b>Figura 9</b>	Conteo espermático en cámara de Neubauer.....	38
<b>Figura 10</b>	Disposición de los tratamientos en el experimento .....	44
<b>Figura 11</b>	Variación de peso de cada tratamiento .....	49
<b>Figura 12</b>	Variación del índice corporal de cada tratamiento .....	49
<b>Figura 13</b>	Gráfico de caja y bigotes del volumen seminal por tratamientos .....	50
<b>Figura 14</b>	Variación de la mortalidad espermática cada tratamiento.....	52
<b>Figura 15</b>	Variación del tiempo de actividad por tratamiento y barras de error. ....	54
<b>Figura 16</b>	Curva de calibración de testosterona; eje Y; eje X .....	56
<b>Figura 17</b>	Variación de testosterona circulante en el tiempo por tratamiento.....	57

## RESUMEN

La producción nacional de trucha arco iris depende de una adecuada comprensión y control de procesos reproductivos y nutritivos. Los microorganismos acuáticos son considerados una fuente alternativa de alimento, dentro de estos se destaca la espirulina por su valor nutricional, con altos contenidos vitamínicos del tipo E y C, elementos de importancia para el desarrollo reproductivo, por lo cual en la presente investigación se analizó el efecto de la suplementación con espirulina, vitamina C y E, sobre la calidad espermática de machos adultos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). El estudio se desarrolló en el Centro de Investigaciones Acuícolas (CENIAC), seleccionando 32 machos. Los tratamientos correspondieron a la suplementación con: 2% de espirulina; vitamina C (24000UI) y E (900UI), su respectiva mezcla y alimento balanceado comercial. De manera general los peces no presentaron diferencias significativas sobre las características macroscópicas y concentración espermática ( $p > 0,05$ ). Los reproductores tratados con 2% de espirulina presentaron mayor volumen seminal con un valor de 5,21 mL ( $p = 0,0019$ ) y menor mortalidad espermática con valores de 7,7 y 6,0 % al segundo y tercer ciclo espermático respectivamente ( $p < 0,05$ ). La movilidad espermática fue significativa a la suplementación de espirulina, vitamina E y C, con un tiempo de actividad de 77.21s y 36s de movimiento progresivo. Adicional a la calidad espermática se estudió el comportamiento de la testosterona durante la espermiogénesis, encontrando valores de 0.24 a 0.93 ng/mL durante los procesos de mitosis y meiosis, y valores 1.07 a 1.23 ng/mL de durante la espermiogénesis.

### PALABRAS CLAVE:

- **ESPERMATOGÉNESIS**
- **TESTOSTERONA**
- **CALIDAD ESPERMÁTICA**
- **TRUCHA ARCO IRIS**

## ABSTRACT

The national production of rainbow trout depends on an adequate protection and control of the reproductive and nutritional processes. Aquatic microorganisms are a source of food, a place of medical attention, their nutritional content, their nutritional content, their nutritional content, their nutritional content, their quality in the present. The effect of supplementation with spirulina, vitamin C and E, on the sperm quality of adult males of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The study is in the Center for Aquaculture Research (CENIAC), selecting 32 males. The treatments corresponded to the supplementation with: 2% spirulina; vitamin C (24000UI) and E (900UI), their respective mix and commercial balanced feed. In general, the differences in macroscopic characteristics and sperm concentration ( $p > 0.05$ ). The broodstock were treated with 2% spirulina, higher seminal volume with a value of 5.21 ml ( $p = 0.0019$ ) and lower sperm mortality with values of 7.7 and 6.0% at the second and third sperm cycles, respectively. ( $< 0.05$ ). Sperm motility was significant in the supplementation of spirulina, vitamin E and C, with a time of activity of 77.21s and 36s of progressive movement. In addition to sperm quality, the behavior of testosterone during spermiogenesis was studied, finding values of 0.24 to 0.93 ng / mL during the mitosis and meiosis processes, and values 1.07 to 1.23 ng / mL during spermiogenesis.

### KEY WORDS:

- SPERMATOGENESIS
- TESTOSTERONE
- SPERM QUALITY
- RAINBOW TROUT

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La acuicultura es uno de los sectores de producción alimentaria de alto crecimiento presentado un aumento anual del 8.8% desde 1970 (FAO, 2009a). En Ecuador una de las especies de mayor actividad dentro del sector acuícola de agua dulce es la trucha arco iris con una producción al 2014 de 4500 tn y al 2016 de 6051 tn (FAO, 2016b).

La producción nacional de trucha arco iris depende de la satisfacción de la demanda de alevines, ya que estos son la materia prima del ciclo productivo, a su vez este depende de un adecuado control de los procesos reproductivos, así como de su alimentación. De acuerdo a Huamaní & Mantilla, al 2017, la alimentación es determinante sobre la calidad de gametos y este a su vez sobre el producto final, ya que gametos de calidad presentan una mejor tasa de eclosión, conversión alimenticia, crecimiento, mejor calidad de carne y rendimiento.

En el Ecuador existe una demanda de alevines de trucha arco iris insatisfecha, por lo que los productores recurren a la importación de ovas embrionadas. Estos procesos de importación e ingreso de germoplasma exótico está regulado por el acuerdo ministerial 0.97, y la inocuidad del producto biológico por parte del Instituto Nacional de Pesca (Ministerio de Comercio Exterior, 2018). Sin embargo, la introducción de ovas embrionadas al país generan implicaciones importantes a la seguridad sanitaria de los proyectos piscícolas, poniéndolos en riesgo por la posible amplificación de patógenos a poblaciones cultivadas y silvestres (Huamaní & Mantilla, 2017). Bajo esta condición, la mejora de los procesos reproductivos por instituciones nacionales,

debe ser una tarea estratégica para la sostenibilidad del sector dulce acuícola de la región interandina del Ecuador.

Por otro lado, existe insuficiente información sobre los estados nutricionales y su impacto en la calidad de la reproducción en organismos estatales. La alimentación de trucha arco iris está basada en proteínas de origen animal que generalmente tienen un costo elevado, como la harina de pescado blanco, la misma que no es sustentable por la demanda creciente y el impacto al medio ambiente, para lo cual se debe de considerar el uso de otras fuentes nutricionales tanto para producción como para la mejora de los procesos reproductivos en truchas (Rodríguez *et al.*, 2013).

En este sentido, las microalgas son consideradas una fuente alternativa de alimentos para la acuicultura, debido a la fácil adaptación a condiciones controladas y producción de biomasa seca para uso alimenticio (Geffroy & Simon, 2013). Dentro del grupo de microorganismos algales se destacan la espirulina y chlorella, con altos contenidos proteicos, lipídicos y vitamínicos los cuales son esenciales para la formación de gametos y la tasa de fecundidad.

La inclusión de espirulina como suplemento alimenticio en etapas de reproducción ha sido evaluada previamente en diferentes especies acuícolas como milkfish, gambas, salmón y red swordtail (Geffroy & Simon, 2013). Por otro lado, estudios en vertebrados superiores, demuestran su efecto, como es el caso de ratones blancos, en donde la inclusión de espirulina tiene un efecto positivo sobre la movilidad, vitalidad y concentración espermática (Mojica, 2008). De igual manera en el estudio realizado por Mariey *et al.*, 2012, se hace mención al efecto positivo de la inclusión de espirulina en dietas balanceadas de aves ponedoras y su impacto en la tasa de fecundidad e incubación de huevos.

En Ecuador existen estudios sobre la mejora de la calidad de la reproducción en hembras de trucha arco iris, a través de la inclusión de vitamina C y E durante los períodos de ovogénesis (Guzman Viveros, 2013) sin embargo, en gran medida la viabilidad de estos procesos depende de la calidad y disponibilidad espermática de machos adultos (Vásconez, 2007). En este aspecto se deben considerar factores alimenticios para que los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis tengan un efecto importante en la tasa de fertilización de óvulos, y por tanto se genere el conocimiento básico en la mejora nutricional para la especie bajo condiciones locales, para incrementar la calidad y disponibilidad de alevines para el mercado nacional.

## **1.2. Justificación**

El cultivo de trucha arco iris a nivel mundial y nacional presenta altas tasas de crecimiento, así en Ecuador existen alrededor de 260 criaderos ubicados principalmente en la región sierra central y dos centros de reproducción comercial Centro de Investigaciones Acuícolas (CENIAC) y Estación Piscícola Arco Iris (EPAI) (Ministerio de Comercio Exterior, 2018). La producción de trucha arco iris sigue un ciclo, el cual implica la fase reproductiva y por ende la comprensión de los mecanismos que la regulan y controlan, siendo estos principalmente la espermatogénesis y ovogénesis. Estos procesos son determinados por el sistema endocrino y el estado nutricional; las alteraciones de estos factores pueden causar afecciones en la maduración gonadal, el descenso o ausencia de las puestas o desoves, por lo tanto una afección en la estabilidad de la producción (Carrillo *et al.*, 2009).

El mejoramiento nutricional de la dieta en reproductores, se establece con la modificación de diversos componentes como proteína, lípidos, ácidos grasos, vitaminas; así la elevación de  $\alpha$ -tocoferol en salmónidos, mejora la calidad de óvulos y espermatozoides, reduciendo el

porcentaje de huevos anormales e incrementando la tasa de fecundidad. Al igual que el  $\alpha$ -tocoferol, la inclusión de microalgas como la espirulina permite mejorar la calidad reproductiva, debido al aporte nutricional de ácidos grasos esenciales, aminoácidos y vitaminas. (Ramakrishnan *et al.*, 2008).

El proceso fisiológico de la reproducción en machos es el resultado de la integración del estado nutricional con el sistema endocrino, el cual está regulado por el eje hipotálamo, hipófisis, gónada, que modulan la actividad y secreción de las hormonas implicadas en el proceso reproductivo, como la testosterona, hormona esencial para el proceso de espermatogénesis (Vázquez & Rendón, 2009).

El presente estudio muestra procesos con resultados importantes en el manejo de parentales machos de truchas, que pueden ser aplicados a nivel de campo, promoviendo la mejora de los procesos de maduración gonadal, gametos y alevines en la producción de truchas en el alto andino ecuatoriano.

### **1.3. Planteamiento del problema**

#### **1.3.1. Problema**

Las dietas balanceadas disponibles en el mercado local tienen su enfoque para la producción de peces de engorde y no para reproducción. Los requerimientos nutricionales para parentales machos no cumplen con los nutrimentos en cantidad o calidad específica generando deficiencias en la calidad espermática, especialmente en el contenido de espermatozoides por mL de semen, % de motilidad y % de fecundidad. Esto provoca un impacto negativo en la viabilidad de alevines eclosionados y productividad trutícola nacional en términos generales.

### **1.3.2. Las causas**

- Las dietas balanceadas correspondientes a la etapa de reproducción pueden causar un déficit nutricional en los reproductores debido a cambios en la distribución de energía para la gametogénesis.
- El principal insumo operativo para la producción de trucha arco iris es la disponibilidad de gametos viables y su posterior fertilización. Esto depende en gran medida del estado fisiológico y calidad de la reproducción de parentales en confinamiento.
- La nutrición en la etapa de reproducción es uno de los aspectos menos investigado en las áreas de nutrición de peces en Ecuador, por lo que su efecto en la rentabilidad de proyectos a pequeña y mediana escala es altamente significativo.

### **1.3.3. Los efectos**

- El déficit nutricional de los reproductores trasciende en la alteración del ciclo gonadal.
- Escasez de huevos embrionados por la ausencia de espermatozoides frescos y de excelente calidad.
- Incremento en la importación de ovas embrionadas de trucha arco iris. Durante el período 2010-2014, el volumen de importación fue de 45 millones de ovas de diferentes orígenes (MAGAP, 2016).
- Deficiencias y problemas de morbilidad y mortalidad durante las primeras fases de cultivo relacionados directamente con el régimen de alimentación de los reproductores.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general:**

Evaluar el efecto de inclusión de espirulina, vitamina C y E en dietas balanceadas para trucha arco iris y su impacto en la calidad espermática de machos adultos.

#### 1.4.2. Objetivos específicos:

- Valorar parámetros reproductivos detectables durante la fase final de la espermiogénesis en machos adultos de trucha arco iris, bajo la acción de dietas balanceadas con la inclusión de espirulina, vitamina C y E.
- Estimar la estacionalidad de la testosterona circulante y su interacción con la espermatogénesis en machos adultos de trucha arco iris, bajo la acción de dietas con espirulina, vitamina C y E.

#### 1.5. Hipótesis

**H<sub>0</sub>:** “La inclusión de *Arthrospira platensis* en dietas balanceadas para reproducción de trucha arco iris, no afecta las características espermáticas de machos adultos de *Oncorhynchus mykiss* durante la maduración gonadal”.

**H<sub>a</sub>:** “La inclusión de *Arthrospira platensis* en dietas balanceadas para reproducción de trucha arco iris afecta las características espermáticas de machos adultos de *Oncorhynchus mykiss* durante la maduración gonadal”.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### 2.1. Generalidades

La trucha arco iris es una especie íctica originaria de las costas del Pacífico de Norte América, fue introducida al Ecuador en el año 1928 con la importación de 60.000 ovas embrionadas para la repoblación de ríos y lagos andinos. En el ámbito de la acuicultura la trucha arco iris presenta gran importancia debido a su capacidad de adaptación y al crecimiento de su producción, así al año 2000 se tiene una producción nacional de 33 toneladas, mientras que en el 2015 la producción fue de 4.500 toneladas (FAO, 2016a) ocupando un 62% de la distribución dulce acuícola de la región andina.

Existen dos estaciones dedicadas a la producción de alevines de trucha arco iris, el Centro de Investigaciones Acuícolas (CENIAC) ubicado en Papallacta y la Estación Piscícola Arco Iris (EPAI) en el Cajas. Sin embargo existe un déficit de abasto de ovas debido a la condición reproductiva de especies sincrónicas, por lo cual se recurre a la importación de ovas exponiendo a centros de producción a la introducción de agentes infecciosos y por lo tanto de enfermedades como el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) y la enfermedad del torneo causada por *Myxobolus cerebralis* (Ingle *et al.*, 2012).

#### 2.2. Descripción taxonómica

La trucha arco iris presenta la siguiente clasificación taxonómica:

## **Taxonomía**

Reino:	Animal
Phylum:	Chordata
Subphylum:	Vertebrata
Superclase:	Pisces
Clase:	Psteichthyes
Orden:	Salmoniformes
Familia:	Salmonidae
Género:	Oncorhynchus
Especie:	Oncorhynchus mykiss
Nombre común:	Trucha arco iris

### **2.2.1. Hábitat**

En su ambiente natural la trucha arco iris habita en zonas acuáticas de aguas no contaminadas, frías con una temperatura óptima entre 7°C y 17°C; cristalinas y bien oxigenadas, con cauces de marcados desniveles topográficos comúnmente en ríos de alta montaña a los que se adaptan bien debido a su complexión aerodinámica (Paz Donoso, 2013).

### **2.2.2. Morfología**

Esta especie se caracteriza por presentar un cuerpo alargado y fusiforme, su piel está cubierta por finas y pequeñas escamas. Posee dos aletas pares y tres impares, una dorsal, formada por radios y una segunda dorsal sin radios, tiene dos aletas impares ubicadas en la abertura anal y en la parte caudal que funciona como órgano de propulsión, estabilizador, timón y freno; además de una aleta adiposa la cuál no presenta una función definida (Arregui, 2013).

Su coloración varía de acuerdo al hábitat, tamaño y condición sexual, pero generalmente presentan el borde de la aleta adiposa de color negro, los flancos tienen una banda irisada rosácea longitudinal, por encima de ella es de color azul verde, por debajo del vientre es color gris plateado o blanquecino; además posee un gran número de máculas negras en la piel, a manera de lunares como se puede observar en la figura 1.



**Figura 1.** Anatomía externa de la trucha arco iris

Fuente: (Arregui, 2013)

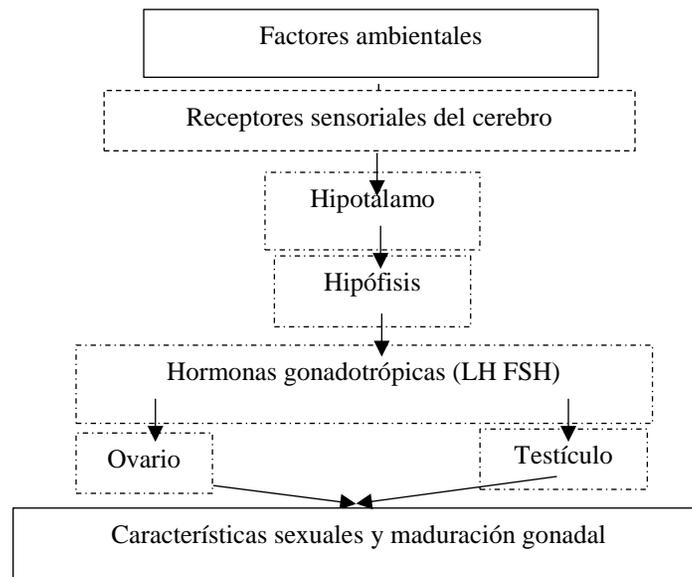
### 2.3. Fisiología de la reproducción

La trucha arco iris se reproduce sexualmente mediante fecundación externa, sus órganos sexuales durante los primeros meses de desarrollo son indiferenciados es decir presentan gonocorismo indiferenciado (Dávila & Garces, 2007). El tiempo en alcanzar la madurez sexual puede variar de acuerdo a la zona geográfica, altitud, latitud, entre otras (Lagos, 2015).

De manera general la reproducción está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis- gónada, iniciando con la recepción de un estímulo ambiental principalmente de temperatura y luminosidad, los cuales son dirigidos hacia el hipotálamo para estimular la síntesis y secreción de hormonas liberadores de gonadotropina (GnRH). La estimulación neural de la GnRH dirige las señales a la glándula pituitaria o hipófisis donde inducen y regulan la síntesis y secreción de hormonas peptídicas como la folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). Ambas hormonas

son secretadas al torrente sanguíneo llegando a las gónadas, estimulando a través de receptores específicos la producción de esteroides (Valdebenito, 2008) (Figura 2).

En salmónidos los niveles de FSH y LH a nivel de plasma y pituitaria varían durante la gametogénesis, la FSH se presenta con niveles elevados durante la espermatogénesis controlando sus primeras etapas, mientras que la LH se aumenta durante la maduración final (Van *et al.*, 2009)



**Figura 2.** Niveles de control en la regulación endocrina

Fuente: (Tresguerres, 2015)

#### 2.4. Madurez sexual

La trucha arco iris es una especie que presenta dimorfismo sexual, estas características se desarrollan durante el proceso de maduración en donde se presentan cambios morfológicos que posibilitan la diferenciación entre machos y hembras. Los machos maduran sexualmente a los 9 a 12 meses de edad, con una concentración espermática de 4,5 a 9,5 millones de espermatozoides/ $\text{mm}^3$ ; mientras que las hembras maduran a los 21 meses de edad, con una fecundidad relativa de

2500 óvulos por kilogramo de peso vivo dependiendo del medio en el que se encuentren (Lagos, 2013).

En la Tabla 1 se detallan las principales características de dimorfismo sexual de la trucha arco iris.

**Tabla 1**

*Dimorfismo sexual en trucha arco iris*

<b>Estructura</b>	<b>Hembra</b>	<b>Macho</b>
Maxilares	Dos maxilares iguales	Boca grande, puntiaguda
Musculatura	Suave	Rígida
Abdomen	Blando	Duro
Poro genital	Prominente	No prominente
Color nupcial	Normal	Negrusco
Forma del cuerpo	Redondeada	Delgada

Fuente: (Ortiz, 2015)

#### **2.4.1. Factores reguladores de la reproducción**

La reproducción de los peces está regulada por factores internos y externos, los factores internos también denominados factores últimos son críticos ya que se encargan de desencadenar varios procesos para finalizar el desarrollo de los gametos y desove; mientras que los factores externos denominados como factores próximos son los encargados de la preparación para el proceso de gametogénesis tales como la temperatura, luminosidad, oxígeno y la satisfacción de los requerimientos nutricionales (Ortiz & Muñoz, 2013).

##### **2.4.1.1. Factores físico- químicos óptimos para la reproducción**

La temperatura y el fotoperiodo son las principales características externas que regulan la reproducción debido a su acción sobre el eje hipotálamo - hipófisis - gónada, así el fotoperiodo tiene relación con la liberación de gonadotropinas antes del desove siendo el óptimo de

luminosidad de 0 a 20 lux. La temperatura es un factor modulador y regulador de la liberación de gametos y embriogénesis, siendo la temperatura ideal para reproducción de 6 a 11°C (Vásquez Gallegos, 2014).

Otros parámetros fisicoquímicos a tener en cuenta son el oxígeno y pH, el oxígeno deberá de estar en una tasa de saturación mayor al 70% y el pH en un rango de 6,5 a 8,5.

#### **2.4.1.2. Factores nutricionales en la reproducción**

El potencial reproductivo está relacionado con el estado nutricional de los animales, afectando el tiempo de espermiación, calidad de gametos y fecundidad. Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los alevines son consecuencia directa o indirecta de la nutrición de los adultos, debido a esta razón el alimento a suministrar debe cubrir los requerimientos alimenticios (Washburn *et al.*, 1990).

Al momento de sustituir la fuente natural y elaborar un alimento alternativo, se debe cumplir con las demandas nutricionales y energéticas de la etapa reproductiva (FAO, 2009a) detalladas en la Tabla 2.

#### **Tabla 2**

*Requerimientos nutricionales de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) durante la etapa reproductiva*

<b>Elementos</b>	<b>Porcentaje</b>
Proteína	47,0
Proteína digestible	43,2
Lípidos	20,0
Carbohidratos	13,5
Fibra	0,6
Humedad	9,0

Fuente: (Guzmán Viveros, 2013)

Los lípidos y ácidos grasos, especialmente los ácidos grasos altamente insaturados de cadena larga (HUFA) en las dietas de reproductores de peces están relacionados con el incremento de la fecundidad, fertilización y calidad de óvulos (Carrillo *et al.*, 2009). También la composición proteica de las dietas influye sobre la calidad de la puesta y composición del saco vitelino (Washburn *et al.*, 1990). Así mismo, la elevación de  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico reduce el porcentaje de anormalidades en ovas e incrementan la tasa de fecundidad.

### 2.4.1.3. Requerimientos de vitaminas en la reproducción

Las vitaminas tienen un profundo efecto en la fecundidad y desarrollo gonadal, siendo elementos importantes en el proceso reproductivo. Se reconocen 15 vitaminas establecidas como esenciales para los peces, siendo las más importantes las vitaminas: A (retinol), D (colecalfiferol), E (tocoferol), K (menadiona) y C (ácido ascórbico) (Carrillo *et al.*, 2009). Los requerimientos de vitaminas por kilogramo de alimento para trucha arco iris se detallan en la siguiente Tabla 3:

**Tabla 3**

*Requerimientos de vitaminas en la fase de reproducción de trucha arco iris*

Vitamina	Valor	Unidad
Vitamina A	10000	UI
Vitamina C	4000	UI
Vitamina D	2500	UI
Vitamina E	140	UI
Vitamina K	6	mg
Vitamina B1	10	mg
Vitamina B2	25	mg
Vitamina B3	150	mg

CONTINÚA



Vitamina B4	1000	mg
Vitamina B5	50	mg
Vitamina B6	10	mg
Vitamina B8	1000	Mcg
Vitamina B9	5	mg

---

Fuente: (Orna, 2010)

UI: unidades internacionales; mg: miligramo; mcg: microgramo

#### **2.4.1.4. Vitamina C**

El ácido ascórbico es el nombre común dado al 2,3-enediol-L-gulónico de carácter hidrosoluble, el cuál en diferentes mamíferos, aves y peces como los teleósteos no es sintetizado, por lo cual debe de ser suministrado por una fuente exógena. En los teleósteos la absorción de vitamina C se da a nivel de la membrana apical de los enterocitos mediante transporte activo pasando en su forma reducida desde el interior del enterocito hacia los capilares sanguíneos que se encuentran en los pliegues intestinales (Richard & Bode, 2017).

El ácido ascórbico a nivel de plasma seminal se mantiene en una relación de proporción directa con el nivel de ácido ascórbico de la dieta nutricional, su requerimiento en reproductores es 8 veces mayor que en juveniles, estableciéndose la máxima concentración de ácido ascórbico en el plasma seminal con una inclusión de 870 ppm, mientras que la saturación se alcanza con 440 ppm de inclusión de ácido ascórbico (Ciereszko & Dabrowski, 1995)

El ácido ascórbico juega un papel relevante en la reproducción de los peces, en salmónidos se señala su importancia en la esteroidogénesis y vitelogénesis, además de proteger las células del esperma durante la espermatogénesis, maduración y fecundación, reduciendo el riesgo de peroxidación de los lípidos que iría en detrimento de la motilidad de los

espermatozoides; así como para la protección del genoma. A nivel embrionario la vitamina C actúa en la síntesis de colágeno durante el desarrollo reproductivo reduciendo la mortalidad embrionaria (Carrillo *et al.*, 2009).

#### **2.4.1.5. Vitamina E**

La vitamina E es un conjunto de 8 especies de tocoferoles y tocotrienoles, de carácter liposoluble y esencial, debido a la incapacidad del organismo para sintetizarla por lo que generalmente es administrada mediante la forma de dl-alfa-tocoferol acetato del cual solo el 20 al 50% es absorbido en el lumen del intestino y la mucosa. El tocoferol circulante es acumulado lentamente por los diferentes tejidos, integrándose a la membrana celular en conjunto con el colesterol y fosfolípidos; el tejido adiposo, hígado y músculo son las áreas más importantes del depósito de esta vitamina (Sayago *et al.*, 2007).

La vitamina E es movilizada al ovario desde tejidos periféricos mediante lipoproteínas, favoreciendo al aumento de lípidos totales en el ovulo, además presenta una función antioxidante a nivel inter e intracelular que previene la degeneración peroxidativa de las grasas en las células, además de la formación de radicales libres. Su inclusión en la dieta de los reproductores incrementa la calidad de los gametos, aumentando los porcentajes de embriones con desarrollo normal, embriones eclosionados y larvas con desarrollo normal (Carrillo *et al.*, 2009).

#### **2.4.2. Control neuroendocrino de la reproducción en machos adultos**

La acción de las gonadotrofinas es indirecta, ya que se realiza a través de la estimulación de las células de Leydig para la producción de andrógenos, que a su vez dependen del estímulo trófico de la hormona gonadotropa circulante (Orvay Castelló, 1993).

El andrógeno endógeno primario producido por los testículos de los peces, es el 17  $\beta$  - hidroxil - 4- androstene - 3, 11 - diona (11 - KT) que se deriva de la testosterona hormona encargada de la espermatogénesis. Los niveles 11 - KT varían en el plasma durante el ciclo reproductivo presentándose en aumento durante la espermatogénesis y disminuyendo antes o durante la espermiación. Posteriormente se desencadena la acción hacia las células de Sertoli para la activación de la espermatogénesis (Valdebenito, 2008).

Los niveles de LH en el plasma causan un aumento de la espermiogénesis a nivel testicular junto con la producción del esteroide inductor de la maduración (MIS). La LH y el MIS inducen un incremento en los niveles de semen producidos a través de la estimulación de la producción del plasma seminal, y el MIS estimula la capacidad de movimiento del espermatozoide a través de un ascenso del pH en el plasma seminal (Valdebenito, 2008).

## **2.5. Testículos**

Los testículos en los salmónidos son internos y se encuentran cubiertos por una túnica albugínea. Se originan como estructuras pares que se encuentran suspendidos por mesenterios alargados en la sección superior de la cavidad del cuerpo ubicándose hacia los lados, debajo de la vejiga natatoria (Chanatasig Chicaiza, 2015).

El tamaño y color varía de acuerdo al grado de madurez a nivel testicular, pero de manera general presentan una estructura longitudinal, compuestos por una porción intersticial y lobular (Muñoz, 2013)

La porción intersticial se encuentra entre los lóbulos testiculares, está conformada por células intersticiales o células de Leydig, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos,

mientras que en la porción lobular se encuentran las células de Sertoli y las células de la línea germinal diseminadas por la periferia de una estructura lobular, provista de lumen central en el que una vez concluida la espermatogénesis, se liberan los espermatozoides de los cistes y las células de Sertoli (Orvay Castelló, 1993).

Durante el ciclo reproductor el índice gonadosomático varía, aumentando durante el período de espermatogénesis siendo máximo después de la meiosis en el estadio de espermatocitos y disminuyendo progresivamente durante la espermiogénesis debido a la eliminación del citoplasma de las espermatidas. Al final de la espermiogénesis, los testículos entran en proceso de regresión gonadal (Orvay Castelló, 1993).

Los procesos espermatogénicos dependen de la asociación entre las células germinales y las células de Sertoli. Las células de Sertoli condicionan el medio químico del túbulo seminífero para el desarrollo de las espermatogonias; también cumplen otras funciones como la compartimentalización, secreción, de barrera entre las células germinales y el sistema vascular y fagocitación de los residuos de espermatozoides (Tabares & Tarazona, 2005).

Las células de Leydig también denominadas como células intersticiales, producen esteroides (11 KT y DHP) necesarios para la espermatogénesis y la expresión de las características sexuales secundarias, estas células varían en número durante el ciclo reproductivo, siendo más abundantes al inicio de la maduración y menores al final de la maduración y espermiación (Andrade *et al.*, 2001).

## **2.5.1. Fases de desarrollo testicular**

### **2.5.1.1. Espermatogénesis**

La espermatogénesis se inicia después de la liberación de los espermatozoos o con la reabsorción intratesticular. La espermatogénesis tiene lugar en las células de Sertoli, que son estructuras císticas del testículo, cada ciste contiene células que parecen originarse por divisiones mitóticas a partir de una espermatogonia, debido a que se encuentran en el mismo estadio de espermatogénesis y avanza en su desarrollo de forma sincrónica. Posteriormente de una serie de divisiones mitóticas, las espermatogonias empiezan la división meiótica transformándose a espermatocitos y después de la segunda división meiótica a espermátidas (Tabares & Tarazona, 2005).

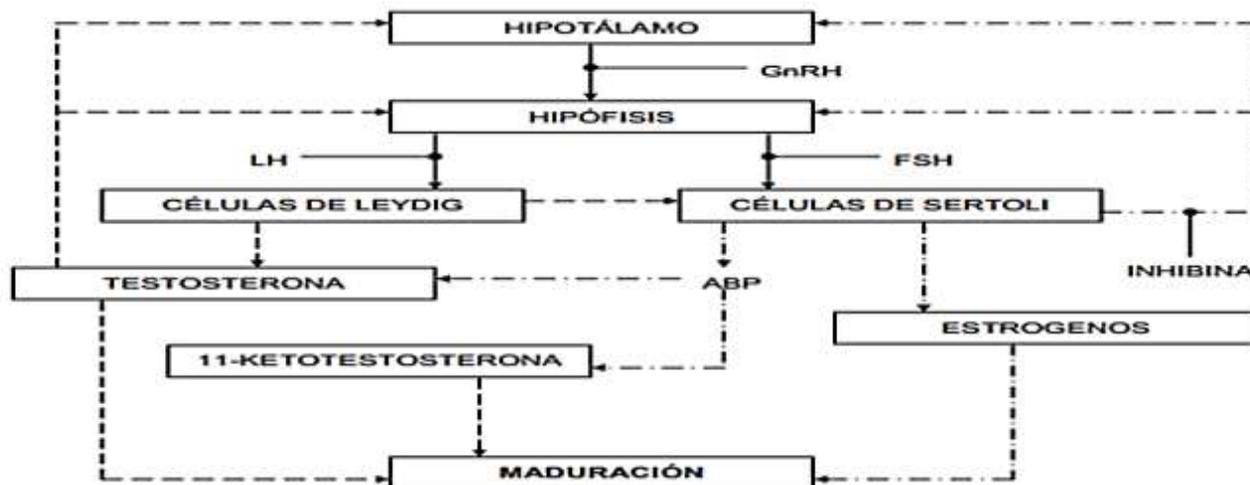
### **2.5.1.2. Espermiogénesis**

La espermiogénesis es el proceso por el cuál las espermátidas se transforman a espermatozoides, pasando por una serie de transformaciones morfológicas, aparecen en la luz del lóbulo testicular y viajan hacia el conducto espermático donde adquieren su motilidad y capacidad de fertilización (Carrillo *et al.*, 2009).

### **2.5.1.3. Esteroides en la espermatogénesis**

Las principales estructuras que intervienen en la maduración de las gónadas en los teleósteos son las células de Leydig y de Sertoli. Las células de Leydig producen y secretan los esteroides testosterona y 11- KTestosterona en los testículos para desencadenar las fases de maduración testicular (DHP) y desarrollar las características sexuales secundarias. Las células de Leydig activan a las células de Sertoli estimulando la división mitótica de las espermatogonias para completar el proceso de espermatogénesis. Estas son también las encargadas de sintetizar las

proteínas fijadoras de andrógenos para así mantener las concentraciones de testosterona elevadas durante todo el proceso de maduración (Figura 3).



**Figura 3.** Interacciones de las células de Leydig (línea-línea) y las células de Sertoli (Punto-Línea) en los diferentes niveles de la cascada endocrina de machos. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona luteinizante (LH), hormona estimuladora del folículo (FSH) y proteína fijadora de andrógenos (ABP)  
(Tresguerres, 2015b)

## 2.6. Generalidades el semen de trucha arco iris

En la Tabla 4 se detalla las principales características del semen de trucha arco iris.

**Tabla 4**

*Características del semen de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) n=12*

Carácter	Valor	Unidad
Concentración ( $\times 10^6$ )	13,28 $\pm$ 4,81	células/mL
Espermatocrito	27,85 $\pm$ 10,04	%
Proteína	1,28 $\pm$ 0,60	mg/mL
Ácido ascórbico	54,32 $\pm$ 15,79	$\mu$ g/mL
Ph	7,8 $\pm$ 0.02	

Fuente: (Ciereszko & Dabrowski, 1994).%: porcentaje; mg/mL: miligramos por mililitro;  $\mu$ g/mL: microgramos por mililitro

### **2.6.1. Volumen seminal**

Esta característica se expresa en mililitros y su valor puede utilizarse posteriormente para el cálculo del número de espermatozoides por muestra, así como espermatozoides por kilogramo de reproductor (fecundidad relativa).

La cantidad de semen producida depende de diversos factores como la época del año, tamaño del ejemplar, edad, entre otras, por ejemplo el volumen seminal de un ejemplar de 3 años de edad está en una media de 18 mL, siendo este valor tres veces mayor que el obtenido de ejemplares de dos años (Vásconez, 2007).

### **2.6.2. Movilidad**

La actividad móvil del espermatozoide respecto a tiempo es corta en comparación con otras especies, esto se debe a la baja capacidad de fosforilización oxidativa mitocondrial y número de mitocondrias presentes en la estructura espermática. Dentro de la estructura testicular en estado de no diluido a un pH de 8 a 8,2 y 220 a 360 mosmol/kg de osmolaridad son inmóviles (Lahnsteiner *et al.*, 1998). Su activación se inicia por el contacto con agua, solución salina o fluido ovárico debido a un choque hipo osmótico, presentando una alta movilidad y velocidad de desplazamiento progresivo durante los 15 segundos post activación disminuyendo hasta quedar inmóviles tras 1 minuto postactivación (Bastardo *et al.*, 2004).

Dentro de este parámetro se determina algunos variables como el inicio, duración y parada de la movilidad.

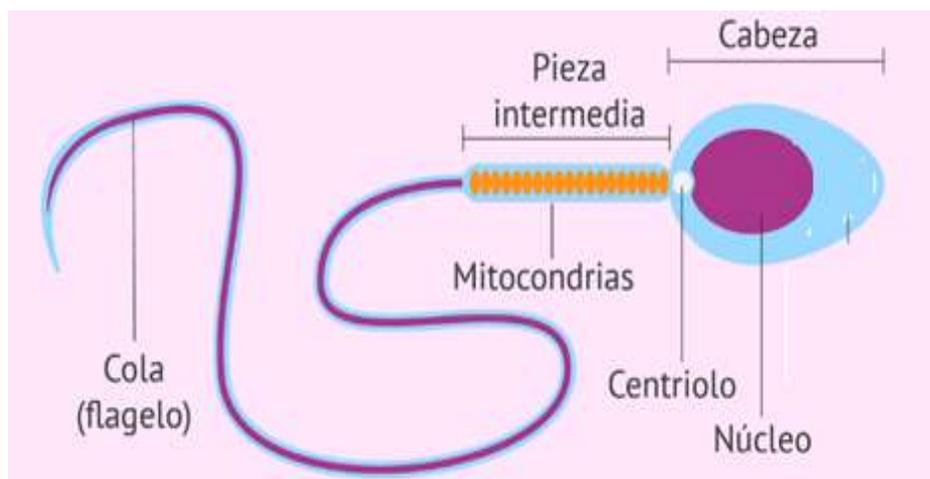
### 2.6.3. Concentración espermática

La concentración varía de 9 a  $16 \times 10^6$  mL espermatozoos por mL, son diversos los factores que afectan la contracción espermática, entre los cuales están los factores ambientales, nutricionales y la época de la estación reproductiva (Bastardo *et al.*, 2004).

### 2.6.4. Morfología

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad *in vivo*.

Morfológicamente el espermatozoide está dividido en cabeza, pieza intermedia y cola; el espermatozoide de la trucha arco iris carece de acrosoma, el cual en vertebrados superiores cumple con la función de disolver la matriz intercelular de las células que rodean al ovocito. La pieza intermedia o cuello es la conexión basal de la cola con la cabeza y está conformado por una vaina mitocondrial dispuesta en hélice que es responsable de la generación de energía para el movimiento del espermatozoide (Hafez, 2002). En los salmónidos el flagelo está compuesto por dos secciones: un segmento principal, más largo y visible, y una pieza final, que es más estrecha, más corta y menos visible (Tuset *et al.*, 2008) (Figura 4 ).



**Figura 4.** Morfología del espermatozoide

Fuente: (Rodrigo, 2016)

De acuerdo a Tuset *et al.*, 2008, la longitud de la cabeza del espermatozoide de trucha arco iris siendo está tomada desde su ápice hacia la inserción del flagelo es de 2,9 a 3,1  $\mu\text{m}$ , mientras que en el flagelo es de 31,3 a 35,7  $\mu\text{m}$  siendo está tomada desde su inserción hasta el final del segmento principal.

Las anomalías en la morfología del espermatozoide pueden presentarse a nivel de cabeza, cuello o cola, presentándose espermatozoides con dos cabezas o dos colas, con cabezas alargadas, piriformes o flagelos cortos, angulados o enrollados (Tuset *et al.*, 2008).

### 2.6.5. Viabilidad espermática

Se refiere al porcentaje de células espermáticas muertas o con daños graves en la integridad de su membrana celular y se determina mediante la técnica de coloración diferencial, utilizando una solución de eosina y como colorante de contraste nigrosina siendo los espermatozoides muertos los que presentan color (Figura 5).

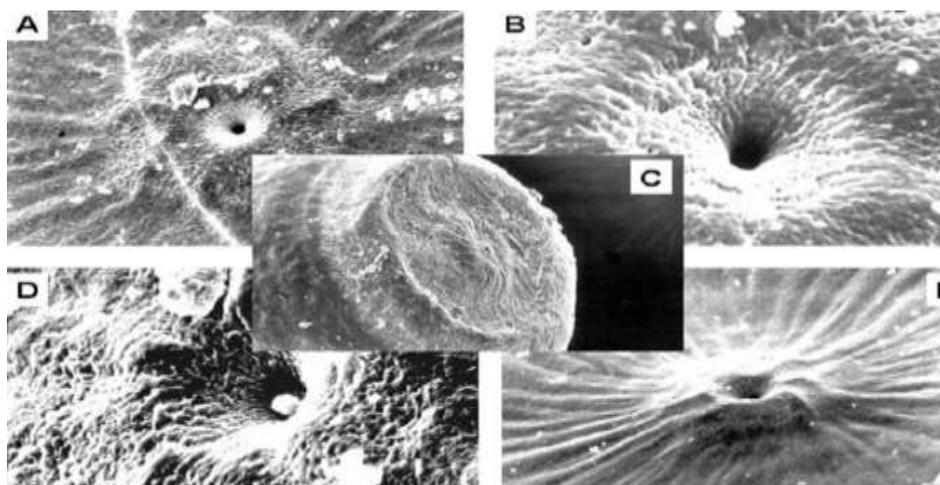


**Figura 5.** Prueba de mortalidad espermática con tinción de eosina  
Fuente: (Rodrigo, 2016)

### 2.6.6. Fertilización

Los procesos que conducen la fertilización en peces muestra una considerable variación en comparación a mamíferos, ya que en salmónidos la fertilización es externa, además que el óvulo se encuentra rodeado por un corión particularmente fuerte, presentando una única abertura denominada micrópilo el cual permite solo la penetración de un espermatozoide (Hoysak & Liley, 2001).

La efectividad de la fertilización depende de factores como la calidad de gametos. Tuset al 2008, en su estudio realizado en trucha arco iris menciona que existe una relación positiva entre la duración del movimiento, densidad de los espermatozoides y velocidad curvilínea media con la tasa de fertilización. El tiempo de contacto también es un factor considerable para la fertilización, en el estudio realizado por Hoysak & Liley, 2001, se determinó que 5 a 10 segundos de contacto entre los gametos activos es suficiente para tener un alto éxito de fertilización.



**Figura 6.** Ilustración de la fecundación mediante microscopía electrónica  
Fuente: (Rodrigo, 2016)

Al tener éxito la fertilización el huevo pasa por diferentes etapas de desarrollo embrionario considerándose tres etapas principales: segmentación, gastrulación y embrionamiento. La segmentación consiste una serie de divisiones mitóticas holoblásticas sin crecimiento celular dando lugar a 8 blastómeros desiguales y después 16 denominándose mórula, la segmentación morular produce una masa de células denominadas blástula. El proceso de gastrulación implica crecimiento embrionario, presentándose una reorganización celular dando lugar a capas germinales, una vez formadas las capas germinales se inicia la formación de tejidos, órganos y aparatos que en conjunto constituirán un embrión ( Muñoz, 2003).

## **2.7. Microorganismos algales y cianobacterias en la acuicultura**

### **2.7.1. Espirulina**

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2008) la espirulina es un cianofito fotosintetizador (cianobacteria) de formación multicelular microscópica filamentosa colonial de forma helicoidal, que ha adquirido

la capacidad de utilizar el dióxido de carbono para su crecimiento, a gran altura y en condiciones muy alcalinas.

#### **2.7.1.1. Clasificación taxonómica**

La espirulina de acuerdo al manual de bacteriología de Bergey es una cianobacteria planctónica perteneciente al phylum Cyanobacteria, orden Oscillatoriales, familia Oscillatoriaceae, género espirulina y especie *Arthrospira platensis* (Rodríguez & Triana, 2006).

#### **2.7.1.2. Reproducción**

El alargamiento del tricoma se da por sucesiva bipartición transversal de las células del mismo llegando a tener una longitud de 200 a 250 micras (Hug & von der Weid, 2012), mientras que su reproducción es por fragmentación intracelular del tricoma, involucrando a destrucción de la célula (FAO, 2008). El período de reproducción se puede resumir en tres etapas:

- Fragmentos de tricomas
- La ampliación de células del hormigonio y procesos de maduración
- Alargamiento de tricoma

El tricoma maduro se divide en varios filamentos a partir de la formación de las células de necridio que son células especializadas, de tabiques transversales. La ruptura celular ocurre en los disyuntores, para lo cual el tricoma aumenta su longitud y presenta su forma típica helicoidal (Rodríguez & Triana, 2006).

#### **2.7.1.3. Ciclos de producción de espirulina**

La espirulina bajo condiciones preestablecidas en un cultivo por lotes pasa por diferentes fases siendo estas: fase de adaptación, crecimiento exponencial, crecimiento lineal, estacionaria y muerte.

En la fase de adaptación el crecimiento es nulo, posterior a la adaptación las microalgas empiezan su proceso de reproducción dividiéndose de forma exponencial para la generación de nuevas células llegando a la fase lineal en el que el proceso de reproducción se empieza a descender, regulándose en la fase estacionaria debido a la limitación de nutrientes como consecuencia del crecimiento celular, si la limitación de nutrientes es alta comienza la muerte celular (Vázquez-Barquero, 2007).

#### **2.7.1.4. Características nutricionales**

De acuerdo a la compañía Sosa Texcoco, la espirulina es una fuente de alimento maravillosa para el futuro”, debido su digestibilidad (83%) y alto contenido de nutrientes. Por cada 100 gramos de espirulina seca se tiene alrededor del 65% de proteína, 15% de carbohidratos, 11% de lípidos, además de contener ficocianina, ficocianobilina, todas las vitaminas del complejo B mayormente vitamina B12, ácido fólico, vitamina K, carotenoides y beta carotenos; también posee minerales esenciales como el sodio, potasio, magnesio, calcio, selenio, fosforo, manganeso, cobre, hierro , entre otros (Ramakrishnan *et al.*, 2008).

En acuicultura la espirulina se utiliza como alimento para moluscos, micro crustáceos (*Artemia* sp.) y sobre todo para peces, ya que ayuda a mantener sana su piel e intensifica la coloración de la misma, además de incrementar las tasas de crecimiento, supervivencia y fecundidad. En algunos países se utiliza como alimento para aves de ornato, para gatos y perros, especialmente para las hembras con crías, y como tónico para caballos, vacas y sementales (Henrikson, 2009). En la Tabla 5 ,6, 7 y 8 se detalla la composición química, mineral, vitamínico y de otras sustancias respectivamente.

**Tabla 5***Composición química de espirulina*

Valor nutricional	Unidad	Valor mínimo	Valor máximo
Proteína	%	60	71
Carbohidratos	%	13	16,5
Lípidos	%	6	13
Fibra cruda	%	0,1	0,9

Fuente:(Henrikson, 2009);%: porcentaje

El contenido de lípidos varía del 6 al 13%, del cual la mitad se presentan en forma de ácidos grasos, teniendo en mayor proporción los ácidos: palmítico, g-linoleico (GLA), linoleico (LA) y oleico (Pati & Habibi, 2002).

El GLA y LA son precursores del ácido araquidónico, el cual es uno de los principales componentes para la formación de prostaglandina, que interviene en la secreción de gonadotropinas que regulan la esteroidogénesis (Echeverría, 2006).

**Tabla 6***Contenido de minerales de espirulina (Arthrospira platensis)*

Mineral	Unidad	Valor mínimo	Valor máximo
Calcio	mg/kg	1045	1215
Fósforo	mg/kg	7617	8942
Hierro	mg/kg	475	580
Sodio	mg/kg	275	412
Magnesio	mg/kg	1410	1915
Manganeso	mg/kg	18	25
Zinc	mg/kg	27	39
Potasio	mg/kg	13305	15400
Cloruro	mg/kg	4000	4400

Fuente: (Henrikson, 2009); mg/kg: miligramo por kilogramo

**Tabla 7***Contenido de vitaminas de espirulina (Arthrospira platensis)*

<b>Vitaminas</b>	<b>Unidad</b>	<b>Promedio</b>
Biotina	mg/kg	0,4
Cianocobalamina	mg/kg	2
D- ca- pantotenato	mg/kg	11
Ácido fólico	mg/kg	0,5
Ácido fólico	mg/kg	0,5
Inositol	mg/kg	350
Piridoxina	mg/kg	3
Riboflavina	mg/kg	40
Tiamina	mg/kg	55
Tocoferol	mg/kg	190

Fuente: (Henrikson, 2009); g/kg: miligramo por kilogramo

**Tabla 8***Contenido de otras sustancias de Arthrospira platensis*

<b>Otras sustancias</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
Esteroles	mg/kg	100	325
Carotenoides	mg/kg	2900	4000
Clorofila a	mg/kg	6100	7600
Colesterol	mg/kg	60	196
B- sitosterol	mg/kg	30	97
Dihidro-colesterol 7, colesterol-7- ol -3- stigmasterol	mg/kg	10	32

Fuente: (Henrikson, 2009); mg/kg: miligramo por kilogramo

**2.7.1.5. Producción de espirulina**

Su cultivo puede realizarse en sistemas acuosos iluminados abiertos ya sean estos naturales o artificiales, o en birreactores con medio nutricional en conjunto con pH, temperatura,

luminosidad y salinidad adecuada; bajo estas condiciones ideales teóricamente se puede generar 15.000 kg/ha anuales de material seco (Ponce López, 2013).

#### **2.7.1.6. Medio nutricional**

El medio nutricional está conformado principalmente por carbono, nitrógeno y fósforo. La principal fuente de carbono es el dióxido de carbono, que puede ser obtenido indirectamente mediante la fertilización con bicarbonato de sodio. El dióxido de carbono es esencial durante el ciclo de Calvin para la formación de azúcares (Anónimo, 2010).

El nitrógeno es necesario para la formación de ácidos nucleicos y proteínas, y su incorporación al medio es esencial debido a que la espirulina no tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por lo que puede ser suministrado en forma de nitratos, nitritos, urea y amoníaco (Guarienti, 2010).

El fósforo puede ser suministrado mediante una fuente de fertilizante inorgánico, este participará en la transferencia de energía intracelular, síntesis de ácidos nucleicos.

#### **2.7.1.7. Parámetros de producción**

- Luz: 12 horas de luz y 12 h de oscuridad
- Temperatura: Óptima de 15°C, mínima de 12°C y máxima de 24°C
- Potencial hidrogeno: Mínimo 8, óptimo 9.3 y máximo 10.3
- Agitación: constante con 2.25 l O<sub>2</sub>

### 2.7.1.8. Medio Zarrouk

Es uno de los principales medios artificiales de producción de *Arthrospira*, debido a que en él se puede alcanzar un crecimiento celular de 220 mil filamentos en fase estacionaria (Rodríguez *et al.*, 2016).

En la Tabla 9 se detalla su composición:

**Tabla 9**

*Composición del medio Zarrouk para un litro de solución*

Sustancia	Concentración	Unidad
NAHCO <sub>3</sub>	13,6	g L <sup>-1</sup>
NA <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,03	g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	g L <sup>-1</sup>
NANO <sub>3</sub>	2,50	g L <sup>-1</sup>
KSO <sub>4</sub>	1,00	g L <sup>-1</sup>
NACL	0,20	g L <sup>-1</sup>
MGSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04	g L <sup>-1</sup>
CACL <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,01	g L <sup>-1</sup>
FESO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05	g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	g L <sup>-1</sup>
MNCL <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,18	g L <sup>-1</sup>
ZNSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22	g L <sup>-1</sup>
NAMOO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39	g L <sup>-1</sup>
CUSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,07	g L <sup>-1</sup>
MNCL <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,18	g L <sup>-1</sup>
ZNSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22	g L <sup>-1</sup>
CO (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,04	g L <sup>-1</sup>
VOSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,04	g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> CR <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ).2H <sub>2</sub> O	0,09	g L <sup>-1</sup>
NISO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04	g L <sup>-1</sup>
NA <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01	g L <sup>-1</sup>
TIOSO <sub>4</sub>	0,33	g L <sup>-1</sup>
CO (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,04	g L <sup>-1</sup>

Fuente : (Q. Rodríguez *et al.*, 2016); g L<sup>-1</sup>: gramos por litro

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. Ubicación del lugar de investigación

##### 3.1.1. Ubicación política

La investigación se realizó en la provincia del Napo, cantón Quijos, parroquia Papallacta, sector Llanura de Baños a 1 ½ km, en el Centro de Investigaciones Acuícolas – CENIAC.

##### 3.1.2. Ubicación geográfica

Según el Instituto Geográfico Militar el Centro de Investigaciones Acuícolas- CENIAC se encuentra en la posición geográfica  $78^{\circ}08'26''\text{O}$  y  $0^{\circ}22'37''\text{S}$  y a una altitud de 3380m.n.s.m.



*Figura 7.* Centro de Investigaciones Acuícolas  
Fuente: Google Maps, (2015)

### 3.1.3. Ubicación ecológica

El CENIAC, se encuentra ubicado en un piso altitudinal herbazal y arbustal montano alto y montano alto superior de páramo, zona de vida bosque muy húmedo y bosque muy húmedo alpino, y corresponde a las siguientes características meteorológicas:

- Temperatura media ambiental:  $9,4 \pm 4,6$  °C
- Precipitación: 1615 mm/año
- Humedad relativa: 86%

## 3.2. Materiales

### 3.2.1. Insumos biológicos

- 40 reproductores machos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)
- 500 gramos en materia seca de espirulina (*Arthrospira platensis*)
- 160 kg de alimento balanceado con un nivel de proteína del 44% para reproductores de marca PISCIS

### 3.2.2. Insumos de campo

- 1 balde de 20 litros
- 1 caja de jeringuillas de 3ml (21 G, ¼ ´´)
- Cajas Petri
- Cooler
- 1 funda de algodón
- Guantes
- Ictiómetro

- Jaulas de malla y madera
- Metro
- 2 redes de pesca medianas
- 1 rollo de piola
- Pipetas Pasteur de plástico
- Tinas plásticas de 60 litros
- Tijeras
- Toallas

### **3.2.3. Equipos**

- Autoclave (ALL AMERICAN)
- Balanza electrónica de 5 kg (M-220D)
- Cámara digital
- Compresor (GLOBER de 0,5 hp)
- Computador (Acer)
- Estereoscopio Binocular (Nikon Smz- 1b Zoom 0.7 – 3x. Led)
- Incubador- agitator (A WARENWESS- Mod Stat Fax 2200)
- Incubadora (MEMMERT)
- Lavador de placas (AWARENWESS – Mod Stat Fax- 2600)
- Lector de ELIZA ( $\mu$ Quant)
- Medidor de pH (Waterproof Ph & EC)
- Microcentrífuga (Thermo micromay)
- Micropipetas (Bueco) 0.5 -10ul; 20 – 200 ul; 100 – 1000 ul.

- Refrigeradora (ELECTROLUX)
- Sonda multiparámetro portátil ( Gama ODEON YSI 550A)
- Vortex (HEIDOLPH Reax Top)

#### **3.2.4. Reactivos**

- Eosina
- Nigrosina
- NaCl
- Eugenol
- Vitamina C
- Vitamina E
- Kits de ELISA para el seguimiento de testosterona (Monobind).

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Instalación de ensayo**

Se seleccionó las piscinas número 7 y 8 correspondientes al bloque A del área de reproducción, las cuales fueron divididas por la mitad, con el fin de tener cuatro áreas iguales de 6.5m<sup>2</sup> para la disposición de los grupos experimentales.

#### **3.3.2. Identificación**

Para la identificación de los reproductores se procedió hacer una incisión en la parte media de la aleta dorsal, colocando una etiqueta de color con su respectiva numeración a cada animal de cada grupo experimental.

### **3.3.3. Inclusión de espirulina, vitamina C y E en el alimento**

Se prepararon cuatro dietas para cada día del experimento para evitar pérdidas de los aditivos por oxidación o contaminación. Las dietas presentaban como base alimento comercial Piscis pigmentado número siete de reproducción (44% de proteína), el cuál fue triturado mediante un molino manual.

Para la dieta experimental con espirulina se adiciono el 2% de la misma al alimento base, se homogenizó la mezcla mediante la incorporación de una solución de gelatina sin sabor con agua, en proporción 1:100, y se procedió a formar el pellet mediante un molino mecánico de carne (Molina, 2015).

El mismo procedimiento se realizó para la inclusión de vitaminas, la mezcla de espirulina y vitaminas, y el testigo que corresponde a la dieta base.

La cantidad de alimento a suministrar se determinó en base al peso corporal con una tasa de alimenticia de 1.1% de acuerdo a la temperatura media del agua, siendo esta de 10°C.

### **3.3.4. Métodos para determinar la calidad de semen**

#### **3.3.4.1. Extracción del semen**

Para la extracción de semen los peces permanecieron 24 horas sin alimentación para evitar la contaminación del semen con heces. Los peces fueron colocados en una solución de 100 ppm de eugenol durante 3 a 5 minutos con el fin de facilitar su manipulación. El semen se extrajo manualmente ejerciendo una suave presión de la zona abdominal y recolectándose en envases plásticos estériles (Chanatasig Chicaiza, 2015).

#### **3.3.4.2. Volumen**

El volumen fue determinado mediante el uso de una probeta graduada de 10 mL, en la cual se colocó el total de semen del individuo (Vásquez, 2007).

#### **3.3.4.3. Apariencia., textura y color**

El aspecto del semen se determinó de forma macroscópica, teniendo en cuenta si la apariencia del semen era homogéneo o heterogéneo; el color de acuerdo a las categorías de blanquecino o transparente y su textura mediante el método de succión, en el cual se succiona la muestra con una pipeta de 5 ml, para luego dejar caer el contenido, observando el filamento. Normalmente el semen debe caer gota a gota (Chanatasig Chicaiza, 2015).

#### **3.3.4.4. Tiempo activo**

Se determinó el tiempo de actividad espermática con un cronómetro, durante el movimiento del espermatozoide desde su activación con solución salina (cloruro de sodio al 0.8%) hasta la pérdida de movimiento (Chanatasig Chicaiza, 2015).

#### **3.3.4.5. Mortalidad espermática**

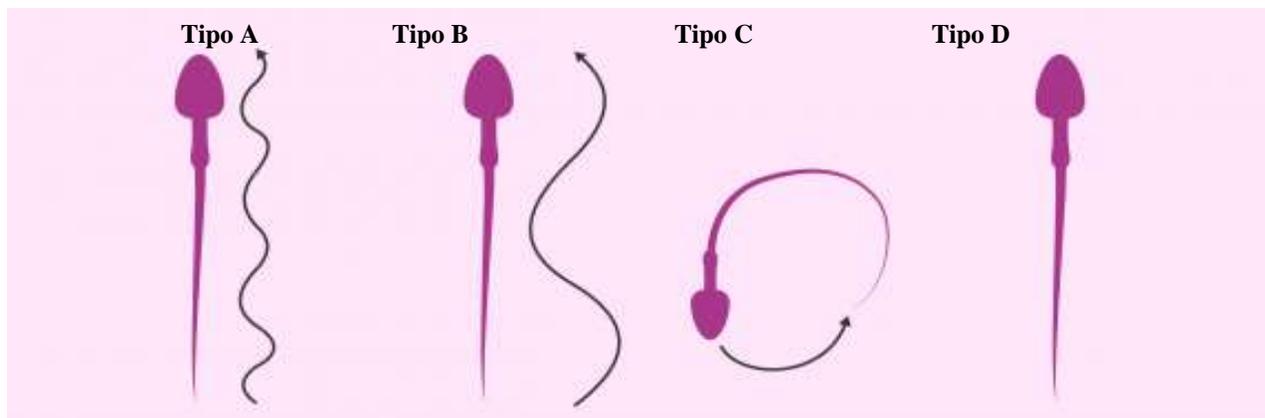
Se empleó la técnica de tinción de Eosina-Nigrosina (E-N) o de coloración diferencial, para lo cual se agregó 10g de nigrosina a eosina 0,5% en PBS o NaCl 0,9% llevando a punto de ebullición, se filtró y guardó en un frasco oscuro (Sarabia, 2010).

Para determinar la mortalidad de los espermatozoides se tomó 10 uL de semen y se mezcló con igual cantidad de la solución E-N, después de 30 minutos. Se realizó un frotis dejando secar a temperatura ambiente y cubriéndolo permanente con medio de montaje para

examinar a 1000x. Se contó 200 espermatozoides diferenciando los espermatozoides vivos (color rosado claro o sin color) y los muertos (color rojo o rosado oscuro) (Chanatasig Chicaiza, 2015).

### 3.3.4.6. Movilidad

Para la evaluación de la movilidad se preparó una dilución 1:10 (semen: agua) con el fin de activar los espermatozoides. La muestra diluida se colocó en un portaobjetos para ser llevada a observación con el lente de 40x y determinar la motilidad en masa. La movilidad en masa se califica subjetivamente con base a la amplitud de las ondas o remolinos que desplieguen los espermatozoides. Su valor se expresa directamente en porcentaje o escala alta, media o baja (Chanatasig Chicaiza, 2015) (Fig. 8).

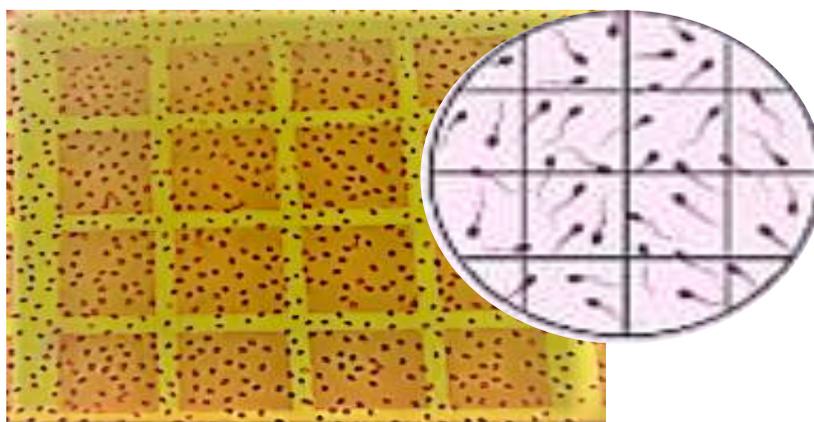


**Figura 8.** Tipos de movimiento espermático. Tipo A: espermatozoides con movimiento progresivo rápido y rectilíneo; Tipo B: espermatozoides con movimiento progresivo pero lento; Tipo C: movilidad lenta sin desplazamiento; Tipo D: inmóvil  
Fuente:(Rodrigo, 2016)

La motilidad de acuerdo a (Lahnsteiner *et al.*, 1996), puede también ser expresada en base al tipo de movimiento de los espermatozoides, como porcentaje de espermatozoides con movimiento circular, lineal y no lineal.

### 3.3.4.7. Concentración espermática

Se realizó una dilución 1:50 (20  $\mu\text{L}$  de semen y 980  $\mu\text{L}$  de diluyente (sacarosa 0.6 M y 10% DMSO)), posteriormente se colocó 10  $\mu\text{L}$  de solución de semen en la cámara de Neubauer llevando después de 10 minutos a observación bajo un lente de 40x para permitir la ubicación de los espermatozoides por decantación en un mismo plano focal. Se procedió a contar los espermatozoides colocados en los cinco cuadrantes de la cámara de Neubauer (Bustamante, Rodríguez, & Cortés, 2018). En la figura 9 se ilustra la técnica de conteo celular.



**Figura 9** Conteo espermático en cámara de Neubauer

Fuente:(Rodrigo, 2016)

### 3.3.5. Métodos para la determinación de testosterona

El análisis de testosterona se realizó al tener las muestras de sangre, las cuales fueron tomadas en los días 0, 15, 30, 45 y 60 correspondientes al antes, durante y después del experimento iniciando el día 0 con la primera extracción seminal. Se seleccionó dos reproductores de forma aleatoria para la primera extracción y luego los mismos individuos para las extracciones posteriores. Para la determinación de testosterona se utilizó técnicas convencionales de Elisa (Kit Testosterona Monobind).

### **3.3.5.1. Extracción de sangre**

Para la toma de sangre se procedió adormecer el animal, para luego proceder a realizar una punción sobre la vena caudal con un ángulo de 45° con jeringas heparinizadas, extrayendo 0.5 mL de sangre por individuo.

Las muestras se almacenaron en tubos de reacción etiquetados, en un cooler con hielo a temperatura de 4°C, hasta su análisis en laboratorio.

### **3.3.5.2. Extracción de plasma sanguíneo**

En laboratorio, se centrifugó las muestras sanguíneas a 3200 rpm por 10 minutos, se extrajo el plasma sanguíneo de cada muestra, separándolo en tubos de reacción de 2mL; las muestras de plasma fueron almacenadas a -20 °C, hasta su análisis.

### **3.3.5.3. Evaluación de la concentración de testosterona circulante**

La cantidad total de testosterona circulante fue obtenida mediante análisis inmunoenzimático de ELISA, para lo cual se empleó el protocolo establecido por el proveedor del Kit de testosterona.

#### **Protocolo de ELISA para testosterona**

- Preparación reactivo enzimático: Se agregó 0,7 mL del reactivo enzimático de testosterona al vial que contenía el tampón conjugado esteroideo, almacenándolo a 2 – 8°C.
- Preparación tampón de lavado: El contenido de la solución de lavado fue diluido en 1000 mL de agua destilada o desionizada.

- Preparación solución sustrato de trabajo: El contenido de la solución A etiquetada en el vial ámbar fue vertido en la solución B etiquetado con el vial transparente, colocando la tapa amarilla en este vial para una fácil identificación. Se mezcló, etiquetó y almacenó a 2-8 ° C
- Se identificó los pocillos de la microplaca para cada control y muestra analizar por duplicado.
- Se colocó 10 µL del control de referencia de suero apropiado y las muestras de suero en los pocillos respectivos.
- Se agregó 50 µL de la enzima de testosterona en funcionamiento reactivo para todos los pozos, agitando suavemente la microplaca durante 20 a 30 segundos.
- 50µL de reactivo de biotina de testosterona fueron agregados a todos los pocillos, agitando posteriormente por 30 segundos para posteriormente cubrir e incubar por 60 minutos a temperatura ambiente.
- El contenido de la microplaca fue descartado por decantación.
- Se agregó 350 µL de tampón de lavado para decantar. Este procedimiento fue repetido dos veces más para obtener un total de tres lavados.
- Se agregó 100µl de solución de sustrato de trabajo a todos los pozos, llevando a incubación por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 50 µL de solución de parada a cada pocillo y suavemente mezclar por 15 a 20 segundos.
- Se leyó la absorbancia en cada pocillo a 450 nm en el lector de microplacas. Los resultados fueron registrados a los 30 minutos después de agregar la solución de parada.

- Para determinar la concentración de testosterona se empleó el software Curve Xpert, en cual se introdujo los datos de absorbancia de los calibradores y la concentración de los mismos en ng/mL para obtener una curva de respuesta a la dosis.
- La concentración de las muestras evaluadas fueron determinadas mediante la fórmula de la curva modelo. En el estudio la fórmula empleada corresponde al modelo matemático de Harris y se detalla a continuación:

$$y = \frac{1}{(a + bx^c)}$$

Donde:

y: absorbancia en ng/mL

a: 3.19977993295E-001

b: 3.27689887073E-001

c: 8.91838272824E-001

- Para que los resultados del análisis sean considerados válidos, se deben cumplir los siguientes criterios:
  - La absorbancia (D0) del calibrados 0 ng/mL debe ser > 1,3.
  - Cuatro de cada seis grupos de control de calidad deberán de estar dentro de lo establecido.

### 3.3.6. Determinación de parámetros zootécnicos

Conjuntamente con la extracción de semen, se procedió a medir la longitud total mediante el ictiómetro y peso del individuo mediante una balanza (0,1g de precisión), con el fin de establecer una relación de la condición corporal del reproductor.

$$\text{Condición corporal} = \frac{\text{Peso}(g)}{\text{Longitud total (cm)}^3} * 100$$

Además, los datos obtenidos del peso fueron utilizados para la determinación del consumo de alimento, así como la respectiva inclusión de aditivos correspondiente a los tratamientos experimentales.

### 3.3.7. Toma de parámetros fisicoquímicos del agua

Durante la ejecución de experimento se registraron diariamente los datos de temperatura del agua mediante un termómetro a las 07:00 am, 14:00 pm y 18:00 pm.

## 3.4. Diseño experimental

### 3.4. 1. Factores

Los factores a considerar en el estudio son la inclusión de espirulina al 2% y vitaminas C y E con valores de 900 UI y 24000 UI respectivamente como suplementos alimenticios para la dieta de reproductores.

La inclusión de espirulina como suplemento alimenticio en etapas de reproducción ha sido evaluada previamente en diferentes especies acuícolas como milkfish, gambas, salmón y red swordtail (Geffroy & Simon, 2013).

El alfa tocoferol como suplemento alimenticio en trucha arco iris en etapas de reproducción ha mostrado su efecto positivo en variables reproductivas como la movilidad y concentración espermática de acuerdo a los estudios realizados por (Ciereszko & Dabrowski, 1995); además la inclusión de 24000 UI de vitamina E y 900 UI de vitamina C permite tener mayor cantidad de ovas y mayor fecundidad.

### 3.4.2. Tratamientos

Para esta investigación se emplearon 4 tratamientos, que se describen en la Tabla 10:

**Tabla 10**

*Descripción de los tratamientos experimentales*

Tratamiento	Descripción	Espirulina (%)	Vitamina C (UI)	Vitamina E (UI)
T1	Alimento Balanceado comercial (Testigo)	-	-	-
T2	Alimento balanceado comercial	2	-	-
T3	Alimento balanceado comercial	-	900	24000
T4	Alimento balanceado comercial	2	900	24000

UI: unidades internacionales

### 3.4.3. Tipo de diseño

Los reproductores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) seleccionados para el desarrollo de la investigación fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 10 peces conformados por 8 machos y dos hembras, de tal manera que la investigación se realizó en base a un diseño de bloques al azar con un universo de 32 machos reproductores de trucha arco iris de dos años de edad.

### 3.4.4. Repeticiones

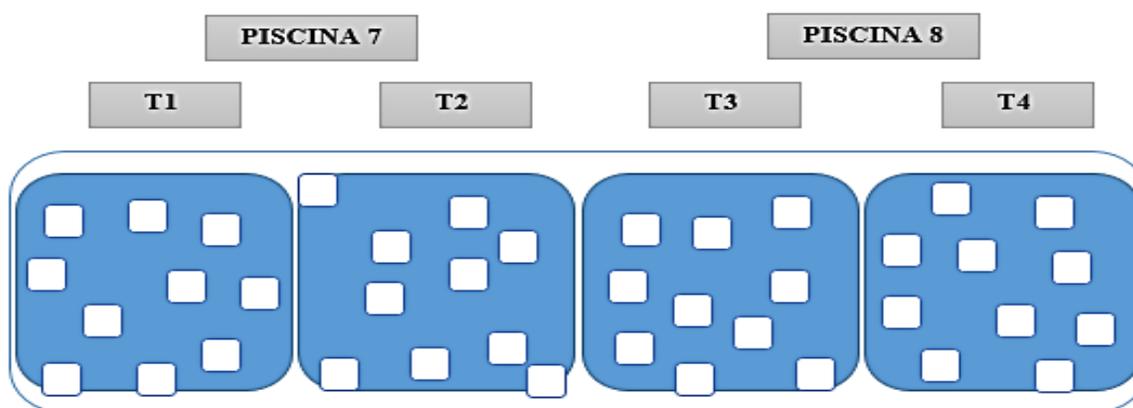
Para el ensayo se empleó 3 repeticiones, las cuales correspondieron a la toma de variables en el tiempo, siendo estas al inicio del experimento, al día 30 y 60 para el mismo individuo etiquetado.

### 3.4.5. Unidades experimentales

Las unidades experimentales fueron representadas por cada división realizada en las piscinas 7 y 8 de reproducción, en total 4 unidades experimentales. Cada grupo estuvo conformado por 10 reproductores, 8 machos y 2 hembras, maduros y activos sexualmente, de 2 años de edad, teniendo una densidad de carga animal de 1 reproductor por metro cúbico. Las hembras empleadas en el experimento tuvieron fines de estimulación sexual hacia los machos.

La unidad observacional corresponde a cada uno de los reproductores distribuidos en los respectivos tratamientos, estos fueron identificados mediante etiquetas de color y numeración para su control y seguimiento.

### 3.4.6. Croquis del diseño



*Figura 10.* Disposición de los tratamientos en el experimento

### 3.4.7. Variables del estudio

Las variables del estudio se midieron de acuerdo a los objetivos planteados en la investigación, realizando una clasificación de tres grupos de acuerdo a su método de determinación, a continuación, se describen los grupos con sus respectivas variables:

- Variables morfométricas

El peso se midió mediante una balanza electrónica, la longitud corporal de los peces se obtuvo con un ictiómetro, ambas variables fueron tomadas al inicio del estudio y con cada extracción seminal.

El índice de condición corporal fue calculado mediante la aplicación de la ecuación:

$$\text{Condición corporal} = \frac{\text{Peso}(g)}{\text{Longitud total (cm)}^3} * 100$$

- Variables reproductivas

Los días de puesta se contabilizaron a partir de la primera extracción de semen hasta la próxima extracción.

Con la extracción de semen se procedió a obtener los datos de volumen, espermatozoides, pH, movilidad y mortalidad.

El número de puestas se obtuvo contabilizando únicamente los machos de los que se obtenga semen en el transcurso de la investigación.

- Variable hormonal

La concentración de testosterona circulante en la espermiación y durante el proceso de espermatogénesis fue analizado mediante pruebas de inmunodetección de ELISA. Esta variable se analizó 5 ocasiones durante la etapa experimental.

Los resultados de absorbancia obtenidos fueron interpretados mediante el software Curve Xpert mediante en modelo matemático Harris, con un valor R de 0.99 y s de 0.05, a continuación se ilustra la fórmula del modelo matemático:

$$y = \frac{1}{(a + bx^c)}$$

Donde:

y: absorbancia en ng/mL

a: 3.19977993295E-001

b:3.27689887073E-001

c: 8.91838272824E-001

### **3.4.8. Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos obtenidos en la investigación se empleó el software informático INFOSTAT, en el que se transformó los datos, debido a que estos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante modelos mixtos; así también se empleó Kruskal Wallis como prueba no paramétrica.

### **3.5. Análisis funcional**

La prueba de significancia empleada para el análisis de medias de las variables por tratamientos en el presente estudio fue la prueba de Duncan con un nivel de significancia del 0,05%.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Resultados

##### 4.1.1. Variables morfométricas

En el estudio las variables morfométricas evaluadas fueron el peso e índice corporal, de las cuales de acuerdo al análisis de modelos mixtos no muestran un efecto significativo para la interacción tratamiento×tiempo ( $p>0.9994$ ), ( $p>0.9672$ ) respectivamente, sin embargo se observa una tendencia de incremento en el peso e índice corporal. Así el tratamiento 1 (alimento balanceado) correspondiente al de menor índice corporal al iniciar el experimento con un valor de 0,97, tiende a incrementarse a 1,12 al finalizar el experimento. Esta tendencia también se hace notoria en los demás tratamientos así como en la variable de peso. Los valores de peso e índice corporal se detallan en la tabla 11.

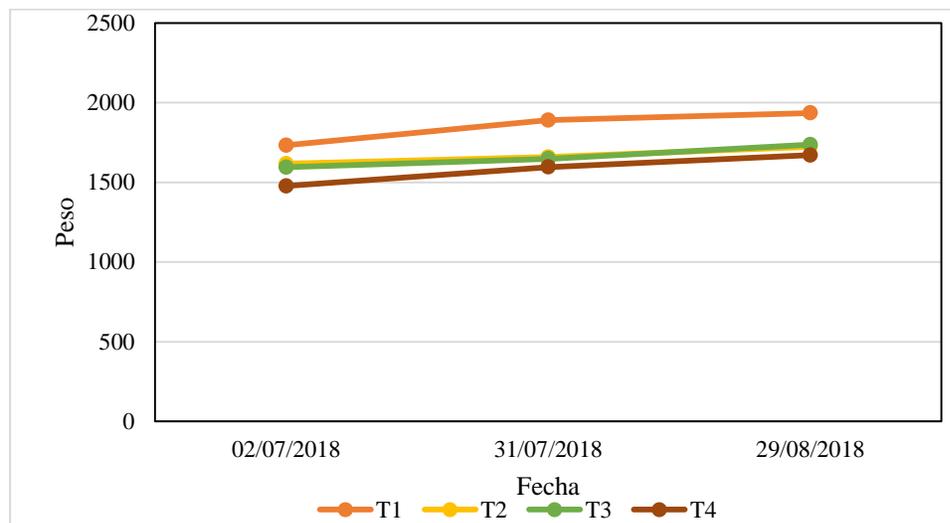
**Tabla 11**

*Promedio ± desviación estándar del peso e índice corporal de *Oncorhynchus mykiss**

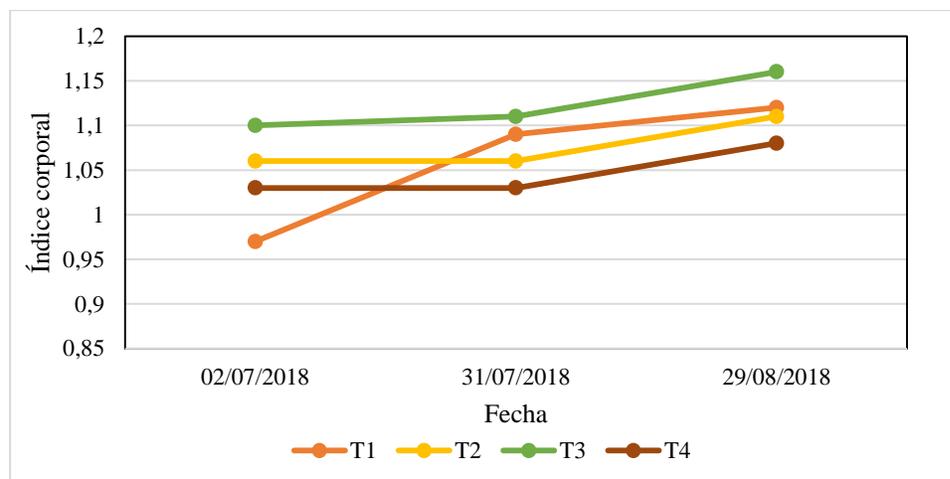
Tiempo (Fecha)	Tratamiento	Peso (g)	Índice corporal
Primer ciclo 02/7/2018	T1	1731,90 ± 421, 16a	0,97 ± 0, 12a
	T2	1617,00 ± 342, 82a	1,06 ± 0, 10a
	T3	1594,70 ± 195, 54a	1,10 ± 0, 16a
	T4	1477,40 ± 309, 99a	1,03 ± 0,09a
Segundo ciclo 31/7/2018	T1	1889,80 ± 548, 53a	1,09 ± 0, 14a
	T2	1658,70 ± 380, 36a	1,06 ± 0, 11a
	T3	1648,00 ± 203, 39a	1,11 ± 0, 17a
	T4	1596,00 ± 491, 41a	1,03 ± 0,09a
Tercer ciclo 29/8/2018	T1	1934,60 ± 572, 83a	1,12 ± 0, 14a
	T2	1723,70 ± 391,07a	1,11 ± 0, 11a
	T3	1735,90 ± 293, 97a	1,16 ± 0, 16a
	T4	1670,20 ± 478, 39a	1,08 ± 0, 10a

T1: Testigo; T2: 2% de espirulina; T3: AB + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C; T4: 2% de espirulina + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C. Medias en columnas con letra común no son significativamente diferentes.

En la figura 11 y 12 se puede observar los datos de peso e índice corporal durante la ejecución del proyecto respectivamente.



**Figura 11.** Variación de peso de cada tratamiento



**Figura 12.** Variación del índice corporal de cada tratamiento

#### 4.1.2. Variables reproductivas

##### 4.1.2.1. Volumen, concentración espermática y mortalidad espermática.

De acuerdo al análisis estadístico de Kruskal Wallis las medianas de las muestras son significativamente diferentes puesto que el valor P para la prueba de chi-cuadrado es menor que 0,05 ( $p=0,0019$ ), con un nivel de confianza del 95,0%. Se observa que el tratamiento 2

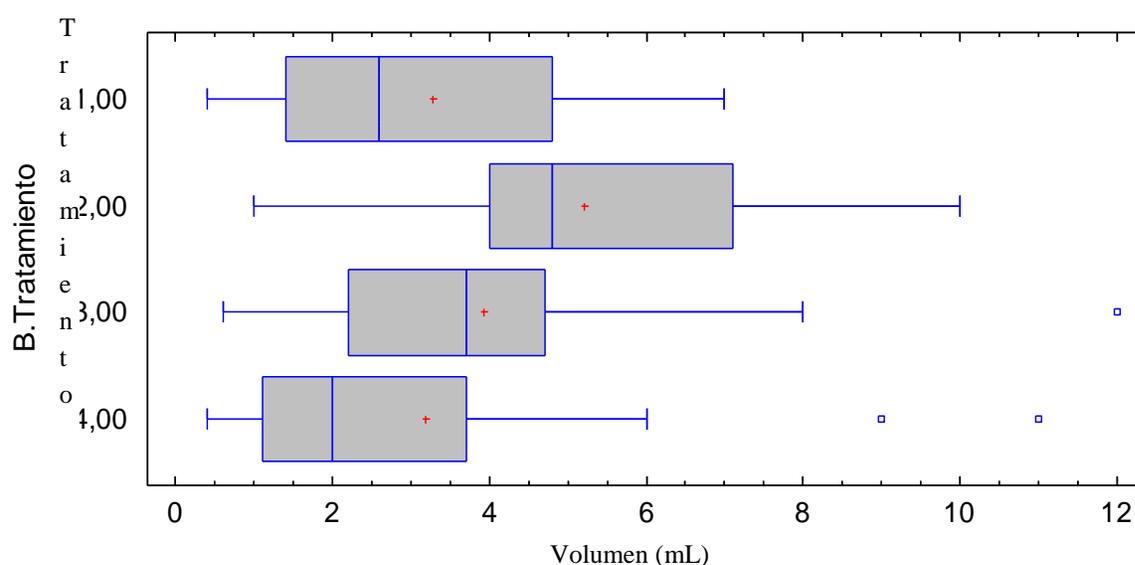
(espirulina 2%) presenta mayor volumen con un valor medio de 5,21 mL. Los datos obtenidos se detallan e ilustran en la tabla 12 y figura 13.

**Tabla 12**

*Promedio  $\pm$  desviación estándar y mediana de volumen seminal de reproductores de *Oncorhynchus mykiss* durante la ejecución del proyecto.*

Tratamiento	Volumen seminal (mL)	Volumen seminal (mL)
	Medias	Medianas
1	3,27 $\pm$ 2,2	2,6
2	5,21 $\pm$ 2,5	4,8
3	3,93 $\pm$ 2,7	3,7
4	3,18 $\pm$ 2,9	2

T1: Testigo; T2: 2% de espirulina; T3: AB + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C; T4: 2% de espirulina + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C. Medias en columnas con letra común no son significativamente diferentes. ml: mililitros; %: porcentaje.



**Figura 13.** Gráfico de caja y bigotes del volumen seminal por tratamientos

Los resultados obtenidos en la variable de concentración espermática ( $p=0,9143$ ), en base al análisis de modelos mixtos y lineales no muestran diferencias significativas como respuesta al ciclo espermático, tratamiento o su interacción. Los valores de forma general a los tratamientos o ciclos se mantienen en una media de 13 millones de células por mL. Los valores obtenidos se detallan en la tabla 13.

**Tabla 13**

*Promedio  $\pm$  desviación estándar de concentración espermática de reproductores de *Oncorhynchus mykiss* durante la ejecución del proyecto*

Fecha	Tratamiento	Concentración espermática (cel /mL)
Primer ciclo 2/7/2018	1	$(10,7 \times 10^6) \pm 3,5 \times 10^{6a}$
	2	$(13,0 \times 10^6) \pm 4,6 \times 10^{6a}$
	3	$(13,4 \times 10^6) \pm 5,4 \times 10^{6a}$
	4	$(14,3 \times 10^6) \pm 8,0 \times 10^{6a}$
Segundo ciclo 31/7/2018	1	$(12,7 \times 10^6) \pm 6,1 \times 10^{6a}$
	2	$(13,0 \times 10^6) \pm 4,5 \times 10^{6a}$
	3	$(12,6 \times 10^6) \pm 3,6 \times 10^{6a}$
	4	$(12,5 \times 10^6) \pm 5,2 \times 10^{6a}$
Tercer ciclo 29/7/2018	1	$(12,1 \times 10^6) \pm 5,4 \times 10^{6a}$
	2	$(13,5 \times 10^6) \pm 2,4 \times 10^{6a}$
	3	$(13,3 \times 10^6) \pm 2,7 \times 10^{6a}$
	4	$(12,2 \times 10^6) \pm 5,3 \times 10^{6a}$

T1: Testigo; T2: 2% de espirulina; T3: AB + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C; T4: 2% de espirulina + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C. Medias en columnas con letra común no son significativamente diferentes. ml: mililitros; %: porcentaje.

En relación a la mortalidad espermática, de acuerdo al análisis de modelos mixtos se observa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, ciclos y en su interacción, presentando menor mortalidad el tratamiento 2 (inclusión de espirulina al 2%).

La mortalidad espermática disminuye progresivamente desde el segundo ciclo espermatogénico con el 7.7% de mortalidad al 6% en el tercer ciclo ( $p < 0,0001$ ). El tratamiento 4 (Inclusión de espirulina + vitaminas) también presenta disminución en la mortalidad espermática, pero en menor valor que el tratamiento 2, presentando valores al segundo ciclo de 14.8% y descendiendo al tercer ciclo espermático con un valor de mortalidad del 11.1%.

Los valores medios de las variables mencionadas con anterioridad se detallan en la tabla 14.

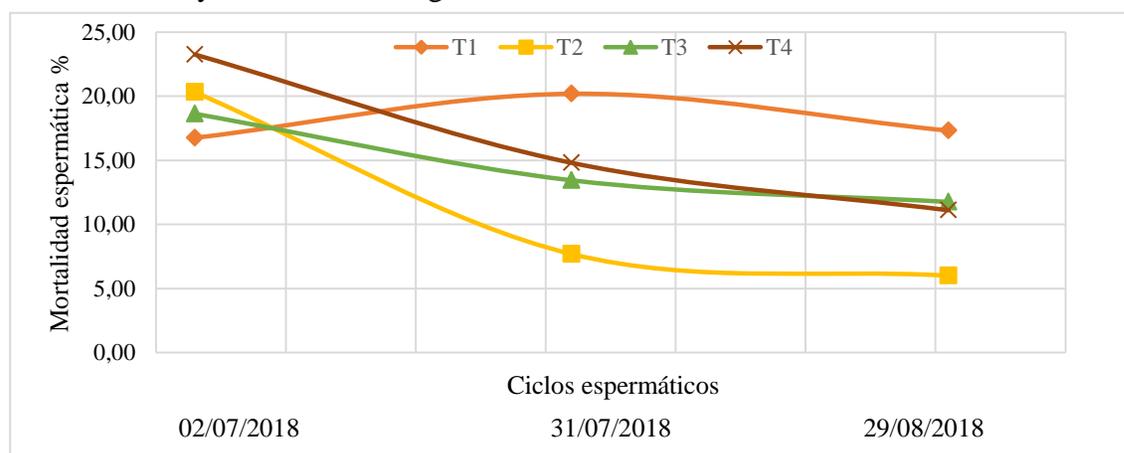
**Tabla 14**

*Promedio  $\pm$  desviación estándar de mortalidad espermática de reproductores de *Oncorhynchus mykiss* durante la ejecución del proyecto*

Fecha	Tratamiento	Mortalidad espermática (%)
Primer ciclo 2/7/2018	1	16,8 $\pm$ 7,5b
	2	20,3 $\pm$ 4,1b
	3	18,6 $\pm$ 4,5b
	4	23,3 $\pm$ 5, 1a
Segundo ciclo 31/7/2018	1	20,2 $\pm$ 3,9b
	2	7,7 $\pm$ 1,5d
	3	13,4 $\pm$ 3,1c
	4	14,8 $\pm$ 8,3c
Tercer ciclo 29/7/2018	1	17,3 $\pm$ 3,1b
	2	6,0 $\pm$ 1,5d
	3	11,8 $\pm$ 1,0c
	4	11,1 $\pm$ 8,6c

T1: Testigo; T2: 2% de espirulina; T3: AB + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C; T4: 2% de espirulina + 9500 UI vitamina E y 450 vitamina C. Medias en columnas con letra común no son significativamente diferentes. ml: mililitros; %: porcentaje.

La variación de la mortalidad espermática de acuerdo a tratamientos y ciclos espermáticos se observa con mayor detalle en la figura 14.



**Figura 14.** Variación de la mortalidad espermática cada tratamiento

#### 4.1.2.2. Movilidad espermática

Para el análisis de movilidad espermática se tomó en cuenta las variables de tiempo de actividad y tiempo de movimiento progresivo. La interacción del tratamiento con el ciclo espermático de acuerdo al análisis de modelos mixtos es significativa para el tiempo de

actividad ( $p=0.0011$ ) teniendo al tratamiento 4 (inclusión de 2% espirulina + vitamina C y E) con los mayores valores de tiempo de actividad espermática y motilidad progresiva seguido del tratamiento 3 (inclusión de vitamina C y E) (tabla 15).

**Tabla 15**

*Promedio  $\pm$  desviación estándar del tiempo de actividad y movimiento progresivo de reproductores de *Oncorhynchus mykiss* en interacción fecha tratamiento*

Fecha	Tratamiento	Tiempo de actividad (s)	Motilidad progresiva (s)
Primer ciclo 2/7/2018	1	78,25 $\pm$ 10a	30 $\pm$ 0,04b
	2	75,88 $\pm$ 12a	29 $\pm$ 0,03b
	3	62,25 $\pm$ 11b	28 $\pm$ 0,03b
	4	81,75 $\pm$ 11a	37 $\pm$ 0,06a
Segundo ciclo 31/7/2018	1	59,13 $\pm$ 5b	28 $\pm$ 0,04b
	2	67,25 $\pm$ 6b	29 $\pm$ 0,06b
	3	68,88 $\pm$ 11b	30 $\pm$ 0,05b
	4	71,50 $\pm$ 11b	33 $\pm$ 0,07b
Tercer ciclo 29/7/2018	1	61,75 $\pm$ 4b	29 $\pm$ 0,03b
	2	69,63 $\pm$ 7b	30 $\pm$ 0,03b
	3	81,00 $\pm$ 17a	34 $\pm$ 0,07a
	4	78,38 $\pm$ 16a	36 $\pm$ 0,06a

Medias en columna con letra común no son significativamente diferentes. min: minutos; s: segundos.

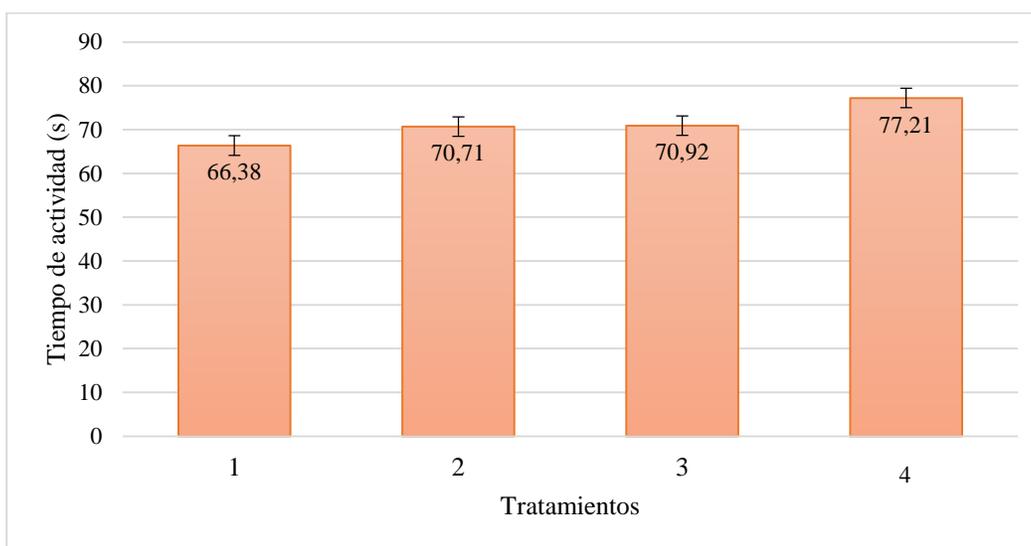
Como respuesta al tratamiento, el tratamiento 4 (inclusión de 2% espirulina + vitamina C y E) presenta mayor movilidad con un tiempo de actividad de 77.21 minutos y 0.36 segundos de moviendo progresivo ( $p=0,0140$ ) ( $p= 0,0036$ ) (tabla 16) (Figura 15).

**Tabla 16**

*Promedio  $\pm$  desviación estándar del tiempo de actividad y movimiento progresivo de reproductores de *Oncorhynchus mykiss* bajo el efecto de 4 tratamientos*

Tratamiento	Tiempo de actividad (s)	Motilidad progresiva (s)
1	66,38 $\pm$ 11a	29 $\pm$ 0,04b
2	70,71 $\pm$ 9,0b	30 $\pm$ 0,04b
3	70,92 $\pm$ 15b	31 $\pm$ 0,04b
4	77,21 $\pm$ 13b	36 $\pm$ 0,06a

Medias en columna con letra común no son significativamente diferentes. min: minutos; s: segundos.



**Figura 15.** Variación del tiempo de actividad por tratamiento y barras de error

De acuerdo al grado de movimiento de los espermatozoides la motilidad fue categorizada como alta, media o baja, encontrando dependencia de la motilidad con el tratamiento ( $p=0,0113$ ). Los reproductores del tratamiento 4 (inclusión de espirulina + vitaminas C y E) presentaron con mayor frecuencia una alta motilidad seguido de los reproductores del tratamiento 3 (inclusión de vitaminas C y E) (Tabla 17).

**Tabla 17**

*Categorización de motilidad de acuerdo al tratamiento del total de datos analizados*

Motilidad	T1	T2	T3	T4
Alta	14	21	22	23
Media	7	3	1	1
Baja	3	0	1	0

Los datos representados en la tabla corresponden al número de observaciones. Alta: presencia de ondas y remolinos, media: ondas y remolinos en menor grado de movimiento o baja: movimiento sin ondas o remolinos (Chanatasig Chicaiza, 2015).

#### 4.1.2.3. Coloración, apariencia y textura seminal

Las variables de coloración, apariencia y textura seminal no mostraron variación de acuerdo al tratamiento o ciclo espermático. Los valores registrados se detallan en la tabla 18.

**Tabla 18***Descripción del semen de acuerdo a: color, textura y apariencia*

<b>Variabes</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
<b>Coloración</b>				
Blanquecina	20	21	22	24
Transparente	4	3	2	0
Total	24	24	24	24
<b>Textura</b>				
Líquido	7	3	2	4
Viscoso	17	21	22	20
Total	24	24	24	24
<b>Apariencia</b>				
Homogénea	24	24	24	24
Heterogénea	0	0	0	0
Total	24	24	24	24

Las unidades presentadas en esta tabla representan el número de observaciones registradas para cada variable.

#### 4.1.3. Variables hormonales

##### 4.1.3.1. Comportamiento de testosterona en el tiempo (ng/mL)

Para la determinación de la concentración de testosterona se hizo uso del software Curve Xpert, los datos de calibración y absorbancia se ajustaron al Modelo Harris teniendo un R de 0,99. En la figura 16 se observa la curva de calibración y a continuación la fórmula empleada para la determinación de testosterona.

$$y = \frac{1}{(a + bx^c)}$$

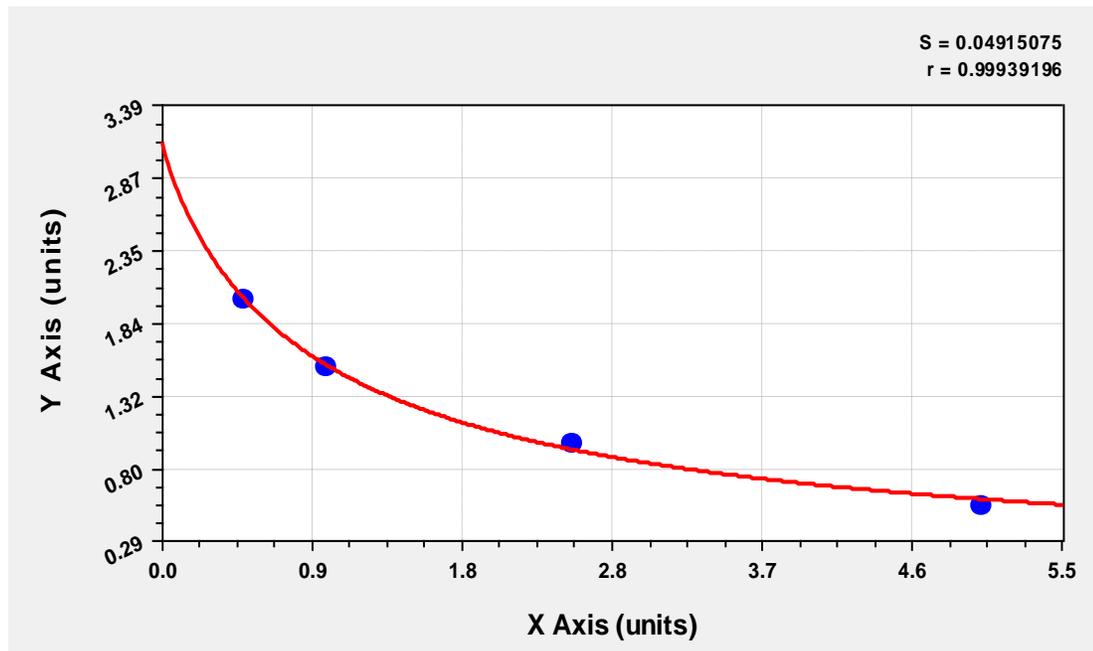
Donde:

y: absorbancia en ng/mL

a: 3.19977993295E-001

b:3.27689887073E-001

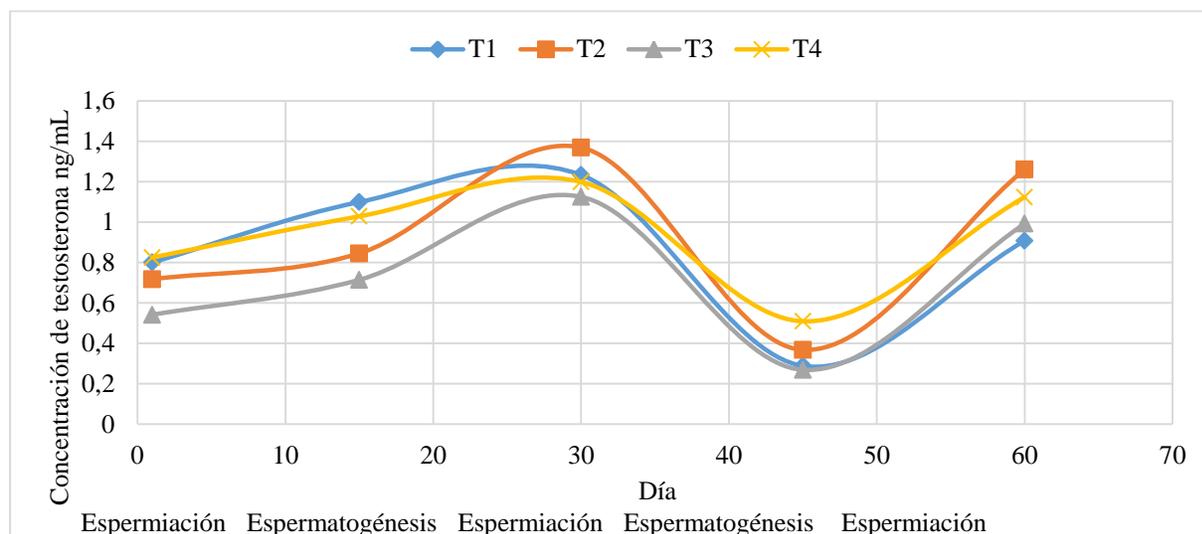
c: 8.91838272824E-001



**Figura 16.** Curva de calibración de testosterona; eje Y (absorbancia en nm); eje X (Concentración de testosterona en ng/mL)

En la figura 17 se observa como la testosterona presenta un comportamiento ondulante en el tiempo, los valores iniciales tienen una media 0,72 ng/mL y corresponden al final del primer ciclo espermático, siendo este de menor valor comparado con el segundo y tercer ciclo espermático con valores medios de 1,23 ng/mL y 1,07 ng/mL a los días 30 y 60 respectivamente.

Los días 15 y 45 corresponden a la primera y segunda fase de espermatogénesis. Los valores de concentración de testosterona son menores al segundo y tercer ciclo espermático con medias de 0,93 y 0,24 ng/mL respectivamente.



**Figura 17.** Variación concentración de testosterona circulante en el tiempo por tratamiento

El modelo estadístico presentado en la tabla 19 demuestra que existen diferencias significativas en la concentración de testosterona durante las etapas de espermiogénesis y espermatogénesis en relación al tratamiento (0,0092), siendo el tratamiento 2 ( inclusión del 2% de espirulina) en la fase de espermiación el de mayor concentración con valores de 1,37 ng/mL a 1,26 ng/mL, menores valores son observados durante el segundo ciclo espermático en la etapa de espermatogénesis en los tratamientos 1 ( alimento balanceado ) y 3 ( inclusión de vitaminas C y E) con valores respectivos de 0,29 ng/mL y 0,27ng/mL.

**Tabla 19**

*Valores medios  $\pm$  desviación estándar de la concentración de testosterona e interacción del tratamiento con la fase del ciclo espermático.*

Tratamiento	Concentración testosterona (ng/mL)				
	Días				
	1	15	30	45	60
1	0,80 $\pm$ 0,20abcd	1,09 $\pm$ 0,18bcd	1,23 $\pm$ 0,01cd	0,29 $\pm$ 0,01a	0,91 $\pm$ 0,01abcd
2	0,72 $\pm$ 0,18abc	0,89 $\pm$ 0,07 abcd	1,37 $\pm$ 0,07d	0,37 $\pm$ 0,11a	1,26 $\pm$ 0,07d
3	0,54 $\pm$ 0,02ab	0,71 $\pm$ 0,02abc	1,12 $\pm$ 0,02bcd	0,27 $\pm$ 0,05a	0,99 $\pm$ 0,03abcd
4	0,82 $\pm$ 0,12abcd	1,03 $\pm$ 0,24abcd	1,20 $\pm$ 0,09cd	0,51 $\pm$ 0,11ab	1,12 $\pm$ 0,02bcd

Medias en columna con letra común no son significativamente diferentes. ng/mL: nano gramos por mililitro

## 4.2. Discusión

### 4.2.1. Variables morfométricas

Los animales empleados en el experimento se encontraban en un período de recuperación, debido a su exposición a estrés alimenticio. Los reproductores comprendían las edades de 2 a 3 años, siendo esta la edad adulta.

El peso e índice corporal son variables morfométricas que se utilizan para evaluar el crecimiento de los animales, el cual se expresa como la ganancia de energía neta obtenida a partir de la energía total ingerida y depende de varios factores conductuales y fisiológicos como la temperatura, disponibilidad de oxígeno, edad, entre otros (Strand, 2005).

La variación del peso no fue significativa ( $p > 0,05$ ), de acuerdo a Martínez, Martínez, & Ramos, 2009, a medida que un animal crece y llega a su madurez sexual cambia su metabolismo, disminuyendo su tasa de actividad metabólica, causando que la tasa de crecimiento relativo sea menor. La energía es canalizada hacia los procesos reproductivos para la formación de tejidos específicos y gametos. Resultados similares fueron encontrados por Teimouri, Amirkolaie, & Yeganeh, 2013 con una inclusión del 2.5, 5, 7.5 y 10% de espirulina, estableciendo que en su experimento la adición de espirulina no afectó a los parámetros de crecimiento. Como respuesta al efecto de la inclusión dietética de la vitamina E, Demerdash, Yousef, Kedwany, & Baghdadi, 2004, menciona que no se presentaron cambios significativos en el peso corporal.

Los valores de índice corporal obtenidos en comparación a lo propuesto por Barnham & Baxter, 2003, son bajos, estableciéndose como respuesta hacia la etapa de recuperación por el estrés alimenticio (Rivera, 2016). Los valores medios son de 0,97 a 1,16, cuando los valores

medios óptimos en la etapa de reproducción son de 1,25 a 1,52. A pesar de no encontrar diferencias significativas como respuesta a los tratamientos o ciclos espermáticos se evidencia que el índice corporal aumenta al final del experimento con medias comprendidas entre 1,08 a 1,12.

#### **4.2.2. Variables reproductivas**

##### **4.2.2.1. Volumen, concentración espermática y mortalidad espermática**

El volumen seminal bajo el efecto de la inclusión del 2% de espirulina es mayor con respecto a los otros tratamientos con una media de 5,21 mL y una mediana de 4,8 ( $p=0,0019$ ). El tratamiento 1, 2 y 3 presentan valores similares de volumen entre rangos de 3,18 a 3,27 mL. Estos valores son relativamente bajos en comparación con los resultados obtenidos por Chanatasig Chicaiza, al 2015, quien encontró valores entre 6,6 a 7 ml; sin embargo Bastardo *et al.*, 2004, reportó valores medios de 10 a 13 ml en reproductores de 3 años, de igual manera hace mención que los reproductores de 2 años presentan un volumen de semen significativamente menor que en peces de tres, cuatro y cinco años.

La cantidad de semen producida depende de diversos factores como la época del año, tamaño del ejemplar, edad, entre otras, por ejemplo el volumen seminal de un ejemplar de 3 años de edad está en una media de 13 mL, siendo este valor tres veces mayor que el obtenido de ejemplares de dos años (Vásconez, 2007)

Los resultados del presente estudio sugieren que el suplemento dietético de espirulina o vitaminas C y E, así como el de los ciclos espermáticos no tiene efecto sobre la concentración espermática. De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 13, la concentración espermática

oscila entre los valores de 10 a 14 millones de espermatozoides /mL. Los valores medios de concentración espermática de acuerdo a la literatura es bastante variable, así Vásconez, 2007, reporta una concentración de 17 millones de espermatozoides/mL , mientras que Chanatasig Chicaiza, 2015; reporta 2,8 millones de espermatozoides/mL. Bastardo, 1992, señala una concentración oscilante entre 7 a 22 millones de espermatozoides por mL, de acuerdo al rango propuesto por Bastardo, 1992, la media obtenida en el experimento estaría dentro de los parámetros establecidos.

Cerolini *et al.*, 2005; Hatamoto *et al.*, 2006, hacen mención que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la concentración espermática, sin embargo los estudios realizados en peces como la perca amarilla (*Perca flavescens*) (Lee & Dabrowski, 2004), tilapia (Gammanpila, Yakupitiyage, & Bart, 2007) y pez dorado (Kashani, Imanpoor, Shabani, & Gorgin, 2011) mostraron que la concentración espermática era independiente de los niveles de inclusión dietética de vitamina E.

Debido al alto contenido lipídico de la membrana plasmática de los espermatozoides, la susceptibilidad a la peroxidación y estrés oxidativo es alta, provocando la pérdida de las funciones espermáticas, disminución del potencial mitocondrial y la muerte del espermatozoide (Ortega *et al.*, 2003). En el estudio la inclusión del 2% de espirulina presentó menores valores de mortalidad espermática con medias de 7.7 a 6.0% en el segundo y tercer ciclo espermático respectivamente, estos valores son similares a los reportados por Vásconez, 2007, quién establece un valor medio de 8.61 %. En la investigación realizada por (Mojica, 2008) la suplementación de 200 mg/kg de espirulina incrementa la vitalidad espermática en un 32,67%; de acuerdo a Ortega y col., 2003, Zayas *et al.*, 2000; la administración de espirulina presenta un efecto protector

contra la peroxidación lipídica, disminuyendo la producción de hidroperóxidos y aumentando la actividad catalasa, reduciendo los niveles de mortalidad espermática.

#### **4.2.2.2. Movilidad espermática**

Según lo reportado en la tabla 15, la motilidad espermática como resultado de la interacción del tratamiento con el ciclo espermático, los tratamientos 3 (inclusión de vitaminas C y E + 2% de espirulina) y 4 (inclusión de vitaminas C y E) al tercer ciclo espermático son los de mayor motilidad con tiempos de actividad de 81,00 y 78,38 segundos y un tiempo de movimiento progresivo de 34 y 36 segundos respectivamente. De acuerdo a Houguo *et al.*, 2015, la duración de motilidad del esperma en rodaballo es significativa a una inclusión de 721,60 mg/kg de vitamina E.

Como respuesta específica al tratamiento hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la motilidad media entre los grupos suplementados y control, pero no hay diferencias significativas entre los grupos suplementados con espirulina, vitaminas o su respectiva mezcla (tabla 18). Resultados similares en trucha arco iris son reportados por Canyurt & Akhan, 2008, quien encontró una respuesta significativa sobre la motilidad espermática como efecto la inclusión dietética del 0.05% de vitamina E., de igual manera Demerdash *et al.*, 2004, informaron que la suplementación con vitamina E reduce la generación de ROS (Especies de oxígeno reactivas) protegiendo a los espermatozoides de la pérdida de la motilidad.

Los valores medios de tiempo de motilidad presentaron diferencias significativas, el tratamiento 4 (inclusión de vitamina C y E + espirulina) presentó mayor tiempo de motilidad progresiva con una media de 36 s, este valor es mayor comparado con el obtenido por Vásconez, 2007, quien establece que el tiempo de motilidad progresiva tiene una media de 30,96 s.

### **4.2.2.3. Coloración, apariencia y textura seminal**

El color y consistencia de la muestra seminal se atribuyen a la concentración espermática y líquido seminal como medio de suspensión. Vásconez, 2007; Bustamante *et al.*, 2018, Chanatasig Chicaiza, 2015, reportan que el semen en salmónidos es de color blanco, consistencia lechosa y de apariencia homogénea, características similares a las obtenidos en la presente investigación.

Shulz, R., & Miura, T. (2003) reporta que la coloración seminal es un indicador de que los espermatozoides se encuentran capacitados y maduros, es decir que han completado su transformación de espermatidas a espermatozoides. Atencio *et al.*, 2013, también hace mención que el registrar la coloración de la muestra, nos permite evidenciar la posible presencia de sustancias ajenas o contaminantes a la muestra.

### **4.2.3. Variables hormonales**

#### **4.2.3.1. Comportamiento de testosterona en el tiempo (ng/mL)**

De acuerdo a la figura 17, la testosterona presenta un comportamiento ondulante durante la espermatogénesis integrada por las fases de: proliferación mitótica de la espermatogonia, meiosis de los espermatocitos y espermiogénesis. De acuerdo a Shulz & Miura (2003), la hormona FSH (folículo estimulante) inicia el proceso de espermatogénesis mediante la activación de las células de Sertoli y producción de 11KT testosterona, mientras que la testosterona actúa a través de mecanismos de retroalimentación que pueden comprometer la señalización para la esteroidogénesis, por ende se asume que los valores de testosterona durante la proliferación de la espermatogonia es menor que en la fase de espermiogénesis, en donde las espermatidas se transforman en espermatozoides flagelados. Pelcastre y Dumas, al 2006 en su estudio realizado

en huachinango del pacífico (*Lutjanus campechanus*) reportaron que la proliferación meiótica de espermatocitos está regulada principalmente por la FSH, aunque los niveles de LH también son mayores después de la segunda meiosis, estableciendo que la FSH estimula la activación de las células de Leydig y de Sertoli.

Durante la espermiogénesis Nagahama, al 2000 establece que la espermiogénesis está regulada en gran medida por la LH provocando un cambio en la ruta metabólica de síntesis esterooidal de 11-KT a la síntesis de  $17\alpha$ -DHP y su posterior conversión a  $17\alpha$ - $20\beta$ -DHP ( $20\beta$ -S) llevada a cabo en los espermatozoides. La  $20\beta$ -S se ha relacionado con el proceso de regulación de espermiogénesis y maduración aunque se desconocen aún sus efectos a nivel celular.

Los valores iniciales tienen una media 0,72 ng/mL y corresponden a la fase de espermiogénesis, siendo este de menor valor comparado con el segundo y tercer ciclo espermático con valores medios de 1,23 ng/mL y 1,07 ng/mL a los días 30 y 60 respectivamente.

Los días 15 y 45 corresponden fase de proliferación de la espermatogonia y mitosis de los espermatocitos. Los valores de concentración de testosterona son menores al segundo y tercer ciclo espermático con medias de 0,93 y 0,24 ng/mL respectivamente.

Se debe tener en cuenta que en el cerebro y a nivel pituitario el aumento de FSH es la señalización asociada con la iniciación de la espermatogénesis; sin embargo Shulz & Miura al 2003, establecen que las señales hormonales y su fisiología reproductiva en peces todavía en gran medida no ha sido estudiada, parece posible que el medio ambiente y/o parámetros nutricionales modulan la actividad hormonal reproductiva.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- La concentración espermática es independiente de la suplementación de espirulina, vitamina C y E, sus valores mantienen una tendencia similar entre tratamientos con medias de 10,7 a 14,3 millones de espermatozoides/mL, estando éstos bajo los parámetros establecidos para machos adultos de 2 a 3 años de edad.
- El volumen seminal como respuesta a la inclusión de espirulina, tiende a ser mayor en el tratamiento 2 con una media de 5,21 mL y una mediana de 4,8 mL.
- Se evidenció menor mortalidad espermática en el tratamiento 2 (6%), como respuesta a la inclusión de espirulina, dado por el efecto protector de la espirulina contra la peroxidación lipídica.
- La movilidad espermática expresada en tiempo de actividad y movilidad progresiva presentan un efecto positivo como respuesta a la inclusión de espirulina, vitamina C y E con valores de 81,00 y 78,38 segundos y un tiempo de movimiento progresivo de 34 y 36 segundos al segundo y tercer ciclo espermático respectivamente.
- El aspecto seminal considerado bajo las variables de color, textura y apariencia no son determinantes para denominar la calidad seminal, las mismas no presentan respuesta frente a tratamientos.
- La concentración de testosterona como respuesta a ciclo espermático se presenta de manera oscilante durante la espermatogénesis y espermiogénesis. Los valores de 0.24 a 0.93 ng/mL durante las fases de mitosis y meiosis y valores mayores de 1.07 a 1.23 ng/mL

hacia la espermiogénesis. Existe una clara tendencia de aumento de concentración del T2 vs el testigo.

- La inclusión de espirulina, vitaminas C y E en dietas de reproductores machos de trucha arco iris no presentó efectos sobre los parámetros morfométricos de peso e índice corporal

## **5.2. Recomendaciones**

- Para mejorar la calidad de semen expresado como tiempo de actividad y mortalidad espermática se recomienda la inclusión del 2% de espirulina a la dieta de parenterales.
- El análisis de calidad seminal se debe realizar de manera inmediata tras la obtención de la muestra para evitar cambios en el tiempo de actividad o mortalidad espermática.
- Antes de realizar la extracción seminal por presión abdominal o canulación es importante que la papila y su área se encuentre limpia y seca con el fin de evitar contaminación de la muestra.
- Es importante llevar registros en campo durante la obtención del semen, en este se detallará el color, apariencia seminal y si la muestra presenta contaminación de sangre, orina, heces o agua ya que puede causar alteración en los resultados.
- Los análisis hormonales específicamente de testosterona se deben de realizar en un lapso de 30 días, para evitar degradación química de las muestras. Al necesitar mayor tiempo para el análisis se puede añadir PMSF.
- Se recomienda analizar la interacción hormonal de GTH, FSH, LH, testosterona y 11 K testosterona durante la etapa reproductiva.

### 5.3. Bibliografía

- Andrade, R. F., Bazzoli, N., Rizzo, E., & Sato, Y. (2001). Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:Characidae). *Tissue and Cell*, 33(5), 524–532. <https://doi.org/10.1054/tice.2001.0206>
- Anónimo. (2010). Manual práctico de cultivo de espirulina en casa. Retrieved from <http://www.xarxaespirulina.cat/wp-content/uploads/2010/07/manual-cultivo-espirulina-bq.pdf>
- Arregui, L. (2013). *El cultivo de la Trucha*. (OESA, Ed.) (1st ed.). España.
- Atencio, V., Perez, E., Espinosa, J., & Pardo, S. (2013). Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae* Evaluation of dimethylacetamide as cryoprotectant for cryopreservation of sperm of bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Arch Med Vet*, 45, 151–158. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200006>
- Barnham, C., & Baxter, A. (2003). Condition Factor , K , for Salmonid Fish, 1–3. Retrieved from <http://bamboorods.ca/Trout condition factor.pdf>
- Bastardo, H. (1992). SEMEN DE LA TRUCHA ARCO IRIS, (*Oncorhynchus mykiss*): CONCENTRACIÓN y VOLUMEN DURANTE UN PERIODO REPRODUCTIVO, EN MÉRIDA, VENEZUELA. *Veterinaria Tropical*, 17, 53–66. Retrieved from [http://sian.inia.gob.ve/revistas\\_ci/VeterinariaTropical/vt17/texto/hrbastardo.htm](http://sian.inia.gob.ve/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt17/texto/hrbastardo.htm)
- Bastardo, H., Guedez, C., & León, M. (2004). Características del semen de trucha arcoiris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. *SciELO*, 22, 277–288. <https://doi.org/ISSN 0798-7269>
- Bustamante, J., Rodríguez, A., & Cortés, M. (2018). Crecimiento y calidad espermática en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* ( Teleostei : Salmonidae ) durante la temporada reproductiva Growth and sperm quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ( Teleostei : Salmonidae ) during the reproductive season, 28(2), 163–170. Retrieved from <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/1200/872>
- Canyurt, M. A., & Akhan, S. (2008). Effect of dietary vitamin E on the sperm quality of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 39(9), 1014–1018. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01952.x>
- Carrillo, M., Muñoz, J., Zanuy, S., Rocha, A., Molés, G., Bayarri, J., ... Cañavate, J. (2009). Reproduccion en Peces: Aspectos Basicos y sus Aplicaciones en Acuicultura. In *Reproduccion en Peces* (p. 362). Madrid: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=MI-fNrm0qtYC&pg=PA369&lpg=PA369&dq=vitamina+en+la+reproduccion+de+trucha+arcoi>

ris&source=bl&ots=Ep-P\_1EQYf&sig=vP12KXqPc1LZk-q1\_uWbrJJ8q-U&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjwyL3b6-HZAhXKtVkJHV4FCwoQ6AEIJTAA#v=onepage&q=vitamina e

- Cerolini, S., Surai, P. F., Speake, B. K., & Sparks, N. H. C. (2005). Dietary fish and evening primrose oil with vitamin E effects on semen variables in cockerels. *British Poultry Science*, 46(2), 214–222. <https://doi.org/10.1080/00071660500065839>
- Chanatasig Chicaiza, J. (2015). *CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TRUCHA ARCOÍRIS (Oncorhynchus mykiss) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI*. Universidad Técnica De Cotopaxi. Retrieved from <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2852/1/T-UTC-00376.pdf>
- Ciereszko, A., & Dabrowski, K. (1994). Relationship between Biochemical-Constituents of Fish Semen and Fertility - the Effect of Short-Term Storage. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12(5), 357–367.
- Ciereszko, A., & Dabrowski, K. (1995). Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction*, 52(5), 982–988. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7626724>
- Dávila, A., & Garces, J. (2007). *OPTIMIZACION DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCION DE ADN EN LAS ESPECIES Oncorhynchus mykiss Y Astroblepus ubidiai Y SU CUANTIFICACION CON TECNICAS MOLECULARES PARA LA ACUICULTURA*. Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2587/1/T-ESPE-IASA I-003306.pdf>
- Demerdash, F., Yousef, M., Kedwany, F., & Baghdadi, H. (2004). Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: Protective role of vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Food and Chemical Toxicology*, 42(10), 1563–1571. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.05.001>
- Echeverría, J. (2006). ISSN 1695-7504 Endocrinología Reproductiva : Prostaglandina F 2 $\alpha$  en vacas . Revisión bibliográfica ( Reproductive Endocrinology : F 2 $\alpha$  Prostaglandin in cows . A Review ) ISSN 1695-7504. *ReVision*, VII, 1–12.
- FAO. (2008). *A REVIEW ON CULTURE , PRODUCTION AND USE OF SPIRULINA AS FOOD FOR HUMANS AND FEEDS FOR*. *Aquaculture* (Vol. 1034). Roma. <https://doi.org/ISBN978-92-5-106106-0>
- FAO. (2009a). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Anuario FAO. Roma. <https://doi.org/978-92-5-308275-9> ISSN1020-5500

- FAO. (2009b). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Anuario FAO. Roma. <https://doi.org/978-92-5-308275-9> ISSN1020-5500
- FAO. (2016a). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. *Contribución a La Seguridad Alimentaria y La Nutrición Para Todos*. Roma., 224. <https://doi.org/978-92-5-306675-9>
- FAO. (2016b). Fisheries and Aquaculture Department. Retrieved from [http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/8.5.16/figis/webapps/figis/temp/hqp\\_9037653109580348305.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/usr/local/tomcat/8.5.16/figis/webapps/figis/temp/hqp_9037653109580348305.xml&outtype=html)
- Gammanpila, M., Yakupitiyage, A., & Bart, A. A. N. (2007). Evaluation of the effects of dietary vitamin C, E and Zinc supplementation on reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). ©Sri Lanka Association for Fisheries and Aquatic Resources Sri Lanka J. Aquat. Sci, 12, 39–60. <https://doi.org/10.4038/sljas.v12i0.2213>
- Geffroy, B., & Simon, O. (2013). Effects of a *Spirulina platensis* -based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate by, 37(1), 31–38.
- Guarienti, C. (2010). Revista do Instituto Adolfo Lutz. *Capacidade Antioxidante Da Microalga Spirulina Platensis Em Células Da Levadura Saccharomyces Cerevisiae Submetidas Ao Estressor Paraquat*, 56–62.
- Guzmán Viveros, A. (2013). *Efecto del ácido ascórbico y alta tocoferol en el desempeño reproductivo de la hembra adulta de trucha arco iris en Paiolones*. Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE.
- Hafez. (2002). Hormonas en la Reproducción. In M. Editores (Ed.), *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7ma ed., pp. 33–69). México.
- Hatamoto, L. K., Baptista Sobrinho, C. A., Nichi, M., Barnabe, V. H., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. M. (2006). Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology*, 66(6–7), 1610–1614. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.012>
- Henrikson, R. (2009). *Earth Food Spirulina*. Hawaii: Ronore Enterprises. Retrieved from <http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2056/servlet/articulo?codigo=4517222&info=resumen&idioma=ENG>
- Houguo, X. U., Huang, L., Mengqing, L., Zheng, K., & Xinxing, W. (2015). Effect of Dietary Vitamin E on the Sperm Quality of Turbot ( *Scophthalmus maximus* ). *Journal of Ocean University of China*, 14(4), 695–702. <https://doi.org/10.1007/s11802-015-2555-7>
- Hoysak, D., & Liley, N. (2001). Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes. *Journal of Fish Biology*, 58(5), 1286–1300.

<https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1536>

Huamani, M., & Mantilla, S. (2017). *IMPORTACIÓN DE OVAS DE TRUCHA ARCO IRIS Y LA SOSTENIBILIDAD DEL CENTRO PISCÍCOLA EL INGENIO DEL DISTRITO DE INGENIO – JUNÍN*. Universidad de San Martín de Porres. Retrieved from [http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/usmp/2802/3/huamani\\_aml.pdf](http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/usmp/2802/3/huamani_aml.pdf)

Hug, C., & von der Weid, D. (2012). Algae as an Approach to Combat Malnutrition in. *Bioresource Technology*, 16–22. Retrieved from [http://www.tatup-journal.de/downloads/2012/tatup121\\_huwe12a.pdf](http://www.tatup-journal.de/downloads/2012/tatup121_huwe12a.pdf)

INEN. (2014). *ALIMENTOS PARA ANIMALES. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN NITRÓGENO Y CÁLCULO DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA BRUTA. PARTE 2: DIGESTIÓN EN BLOQUE Y MÉTODO DE DESTILACIÓN POR VAPOR (ISO 5983-2:2009, IDT)*. Ecuador. Retrieved from [http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/EXTRACTO\\_2014/AOC/nte\\_inen\\_iso\\_5983-2extracto.pdf](http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/EXTRACTO_2014/AOC/nte_inen_iso_5983-2extracto.pdf)

Ingle, G., Rodriguez, M., Sandoval, A., & Mora, I. (2012). Proceso de adaptación, validación, transferencia y adopción de la tecnología, para la producción de huevo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) fuera de estación mediante la manipulación de fotoperiodo. *INSTITUTO NACIONAL DE PESCA DIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE INVESTIGACIÓN EN ACUACULTURA*, 27. Retrieved from [http://www.rusp.gob.mx/PNAP/documentos/INPESCA\\_3ER\\_GRADO.DOCX](http://www.rusp.gob.mx/PNAP/documentos/INPESCA_3ER_GRADO.DOCX)

Kashani, Z. H., Imanpoor, M. R., Shabani, A., & Gorgin, S. (2011). Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acids supplementation on sperm quality of goldfish (*Carassius auratus*). *AACL Bioflux*, 4(3), 334–338. <https://doi.org/10.2739/kurumemedj.MS64001>

Lagos, L. (2015). ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD PARA LA INSTALACIÓN DE UN CENTRO DE PRODUCCIÓN DE OVAS Y ALEVINOS DE TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*) EN AYACUCHO. Retrieved from [http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/939/Tesis/AI149\\_Lag.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/939/Tesis/AI149_Lag.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Lagos, U. (2013). Manejo de la fase de agua dulce en el cultivo de salmónidos. Retrieved from [http://tronador.ulagos.cl/stie/acuicultura/curso3/cap1\\_11.htm](http://tronador.ulagos.cl/stie/acuicultura/curso3/cap1_11.htm)

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., & Patzner, R. A. (1996). Physiological and Biochemical Determination of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Semen Quality for Cryopreservation. *Journal of Applied Aquaculture*, 6(4), 47–73. [https://doi.org/10.1300/J028v06n04\\_05](https://doi.org/10.1300/J028v06n04_05)

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., & Patzner, R. A. (1998). Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, 163(1–2), 163–181.

[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00243-9)

Lee, K., & Dabrowski, K. (2004). Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230(1–4), 377–389. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00421-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00421-6)

MAGAP. (2016). Estado actual y proyección de la acuicultura continental en el Ecuador, 46. Retrieved from <http://acuicultura.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2016/05/1-Estado-y-Proyección-de-la-Acuicultura-Ecuatoriana-Alejandro-de-la-Roche.pdf>

Maiz Padrón, A. R., Valero Lacruz, L., & Briceño Piñero, D. (2010). Elementos prácticos para la cría de truchas en Venezuela. *Mundo Pecuario*, VI(2), 157–168. Retrieved from <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/31338/articulo5.pdf;jsessionid=69545A7FF1B94ADD207408CD23FC5CE3?sequence=1>

Mariey, Y. A., Samak, H. ., & Ibrahim, M. . (2012). Effect of using spirulina platensis algae as a feed additive for poultry diets: 1-productive and reproductive performances of local laying hens. *Poultry Science*, 32(32), 201–215. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/22d0/a2870cf60cdaf497b823cc6a617b9812ca2e.pdf>

Martínez, M., Martínez, L., & Ramos, R. (2009). Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. *RedVet*, 10. Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009/100915.pdf>

Ministerio de Comercio Exterior. (2018). *Procedimiento unificado para importar productos originarios de la unión europea al ecuador*. Quito. Retrieved from <https://www.comercioexterior.gob.ec/productos-negociados-en-el-acuerdo/>

Mojica, M. (2008). *Efecto de la spirulina y la c-ficocianina sobre la calidad espermática y la reacción acrosomal en ratones hipercolesterolémicos*. Instituto Politécnico Nacional. Retrieved from <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/4367/EFECTOSPIRULINA.pdf?sequence=1>

Molina, J. (2015). *Valoración de aditivos alimenticios para la estimulación del apetito en trucha arco iris en etapa de engorde. Determinación De Metales Pesados En Miel De Abeja Para Su Evaluación Como Indicador Ambiental En Zonas Contaminadas, En La Provincia De Pichincha-Ecuador*. Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE.

Muñoz, D. (2003). *Inducción de triploidía mediante la estandarización del choque térmico en trucha arco iris (Oncorhynchus Mykiss) en el Centro de Investigaciones Acuícolas Ceniac, provincia de Napo, cantón Quijos, parroquia Papallacta*. Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/668>

Muñoz, J. (2013). *Regulación Neuroendocrina de la Reproducción en Peces*. Regulación Neuroendocrina de la Reproducción en Peces. Retrieved from

<http://acuacultura.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2013/09/Jose-Muñoz-Cueto-Regulacion-Neuroendocrina.pdf>

- Nagahama, Y. 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway University of Bergen
- Orna, E. (2010). Manual de alimento balanceado para truchas. *Alimento Balanceado - Elaboración y Formulación*, 30. Retrieved from <http://docplayer.es/6836244-Manual-de-alimento-balanceado-para-truchas.html>
- Ortega, M., Izquierdo, C., Gómez, H., José, J., Corichi, O., María, I., ... Valencia, D. E. J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *ResearchGate*, 28, 699–704. <https://doi.org/0378-1844>
- Ortiz, J. (2015). *Acuicultura Producción dulce acuícola en el Ecuador*. (D. Andrade, Ed.) (1st ed.). Sangolquí: ESPE.
- Ortiz, J., & Muñoz, D. (2013). Extractos de pituitaria de tilapia y su valoración biológica in vitro. *Revista Ciencia*, Vol. 15, 11–21.
- Orvay Castelló, F. (1993). *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción* (UNIVERSITA). Barcelona. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=hjwMNMgh1cQC&pg=PA138&lpg=PA138&dq=esteroide+que+induce+la+maduración+\(MIS\)&source=bl&ots=3ncOrbKH0O&sig=SjGlk1BxHoqQasL5pLONmveQf94&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwignt7Z7evYAhVndt8KHb4YC5MQ6AEIJTAA#v=onepage&q=esteroide+que+in](https://books.google.com.ec/books?id=hjwMNMgh1cQC&pg=PA138&lpg=PA138&dq=esteroide+que+induce+la+maduración+(MIS)&source=bl&ots=3ncOrbKH0O&sig=SjGlk1BxHoqQasL5pLONmveQf94&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwignt7Z7evYAhVndt8KHb4YC5MQ6AEIJTAA#v=onepage&q=esteroide+que+in)
- Pati, D., & Habibi, H. R. (2002). Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-releasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the goldfish ovary. *Biology of Reproduction*, 66(3), 813–822. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870090>
- Paz Donoso, D. (2013). *Evaluación, optimización y mejoramiento de la producción de Trucha Arcoiris en el centro ambiental piscícola de Guairapungo-Corponariño*. Universidad de Nariño. Retrieved from <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/85998.pdf>
- Pelcastre, V., & Dumas, S. (2006). Inducción a la ovulación y espermatogénesis en HUachinango del pacífico *Lutjanus Peru* y almacenamiento de su semen. *Instituto Politécnico Nacional*.
- Ponce López, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo. *Idesia*, 31(1), 135–139. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292013000100016>
- Ramakrishnan, C., Haniffa, M., Mamoha, M., Dhanaraj, M., Arockiara, J., & Arunsingh, S. (2008). The Open Access Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh Editor-in-Chief Copy Editor Effects of Probiotics and Spirulina on Survival and. *Isr J Aquacult*, 60(January), 128–

133. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10862/1958>
- Richard, C. R., & Bode, M. A. (2017). *Biology radical*, 7(12), 1135–1142.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.7.12.8375611>
- Rivera, M. (2016). *MADURACIÓN OVÁRICA DE TRUCHA ARCO IRIS (Oncorhynchus mykiss) Y SU CONTROL MEDIANTE ULTRASONOGRAFÍA* No Title. Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE.
- Rodrigo, A. (2016). Prueba de vitalidad: espermatozoides inmóviles vivos o muertos. Retrieved from <https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-vitalidad-de-los-espermatozoides/>
- Rodriguez, A. R., & Triana, F. C. (2006). Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (=Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio. *Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología Industrial*, 106, Tesis doctoral. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8281/tesis261.pdf?sequence=1>
- Rodríguez, D., Avendaño, A., Ojeda, M., Gonzalez, H., Morales, E., & Hernández, J. (2013). Producción de harina de *Spirulina* máxima para ser empleada como ingrediente en la elaboración de dietas para peces, *31*(3), 187–191.
- Rodríguez, Q., Vega, A., Tavizón, F. E., Félix, V., Domínguez, B., Verduzco, C., & Maldonado Macías A A, M. G. (2016). SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO A NIVEL LABORATORIO PARA EL CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA *Spirulina* (*Arthrospira* maxima) Y, *1*(1), 532–537. Retrieved from <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/4/91.pdf>
- Sarabia, L. (2010). Espermiograma. *Programa de Anatomía y Biología Del Desarrollo. Universidad de Chile.*, (1982), 27.
- Sayago, A., Marin, M. I., Aparicio, R., & Morales, M. (2007). Vitamin E and vegetable oils. *Grasas Y Aceites*, 58(October 2015), 74–86. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i1.11>
- Shulz, R., & Miura, T. (2003). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *CFish Physiology and Biochemistry*, 1621(January), 36–43. <https://doi.org/10.1023/A>
- Strand, A. (2005). *Growth- and Bioenergetic Models and their Application in Aquaculture of Perch ( Perca fluviatilis )* Åsa Strand. Umea: Vattenbruksinstitutionen. Retrieved from <http://www.haparanda.se/download/18.786ab49113d008f9ee5fdd/1362143818794/Growth-and-Bioenergetic-Models-and-their-Applications-in-Aquaculture-of-Perch.pdf>
- Tabares, C. J., & Tarazona, A. M. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(4), 149–161.
- Teimouri, M., Amirkolaie, A., & Yeganeh, S. (2013). Effect of *Spirulina platensis* Meal as a Feed Supplement on Growth Performance and Pigmentation of Rainbow Trout ( *Oncorhynchus*

- mykiss ). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5(2), 194–202.  
<https://doi.org/10.5829/idosi.wjfms.2013.05.02.7223>
- Tresguerres, J. (2015a). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, 4, 243. Retrieved from  
[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwifjb2nk53bAhVJvFMKHewWA-0QFgg-MAc&url=http%3A%2F%2Fhighered.mheducation.com%2Fsites%2Fd1%2Ffree%2F6071503497%2F818401%2Ftresguerres\\_fh\\_4e\\_cap\\_muestra.pdf&usg=AOvVaw1](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwifjb2nk53bAhVJvFMKHewWA-0QFgg-MAc&url=http%3A%2F%2Fhighered.mheducation.com%2Fsites%2Fd1%2Ffree%2F6071503497%2F818401%2Ftresguerres_fh_4e_cap_muestra.pdf&usg=AOvVaw1)
- Tresguerres, J. (2015b). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, 4, 243.
- Tuset, V., Dietrich, G., Wojtczak, M., Słowińska, M., De Monserrat, J., & Ciereszko, A. (2008). Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4), 393–397.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01145.x>
- Valdebenito, I. (2008). Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40(2), 115–123.  
<https://doi.org/10.4067/S0301-732X2008000200002>
- Van, G., Dufour, S., & Rankin, C. (2009). Spawning Migration of the European Eel. In *Spawning Migration of the European Eel: Reproduction Index, a Useful Tool for Conservation Management*. New York: Springer. Retrieved from  
<https://books.google.com.ec/books?id=ctln9iiU9uwC&pg=PA261&lpg=PA261&dq=GOMEZ+1999+FSH+Y+LH+SALMONIDS&source=bl&ots=M2j9eT5SNx&sig=JE96-5sjdWM77-OaOnkieTC-Qr0&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwvjvzOm57-HZAhWok1kKHS2qB-0Q6AEIKDAA#v=onepage&q=GOMEZ 1999 FSH Y LH SALMONI>
- Vásconez, M. (2007). *Crioconservación de semen para neomachos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* en el proyecto de mejoramiento genético*. Universidad de las Fuerzas Armadas-Espe. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/481/1/T-ESPE-026783.pdf>
- Vásquez Gallegos, P. (2014). *Maduración sexual de la trucha de San Pedro Mártir *Oncorhynchus mykiss nelsoni* evaluada mediante un método no invasivo*. Retrieved from <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/127/1/235961.pdf>
- Vázquez-Barquero, A. (2007). Redalyc.Desarrollo endógeno. Teorías y políticas de desarrollo territorial. *Investigaciones Regionales*, 11, 183–210.  
<https://doi.org/10.1080/09654313.2012.716246>
- Vázquez, R., & Rendón, C. (2009). Nutrición y Reproducción. In *La Nutrición y Alimentación en la Acuicultura* (1st ed., pp. 531–582). Madrid. Retrieved from  
<https://books.google.com.ec/books?id=NEqkj2By-kEC&printsec=frontcover&dq=nutricion+acuicultura&hl=es->

419&sa=X&ved=0ahUKEwifwqD\_sPHaAhVBtFMKHSBhDTUQ6AEIJjAA#v=onepage&q=nutricion acuicultura&f=false

Washburn, B., Frye, D., Hung, S., Doroshov, S., & Conte, F. (1990). Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *90*(2), 179–195. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90340-S](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90340-S)

Zayas, L., Monzón, G., Pelaéz, L., & Quintero, Y. (2000). Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Cubana Invest Biomed*, *19*(3), 202–205. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v19n3/ibi11300.pdf>