UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA

EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA SOBRE LA VIABILIDAD EN ESPERMATOZOIDES DE *Loxechinus albus* "ERIZO VERDE"

TESIS

PRESENTADO POR:

Bachiller ALEXANDRA ELVIRA ALVIS MANRIQUE

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO PESQUERO

MOQUEGUA – PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
UNAM
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
UNAM
FEDATARIO

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA

Folio Nº 0044

ACTA DE SUSTENTACIÓN

I. Modalidad:

Tesis : [X]
Trabajo de Suficiencia Profesional : [ ]
Otro: ..... : [ ]

II. Documento de aprobación para la sustentación:

Resolución de Facultad N°068-2023-FACIA-UNAM

Fecha: 19 de Mayo 2023.

III. El jurado ha dictaminado la (el) Tesis, TITULADO:

Efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa sobre la Viabilidad en espermatozoides de Loxechinus albus "Erizo verde"

Bachiller: Alexandra Elvira Alvis Manrique

Asesor Principal: Msc. Eurich Yam Uasaca Calisaya

Co-Asesor: Mg. Richard Pouce Cusi

IV. Se dictamina:

Como: Aprobado por Unanimidad la sustentación de manera:

Presencial [X] Virtual [ ]

Con nota: (16) Dieciseis) por lo que; Sí [X] No [ ]

Opta el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO.

Siendo las 10:30 horas, del 2 de Junio del año 2023 se procede con la firma en conformidad de lo dictaminado por el Jurado.

Mg. Vilma Amalia Vilca Cáceres
Presidente

Dr. MARIO RUIZ CHOQUE
Primer Miembro

Mg. Suly Alicia Caballero Apaza
Segundo Miembro

Alexandra Elvira Alvis Manrique
Bachiller

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA

TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO

EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA SOBRE LA VIABILIDAD EN ESPERMATOZOIDES DE *Loxechinus albus* "ERIZO VERDE"

Tesis sustentada y aprobada el …02… de ……Junio…….. del 2023; estando el jurado calificador y asesor integrado por:

PRESIDENTE : ……..
Mg. Vilma Amalia Vilca Cáceres

1ER MIEMBRO : ……..
Dr. Mario Ruiz Choque

2DO MIEMBRO : ……..
MSc. Sucy Alicia Caballero Apaza

ASESOR : ……. ……..
MSc. Ehrlich Yam Llasaca Calizaya

DEDICATORIA

Primeramente, quiero dedicar este trabajo de investigación, hecho con mucho esfuerzo y dedicación a mis padres y guías celestiales Elvira y Amador, que iluminan mi camino y son la base de mis principios y virtudes.

A mi madre Mary Manrique, a quien brindo con mucho gusto este logro, y es quien siempre me incentiva a seguir adelante, y me ha enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca el objetivo y que con paciencia además de esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy una meta más.

Dedico este trabajo a mi querido hermano Diego David, a quien amo infinitamente.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

Agradezco a mi madre, por el apoyo económico que me permitió concluir de manera satisfactoria esta investigación. Gracias a mi familia y a mis amigos queridos más cercanos, que estuvieron pendientes de manera directa o indirecta.

Así mismo, esta investigación fue posible gracias a mi asesor, M.Sc. Ehrlich Y. Llasaca Calizaya, quien con sus conocimientos, experiencia y profesionalismo me ayudo a llevar con éxito este proyecto.

Me gustaría también en estas líneas agradecer la ayuda de muchas personas que me han brindado su asistencia durante el proceso de investigación, experimentación y redacción de este trabajo.

Mis agradecimientos a la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera por acogerme los mejores años de mi vida y a los maestros por impartirme sus conocimientos.

RESUMEN

Teniendo en cuenta la realidad pesquera actual del recurso *Loxechinus albus* (Molina,1872) "erizo verde", y la limitada obtención de reproductores aptos fuera de época reproductiva para el desarrollo de la reproducción inducida, se prioriza la necesidad de investigación en desarrollar técnicas acuícolas en medio controlado, siendo así la crio preservación del germoplasma del erizo verde una alternativa de sustentabilidad del recurso. De tal forma que la presente investigación tiene como objetivo determinar el efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa sobre la viabilidad en espermatozoides de erizo verde, como inicio de un protocolo de conservación de espermios de este invertebrado. Para ello se desarrolló la metodología, por medio de 2 ensayos. Los 2 ensayos se hicieron con sus respectivos tratamientos de concentración: T1= 0.8M, T2= 0.6M, T3= 0.4 M, T4= 1 M, T5= 0 M, con 3 réplicas respectivamente posteriormente mediante microscopia directa se tomaron los valores de motilidad y mortalidad mediante videos procesados utilizando el software de libre (Fiji is Just ImageJ), finalmente los datos obtenidos fueron sometidos al modelo estadístico ANOVA mediante (INFOSTAT). Los resultados mostraron que en el ensayo 1, la motilidad con indicadores de velocidad, para todas las unidades experimentales con sus tratamientos, mostraron diferencias significativas, dando un valor de ($p=0.0001$) y como resultado una motilidad con indicadores de velocidad máxima de (3968.75 ± 0 µm/s) y una motilidad con velocidad mínima de (1973.37 ± 0 µm/s), aceptándose así la hipótesis alterna. En el ensayo 2 tuvo como resultado una motilidad con indicadores de velocidad máxima de (3933.31 ± 0 µm/s) y una motilidad con velocidad mínima de (2958.13 ± 0 µm/s) con sus respectivos tratamientos, y a diferentes horas de conservación. En la evaluación del efecto de cinco tratamientos sobre la tasa mortalidad (%) del espermio del L. albus, se mostraron diferencias significativas en torno al tiempo de almacenamiento (Hrs) en refrigeración, demostrando así que el semen puro refrigerado obtiene una motilidad alta hasta las 72 horas a comparación de los demás tratamientos con sacarosa donde se observa una caída de la motilidad a partir de las 48 horas, teniéndose valores de mortalidad del 40%, Este trabajo permitirá desarrollar nuevos protocolos de preservación de espermatozoides en invertebrados marinos, con el objetivo de lograr técnicas de conservación para mejorar los aspectos sobre la calidad espermática.

Palabras clave: Espermatozoides, erizo verde, sacarosa, motilidad, conservación, viabilidad.

ABSTRACT

Taking into account the current fishing reality of the *Loxechinus albus* (Molina, 1872) "green urchin" resource, and the limited obtaining of suitable broodstock outside the reproductive season for the development of induced reproduction, the need for research in developing aquaculture techniques in a controlled environment is prioritized, thus being the cryopreservation of green urchin germplasm an alternative for the sustainability of the resource. Thus, the present research aims to determine the effect of different concentrations of sucrose on the viability of green urchin spermatozoa, as the beginning of a protocol for the conservation of spermatozoa of this invertebrate. For this purpose, the methodology was developed by means of 2 trials. The 2 trials were carried out with their respective concentration treatments: T1= 0.8M, T2= 0.6M, T3= 0.4 M, T4= 1 M, T5= 0 M, with 3 replicates respectively, then by direct microscopy the motility and mortality values were taken by means of videos processed using the free software (Fiji is Just ImageJ), finally the data obtained were submitted to the ANOVA statistical model by means of (INFOSTAT). The results showed that in trial 1, motility with velocity indicators, for all experimental units with their treatments, showed significant differences, giving a value of ($p=0.0001$) and as a result a motility with maximum velocity indicators of (3968.75 ± 0 µm/s) and a motility with minimum velocity of (1973.37 ± 0 µm/s), thus accepting the alternative hypothesis. Trial 2 resulted in a motility with maximum velocity indicators of (3933.31 ± 0 µm/s) and a motility with minimum velocity of (2958.13 ± 0 µm/s) with their respective treatments, and at different storage times. In the evaluation of the effect of five treatments on the mortality rate (%) of the sperm of L. albus, significant differences were shown with respect to the storage time (Hrs) in refrigeration, demonstrating that pure refrigerated semen obtains high motility up to 72 hours, compared to the other treatments with sucrose where a drop in motility is observed after 48 hours, with mortality values of 40%. This work will allow developing new protocols for preserving spermatozoa in marine invertebrates, with the objective of achieving conservation techniques to improve aspects of sperm quality.

Key words: Spermatozoa, green urchin, sucrose, motility, preservation, viability.

ÍNDICE

DEDICATORIA i

AGRADECIMIENTO ii

RESUMEN iii

ABSTRACT iv

ÍNDICE DE TABLAS viii

ÍNDICE DE FIGURAS ix

ÍNDICE DE ANEXOS x

INTRODUCCIÓN 1

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 3

1.1. Descripción y Formulación del Problema 3

1.1.1. Descripción del problema 3

1.1.2. Formulación del problema 5

1.2. Objetivos 5

1.2.1.Objetivo General: 5

1.2.2. Objetivos Específicos: 5

1.3. Justificación e Importancia 6

1.4. Hipótesis 8

1.5. Hipótesis general 8

1.6. Hipótesis nula general 8

1.7. Hipótesis alternativa general 8

1.8. Hipótesis específica 8

1.8.1. Hipótesis específica 01 8

1.8.2. Hipótesis específica 02 9

1.9. Variables 10

1.9.1. Variable conceptual independiente “Concentración de Sacarosa” 10

1.9.2. Variable conceptual dependiente “Viabilidad en espermatozoides de Loxechinus albus “erizo verde”” 11
II. MARCO TEÓRICO 12
2.1. Antecedentes 12
2.1.1. Internacionales 12
2.1.2. Nacionales 15
2.2. Bases Teóricas 17
2.2.1. Descripción taxonómica de: *Loxechinus albus* “erizo verde” 17
2.2.2. Distribución geográfica, hábitat, morfología y ecología del *Loxechinus albus* “erizo verde”. 18
2.2.3. Reproducción 19
2.2.4. Gónadas 20
2.2.5. Gametos 20
2.2.5.1. Concentración espermática 20
2.2.5.2. Espermatozoide del *Loxechinus albus* “erizo verde” 21
2.2.6. Crio preservación del semen de *Loxechinus albus* “erizo verde” 22
2.2.6.1. Principios básicos para Crio preservación 22
2.2.6.2. Diluyentes 22
2.2.6.3. Azúcares 24
2.3. Definición de Términos 26
2.3.1. Viabilidad 26
2.3.2. Motilidad 26
2.3.3. Los ACP (Agentes Crioprotectantes): 28
2.3.4. La sacarosa: 29
III. METODOLOGÍA 30
3.1. Tipo y Nivel de Investigación 30
3.2. Ámbito Temporal y Espacial 30
3.3. Población y Muestra 31

3.3.1. Población....31
3.3.2. Muestra....31
3.4. Instrumentos....32
3.4.1. Materiales....32
3.4.2. Equipos....33
3.4.3. Insumos Químicos....33
3.5. Procedimientos....34
3.5.1. Extracción de *L. albus* reproductores....34
3.5.2. Traslado y acondicionamiento de *L. albus* reproductores....35
3.5.3. Selección de *L. albus* reproductores por Biometría e Inducción....36
3.5.4. Colecta de muestra....38
3.5.5. Obtención de datos....39
3.5.6. Procesamiento de los videos obtenidos por microscopia directa....40
3.5.7. Análisis de los datos obtenidos del diseño experimental....40
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN....43
4.1. Efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa sobre la motilidad en espermatozoides de *Loxechinus Albus* "Erizo Verde"....43
4.2. Efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa sobre la mortalidad en espermatozoides de *Loxechinus Albus* "Erizo Verde"....49
V. CONCLUSIONES....52
VI. RECOMENDACIONES....53
VII. REFERENCIAS....54
VIII.ANEXOS....60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de Variables 10

Tabla 2. Diseño experimental del ensayo 1 41

Tabla 3. Diseño experimental del ensayo 2 42

Tabla 4. Diseño experimental de la Tasa de Mortalidad (%) 42

*Tabla 5.*Tabla resumen descriptivo de los datos estadísticos obtenidos del modelo Análisis de Varianza (ANOVA) del ensayo 1 43

Tabla 6 Tabla Resumen descriptivo de los datos estadísticos obtenidos del modelo Análisis de Varianza (ANOVA) del ensayo 2 44

Tabla 7. Tabla Resumen descriptivo de los datos estadísticos obtenidos del modelo Análisis de Varianza (ANOVA) de la tasa de mortalidad 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Loxechinus albus “erizo verde” 17

Figura 2. Morfología del espermatozoide de Loxechinus Albus “erizo verde” 21

Figura 3. Ubicación de la zona de extracción de L. Albus en Moquegua 31

Figura 4. Extracción de erizos verdes 34

Figura 5. Estibado en cajas isotérmicas (coolers) 35

Figura 6. Acondicionamiento de erizos verdes 36

Figura 7. Biometría de erizos verdes 37

Figura 8. Inducción al desove de erizos verdes 37

Figura 9. Colecta y dilución de la muestra de esperma de erizo verde 38

Figura 10. Refrigeración y microscopia directa de las muestras de esperma de erizo verde 42

Figura 11. Procesamiento de los videos obtenidos por microscopía 42

Figura 12. Gráfico de cajas (Box-Plot), INFOSTAT: Varianza de la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales de 5 machos del ensayo 45

Figura 13. Gráfico de cajas (Box-Plot), INFOSTAT: varianza de la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales de 5 machos del ensayo 1 46

Figura 14. Gráfico de cajas (Box-Plot), INFOSTAT: Varianza de la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales en torno al tiempo de almacenamiento (Hrs) en refrigeración del ensayo 2 47

Figura 15. Gráfico de barras (Bar-Chart), INFOSTAT: Varianza del efecto de los Tratamientos Experimentales sobre la mortalidad en espermatozoides 50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tablas de análisis de varianza y prueba post prueba post (Tukey) para la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales. Ensayo1..... 61

Anexo 2. Tablas de análisis de varianza y prueba post prueba post (tukey) para la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales. Ensayo2..... 62

Anexo 3. Tablas de análisis de varianza y prueba post prueba post (Tukey) Para la mortalidad con indicadores de tasa de mortalidad (%) , entre los Tratamientos Experimentales. 64

INTRODUCCIÓN

El erizo de mar comestible *Loxechinus albus* se distribuye desde la Isla Lobos de Afuera en Perú (6°S) hasta el extremo sur de Sudamérica (55°S). *L.albus* es una de las especies de mayor importancia económica en los sistemas bentónicos litorales de la región del Pacífico Sudeste, siendo fuertemente explotada y utilizada como fuente de alimento desde tiempos precolombinos. Su pesquería es la mayor del mundo, realizada exclusivamente por pescadores artesanales. Durante los últimos 15 años, la pesquería se ha desplazado al sur de la latitud 42°S, y esta región representa más del 90% de los desembarques totales, (Vásquez, 2020).

Es el principal equinodermo explotado por la pesquería artesanal en el centro y sur de Perú, desde Pisco hasta Ilo, a profundidades entre 5 y 35 m cuya pesquería se encuentra regulada por la talla mínima de captura (TMC) establecida en 70 mm de diámetro del caparazón, mediante la Resolución Ministerial Nº 209-2001-PE (26-6-2001). Debido a su alta demanda tanto en el mercado nacional como internacional, la presión pesquera en sus principales bancos naturales se ha incrementado, generando un impacto negativo en el recurso, (Incio et al., 2020).

Cabe destacar, que, debido a la disminución de las poblaciones de estos recursos, los extractores vienen tomando medidas de autorregulación, para lo cual han llegado a acuerdos comunes para mejorar el precio de los productos y efectuar un manejo sostenible, estableciendo limites en los volúmenes de extracción por embarcación de acuerdo a la demanda del recurso. En Moquegua y Tacna, la pesquería marisquera es una importante actividad económica, sin embargo, los bancos naturales de invertebrados marinos bentónicos en los últimos años han presentado variaciones debido a la intensa explotación que ha ocasionado la disminución de los stocks poblacionales; de allí la importancia de conocer la situación poblacional de los recursos, a fin de diseñar estrategias de gestión y manejo para su uso óptimo y sustentable, (IMARPE, 2022).

Por ello, es relevante conocer los aspectos biológicos reproductivos del *Loxechinus albus* que contribuyan, por un lado, a una mejor comprensión de su papel en las comunidades en que vive y, por otro, a desarrollar el conocimiento que permita implementar mejores medidas de manejo que aseguren su mantención como recurso de importancia económica (Zamora & Stotz, 1992).

En este sentido, es necesario desarrollar técnicas acuícolas, como la "Criobiología", que es una técnica ampliamente reconocida para el almacenamiento a largo plazo de material biológico usando temperaturas criogénicas. La crio preservación consiste en congelar, almacenar y descongelar material biológico, ya sean células, tejido u organismos, en la presencia de agentes crio protectores conservando su estructura y función. La crio preservación tiene aplicaciones en ciencia básica, acuicultura, gestión de pesquerías y conservación de la biodiversidad, (Paredes y Campos, 2023).

Los erizos de mar permiten observaciones básicas sobre la motilidad de los espermatozoides. La mayoría de las ventajas de los erizos de mar son que proporcionan una gran cantidad de semen por individuo, una propiedad crucial para los primeros estudios bioquímicos, y están grávidos la mayor parte del año con espermatozoides maduros capaces de nadar durante períodos muy largos, (Yoshida y Asturiano, 2020).

En tal sentido, teniendo en cuenta las ventajas del erizo de mar y con el propósito de independizar del medio natural la obtención de reproductores aptos para continuar con la reproducción en medio controlado fuera de época reproductiva, considerando que el *L. albus*, tiene una pesquería estacional, principalmente entre abril y setiembre, es por ello que se busca a través de esta investigación, el almacenamiento de espermatozoides por medio de la técnica de crio preservación.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción y Formulación del Problema

1.1.1. Descripción del problema

En el Perú el equinodermo de mayor importancia comercial es el *Loxechinus albus* "erizo verde", por su reconocida calidad en el mercado nacional e internacional, que lo cotiza como un producto de gran demanda y alto precio (Yamashiro et al. 1996). Actualmente, en el sur del país, esta especie constituye un recurso preferencial para la actividad artesanal de los "buzos"; abasteciendo tanto al consumo nacional y mercado internacional. El erizo es uno de los principales recursos que extrae la flota marisquera de las regiones Ica, Arequipa y Moquegua, presentando en los últimos años una creciente demanda, registrando en el 2019 un desembarque de 3984 t a nivel nacional, que ha traído beneficios económicos para los extractores, sin embargo, esto puede conllevar a la disminución de sus poblaciones, (Zapata,2021).

La pesquería de este equinodermo se orienta a la comercialización de sus gónadas, las que alcanzan mayor tamaño y peso en la época de desove, condición desfavorable para su población, considerando que las mayores capturas se realizan durante esta época, rompiendo el ciclo biológico natural de la especie, afectando el desove y los futuros reclutamientos poblacionales. El conocimiento de los procesos y patrones reproductivos, la estructura poblacional, entre otros aspectos de las poblaciones explotadas son de suma importancia para proponer recomendaciones que permitan el sostenimiento de estos recursos en el espacio y tiempo, (Galindo et al., 2016).

(Ayerbe et al. 2018), refirieron sobre la biotecnología de cultivo del erizo verde en ambientes controlados y a nivel experimental en sistemas suspendidos en la zona sur del Perú. Sin embargo, estos trabajos realizados para mejorar la sustentabilidad del recurso, tienen como limitación la disponibilidad de gametos, ya que solo se dispone de estos en las épocas de reproducción de esta especie, es decir están limitados por la variabilidad estacional.

Dada la realidad pesquera de este recurso se debe priorizar la investigación para desarrollar tecnologías de acuicultura en un ambiente controlado. En este sentido como una parte en la investigación para el mejoramiento de la sustentabilidad de los recursos, es que hasta años recientes se ha logrado la crio preservación del germoplasma de más de 200 especies de organismos acuáticos en el mundo, siendo en su mayoría células espermáticas (Hiemstra et al. 2005; Tiersch & Green, 2011). Aun cuando durante estos últimos 25 años, pese a que un gran número de protocolos de espermatozoides de peces han sido desarrollados, no se ha logrado aún determinar alguno que permita la técnica a escala comercial (Llasaca, 2014).

Por otra parte, uno de los problemas de la crioconservación de semen de peces es la carencia de protocolos estandarizados durante cada etapa del proceso. Por esta razón, la comercialización de semen crio preservado de peces en la acuicultura es limitada (Asturiano et al., 2016; Martínez et al., 2016). De igual manera, existen muchos factores que influyen en el proceso de crioconservación que afectan el semen crio conservado, la calidad inicial del semen, la composición del diluyente, los crio protectores, el factor de dilución, la velocidad de congelación y descongelación, así como los aspectos fisiológicos del espermatozoide y la especificidad de la especie (Aramli et al., 2015; Linhartova et al., 2013; Shishanova et al., 2012); los cuales generan una disminución de la motilidad del esperma e integridad de la membrana (Trigo et al., 2015, como se citó en Carmona, 2021).

Considerando estos factores, es necesario plantear protocolos que permitan mantener el semen en óptimas condiciones durante prolongados periodos de tiempo (horas) a condiciones de refrigeración (sin llegar a la congelación), produciendo el menor daño posible a las células espermáticas, permitiendo de esta manera transportar dicho material a laboratorios especializados, pudiendo obtenerse datos no muy distantes a los que se obtendrían si se hubieran utilizado semen fresco y recién colectado. Dicho mantenimiento ayudará a perfeccionar un protocolo de crio preservación de semen para la especie de forma específica, (Briceño,2020).

1.1.2. Formulación del problema

Interrogante general

¿Qué efecto produce las diferentes concentraciones de Sacarosa, sobre la viabilidad en espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde"?

Interrogantes específicas

¿Cuál es la motilidad en los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa?

¿Cuál es la mortalidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General:

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Sacarosa, sobre la viabilidad en espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde".

1.2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la motilidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa.

- Determinar la mortalidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa.

1.3. Justificación e Importancia

En la acuicultura, la relevancia del diagnóstico del semen predice la capacidad fecúndate del eyaculado y contribuye a mejorar las técnicas de fertilización in vitro y el desarrollo de metodologías de crioconservación o biotecnologías aplicadas al mejoramiento genético, por ellos es de importancia considerar competentes los espermatozoides de un pez, en vista que deben cumplir con los requerimientos básicos de calidad espermática (Herráez et al. 2017).

Ante ello se han realizado con éxito estudios de crioconservación con gametos y larvas de diversas especies acuáticas, principalmente peces y moluscos de importancia ecológica y comercial. Sin embargo, se han realizado pocos estudios con equinodermos. El erizo a pesar de ser una de las especies más importantes para la pesca en la costa occidental del Pacífico y con una creciente demanda, que ha provocado una sobrepesca y una alarmante disminución de su población natural, cuenta con poca investigación sobre su conservación (Sonnenholzner Varas, 2021). Esta situación ha generado preocupación por la necesidad de garantizar la sostenibilidad de este recurso en las zonas en las que se intensiva, generando la necesidad de aumentar la biomasa de las poblaciones naturales de esta especie, a través del desarrollo de cultivos en sistemas controlados para su repoblación.

En este sentido la crio preservación de gametos o larvas permiten una alternativa para proporcionar material biológico de alta calidad durante todo el año, independientemente de su ciclo reproductivo, (Dupré y Carvajal, 2019).

El acceso a material biológico con las menores restricciones posibles en el tiempo junto con la posibilidad de almacenar copias exactas de los organismos o células de trabajo de forma estable son dos pilares centrales al desarrollo biotecnológico marino necesario en el siglo XXI y que se ha venido acuñando como Crecimiento azul. La posibilidad de poner esta herramienta tan útil, al servicio de la ciencia abre las puertas para una edad de oro de la investigación marina con base biotecnológica.

En definitiva, se abre la puerta a la expansión del concepto de biobanco para albergar organismos marinos vivos, pero en condiciones de vida suspendida, con aplicaciones a la investigación básica, para la conservación de la biodiversidad, para biomedicina con base marina o para la acuicultura, (Paredes y Campos, 2023).

Desde este punto de vista, se justifica realizar esta investigación para generar datos que puedan ayudar a mejorar los métodos de conservación de espermatozoides del *Loxechinus albus* "erizo verde" con el uso de la sacarosa como diluyente, dicho diluyente ayudara en el mantenimiento y conservación del esperma a temperaturas de refrigeración y que no producirá daño a la célula.

Además, la información obtenida permitiría establecer las bases para el desarrollo del sector acuícola de la especie contribuyendo en la conservación de las poblaciones y su ambiente influyendo positivamente al bienestar de pescadores y acuicultores por medio del desarrollo de programas de mejoramiento genético o repoblamiento utilizando semilla producida con germoplasma congelado, (Castro Acevedo, 2021).

El objetivo principal de la investigación es, poder contribuir al establecimiento de un protocolo especifico de crio preservación del gameto masculino (espermatozoide), de este equinodermo de gran demanda nacional e internacional, determinando la óptima concentración del diluyente, el efecto del tiempo para su conservación, y la motilidad del espermatozoide. Asimismo, este trabajo de investigación tiene como objetivo a largo plazo obtener datos que permitan establecer un banco de germoplasma de las poblaciones locales de erizo verde, que darán pauta para futuras investigaciones en el mejoramiento de protocolos para la conservación de la especie.

1.4. Hipótesis

Hipótesis general

Se determino el efecto de las diferentes concentraciones de Sacarosa sobre la viabilidad en espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde".

Hipótesis nula general

$\mathbf{H_0}$: Las diferentes concentraciones de Sacarosa no tienen efecto sobre la viabilidad en espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde".

Hipótesis alternativa general

$\mathbf{H_1}$: Las diferentes concentraciones de Sacarosa tienen efecto sobre la viabilidad en espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde".

Hipótesis específica

Hipótesis específica 01

- Hipótesis nula 01

  $\mathbf{H_0}$: No existe motilidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa.

- Hipótesis alternativa 01

  $\mathbf{H_1}$: Existe motilidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa.

Hipótesis específica 02

- Hipótesis nula 02

  $\mathbf{H_0}$: No existe mortalidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa.

- Hipótesis alternativa 02

  $\mathbf{H_1}$: Existe mortalidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde" en diferentes concentraciones de Sacarosa.

1.5. Variables

El presente estudio se apoya de dos (02) variables con una relación causa y efecto, por lo que se definiría una variable independiente y otra dependiente (Tabla 1).

Tabla 1.

Operacionalización de variables, con una relación causa y efecto

Variables Conceptuales	Dimensión	Indicador
Variable independiente:		T1 = 0.8 M
Concentración de Sacarosa	Concentración molar	T2 = 0.6 M
		T3 = 0.4 M
		T4 = 1 M
		T5 = 0 M (semen puro)
Variables dependientes:		Velocidad (max.) en µm/s
Viabilidad en espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde"	**a)** Motilidad	Velocidad (med.) en µm/s
		Velocidad (min.) en µm/s
	b) Mortalidad	Tasa de mortalidad (%)

Nota. Elaboración propia (2023).

1.9.1. Variable conceptual independiente “Concentración de Sacarosa”

La variable independiente está caracterizada dentro de la escala de intervalos, siendo su dimensión la concentración molar (M). Los indicadores se encuentran nivelados en cinco (5) intervalos.

- Molaridad 1 = 0.8 M.
- Molaridad 2 = 0.6 M
- Molaridad 3 = 0.4 M
- Molaridad 4 = 1 M
- Molaridad 5 = 0 M

1.9.2. Variable conceptual dependiente “Viabilidad en espermatozoides de *Loxechinus albus* “erizo verde””

Esta variable se encuentra dentro de la escala de razón, donde se observan dos (02) dimensiones:

- **Dimensión 01: “Motilidad”**

  Esta dimensión se le atribuyó el indicador “VELOCIDAD” del espermatozoide en µm/s .

- **Dimensión 02: “Mortalidad”**

  Está determinada por la “TASA DE MORTALIDAD (%)” en espermatozoides como indicador.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Internacionales

Urrego Gutiérrez (2022), en su tesis se evaluó el uso de diferentes crio protectores, para establecer el protocolo de Crio preservación de semen de la especie "Capitán de la sabana" *Eremophilus mutisii,* donde seleccionaron cuatro machos adultos y maduros sexualmente. La eyaculación fue estimulada aplicando extracto de pituitaria de carpa (4 mg EPC/kg). Transcurridas 24 horas, los animales fueron anestesiados con MS-222, posteriormente se realizó la colecta de semen. Se utilizó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y cuatro réplicas por tratamiento. Tratamiento1: Dimetilsulfoxido 10% + Yema de Huevo de Gallina 12% + Glucosa 5.5%. Tratamiento 2: Dimetilsulfoxido 10% + Glucosa 5.5%. Tratamiento 3: Dimetil Acetamida 8% + Yema de Huevo de Gallina 12% + Glucosa 5.5%. Tratamiento 4: Dimetil Acetamida 8% + Glucosa 5.5% Tratamiento 5: Metanol 10% + Yema de Huevo de Gallina 12% + Glucosa 5.5%. Tratamiento 6: Metanol 10%+ Glucosa 5.5%. Se realizó descongelación de las pajillas los días 1, 30 y 60. Los mayores porcentajes de motilidad post descongelación fueron observados cuando se utilizaron los tratamientos 1, 2 y 6. El mayor tiempo de activación fue obtenido con los tratamientos 2, 1 y 6. Sin embargo, estos porcentajes fueron inferiores cuando se compararon con los observados con semen fresco. Los resultados obtenidos, permiten concluir que los tratamientos 1, 2 y 6 son una alternativa viable para la crioconservación del semen de capitán de la sabana *E. mutisii.*

Carmona Calderón (2021), evaluó la crio preservación de semen de dorada *Brycon sinuensis* con dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) o etilenglicol (EG) a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%); para lo cual se indujeron 12 machos con 5 mg extracto hipofisario de carpa por Kg de peso y seis horas después el semen fue colectado en tubos Falcón de 20 ml. El semen fue diluido (1:4) en la solución crio protectora compuesta por glucosa 6%, yema de huevo 12% y DMSO o DMA o EG a dos porcentajes de inclusión (5 o 10%); luego fue empacado en pajillas de 2.5 ml y congelado en vapores de nitrógeno líquido (NL) durante 30 minutos y posteriormente almacenadas en NL en termos de 34 L. El semen fue descongelado por inmersión directa en baño serológico a 35°C durante 60 segundos. La calidad del semen fresco, precongelado y descongelado fue evaluada con la ayuda del software Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic, España) y un microscopio de contraste de fase (Nikon E55, Japón) mediante la movilidad total, tipos de movilidad (rápida, media, lenta), espermatozoides inmóviles, velocidades (lineal y curvilínea), progresividad total y concentración espermática. Además, en el semen descongelado, se evaluaron los daños en membrana espermática (D-Mem), en mitocondria (D-Mit) y fragmentación de DNA (F-DNA) mediante citometría de flujo (Citómetros FACS CANTO II, BD Biosciences San José, CA y LSR 2 FORTESSA) (BD Biosciences San José, CA). El semen fresco presentó alta movilidad total (97.0±7.0%); mientras que en semen precongelado (82.5±17.9%) y descongelado (45.4±13.6%) fue mayor cuando fue tratado con DMSO10% (p0.05). Los resultados del presente estudio concluyeron que DMSO incluido a 5 o 10%, registró mejor calidad del semen descongelado al compararlo con los obtenidos con DMA y EG; sin embargo, la capacidad fecundante del semen crio preservado con esta solución crio protectora (DMSO 5 o 10%, yema de huevo 12% y glucosa 6%) debe ser evaluada mediante pruebas de fertilidad y eclosión.

Castro Acevedo (2021), en su trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la conservación a corto plazo en refrigeración (4°C) y desarrollar un protocolo de crio preservación para el esperma de la abulón azul. En el almacenamiento a corto plazo se evaluó la motilidad espermática y se determinó que el esperma puede mantener una motilidad >40% al tercer día de almacenamiento. Para el experimento de crio preservación se evaluaron cuatro crio protectores: dimetilsulfóxido (DMSO), propilenglicol (PG), glicerol (GLY) y metanol (MeOH) a cuatro concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) y cuatro tiempos de incubación (5, 10, 15 y 20 min). El congelamiento fue a una tasa de -30 °C por 10 min. Para determinar la calidad del esperma descongelado se evaluó la motilidad y viabilidad de las células. La motilidad fue evaluada estimando el porcentaje de esperma móvil en los diferentes tratamientos. En el experimento de crio preservación se encontraron diferencias significativas en la selección del crio protector. La máxima motilidad (48 ± 4.7%) y viabilidad (62 ± 8.8%) se obtuvieron al suspender el esperma en 15% de DMSO durante 5 min. Mientras que el uso de PG, GLY y MeOH mostró una motilidad < 5% en todos los tratamientos. Posteriormente se realizó un protocolo de optimización utilizando 12%, 15% y 18% de DMSO durante 8 y 18 min de incubación. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la motilidad y viabilidad espermática.

2.1.2. Nacionales

Domínguez et al. (2020), evaluaron el efecto de seis soluciones crio protectoras basadas en MgCl y metanol, acompañado de sucrosa y gel de Aloe vera al 10% o yema de huevo al 10%, sobre la viabilidad espermática en espermatóforo y masa espermática de *Litopenaeus vannamei*. Además, se usaron tasas de enfriamiento de -0.5, -1 y -2°C/min hasta lograr descensos de temperatura a -35, -80 y -100 °C previo a la inmersión en nitrógeno líquido. La tasa de viabilidad espermática fue determinada mediante la tinción eosina-nigrosina. Los resultados mostraron que las soluciones basadas en MgCl , sucrosa más yema de huevo o gel de Aloe vera preservaron mejor la viabilidad espermática en espermatóforo (82.8 ± 2.3% y 72.6 ± 3.1%) y en masa espermática (83.4 ± 2.5% y 76 ± 1.1%), sin diferencias significativas con el grupo control ($p>0.05$).En conclusión, el uso de una solución compuesta por MgCl , sucrosa, gel de Aloe vera o yema de huevo y una tasa de enfriamiento de -1°C/min o -2°C/min hasta alcanzar -35°C permite una protección exitosa en el congelamiento de espermatóforos o masa espermática de Litopenaeus vannamei.

Rios Inga (2020), desarrolló su trabajo de investigación con el objetivo de obtener un protocolo para la crio preservación del semen de gamitana (*Colossoma macropomum).* Se trabajó con semen de peces reproductores de las estaciones LLunchicate, distrito de Cajaruro, provincia de Utcubamba, perteneciente a la Asociación de Productores y Servicios Múltiples “Caña Brava” y en el Centro de Investigación Carlos Miguel Castañeda Ruiz, en el caserío de Bello Horizonte, distrito La Banda de Shilcayo en el Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP) de Tarapoto. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Producción de Semen de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM). Se utilizó como crio protectores metanol, Dimetilsulfoxido (DMSO) y Hidroximetilamino (TRIS) con una congelación de 6 minutos a -140°C y colocados en nitrógeno líquido a -196°C; dos alternativas de conservación para el transporte (con y sin solución Hank). Luego del transporte, previa evaluación, se optó por trabajar con el semen con solución Hank (88,35 % de motilidad) en vez del transportado en fresco (84% de motilidad). Con la mejor solución crio protectora (DMSO 4,8%) se obtuvo 93,88% de motilidad.

Briceño Bernal (2020), en su investigación tuvo por objetivo obtener información relevante para la buena manipulación, obtención, transporte y crio preservación de espermatozoides de *Pseudoplatystoma punctifer* (bagre rayado o doncella). Se realizaron pruebas con cuatro soluciones de transporte propuestas por SB, EG y solución B para los espermatozoides desde la zona de muestreo (ZONAS) a temperatura de refrigeración a 4ºC (en una proporción de muestra en relación al medio de 1:4) y 24 medios de crio preservación utilizando crio protectores permeables y no permeables. Las movilidades masales en dichas soluciones de transporte fueron de: 83.57 ± 8.52 y 92.14 ± 2.44% para las soluciones SB y su variación sin yema de huevo, 0 ± 0% para la propuesta por EG y 0 ± 0% para la solución B a las 24 horas, donde, la solución de transporte más adecuada para su almacenamiento durante periodos extendidos fue la SB sin presencia de yema de huevo, independientemente del método de colecta. En las pruebas de citotoxicidad se observó una mayor resistencia en los espermatozoides recuperados desde las gónadas (espermatozoides gonadales) que de los obtenidos mediante eyaculación enfrentados a los medios de crio preservación, mostrando mayor movilidad espermática en el transcurso de las 8 horas evaluadas. Para la crio preservación, la muestra transportada se diluyó en los 24 medios de crio preservación en una proporción de 1:4 (muestra - dilutor), las que fueron cargadas en pajillas de 0.5 mL. Se congeló la muestra utilizando dos metodologías, congelamiento rápido utilizando vapores de nitrógeno líquido y lento mediante el sistema termo controlado. La mayor movilidad espermática progresiva post descongelamiento para cada metodología fueron de (media ± SD) 49.56 ± 11.86% en el medio compuesto por METANOL al 10% asociado a FRUCTOSA al 5.5%, utilizando vapores de nitrógeno líquido; mientras que fue de 35.55 + 6.96% en el medio compuesto por METANOL 15% y GLUCOSA al 5.5% utilizando la congelación lenta. Para ambos casos la proporción de muestra en relación al medio de crio preservación fue de 1:4. Ambos resultados fueron obtenidos de la muestra espermática obtenida gonadalmente. Con estos resultados se concluyen en individuos machos de *Pseudoplatystoma punctifer* en los que por distintos factores (ambientales, alimentación, temporada) sea imposible obtener semen, es posible recuperar espermatozoides, directamente de la gónada mediante cortes, con parámetros espermáticos similares a los obtenidos por masajes. Además, es posible transportar y crio preservar dicho material espermático exitosamente.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Descripción taxonómica de: *Loxechinus albus* "erizo verde"

Phylum : Echinodermata
Clase : Echinoidea
Subclase: Euechinoidea
Superorden: Echinacea
Orden : Echinoida
Familia : Echinidae
Género : *Loxechinus*
Especie : *Loxechinus albus* (Molina, 1782)
(Yamashiro, 1996)

Chirichigno et al (1982), menciona los siguientes nombres comunes:
Perú: erizo verde
Chile: erizo blanco, erizo verde y erizo rojo.

Figura 1.

Loxechinus albus "erizo verde"



Nota. La figura es tomada de IMARPE, 2018.

2.2.2. Distribución geográfica, hábitat, morfología y ecología del *Loxechinus albus* "erizo verde".

Se distribuye a lo largo de la costa suroriental del océano Pacífico, desde el Perú (Isla Lobos de Afuera, 6°53'50S), hasta el extremo austral de Chile (Cabo de Hornos, 55°52"S) (Guisado & Castilla, 1987). Tiene una distribución batimétrica que abarca desde la zona intermareal que se extiende hasta el infralitoral y submareal, habiéndose reportado ejemplares a 340 m de profundidad, (Larraín, 1975, como se citó en Vásquez, 2007a).

El hábitat de esta especie son los substratos rocosos, particularmente grietas y hendiduras, del litoral intermareal y submareal, encontrándose muchas veces asociado a las macroalgas por ser estas su alimento (Zamora y Stotz 1992).

El "erizo verde" en su morfología interna cuenta con cinco gónadas, conocidas como lenguas y un gonoducto corto que se prolonga en dirección aboral desde cada gónada y que desemboca al exterior por un gonoporo situado en una de las cinco gónadas, el cual permite la salida de sus gametos (óvulos y espermatozoides) en el agua de mar, donde ocurre la fecundación (Arrau, 1958).

La ecología del *Loxechinus albus* "erizo verde" muestra un comportamiento gregario (forma grupos desde unos pocos individuos hasta millares) principalmente para protegerse de los depredadores (peces, estrellas de mar y jaibas) y para alimentarse de frondas de algas flotantes o ramonear sobre el sustrato. La dieta del "erizo verde" consiste básicamente de algas marinas, de los géneros *Lessonia*, *Macrocystis, Ulva, Polysiphonia, Porphyra*, etc. De acuerdo a las observaciones sobre su comportamiento trófico (Castilla, 1981).

2.2.3. Reproducción

El *Loxechinus albus* “erizo verde” es una especie dioica que no presenta hermafroditismo, es decir, tiene los sexos separados, aunque no presenta dimorfismo sexual y se estima que el tamaño de primera madurez en las hembras se produce a los 45 mm, mientras que los machos la alcanzan a los 55 mm (Bay-Schmith et al., 1981; SUBPESCA, 1994).

Bendita (2015), reporta que la talla de primera madurez obtenida en un 50% de ejemplares de *Loxechinus albus* “erizo verde”, maduran en 44.4 mm de longitud para hembras y 44.35 mm para ambos sexos.

El ciclo reproductivo en el Perú depende de la latitud geográfica; en la zona sur la época de reproducción es de setiembre a diciembre,(Ayerbe et al., 2018). Sin embargo, Bendita (2015), determinó que el ciclo reproductivo del *Loxechinus albus* “erizo verde” está asociado a los periodos estacionales, identificando el primer periodo de reproducción en la estación de invierno y el segundo pico en primavera donde hubo una tendencia favorable a la maduración. En las estaciones verano y otoño el recurso se encuentra en estado de recuperación y en maduración.

También se determinó los cambios en la proporción sexual del erizo verde, donde evidenciaron el predominio de machos con un 53% sobre las hembras que presentaron el 47%, obteniendo una proporción de 1:1.

La fecundación de los gametos se da después de un minuto; la etapa embrionaria se inicia hasta las 48 horas aproximadamente (Barahona, 2003). La coincidencia de la época de desove con temperaturas bajas, producidas durante los días más cortos del año y seguidas de un período de alta productividad primaria, sugiere fuertemente una relación entre estos fenómenos y el período reproductivo del Loxechinus albus “erizo verde” (Zamora & Stotz, 1992).

2.2.4. Gónadas

El dimorfismo sexual del erizo verde produce que la separación de sexos sea muy difícil de realizar sin un examen histológico y más aún si las gónadas de machos y hembras tienen la misma morfología externa y coloración; aunque ésta última puede variar del amarillo al café oscuro (Bückle, 1973). Es la glándula productora de gametos; puede ser ovario en hembras o testículo en machos.

2.2.5. Gametos

La identificación sexual se puede lograr durante el período de máxima actividad reproductiva, cuando de las gónadas de las hembras fluye un líquido de color anaranjado que contiene los óvulos; mientras que de los machos fluye un líquido blanco constituido por los espermatozoides. (Arana et al., 1996).

Los ovocitos son células de forma esférica y pequeña, de 120 µ aproximadamente. De forma conjunta muestran un color amarillento, su núcleo mide 14.8 µ de diámetro. En algunos ovocitos. encontramos una envoltura mucilaginosa que es atravesada sin dificultad por los espermatozoides en el momento de la fecundación (Arrau, 1958).

Los espermatozoides están formados por una cabeza de 10 µ de largo, la cola nace desde la base de esta y mide 50 µ (Arrau, 1958). Los espermatozoides tienen dos funciones importantes: activar los procesos moleculares del ovulo fertilizado y transmitir el material biológico.

2.2.5.1. Concentración espermática

Un erizo macho puede generar alrededor de 1010 espermatozoides por cada eyaculación a diferencia de un hombre que produce 108 espermatozoides por eyaculación (Cortés et al., 2005).

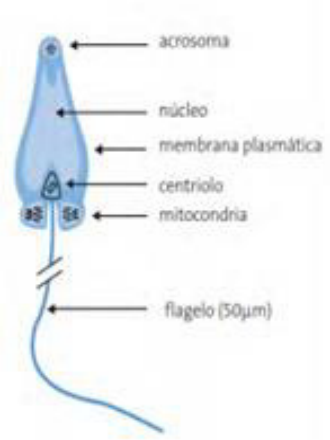
2.2.5.2. Espermatozoide del *Loxechinus albus* "erizo verde"

El espermatozoide del *Loxechinus albus* "erizo verde" es una célula especializada, constituida como cualquier otro espermatozoide por dos partes, una cabeza y un flagelo, la primera contiene enzimas hidrolíticas que ayudan al espermatozoide atravesar al ovocito, contiene el núcleo, la vesícula acrosomal y centriolo.

Dentro de la gónada se presenta una alta concentración de CO2 que hace que el semen mantenga un Ph de 7.2, impidiendo la movilidad de los espermatozoides. Una vez liberados al agua de mar, el CO2 desciende y el Ph es alcanizado, activando la dineína, permitiendo a su vez la respiración mitocondrial y su movilidad (Darszon, 2007).

Figura 2.

Morfología del espermatozoide de *Loxechinus albus* "erizo verde"



Nota. La figura es tomada de Darszon, 2007.

2.2.6. Crio preservación del semen de *Loxechinus albus* "erizo verde"

2.2.6.1. Principios básicos para Crio preservación

- La crio preservación es una técnica mediante la cual el material bilógico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido.
- El proceso de crio preservación incluye 5 etapas: Dilución, refrigeración, adición del crío protector, congelación y descongelación. Mientras algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Holt, 2000).

2.2.6.2. Diluyentes

"Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado" (Carballo, 2005).

Los diluyentes seminales tienen como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, asimismo los diluyentes son la parte más importante de la crio preservación, ya que prolonga la sobrevivencia y motilidad de los espermatozoides. Para que un diluyente sea efectivo debe contener sustancias lo más parecido al plasma seminal, por ello un diluyente debe tener ser una fuente de energía (azúcares).

(Fernández, 2013) afirma que: "los diluyentes de origen animal contienen hormonas propias como la progesterona, que en condiciones naturales inician la capacitación espermática y por ende la reacción acrosomal, por ello es posible que en condiciones de congelamiento la calidad del semen (viabilidad, motilidad y daño acrosomal) se vea afectada por la interacción de dicha hormona con el acrosoma".

Mientras los ACPs (Agentes Crioprotectantes), son esenciales para la supervivencia celular durante la criopreservación, su adición y eliminación posterior crea un medio ambiente anisosmótico para las células, lo que resulta en una modificación de su volumen y un potencial daño. Durante la adición de un ACP permeable a una suspensión de células, éstas se exponen a un entorno hiperosmótico.

Las células primero se contraen debido al agua que sale a través de la membrana plasmática, y luego se hinchan según el ACP entra en la célula y el agua vuelve a entrar para mantener el potencial químico. Durante la eliminación de un ACP, las células inicialmente se hinchan debido a un influjo de agua, y luego vuelven lentamente a un volumen normal (isosmótico) conforme el ACP y el agua salen de la célula. Los cambios repetidos en la osmolaridad pueden resultar en una pérdida significativa de la integridad funcional, tal como la motilidad espermática, o incluso la muerte celular, sin pérdida de integridad de la membrana plasmática.

Además de causar daño osmótico, los ACP pueden causar pérdida de la viabilidad debido a su propia toxicidad química. En este sentido, una pérdida de motilidad de los espermatozoides puede ser el resultado de la exposición prolongada a ACPs, siendo esta sensibilidad diferente de acuerdo a cada especie (variando con respecto al tipo y concentración de los ACPs que pueden tolerar), (Aisen,2014).

Como sabemos, el proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación del semen; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a tiempo indeterminado para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura.

2.2.6.3. Azúcares

Los azúcares son componentes importantes en los diluyentes, ya que pueden actuar como fuente de energía para los espermatozoides durante su almacenamiento. Como es el caso de la glucosa y de la fructuosa, o bien como crío protector ya que también actúan manteniendo o incrementando la presión osmótica de manera extracelular en el espermatozoide, lo que permite mantener la integridad de la membrana espermática al almacenamiento por un largo período (McDonald, 1991; Salamon & Maxwell, 1995).

Existen diferentes opiniones sobre el tipo de azúcar que se debe agregar al diluyente, por una parte, los espermatozoides pueden tolerar una doble presión osmótica por parte de los monosacáridos gracias a la capacidad de estos para penetrar en la célula, lo cual logra que el metabolismo sea más eficiente en el semen, sin embargo, los disacáridos como la sacarosa han sido utilizados porque se ha observado que protege la integridad acrosomal (Holt, 2000).

Durante la refrigeración de semen, la función principal de los azúcares es proveer el sustrato energético requerido por los espermatozoides para el desempeño normal de sus funciones, siendo la glucosa uno de los azúcares mejor utilizados por la célula espermática y células en general (Rigau et al. ,2002). El efecto benéfico de la sacarosa se explicaría por la posible existencia de sitios de unión específicos para este disacárido.

Los azúcares de bajo peso molecular (fructuosa, glucosa) que pasan a través de la membrana celular sirviendo como fuente de energía para el espermatozoide, agentes protectores de membrana , que contienen macromoléculas que protegen contra el shock por frío, y agentes crio protectores permeables glicerol, polialcoholes y no permeables (trehalosa y sacarosa) ; los primeros son sustancias de bajo peso molecular que atraviesan la membrana plasmática, evitando la formación intracelular de cristales de hielo y la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta (Medeiros et al., 2002).

Fernández-Novell et al. (2004) observaron en espermatozoides de perro que la glucosa, pero no la fructosa, puede activar específicamente la proteína quinasa AKT, implicada en la regulación de varios procesos metabólicos celulares importantes. Esto implica que la glucosa activaría directamente todos los caminos AKT-regulados del espermatozoide canino.

Los estudios realizados por Rigau et al. (2002), indican que los distintos efectos funcionales de la glucosa y la fructosa sobre el espermatozoide canino, son el resultado de diferencias en las rutas metabólicas que mantienen el equilibrio de su estatus energético. La fructosa, con respecto a la glucosa, mostró un incremento de velocidad en las rutas metabólicas y, por lo tanto, en la formación de ATP. La fructosa, al aumentar el índice de consumo de ATP relacionado a motilidad, da lugar a un patrón específico más rápido y linear que el observado con la glucosa (Rigau et al., 2001), dedicándose la mayor parte del consumo de energía del espermatozoide al mantenimiento de dicha motilidad.

El efecto de la fructosa sobre la motilidad, se encontraría relacionado a un fuerte aumento en el índice de fosforilación de las hexosas con respecto a la glucosa. Este aumento, sumado al consumo de ATP en la fosforilación de tirosina, podría llevar al establecimiento del substrato que completa el ciclo en el cual se genera la energía que se pierde inmediatamente. Una caída en los niveles intracelulares de ATP induciría lógicamente, a un incremento inmediato del ADP, el cual a su vez activaría el ritmo glucolítico y aumentaría la formación de ATP. Cuando el ATP recobrara niveles altos, se produciría una bajada simultánea de los niveles de ADP, con la consecuente disminución en el ritmo glucolítico (Hammersted y Lardy, 1983). Este fenómeno de retroalimentación causaría una tasa elevada en el consumo y posible agotamiento de la fructosa aportada en el diluyente. Eso indica la importancia de escoger el tipo y concentración adecuada de azúcar, puesto que pequeñas variaciones podrían originar grandes cambios en el estado funcional, y por lo tanto en la capacidad de supervivencia de los espermatozoides almacenados en refrigeración.

2.3. Definición de Términos

2.3.1. Viabilidad

La viabilidad del embrión, es la suma de la calidad del óvulo y del espermatozoide (Dzyuba & Cosson, 2014). Las técnicas más utilizadas para evaluar la viabilidad espermática son los métodos por coloración selectiva Nigrosina - Eosina para espermatograma, preparando las soluciones se obtiene la mezcla final que contiene 14 ml de solución de eosina y 50 ml de solución de nigrosina. Con una proporción 1:1 (semen: colorante), se realiza un conteo para obtener el porcentaje de células viva.

Los espermatozoides vivos no absorben el colorante ya que cuentan con una membrana plasmática intacta, mientras que, en los espermatozoides muertos, el colorante internaliza la célula porque tiene una membrana no funcional.

La capacidad de los espermatozoides de conservar las características funcionales, morfológicas y de capacitación se ven reflejadas en la viabilidad, siendo esta una valoración muy importante al momento de realizar una inseminación artificial, concordando lo que señala Trejo, Meza, Antonio, Cotera y Antonio (2013).

2.3.2. Motilidad

La Motilidad es el porcentaje de células vivas que se deslizan en cualquier dirección, sin importar la velocidad a que lo hagan, se coloca una gota de semen sin diluir sobre una lámina porta-objetos, se realiza un extendido y se observa al microscopio para verificar, en primera 'Instancia, la inactividad del esperma. Se agrega una gota de agua para activarlo y se observa inmediatamente, asignando una calificación en porcentaje (Sorensen, 1982).

Si los porcentajes de motilidad superan el 80%, se realizan pruebas para la Motilidad en tiempo para lo cual, con la ayuda de un cronómetro se procede a medir el tiempo desde el momento de la activación con agua o solución salina hasta que la mayoría de espermatozoides cesan sus movimientos o presentan un leve temblor.

Se reconocen básicamente tres movimientos: uno rápido y vibrante con el mayor poder fecundante, un segundo en que la vibración generalmente decae y un tercero en el que cesa todo movimiento (Rodríguez, 1992).

El tiempo de motilidad varía de acuerdo con la especie y al activador que se utilice, soluciones salinas como cloruro de sodio y bicarbonato de sodio a bajas concentraciones prolongan por algunos minutos la motilidad en peces de agua dulce.

La motilidad es quizás el parámetro más cercano para medir la viabilidad de los espermatozoides. Basados en este supuesto, la observación visual de la motilidad es el criterio más comúnmente utilizado para estimar la viabilidad espermática, pero es un método inexacto, puesto que es subjetivo y depende del observador.

Depende de factores intrínsecos (estructura del flagelo, actividad enzimática), y de factores extrínsecos (composición bioquímica del medio extracelular en el que se encuentra el espermatozoide, plasma seminal, moco cervical, etc.). En la valoración de la motilidad espermática hay un aspecto cuantitativo, o porcentaje de espermatozoides con movilidad, y un aspecto cualitativo, o velocidad y direccionalidad de los espermatozoides (Rutter y Russo, 2006, p. 74).

2.3.3. Los ACP (Agentes Crioprotectantes):

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor.

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido, los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular, (Ávila et al.,2006).

Se pueden dividir en dos tipos: crioprotectantes penetrantes y no penetrantes a la membrana plasmática.

- Crioprotectantes penetrantes: Los crioprotectores permeables ingresan a la célula penetrando la membrana celular, debido a que poseen bajo peso molecular tales como el glicerol, metanol, etilénglicol , dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros (Suquet et al., 2000). Estas sustancias van a permitir la congelación de la célula sin la formación de cristales de hielo, reduciendo las interacciones entre las moléculas de agua (Vincent et al., 1998).

- Crioprotectantes no penetrantes, como los azúcares: Son aquellas sustancias que no penetran la membrana celular a causa de su alto peso molecular. Estos crioprotectores son utilizados para remover osmóticamente el agua dentro de la célula, para luego ser reemplazado por los crioprotectores permeables en el proceso de enfriamiento. Además, previene el choque osmótico controlando la rehidratación intracelular durante el proceso de criopreservación, (Medina et al., 2005). Son los azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa o trehalosa y las proteínas que podemos encontrar en la yema de huevo, glucosa, trehalosa y sacarosa, entre otros.

2.3.4. La sacarosa:

La glucosa, la fructosa y la galactosa, son monosacáridos o azúcares simples; la lactosa, maltosa y sacarosa son disacáridos, formados por la condensación (unión) de dos azúcares monosacáridos iguales o distintos. La sacarosa está constituida por glucosa y fructosa.

La sacarosa o azúcar común es un disacárido formado por alfa-glucosa y beta-fructosa. Su nombre químico es: alfa-D-glucopiranosil (1->2)-beta-D-fructofuranósido. Su fórmula química es: (C12H22O11). Es un disacárido que no tiene poder reductor sobre el licor de Fehling.

El azúcar de mesa es el edulcorante más utilizado para endulzar los alimentos y suele ser sacarosa. En la naturaleza se encuentra en un 20% del peso en la caña de azúcar y en un 15% del peso de la remolacha, de la que se obtiene el azúcar de mesa. La miel también es un fluido que contiene gran cantidad de sacarosa parcialmente hidrolizada.

La sacarosa es un "disacárido no permeable de alto peso molecular (Mayes, 1997). La sacarosa indica un efecto crío protector. Este disacárido, "tiene acción protectora sobre la integridad de la membrana y la estructura proteica durante la deshidratación y rehidratación celular" (Aisen et al., 2000).

En la actualidad y desde hace años, el procedimiento de retirada del crioprotector con un agente no permeable de elevado peso molecular, habitualmente la sacarosa, es el más empleado (Leibo, 1989); esta macromolécula, actúa como una fuerza osmótica que restringe el movimiento de agua a través de la membrana, lo que evita el incremento de volumen de la célula que se produciría cuando el crioprotector sale de las células, recuperando su volumen normal tras el paso a una solución fisiológica. Existe una discusión abierta en la literatura científica sobre la concentración de sacarosa que resulta más eficaz para la retirada del crioprotector, que generalmente se relaciona con el agente crioprotector que se utiliza, (García et al., 1992).

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y Nivel de Investigación

- De acuerdo a la Resolución C. O. N° 059-2022-UNAM, el presente trabajo se acoge a la línea de investigación "LI. 29: Diversificación en pesca y acuicultura". El tipo de investigación según su finalidad es Aplicada, en vista que los conocimientos obtenidos serán empleados ante una realidad problemática inmediata; obedeciendo la naturaleza de los datos de manera cuantitativa.
- El diseño de la investigación es experimental pues se estableció una relación donde se observa el efecto causado por la variable independiente sobre la variable dependiente.
- El nivel de investigación es: Explicativo.

3.2. Ámbito Temporal y Espacial

En el litoral costero de las regiones de Moquegua y Tacna, existen bancos naturales de invertebrados marinos bentónicos que son objeto de fuerte explotación por la flota marisquera (buceo a compresora) así como, por buzos pulmoneros y saltamocheros por orilla desde la década de 1990. Actualmente, se dispone de información localizada y puntual sobre principales zonas de extracción por recursos. Bancos naturales en Moquegua: En el sector sur, cuenta con nueve bancos naturales que se distribuyen desde Patillos hasta Tancona, (Tejada et al, 2016).

- Zona de extracción de *L. albus* en Moquegua: Corralitos.

Figura 3. Ubicación de la zona de extracción de *L. albus* en Moquegua



Nota: Adaptado de Bancos Naturales de Invertebrados Marinos en las Regiones Moquegua Y Tacna, (Tejada et al, 2016).

Mientras que la ejecución del experimento se hizo en el laboratorio del Semillero de Investigación en Producción Acuícola Sostenible – SICPAS – UNAM. Donde se realizó el experimento en su totalidad, con las diligencias respectivas y necesarias.

3.3. Población y Muestra

3.3.1. Población

Para la ejecución del proyecto, se colectaron un promedio de 30 erizos, extraídos de la zona de Corralitos durante los meses de junio y octubre del 2022.

3.3.2. Muestra

Los individuos fueron evaluados al azar en base a criterios de inclusión y exclusión, los organismos seleccionados, fueron los que obtuvieron una talla reproductiva mediante la biometría y erizos machos que realizaron la espermiación mediante la inducción, aplicando 0.5 M de KCl.

Una vez que los reproductores respondieron al proceso de inducción a la espermiación, se hizo la colecta de semen en un volumen de 1 ml de semen aprox. en una jeringa de tuberculina y se mezcló con solución sacarosa en tratamientos de concentración de: 0.8 M, 0.6 M, 0.4 M, 1 M y 0 M (semen puro).

3.4. Instrumentos

3.4.1. Materiales

- 02 Envases de plástico (40 lts)
- 02 Termómetros digitales
- 01 Micropipeta (0-100 ul)
- 01 Micropipeta (10-1000ul)
- 01 Soporte de micropipetas
- 01 Caja de Tips (0.1 ml)
- 01 Caja de Tips (1ml)
- 01 Caja de Tiras de pH
- 80 Jeringas
- 02 Vasos precipitados de (250 ml)
- 03 Vasos precipitado de (500 ml)
- 02 Coolers de (20lts)
- 06 Gelpacks
- 03 Frascos de 500ml
- 30 Vasos acrílicos por ensayo
- 200 Tubos de Eppendorf

- 02 Verniers
- 15 Placas de petri
- 01 Caja de Portaobjetos
- 01 Soporte de celular
- 02 Plumones permanentes

3.4.2. Equipos

- 02 Balanzas grameras
- 01Vortex
- 01 Microscopio binocular
- 01 Refrigerador
- 01 Cámara fotográfica digital
- 01 Laptop i3
- 01 Refractómetro digital (marca SOONDA)

3.4.3. Insumos Químicos

- Sacarosa (240 gr)
- Cloruro de Potasio (KCl a 0.5 M)

3.5. Procedimientos

3.5.1. Extracción de *L. albus* reproductores

Se colectaron un promedio de 30 erizos, los erizos fueron extraídos de la zona de Corralitos, mediante buceo semiautónomo, usando embarcación con motor fuera de borda implementada con compresora para surtir de aire al buzo colector, el buzo introdujo los erizos extraídos a una bolsa de malla (capacho) evitando deteriorar los ejemplares.

Una vez que el buzo se encontró en la cubierta, los erizos fueron estibados en dos cajas isotérmicas (coolers) con agua de mar sobre una camilla de algas pardas y gel packs para mantener la temperatura del agua y evitar el estrés en los individuos para su posterior traslado.

Figura 4. Extracción de erizos verdes



Nota: Extracción de erizos verdes en la zona de Corralitos en el puerto de Ilo, mediante buceo semiautónomo.

Figura 5. Estibado en cajas isotérmicas (coolers)



Nota: Erizos verdes puestos en agua de mar sobre una camilla de algas pardas y gel packs.

3.5.2. Traslado y acondicionamiento de *L. albus* reproductores

Posterior a la extracción se hizo el traslado de erizos en los coolers con agua del medio, el acondicionamiento se realizó en el laboratorio del Semillero de Investigación en Producción Acuícola Sostenible – SICPAS – UNAM, donde los erizos fueron colocados con una densidad de 15 erizos macho: hembra aprox. por recipientes de 40 L, con agua del mismo punto de extracción, además de agregar una camilla de algas pardas y gel packs para mantener la temperatura del agua en promedio de 14-16 °C. y con aireación artificial.

Figura 6. Acondicionamiento de erizos verdes



Nota: Erizos verdes acondicionados en recipientes de 40 L con termómetros para la toma de T°.

3.5.3. Selección de *L. albus* reproductores por Biometría e Inducción

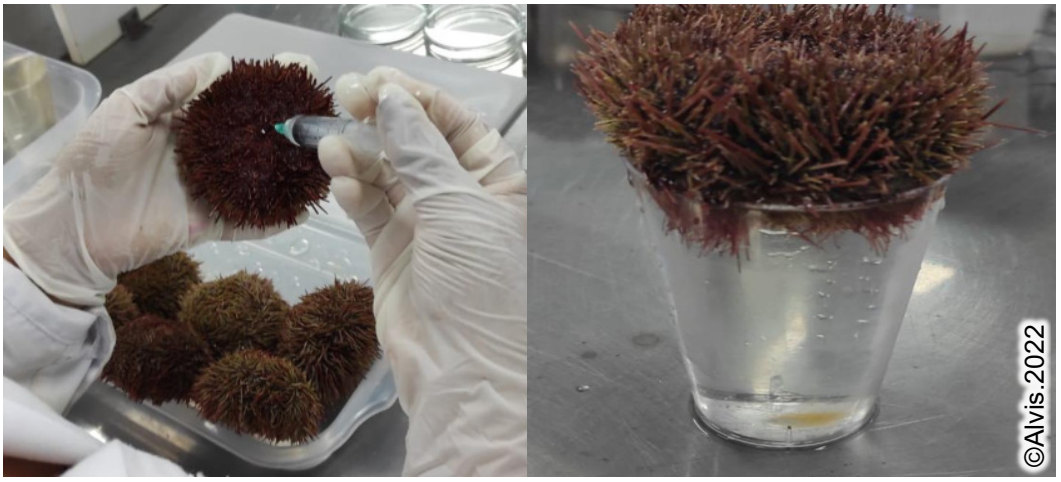
En base a criterios de inclusión y exclusión, los organismos seleccionados, fueron los que obtuvieron una talla reproductiva mediante la biometría, obteniendo tallas y pesos, registrados en una hoja de cálculo de Excel. Los ejemplares fueron inducidos al desove para determinar el sexo y discriminar las hembras y solo seleccionar machos, los erizos se distribuyeron sobre vasos de policarbonato conteniendo agua de mar, teniéndose en cuenta que fueron colocados en la posición aboral (ubicación de estructuras reproductivas) buscando el contacto con el agua de mar, ya distribuidos los erizos, se empleó la técnica de inducción química con los erizos sexualmente maduros , según manual: "cultivo de erizo comercial *Loxechinus albus* en la región Moquegua" (IMARPE,2018), se procedió a inyectar en la membrana peristomal 3 ml de KCl a 0.5 M para la liberación de gametos. Las hembras evacuaron los gametos (óvulos) color amarillo-naranja y los machos (espermios) color blanquecino.

Figura 7. Biometría de erizos verdes



Nota: Toma de peso y talla de erizos verdes, con base a criterios de inclusión y exclusión.

Figura 8. Inducción al desove de erizos verdes



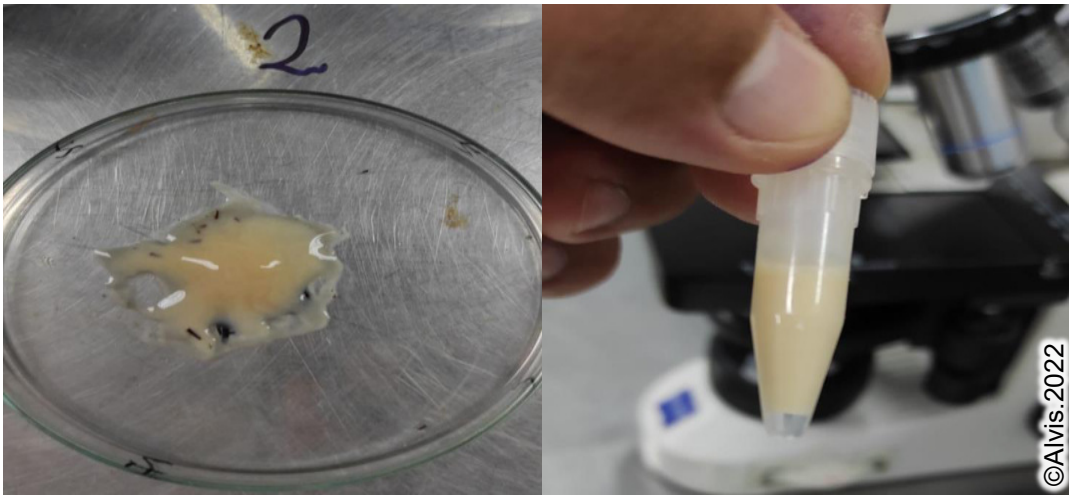
Nota: Inducción al desove, inyectando en la membrana peristomal 3 ml de KCl a 0.5 M.

3.5.4. Colecta de muestra

Una vez que los reproductores realizaron la espermiación, fueron separados en placas Petri, colocando la parte aboral de los erizos machos hacia arriba para evitar su activación. Después de una hora de espera, buscando el total de eyaculado del individuo, se hizo la colecta de semen en un volumen de 1 ml aprox. de semen por macho, en tubos de Eppendorf. Las muestras de semen colectadas pasaron a dividirse en otros tubos de Eppendorf, en una dilución de 200 ul de semen: 200 ul de tratamiento de Sacarosa es decir una dilución de 1:1, cada muestra mezclándose con solución sacarosa con ayuda de jeringas de tuberculina, en tratamientos de concentración:

- Ensayo 1: T1= 0.8M, T2= 0.6M, T3= 0.4 M, con 3 réplicas por tratamiento respectivamente.
- Ensayo 2: T1= 0.8M, T2= 0.6M, T3= 0.4 M, T4= 1 M, T5= 0 M, con 3 réplicas por tratamiento respectivamente.

Figura 9. Colecta y dilución de la muestra de esperma de erizo verde



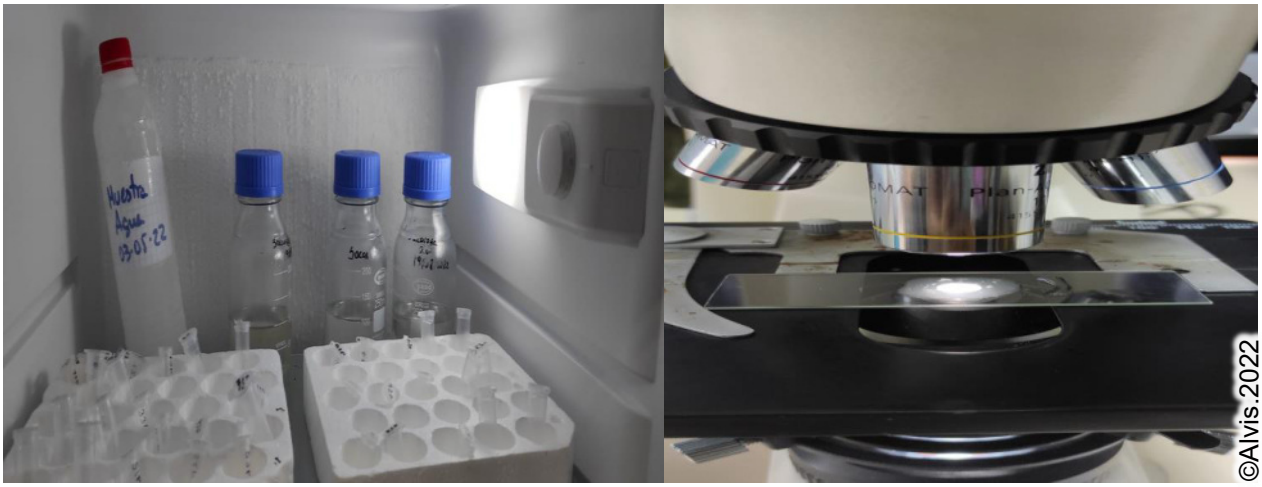
Nota: Colecta de muestra de esperma de erizo verde en tubos de Eppendorf y dilución con los tratamientos de Sacarosa**.**

3.5.5. Obtención de datos

Las muestras ya colectadas, pasan a ser refrigeradas a 4°C, teniendo en cuenta como un paso previo, la observación de inmotilidad de las muestras se hizo por microscopía directa con el objetivo de 40x, por consiguiente, teniendo nuestras muestras de semen con sus respectivos tratamientos refrigeradas, se procedió con las lecturas, para analizar nuestras muestras, se coloca 5ul de muestra sobre el portaobjeto.

Posteriormente se activa a los espermatozoides con unas gotas de agua de mar, para obtener datos de motilidad de los espermios colectados, mediante videos obtenidos por medio de la cámara sujetada en el microscopio.

Figura 10. Refrigeración y microscopia directa de las muestras de esperma de erizo verde



Nota: Refrigeración de las muestras a 4°C y microscopía directa con el objetivo de 40x.

3.5.6. Procesamiento de los videos obtenidos por microscopia directa

El procesamiento de los videos obtenidos por microscopía se hizo utilizando el software de libre distribución ImageJ y especialmente su versión Fiji (Fiji is Just ImageJ), cuyo programa nos brinda datos de motilidad mediante indicadores de Velocidad de los espermios.

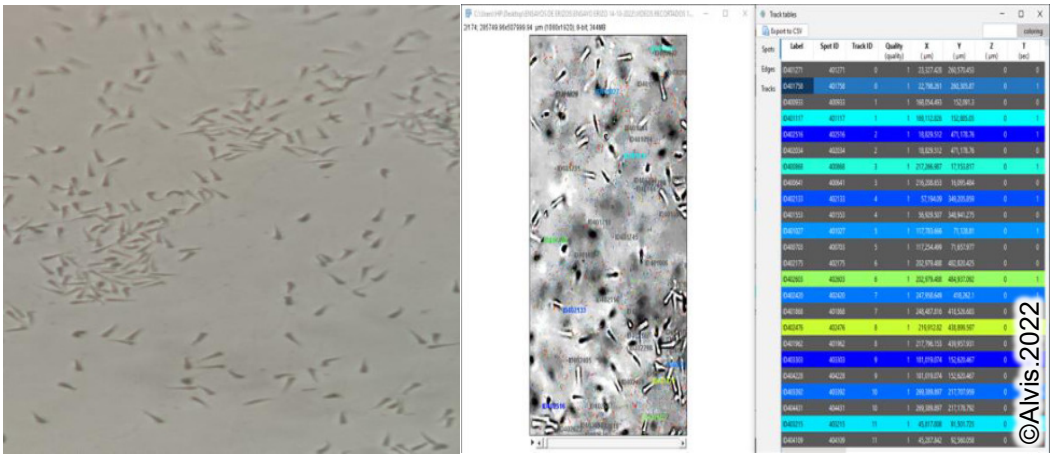
3.5.7. Análisis de los datos obtenidos del diseño experimental

Se empleó el diseño de experimentación factorial, con un arreglo factorial simétrico, en donde el primer factor era la concentración de sacarosa y el segundo factor macho, esto con el fin de evaluar los efectos de las interacciones o efectos simples de estos dos factores sobre las variables espermáticas planteadas.

- Ensayo1 = 1 Variable x 3 tratamientos x 3 réplicas
- Ensayo2 = 1 Variable x 5 tratamientos x 3 réplicas

La obtención de datos se da según la tabla 2 y tabla 3, así mismo para el procesamiento de los datos se utilizó el software libre INFOSTAT versión 2020, para la medición de las longitudes necesarias y posterior cálculo de los indicadores de velocidad de los espermios, como datos de motilidad. Para determinar la diferencia significativa se usó el modelo estadístico de Análisis de Varianza (ANOVA).

Figura 11. Procesamiento de los videos obtenidos por microscopía



Nota: Procesamiento, análisis mediante Fiji (Fiji is Just ImageJ), y evaluación de los datos.

Tabla 2. Diseño experimental del ensayo 1

	Vi: Concentración de Sacarosa (HÍ)		
	T_1= 0.8 M	**T_2= 0.6 M**	**T_3= 0.4 M**
24 Hrs	R_1	R_1	R_1
	R_2	R_2	R_2
	R_3	R_3	R_3

Nota. Elaboración propia (2023).

Tabla 3. Diseño experimental del ensayo 2.

	Vi: Concentración de Sacarosa (HÍ)				
	T1	T2	T3	T4	T5
48 Hrs	R_1	R_1	R_1	R_1	R_1
	R_2	R_2	R_2	R_2	R_2
	R_3	R_3	R_3	R_3	R_3
72 Hrs	R_1	R_1	R_1	R_1	R_1
	R_2	R_2	R_2	R_2	R_2
	R_3	R_3	R_3	R_3	R_3
96 Hrs	R_1	R_1	R_1	R_1	R_1
	R_2	R_2	R_2	R_2	R_2
	R_3	R_3	R_3	R_3	R_3
120Hrs	R_1	R_1	R_1	R_1	R_1
	R_2	R_2	R_2	R_2	R_2
	R_3	R_3	R_3	R_3	R_3

Nota. Elaboración propia (2023).

Tabla 4. Diseño experimental de la Tasa de mortalidad (%)

	TRATAMIENTO / (% MORTALIDAD)				
	T1 (0.8M)	T2 (0.6M)	T3 (0.4M)	T4 (1M)	T5 (0M)
TIEMPO DE REFRIGERACION	24 Hrs	24 Hrs	24 Hrs	24 Hrs	24 Hrs
	48 Hrs	48 Hrs	48 Hrs	48 Hrs	48 Hrs
	72 Hrs	72 Hrs	72 Hrs	72 Hrs	72 Hrs
	96 Hrs	96 Hrs	96 Hrs	96 Hrs	96 Hrs
	120 Hrs	120 Hrs	120 Hrs	120 Hrs	120 Hrs

Nota. Elaboración propia (2023).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa sobre la motilidad en espermatozoides de *Loxechinus Albus* "Erizo Verde".

El ensayo 1 nos muestra una motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima), para todas las unidades experimentales de los tres tratamientos (0.8M), (0.6M) Y (0.4M), presentando una distribución que se aparta de la normalidad de datos ($p<0.05$), obteniendo un valor $p=0.0001$, esto nos muestra que las unidades experimentales presentan diferencias significativas. Dando como resultado del ensayo 1 una motilidad con indicadores de velocidad máxima de (3968.75 ± 0 µm/s) y una motilidad con velocidad mínima de (1973.37 ± 0 µm/s).

Tabla 5. Tabla resumen descriptivo de los datos estadísticos obtenidos del modelo Análisis de Varianza (ANOVA) del ensayo 1.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Velocidad maxima (µm/sec)/Tratamiento	63316016.18	2	31658008.09	41.76	0.0001
Error	1693011383	2233	758177.96	/	/
Total	2260132660	2249	/	/	/

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Velocidad media (µm/sec)/Tratamiento	31054833.9	2	15527416.95	39.89	0.0001
Error	869219826.8	2233	389261.01	/	/
Total	1325819876	2249	/	/	/

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Velocidad minima(µm/sec)/Tratamiento	15398905.48	2	7699452.74	19.6	0.0001
Error	877295243.1	2233	392877.4	/	/
Total	1191081754	2249	/	/	/

Nota. Esta tabla muestra de forma resumida el p-valor del ensayo 1, dándonos la significancia entre las variables mediante el modelo ANOVA.

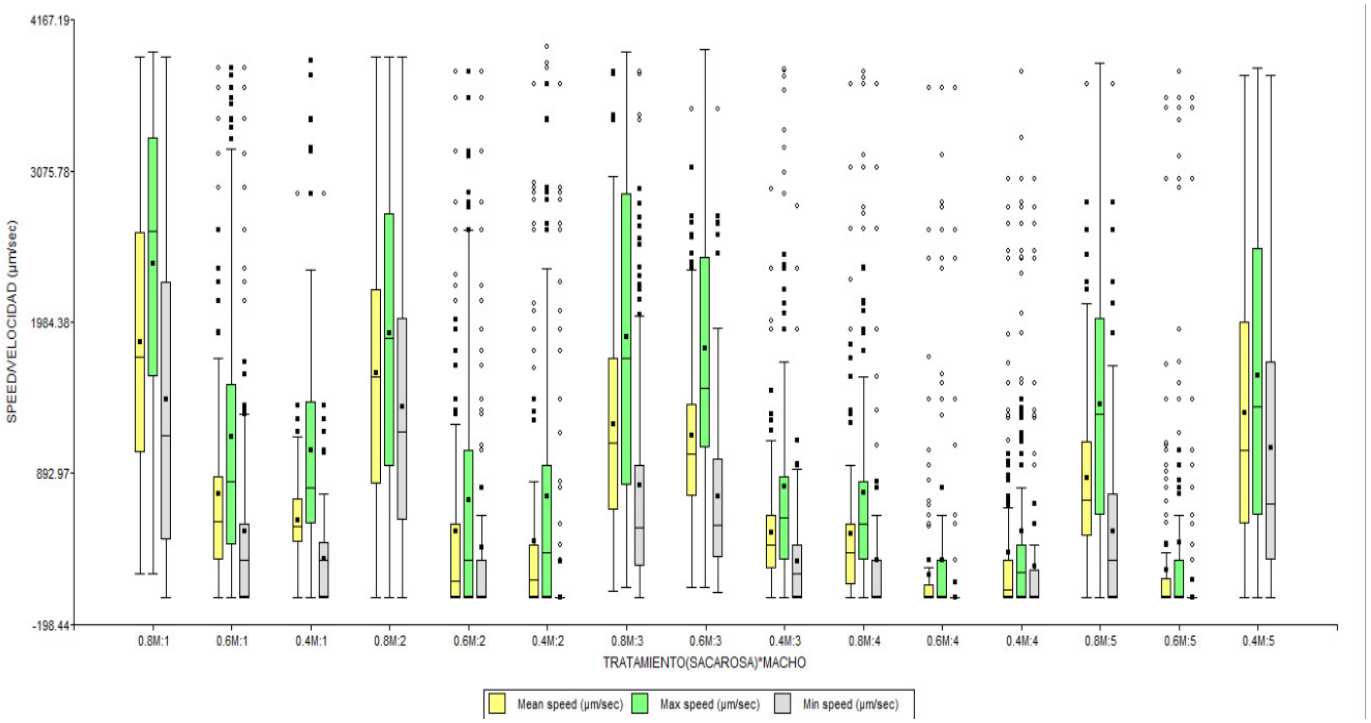
Asimismo, el ensayo 2 nos muestra una motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima), para todas las unidades experimentales de los cinco tratamientos T1= 0.8 M, T2= 0.6 M, T3= 0.4 M, T4= 1 M, T5= 0M, presentando una distribución que se aparta de la normalidad de datos ($p<0.05$), obteniendo un valor $p=0.0001$, las unidades experimentales muestran diferencias significativas en torno al tiempo de almacenamiento (Hrs) en refrigeración. Dando como resultado del ensayo 2 una motilidad con indicadores de velocidad máxima de (3933.31 ± 0 µm/s) y una motilidad con velocidad mínima de (2958.13 ± 0 µm/s).

Tabla 6. Tabla resumen descriptivo de los datos estadísticos obtenidos del modelo Análisis de Varianza (ANOVA) del ensayo 2.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Velocidad máxima (µm/sec) /Tratamiento	175965211.98	5	35193042.40	27.75	0.0001
Error	3794937745.37	2992	1268361.55	/	/
Total	3979297159.76	2999	/	/	/
Velocidad media (µm/sec) /Tratamiento	232717836.78	5	46543567.36	54.79	0.0001
Error	2541720006.92	2992	849505.35	/	/
Total	2781316722.74	2999	/	/	/
Velocidad mínima(µm/sec) /Tratamiento	251083134.07	5	50216626.81	59.97	0.0001
Error	2505564037.49	2992		/	/
Total	2761630412.12	2999	/	/	/

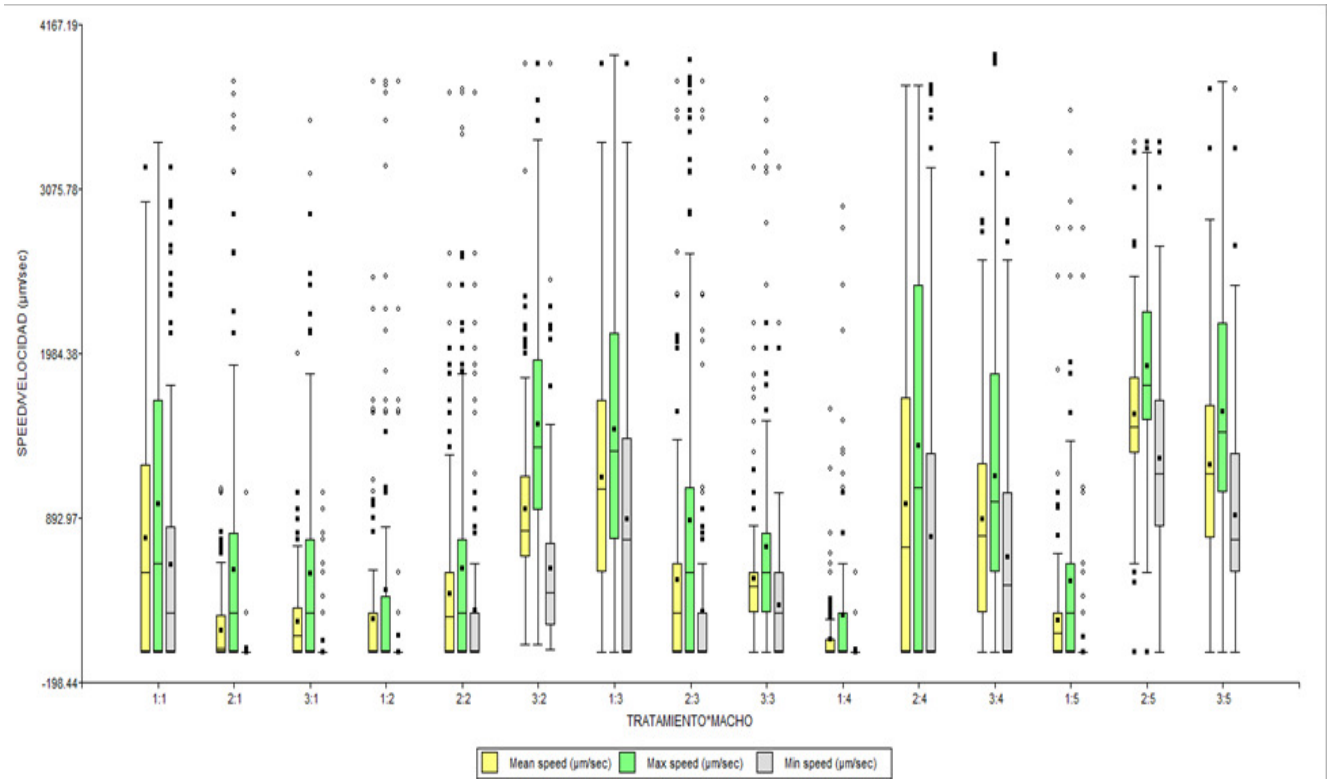
Nota. Esta tabla muestra de forma resumida el p-valor del ensayo 2, dándonos la significancia entre las variables mediante el modelo ANOVA.

Figura 12. Gráfico de cajas (Box-Plot), INFOSTAT: Varianza de la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales de 5 machos del ensayo 1.



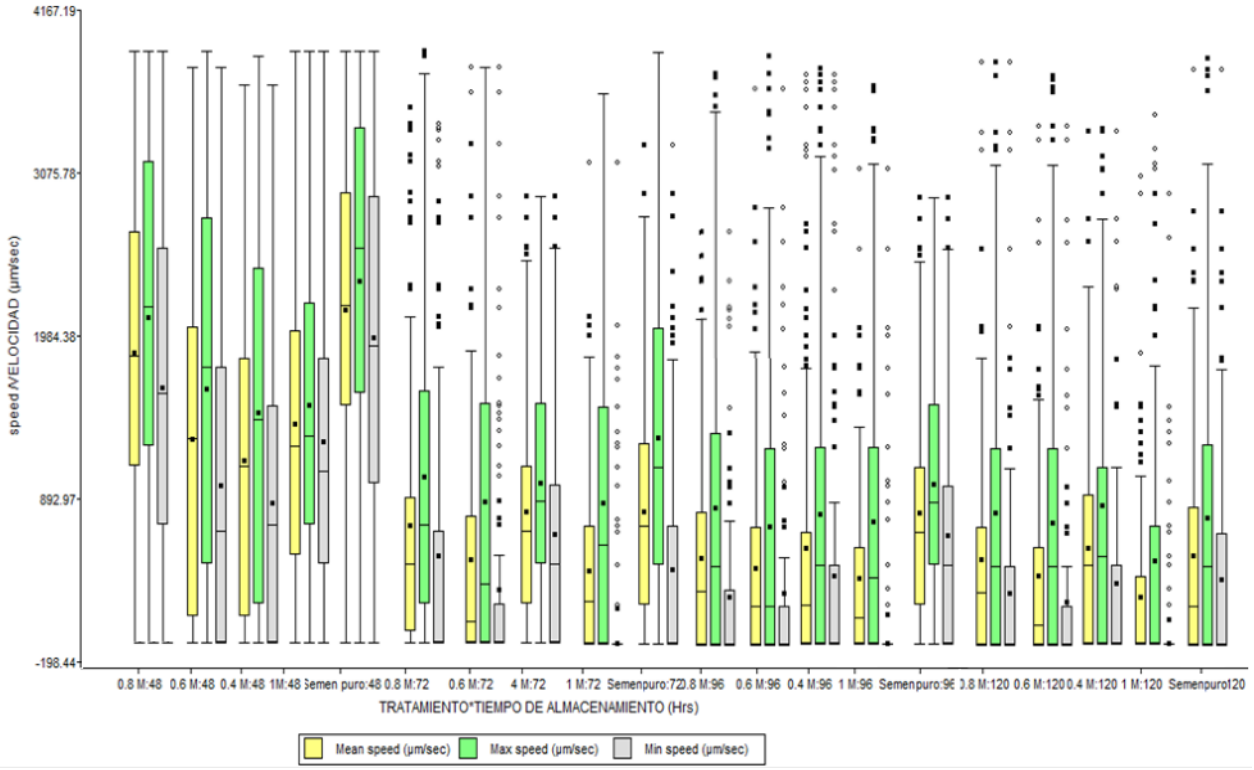
Nota. Esta figura muestra los valores de motilidad por macho sobre los tratamientos en µm/s, del ensayo1

Figura 13. Gráfico de cajas (Box-Plot), INFOSTAT: Varianza de la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales de 5 machos del ensayo 1.



Nota. Esta figura muestra los valores de motilidad por macho sobre los tratamientos en µm/s, del ensayo1

Figura 14. Gráfico de cajas (Box-Plot), INFOSTAT: Varianza de la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales en torno al tiempo de almacenamiento (Hrs) en refrigeración del ensayo 2.



Nota. Esta figura muestra los valores de motilidad por macho sobre los tratamientos en µm/s, del ensayo2

Según lo reportado por Atencio et.al, (2017), los resultados de las características seminales de *B. moorei*, "dorada" , de su estudio son los primeros registros para machos mantenidos en cautiverio, los valores de movilidad total (84,0±3,2%), progresividad total (52,4±8,8%), velocidad curvilínea (118,7±23,1 μm/s) y velocidad lineal (65,9±15,7 μm/s) de semen fresco fueron mayores con respecto a los registrados en semen descongelado ($p<0,05$). El semen fresco también registró el mayor porcentaje de espermatozoides con movilidad rápida (44,0±9,6%) y media (16,6±4,7%) y el menor porcentaje de espermatozoides estáticos (17,0±3,7%), se observó diferencia significativa con relación a los registros del semen descongelado. Las velocidades espermáticas (curvilínea y lineal) del semen descongelado se redujeron en más del 60 %; mientras que la progresividad total disminuyó en más del 80 % con relación a los registros de semen fresco. A pesar que en estas variables, en el semen descongelado, no hubo diferencia estadística entre las tres inclusiones de DMSO probadas (5, 10 y 15 %), se observa una tendencia de menores velocidades y progresividad a medida que aumenta la inclusión del crio protector. Por otro lado, Hassan et.al, (2017) desarrollaron un protocolo para crioconservar esperma de la ostra plana australiana Ostrea angasi mediante la optimización de los factores clave que influyen en la calidad del esperma crioconservado, demostraron que el dimetilsulfóxido (DMSO), produjo una mayor motilidad espermática tras la descongelación entre los tratamientos con un único crioprotector. La inclusión de trehalosa o glucosa con DMSO aumentó aún más la motilidad (%), demostrando que los diluyentes tienen efecto sobre la motilidad de la esperma y que la disponibilidad de espermatozoides crio conservados viables abriría una opción para futuros programas de cría y mejora genética de la ostra plana australiana. Asimismo, en nuestro estudio mediante el ensayo 1 y ensayo 2 observamos las velocidades espermáticas (velocidad media, velocidad máxima y velocidad lenta) de *L. albus*, que si mostraron diferencia significativa con relación a los diferentes tratamientos de solución de sacarosa, coincidiendo con Atencio et.al, (2017), que el semen fresco también registró mayor número de espermatozoides con movilidad rápida y el menor número de espermatozoides estáticos, por otro lado teniendo en cuenta que el tratamiento 0M (semen puro) del ensayo 2 sin la necesidad de la sacarosa como diluyente obtuvo mayor número de espermatozoides con motilidad (%) a diferencia de Hassan et.al, (2017) que con la inclusión de trehalosa o glucosa con DMSO aumentó aún más la motilidad (%) en espermatozoides.

4.2. Efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa sobre la mortalidad en espermatozoides de *Loxechinus Albus* "Erizo Verde".

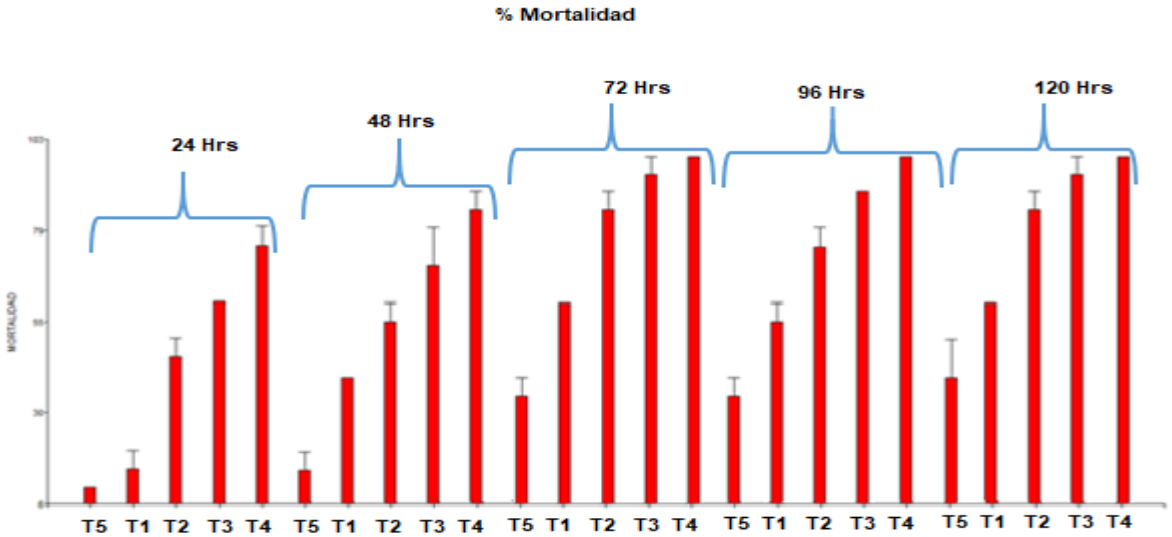
Los resultados de los ensayos nos muestran indicadores de tasa de % mortalidad, para todas las unidades experimentales de los diferentes tratamientos, presentando una distribución que se aparta de la normalidad de datos ($p<0.05$), obteniendo un valor $p=0.0001$ esto nos muestra que las unidades experimentales presentan diferencias significativas. Teniendo como resultado que en todos los tratamientos con Sacarosa la tasa de mortalidad asciende a partir de las 48 Hrs en refrigeración.

Tabla 7. Tabla resumen descriptivo de los datos estadísticos obtenidos del modelo Análisis de Varianza (ANOVA) de la tasa de mortalidad

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
%Mortalidad/Tratamiento	9375.52	4	2343.88	25.01	0.0001
Error	4030.28	43	93.73	/	/
Total	37178.82	49	/	/	/

Nota. Esta tabla muestra de forma resumida el p-valor en base a la mortalidad, dándonos la significancia entre las variables mediante el modelo ANOVA.

Figura 15. Gráfico de barras (Bar-Chart), INFOSTAT: Varianza del efecto de los Tratamientos Experimentales sobre la mortalidad en espermatozoides.



Nota. Esta figura muestra los valores de mortalidad sobre los tratamientos, del ensayo 2.

Lo reportado por Llasaca, et al. (2014), en su trabajo denominado, "Tiempo de latencia para semen colectado de *Colossoma macropomum* "Gamitana" en solución sacarosa", la motilidad fue evaluada, cada hora, hasta la 7ma hora post colecta. El segundo lote con un semen en sacarosa 0.4 M a temperatura refrigerada y evaluada cada 12 horas. Los resultados del primer lote de semen demuestran que a partir de la 7ma hora hacia delante los índices de motilidad caen significativamente por debajo del 40%. Los resultados del segundo lote demuestran la viabilidad de utilizar solución de sacarosa, como medio de conservación, para mantener semen refrigerado por 2 días y activarlos con agua destilada, concluyendo que la utilización de sacarosa como medio para almacenar semen inmótil viable de gamitana, ayuda a conservar los espermatozoides por tiempos relativamente cortos.

Sin embargo, en el presente estudio se evaluó el efecto de cinco tratamientos , sobre la tasa mortalidad (%) del espermio del *L. albus*, donde las unidades experimentales mostraron diferencias significativas en torno al tiempo de almacenamiento (Hrs) en refrigeración, demostrando así que el semen puro refrigerado obtiene una motilidad alta hasta las 72 Hrs a comparación de los demás tratamientos donde se observa una caída de la motilidad a partir de las 48 Hrs, teniéndose valores de mortalidad del 60%, sin embargo existe motilidad en semen puro refrigerado que puede mantenerse hasta las 120 Hrs. sin necesidad del uso de la sacarosa como medio de conservación , es decir que los valores de motilidad del semen puro refrigerado van decayendo desde las 96 Hrs, teniendo una mortalidad del 80% , de mostrando así que el semen puro correctamente colectado puede almacenarse por periodos de hasta 72Hrs con 60% de motilidad y un 40% de mortalidad , teniéndose así semen inmótil viable de *L.albus*. Coincidiendo con lo reportado por Minardi et al (2011), donde indica que el decrecimiento en la vida del espermatozoide, puede estar relacionado con el tiempo de exposición del semen con la solución diluyente, lo que coincide con lo observado en el presente trabajo.

Sin embargo, no sólo la exposición a los diluyentes puede afectarla motilidad, si no también, las diferencias de temperaturas provocadas por la extracción de un lote para varias pruebas a diferentes tiempos, lo que contribuiría negativamente con el tiempo de almacenamiento de gametos refrigerados. El presente estudio demostró esta teoría, observándose que el efecto de sacar repetidamente la muestra y luego conservarla nuevamente en el refrigerador, tiene un efecto claramente negativo en su motilidad a través del tiempo de almacenamiento obteniéndose espermios no viables.

V. CONCLUSIONES

- La motilidad de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde", por medio del indicador de Velocidad, muestra una velocidad máxima en la concentración de 0.8M de Sacarosa, al igual que los espermatozoides que no fueron conservados con Sacarosa y que fueron colectados adecuadamente sin activarlos antes del proceso de conservación. Así mismo la motilidad de los espermatozoides de *L. albus* con diferentes concentraciones de Sacarosa, conservados a diferentes horas determina que la motilidad óptima mediante la velocidad máxima es hasta las 48 Hrs, posterior a este rango de horas la motilidad va decayendo, hasta llegar a una velocidad mínima y casi nula a las 120 Hrs, siendo un factor importante de estos resultados el factor macho.

- El efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa sobre la tasa de mortalidad (%) de los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde, demuestra que a partir de las 48 Hrs, desciende la motilidad de los espermios con los tratamientos de sacarosa, teniéndose valores de mortalidad del 60% en el T1 de 0.8 M , con una motilidad del 40% de semen inmótil viable de *L.albus* , sin embargo el semen puro refrigerado , puede mantenerse hasta las 120 Hrs , pero con una motilidad de espermios que va decayendo desde las 96 Hrs.

VI. RECOMENDACIONES

- Se debe considerar la zona de extracción de las muestras vivas para su posterior proceso de conservación, ya que se demostró que el factor macho y la zona de donde se extrae influye sobre la viabilidad de los espermatozoides.

- Así como también, que a raíz de ensayos antes del experimento, se debe de considerar que los individuos, no hayan sido activados o que hayan espermiado antes del experimento, ya que se puede obtener una cantidad mínima de la muestra y tener resultados deficientes en la motilidad, por ello se recomienda verificar por microscopia si los espermatozoides están activos antes de ser refrigerados.

- Además, se debe evitar los cambios de temperatura sobre las muestras si se quiere buscar realizar varias fertilizaciones con un mismo lote de semen, los volúmenes deben de ser separados para cada fertilización, para evitar que la muestra afecte su motilidad y no dañen los espermatozoides, al extraer y volver a refrigerar.

- Las diferentes concentraciones de sacarosa al no tener un efecto conservador relevante para los espermatozoides de *Loxechinus albus* "erizo verde "a comparación de la conservación de semen puro, se recomienda el uso exclusivo de la sacarosa para clasificar los espermatozoides más resistentes a la refrigeración, y así mismo seleccionar los espermatozoides más viables.

VII. REFERENCIAS

Aisen, E., Álvarez, H., Venturino, A., & Garde, J. (2014). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. In *Theriogenology* (pp. 1053–1061).

Aramli S, Golshahi R, Nazari, S. 2015. Effect of freezing rate on motility, adenosine triphosphate content and fertilizability in beluga sturgeon (Huso huso) spermatozoa, Cryobiology. 306; (70): 170-174.

Arana, P., Palma, S., Bay-Schmith, E., Gálvez, M., & Monardes, M. (1996). Aspectos biológicos y pesqueros del erizo (Loxechinus albus) en la región de Magallanes. *Estud. Doc., Univ. Católica Valparaíso*, *23/96*, 83-140 pp.

Arrau, L. (1958). Desarrollo del erizo comestible de Chile Loxechinus albus. *Revista de Biología Marina*, VII. N° 1, 2 y 3.

Asturiano J, Cabrita E, Horvath A. 2016. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. Gen. Comp. Endocrinol. 245, 69- 76.

Atencio García, V. J., Dorado Longas, M., Montes Prieto, C., Prieto-Guevara, M. y Espinosa-Araujo, J. (2017). Crioconservación de semen de dorada *Brycon moorei* con dimetilsulfóxido. Revista Colombiana de Biotecnología, 19(2), 87–94. https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.59987

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., ... & Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. Revista colombiana de obstetricia y ginecología, 57(4), 291-300.

Ayerbe, R., Zevallos, S., Castañeda, V., Lope, F., Bendita, H., Vizcarra, Y., & Sanz, Y. (2018). *MANUAL: Cultivo De Erizo Comercial Loxechinus albus En La Región Moquegua*. https://doi.org/0378-7702

Barahona, N. J. (2003). Bases biológicas para rotación de áreas. *Informe Final FIP N°2000-18*.

Bay-Schmith, E., Werlinger, C., & Silva, J. (1981). *Ciclo anual de reproducción del recurso Loxechinus albus entre la X y XIIa Región.*

Bendita , H. (2015) Determinación del ciclo reproductivo del "erizo verde" *Loxechinus albus*, asociados a periodos estacionales en la zona de Punta de Coles – Ilo, 2015 .Universidad Nacional de Moquegua.

Bückle, L. (1973). El erizo comestible, (Loxechinus albus) (Mol.) (Echinoidea: Echinoidea). *Noticiero Mensual, Mus. Nac. Hist. Nat., Chile*, *17*(205), 8–11.

Briceño Bernal, R. A. (2020). Ensayos preliminares en la búsqueda de dilutores para el transporte y la criopreservación de espermatozoides de Doncella Pseudoplatystoma punctifer (Castelnau, 1855).

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez, S.-P., Robles, V., Beirão, J., Herraez, S., & Pérez-Cerezales, P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology.

Carballo, D. (2005). Comparación de dos diluyentes comerciales para crio preservarsemen de bovino bajo condiciones decampo en el trópico húmedo.

Carmona-Calderón, J., Espinosa-Araújo, J., Atencio-García, V., & Díaz-Hernández, O. (2021). Crioconservación de semen de dorada (Brycon sinuensis) con diferentes crioprotectores a dos porcentajes de inclusión. Orinoquia, 25(2), 15-24.

Castilla, J. J. (1981). "Informe Final Proyecto de Investigación Biología y factibilidad de utilización de praderas de Macrocystis pyrifera".

Castro Acevedo, E. 2021. Criopreservación del esperma del abulón azul Haliotis fulgens: Efecto de los crioprotectores y la tasa de enfriamiento en la viabilidad espermática. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 65 pp.

Cortés, M., Hidalgo, R., Moreno, M., & Zarak, A. (2005). Efectos de la capsaicina en la reacción acrosomal del espermatozoide del erizo de mar S.purpuratus. *Proyectos Académicos. Colegio Marymount Cuernavaca. Consultado*. http://www.marymount.edu.mx/ciencias/Efecto de la Capsaicina Proyecto.pdf

Darszon, A. (2007). Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Instituto de Biotecnología UNAM*.

Dominguez M, Luz et al. Optimización de un protocolo para la criopreservación del espermatóforo y masa espermática del langostino blanco Litopenaeus vannamei (Boone, 1931). Rev. investig. vet. Perú [online]. 2020, vol.31, n.3, e17101. ISSN 1609-9117. http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17101.

Dupré, E., & Carvajal, J. (2019). Cryopreservation of embryos and larvae of the edible sea urchin loxechinus albus (Molina, 1782). Cryobiology, 86, 84-88.

Dzyuba, V., & Cosson, J. (2014). Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. In *Reprod. Biol* (pp. 165–175).

Fernandez, F. (2013). *Evaluacion de dos diluyentes para conservacion de semen ovino : yema de huevo vs lecitina de soya* (p. 2).

Fernández-Novell JM, Ballester J, Medrano A, Otaegui P, Rigau T, Guinovart J, Rodríguez-Gil JE. 2004. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. FEBS Lett 570: 211-216.

Galindo O, Ramírez A, Campos S, Quispe S, Argüelles J. 2016. Protocolo para muestreo biológico y biométrico del erizo de mar Loxechinus albus (Molina, 1782). Instituto del Mar del Perú, Vol. 43.

García García, R. M., Domínguez, V., Gonzales Bulnes, A., Veiga López, A., & Cocero, M. J. (1992). Efecto de la concentración de sacarosa sobre la supervivencia post-descongelación de embriones ovinos en distintos estadios del desarrollo preimplantacional. ITEA, 24, 229-281.

Hammersted RH, Lardy HA. 1983. The effects of substrate cycling on the ATP yield of sperm glycolysis. J Biol Chem 258: 8759-8768.

Hassan, M. M., Li, X., Liu, Y., & Qin, J. G. (2017). Sperm cryopreservation in the spermcasting Australian flat oyster Ostrea angasi by a programmable freezing method. Cryobiology, 76, 119-124.

Hiemstra, S. J., T. Van der Lende & H. Woelders. 2005. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for Animal Genetic Resources Conservation Strategies. In: The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources: International workshop, 5-7 March 2005, Turin, Italy. pp. 25-35.

Herráez, M. P., Ausió, J., Devaux, A., González-Rojo, S., Fernández-Díez, C., Bony, S., Saperas, N. & Robles, V. (2017). Paternal contribution to development: Sperm genetic damage and repair in fish. Aquaculture, 472, 45-59. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.007.

Holt, W. (2000). fundamental aspects of sperm cryobiology; the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, *43*, 47–58.

IMARPE realiza Monitoreo de “chanque”, “lapa negra” y “erizo verde” en Moquegua y Tacna - Noticias - Instituto del Mar del Perú - Plataforma del Estado Peruano. (2022). Retrieved April 23, 2023, from https://www.gob.pe/institucion/imarpe/noticias/603537-imarpe-realiza-monitoreo-de-chanque-lapa-negra-y-erizo-verde-en-moquegua-y-tacna.

Incio Pérez, A., Lucero Pérez, S., & Barriga Rivera, E. (2020). Aspectos reproductivos del erizo verde Loxechinus albus (Molina, 1782) de la Región Arequipa, 2017-2018.

Larrain, A. (1975). *Los equino ideos fósiles y recientes de Chile. Gayana Zoología*.

Linhartova Z, Rodina J. Nebesarova J, Cosson, Psenicka M. Morphology and ultrastructure of beluga (Huso huso) spermatozoa anda comparison with related sturgeons, Animal Reproduction Science 137 (2013) 220-229.

Llasaca, E., Napuchi, J., Verdi, L., & Núñez, J. (2014). *Tiempo de latencia para semen colectado de Colossoma macropomum "Gamitana" en solución sacarosa.* 138–142. http://dx.doi.org/10.22386/ca.v4i2.79

Llasaca, E., Verdi, L., & Nuñez, J. (2014). Evaluación de una solución inmovilizadora para criopreservación del semen de Colossoma macropomum , "Gamitana". *Universidad Científica Del Perú*, *4*(2), 143–150. http://dx.doi.org/10.22386/ca.v4i2.80

Martínez S, Horváth Á, Labbé C, Zhang T, Robles V, Herráez P, Suquet M, Adams S, Viveiros A, Tiersch T, Cabrita E. 2016. Cryobanking of aquatic species. Aquaculture. 2016.05.042.

Mayes, P. (1997). Carbohidratos de importancia fisiológica. In M. Moderno (Ed.), *Murray R,Granner, D., Mayes, P. y Rodwell. Bioquímica de Harper* (24ª, pp. 165–176).

McDonald, L. E. (1991). *Endocrinología Veterinaria y Reproducción.* (4ta ed.). Interamericana McGraw-Hill.

Medeiros, C., Forel, F., Oliveira, A., y Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, 57(1), 327-344.

Medina Robles, Víctor M., Yohana M. Velasco Santamaría, and Pablo E. Cruz Casallas. "Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos." Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 18.1 (2005): 34-48.

Minardi J, Pereira R, Streit D, Kawakami E, Fornari D, Jayme L, de Oliveira D, Vanini G, Vargas L. 2011. Sêmen de Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) resfriado en diferentes diluidores. III conferência latinoamericana sobre cultivo de peixes nativos III congresso brasileiro de produção de peixes nativos.

Paredes, Estefania & Campos, Sara. (2023). LIBRETO PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ERIZO DE MAR.

Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. Theriogenology 56: 801-815.

Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernández-Novell JM, Mogas T, Ballester J, Peña A, et al. 2002. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. Reproduction 123: 579-591.

Rios Inga, C. E. (2020). Desarrollo de un protocolo para crio preservar semen de gamitana.

Rodríguez, G. (1992). Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. (A.G.T (ed.)).

Rutter, B., y Russo, A. (2006). Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Buenos Aires: Agro-Vet.

Shishanova E, Trenkler A, Mamonova S. Influence of milt cryoconservation on survival and genetic polymorphism of larvae of Russian sturgeon, Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry 2 (2012) 105-111.

Sonnenholzner-Varas, Jorge-I. (2021). ¿Hacia dónde va la acuicultura de equinodermos en América Latina? Potencial, retos y oportunidades. Revista de Biología Tropical, 69(Suppl. 1), 514-549. https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v69isuppl.1.46393

Suquet, M., et al.,Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Research: Original Articles, 2000, vol. 31, no 3, p. 231-243.

Tejada, Gonzales, Baldarrago, & Liza. (2016). BANCOS NATURALES DE INVERTEBRADOS MARINOS EN LAS REGIONES MOQUEGUA Y TACNA.

Trejo, A., Meza, V., Antonio, C., Cotera, J., y Antonio, C. (2013). Agua de coco (cocus nucifera) como diluyente para semen fresco de conejo en la Inseminación Artificial. Arch Zootec, 238(62), 299-302.

Trigo P, Merino O, Figueroa E, Valdebenito I, Sánchez R, Risopatrón J, 2015. Effect of short-term semen storage in salmon (Oncorhynchus mykiss) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. Andrologia 47, 407-411.

Urrego Gutiérrez, D. M. (2022). Criopreservación de espermatozoides de Capitán de la Sabana (Eremophilus mutisii) (Doctoral dissertation, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales).

Vincent, Caroline, et al.,Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. Biophysical Chemistry, 1988, vol. 29, no 1-2, p. 161-169.

Yamashiro C, Benites C, Zeballos J, Tafur R. 1996. Algunos aspectos biológico – pesqueros del recurso erizo Loxechinus albus (Molina, 1782). Instituto del Mar del Perú. Informe Progresivo N° 38.

Yoshida, M., & Asturiano, J. F. (Eds.). (2020). Reproduction in aquatic animals: from basic biology to aquaculture technology. Springer Nature.

Zamora, S., & Stotz, W. (1992). Ciclo reproductivo de Loxechinus albus (Molina 1782) (Echinodermata: Echinoidea) en Punta Lagunillas, IV Región, Coquimbo, Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 121–133.

Zapata Rojas, J. C. (2021). Evaluación poblacional del recurso Loxechinus albus “erizo” en la zona de Punta Coles (Ilo, Moquegua). https://repositorio.profonanpe.org.pe/bitstream/handle/20.500.14150/1788/056C-2021000001-Producto%202.pdf?sequence=1

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Tablas de análisis de varianza y prueba post prueba post (Tukey) para la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales. Ensayo1

Analysis of variance
Mean speed (µm/sec)

Variable	N	R^2	Adj R^2	CV
Mean speed (µm/sec)	2240	0.34	0.34	90.36

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	593421141.51	16	37088821.34	72.39	<0.0001
TRATAMIENTO	196523681.43	2	98261840.71	191.79	<0.0001
MACHO	144756118.20	4	36189029.55	70.64	<0.0001
REPLICA	5598309.93	2	2799154.97	5.46	0.0043
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	0.00	0	0.00	nd	nd
TRATAMIENTO*MACHO	246278008.95	8	30784751.12	60.09	<0.0001
Error	1138926075.96	2223	512337.42		
Total	1732347217.47	2239			

Max speed (µm/sec)

Variable	N	R^2	Adj R^2	CV
Max speed (µm/sec)	2240	0.30	0.30	82.52

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	880426094.73	16	55026630.92	60.35	<0.0001
TRATAMIENTO	297694909.78	2	148847454.89	163.26	<0.0001
MACHO	309153284.15	4	77288321.04	84.77	<0.0001
REPLICA	11115629.93	2	5557814.97	6.10	0.0023
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	0.00	0	0.00	nd	nd
TRATAMIENTO*MACHO	262727255.69	8	32840906.96	36.02	<0.0001
Error	2026774763.92	2223	911729.54		
Total	2907200858.65	2239			

Min speed (µm/sec)

Variable	N	R^2	Adj R^2	CV
Min speed (µm/sec)	2240	0.25	0.24	134.77

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	406021238.77	16	25376327.42	45.99	<0.0001
TRATAMIENTO	117937473.80	2	58968736.90	106.86	<0.0001
MACHO	75932550.47	4	18983137.62	34.40	<0.0001
REPLICA	2615187.30	2	1307593.65	2.37	0.0937
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	0.00	0	0.00	nd	nd
TRATAMIENTO*MACHO	209170111.78	8	26146263.97	47.38	<0.0001
Error	1226671568.91	2223	551809.07		
Total	1632692807.68	2239			

Anexo 2. Tablas de análisis de varianza y prueba post prueba post (Tukey) para la motilidad con indicadores de velocidad (velocidad media, velocidad máxima y velocidad mínima) entre los Tratamientos Experimentales. Ensayo2

Mean speed (µm/sec)

Variable	N	R^2	Adj R^2	CV
Mean speed (µm/sec)	3000	0.09	0.08	105.26

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	239596715.81	7	34228102.26	40.29	<0.0001
TRATAMIENTO	232717836.78	5	46543567.36	54.79	<0.0001
MACHO	0.00	0	0.00	nd	nd
REPLICA	6835299.99	2	3417649.99	4.02	0.0180
Error	2541720006.92	2992	849505.35		
Total	2781316722.74	2999			

Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=189.50008

Error: 849505.3499 df: 2992

TRATAMIENTO	Means	n	S.E.		
Semen puro	1288.92	600	37.63	A	
0.6 M	1008.41	601	37.60		B
1M	879.10	150	75.27		B
0.8 M	622.26	599	37.67	C	
0.4 M	515.83	600	37.63		C

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Max speed (µm/sec)

Variable	N	R^2	Adj R^2	CV
Max speed (µm/sec)	3000	0.05	0.04	95.89

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	184359414.39	7	26337059.20	20.76	<0.0001
TRATAMIENTO	175965211.98	5	35193042.40	27.75	<0.0001
MACHO	0.00	0	0.00	nd	nd
REPLICA	8385951.40	2	4192975.70	3.31	0.0368
Error	3794937745.37	2992	1268361.55		
Total	3979297159.76	2999			

Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=231.55164

Error: 1268361.5459 df: 2992

TRATAMIENTO	Means	n	S.E.			
Semen puro	1501.59	600	45.99	A		
0.8 M	1374.16	601	45.95	A	B	
1M	1065.15	150	91.97		C	D
0.6 M	910.72	599	46.02			D
0.4 M	905.32	600	45.99			D

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Min speed (µm/sec)

Variable	N	R^2	Adj R^2	CV
Min speed (µm/sec)	3000	0.09	0.09	138.50

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	256066374.63	7	36580910.66	43.68	<0.0001
TRATAMIENTO	251083134.07	5	50216626.81	59.97	<0.0001
MACHO	0.00	0	0.00	nd	nd
REPLICA	4921144.02	2	2460572.01	2.94	0.0531
Error	2505564037.49	2992	837421.14		
Total	2761630412.12	2999			

Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=188.14743

Error: 837421.1355 df: 2992

TRATAMIENTO	Means	n	S.E.			
Semen puro	1122.76	600	37.37	A		
1M	726.30	150	74.73		B	
0.6 M	709.57	601	37.33		B	
0.8 M	441.66	599	37.40			C
0.4 M	278.29	600	37.37			C

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

Anexo 3. Tablas de análisis de varianza y prueba post prueba post (Tukey) para la mortalidad con indicadores de tasa de mortalidad (%) , entre los Tratamientos Experimentales.

Analysis of variance

Variable	N	R^2	Adj R^2	CV
MORTALIDAD	50	0.89	0.88	15.35

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value	Coef
Model	33148.54	6	5524.76	58.94	<0.0001	
TRATAMIENTO	9375.52	4	2343.88	25.01	<0.0001	
MACHO	118.58	1	118.58	1.27	0.2669	-3.08
HORA	23654.44	1	23654.44	252.37	<0.0001	0.64
Error	4030.28	43	93.73			
Total	37178.82	49				

Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=12.32590

Error: 93.7274 df: 43

TRATAMIENTO	Means	n	S.E.		
T2	74.80	10	3.06	A	
T5	74.70	10	3.06		A
T4	71.80	10	3.06	A	
T3	53.00	10	3.06	B	
T1	41.00	10	3.06		B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.05)

"UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNAM

Formulario de autorización para la publicación electrónica en la página web del Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Moquegua, de conformidad con la Ley N° 30035 Ley que regula el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto y Resolución de Comisión Organizadora N° 041-2022-UNAM que aprueba el Reglamento que regula el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

1. DATOS DEL AUTOR

Nombres y Apellidos : ALEXANDRA ELVIRA ALVIS MANRIQUE
DNI/Carnet de Extranjería/Pasaporte N° : 74047893
Correo electrónico : alexandra.alvis0510@gmail.com
Teléfono/Celular : 928108692

2. GRADO, TITULO O ESPECIALIZACIÓN (Marque con una X)

Bachiller	Título Profesional	Magister	Doctor	Segunda Especialidad
	X			

3. TIPO DE PUBLICACIÓN (Marque con una X)

a) Articulo ( )
b) Tesis de pregrado (X)
c) Tesis de Maestría ( )
d) Tesis de Doctorado ( )
e) Monografía ( )
f) Reporte de caso científico o hallazgos ( )
g) Libro ( )
h) Parte de un libro ( )
i) Revisión ( )
j) Conferencia ( )
k) Presentación ( )
l) Artículo preliminar ( )
m) Articulo antes de ser publicado ( )
n) Artículo de prensa ( )
o) Documentos internos ( )
p) Imagen ( )
q) Documentos técnicos ( )
r) Ponencias presentadas en eventos científicos (Jornada, Congreso, Simposio Conferencias, etc.) ( )
s) Informes de suficiencia profesional ( )
t) Patentes producidas por académicos/as ( )

4. TIPO DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (Marque con una X)

a) Tesis ( )
b) Trabajo de Investigación (X)
c) Trabajo de suficiencia profesional ( )
d) Trabajo académico ( )

5. DATOS DE LA PUBLICACION

a) Título : EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA SOBRE LA VIABILIDAD EN ESPERMATOZOIDES DE *Loxechinus albus* "ERIZO VERDE".
b) Campo del conocimiento OCDE (Indicar el código de clasificación OCDE de la obra : https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html) : 4.01.08 -- Acuicultura
c) Fecha de publicación : 2023

6. DATOS DEL ASESOR:

a) Nombres y Apellidos : EHRLICH YAM LLASACA CALIZAYA
b) DNI/Pasaporte/Cédula : 40395472
c) ORCID : 0000-0002-9918-6073

FIRMA : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDAD : 74047893
NOMBRES Y APELLIDOS : ALEXANDRA ELVIRA ALVIS MANRIQUE

"UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA"
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

LICENCIAS

Licencia Estándar

Bajo los siguientes términos, autorizo el depósito de mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional Digital de la UNAM.

Con la autorización de depósito da mi trabajo de investigación, otorgo a la Universidad Nacional de Moquegua, una Licencia No Exclusiva para reproducir. distribuir, comunicar al público, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público mi trabajo de investigación (incluido el resumen), en formato físico o digital, en cualquier medio, conocido o por conocerse, a través de los diversos servicios provistos por la Universidad, creados o por crearse, tales como el Repositorio Institucional Digital de la UNAM, Colección de Tesis, entre otros, en el Perú y en el extranjero, por el tiempo y veces que considere necesarias, y libre de remuneraciones.

En virtud de dicha Licencia, la UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA, podrá reproducir mi trabajo de investigación en cualquier tipo de soporte y en más de un ejemplar, sin modificar su contenido, solo con los propósitos de seguridad, respaldo y preservación.

Declaro que el trabajo de investigación es una creación de mi autoría y exclusiva titularidad, o coautoría con titularidad compartida, y me encuentro facultado a conceder la presente licencia y, asimismo, garantizo que dicho trabajo de investigación no infringe derechos de autor de terceras personas.

La UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA consignara el nombre del/los autor/es del trabajo de investigación, y no le hará ninguna modificación más de la permitida en la presente licencia.

Autorizo el depósito (marque con una X).

( ) **SI autorizo que se deposite inmediatamente.**

FIRMA : .....



DOCUMENTO DE IDENTIDAD : 74047893
NOMBRES Y APELLIDOS : ALEXANDRA ELVIRA ALVIS MANRIQUE
FECHA : 10 de agosto del 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN / TESIS / TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL

Yo, ALEXANDRA ELVIRA ALVIS MANRIQUE, bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera, de la Universidad Nacional de Moquegua, identificado (a) con DNI: Nº 74047893, autor(a) del Trabajo de investigación / Tesis / Trabajo de suficiencia profesional titulado EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA SOBRE LA VIABILIDAD EN ESPERMATOZOIDES DE *Loxechinus albus* "ERIZO VERDE".

Declaro bajo juramento que:

1. El trabajo de investigación es auténtico, siendo resultado de mi trabajo personal, que no se ha copiado, que no se ha utilizado ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones diversas, sacadas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor, tanto en el cuerpo del texto, figuras, cuadros, tablas u otros que tengan derechos de autor. Por tanto, el trabajo de investigación no ha sido plagiado total ni parcialmente.
2. El trabajo de investigación no ha sido autoplagiada, es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
3. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presentan en el trabajo de investigación constituirán aporte a la realidad investigada.

Soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones universitarias y/o legales, por lo que asumo cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de irregularidades en el trabajo de investigación, así como de los derechos sobre la obra presentada.

Moquegua, 10 de agosto de 2023



Huella digital

Nombres y Apellidos: ALEXANDRA ELVIRA ALVIS MANRIQUE
DNI: 74047893

Base legal: RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 194-2020-SUNEDU-02-15

Document Information

Analyzed document	TESIS ALEXANDRA REPORTE DE ORIGINALIDAD.docx (D169390937)
Submitted	2023-06-02 05:49:00
Submitted by	
Submitter email	alexandra.alvis0510@gmail.com
Similarity	1%
Analysis address	ellasacac.unampe@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA	**TESIS YESENIA HERNANDEZ.doc** Document TESIS YESENIA HERNANDEZ.doc (D53063513)	1
SA	**Tesis corregida 1 - copia-2.docx** Document Tesis corregida 1 - copia-2.docx (D28763291)	2

Entire Document

INTRODUCCIÓN

El erizo de mar comestible Loxechinus albus se distribuye desde la Isla Lobos de Afuera en Perú (6°S) hasta el extremo sur de Sudamérica (55°S). L.albus es una de las especies de mayor importancia económica en los sistemas bentónicos litorales de la región del Pacífico Sudeste, siendo fuertemente explotada y utilizada como fuente de alimento desde tiempos precolombinos. Su pesquería es la mayor del mundo, realizada exclusivamente por pescadores artesanales. Durante los últimos 15 años, la pesquería se ha desplazado al sur de la latitud 42°S, y esta región representa más del 90% de los desembarques totales, (Vásquez, 2020). Es el principal equinodermo explotado por la pesquería artesanal en el centro y sur de Perú, desde Pisco hasta Ilo, a profundidades entre 5 y 35 m cuya pesquería se encuentra regulada por la talla mínima de captura (TMC) establecida en 70 mm de diámetro del caparazón, mediante la Resolución Ministerial Nº 209-2001-PE (26-6-2001). Debido a su alta demanda tanto en el mercado nacional como internacional, la presión pesquera en sus principales bancos naturales se ha incrementado, generando un impacto negativo en el recurso, (Incio et al., 2020).

Cabe destacar, que, debido a la disminución de las poblaciones de estos recursos, los extractores vienen tomando medidas de autorregulación, para lo cual han llegado a acuerdos comunes para mejorar el precio de los productos y efectuar un manejo sostenible, estableciendo límites en los volúmenes de extracción por embarcación de acuerdo a la demanda del recurso. En Moquegua y Tacna, la pesquería marisquera es una importante actividad económica, sin embargo, los bancos naturales de invertebrados marinos bentónicos en los últimos años han presentado variaciones debido a la intensa explotación que ha ocasionado la disminución de los stocks poblacionales; de allí la importancia de conocer la situación poblacional de los recursos, a fin de diseñar estrategias de gestión y manejo para su uso óptimo y sustentable, (IMARPE, 2022).