

Efecto del pH de cinco soluciones extensoras sobre la movilidad espermática en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Effect of pH on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm motility using five extender solutions

María de los Ángeles Peralta-Martínez^{1,2}, Salvador Romo García³, Michael Edward Kjelland⁴ y Humberto González-Márquez⁵

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186, col. Vicentina, Iztapalapa, CDMX, 09340. México

² Dirección General Adjunta de Investigación en Acuicultura, Instituto Nacional de Pesca. Avenida México 190, col. del Carmen, Coyoacán, CDMX, 04100. México

³ Laboratorio de Reproducción, Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, Estado de México, 54714. México

⁴ Conservation, Genetics & Biotech, LLC, 10921 36 Street SE Valley City, ND 58072, Estados Unidos

⁵ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186, col. Vicentina, Iztapalapa, CDMX, 09340. México

e-mail: angeles.peralta@inapesca.gob.mx

Recibido: 29 de mayo de 2017.

Aceptado: 26 de junio de 2018.

Peralta-Martínez M. de los Á., S. Romo García, M. E. Kjelland y H. González-Márquez. 2018. Efecto del pH de cinco soluciones extensoras sobre la movilidad espermática en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Hidrobiológica* 28 (1): 171-178. DOI: 10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n2/Paralta

RESUMEN

Antecedentes. La función principal de los diluyentes o soluciones extensoras es conservar la viabilidad y mantener inactiva la movilidad espermática el mayor tiempo posible para, posteriormente, permitir al espermatozoide llegar al micrópilo y fecundarlo. En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) la elaboración de estos diluyentes ha logrado avances importantes al establecer protocolos de control y manejo de gametos, los cuales difieren mucho en su composición. No obstante, no ha quedado establecido cuál es el mecanismo de acción del pH sobre la movilidad espermática ni su efecto en la elaboración de estas soluciones. **Objetivos.** Evaluar el efecto del pH de cinco soluciones extensoras a 5 °C sobre la movilidad espermática de trucha arcoíris durante la activación de espermatozoides. **Métodos.** Se recolectaron muestras de semen de 96 machos y se probaron 3 soluciones extensoras de composición simple (306, 512 y Mounib) y dos de composición compleja (Erdahl & Graham y Hanks), con diferentes pH (7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0 y 8.2), así como tres soluciones activadoras (DIA 532, suero salino fisiológico y agua de estanque). **Resultados.** Los extensores presentaron una alta capacidad de amortiguamiento porque fueron esterilizados. Los mayores porcentajes de activación de movilidad se obtuvieron con DIA 532. Las soluciones extensoras 306, 512 y Hanks mostraron una relación positiva entre el pH y el porcentaje de movilidad. Las soluciones de Erdahl & Graham y Mounib no permitieron la activación del movimiento de espermatozoides sin importar el pH. **Conclusiones.** Con las soluciones 306, 512 y Hanks se encontró una relación positiva entre el pH y el porcentaje de movilidad de espermatozoides de trucha y un efecto inverso con la solución de activación DIA 532.

Palabras clave: espermatozoides, movilidad, pH, soluciones extensoras, trucha arcoíris

ABSTRACT

Background. The main function of extender solutions for trout semen is to preserve viability while keeping the sperm motility inactivated. The longer the sperm remain viable and inactivated the better, so that later they can be intentionally activated when the sperm must travel to reach the egg micropyle for fertilization. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), considerable advances have been made concerning the production of sperm extenders, quality control protocols, and the handling of gametes. However, the protocols for using an extender can differ considerably, especially regarding the extender composition. Additionally, the precise impact of pH on sperm motility, and its effect in the design and selection of a sperm extender remain unclear. **Goals.** The aim of this study was to determine the effect of pH on rainbow trout sperm motility and activation during storage at 5 °C and using 5 different extenders. **Methods.** Three simple composition sperm extenders (306, 512, and Mounib) and two complex composition sperm extenders (Erdahl & Graham, and Hank's) were tested at different pHs (7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, and 8.2), as well as 3 activation solutions (DIA 532, saline solution, and pond water). **Results.** The extenders showed a high buffer capacity. The highest percentages of motility were obtained with DIA 532. Extenders 306, 512, and Hanks exhibited a positive relationship between pH and % motility. Erdahl & Graham and Mounib extender did not induce motility in rainbow trout sperm at different pHs. **Conclusions.** A positive relationship was found between the pH and motility of trout sperm, as well as a negative effect regarding the activation solution DIA 532 with the 306, 512, and Hanks extenders.

Keywords: extender solutions, motility, pH, rainbow trout, sperm

INTRODUCCIÓN

Los procesos de conservación en espermatozoides de peces han sido ampliamente estudiados, lo que ha permitido avances importantes en el manejo y control de gametos. No obstante, los protocolos de preservación que se reportan difieren en cuanto a la composición de los diluyentes o extensores, que son formulados para simular la composición y osmolaridad del plasma seminal, con el objetivo de no activar la movilidad. Esta variable es utilizada ampliamente para estimar la calidad espermática, ya que le permite al espermatozoide llegar y entrar al micrópilo para su fecundación (Fauvel *et al.*, 2010; Hajirezaee *et al.*, 2010). La función principal de estos extensores es mantener la viabilidad celular y la inmovilidad espermática el mayor tiempo posible, así como permitir la activación de las células cuando sea necesario para la optimización del semen en los procesos de conservación y fecundación (Medina-Robles *et al.*, 2005; Valdebenito *et al.*, 2009). Los factores que activan el movimiento de los espermatozoides, como composición iónica, osmolaridad y pH han sido objeto de diversos estudios (Alavi & Cosson, 2005; Alavi & Cosson, 2006; Garzon *et al.*, 2008; Takei *et al.*, 2012); éstos determinan que el movimiento se genera principalmente por el intercambio iónico de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} (Dziewulska & Domagala, 2013; Rosengrave *et al.*, 2008; Tabares *et al.*, 2005; Takei *et al.*, 2012; Valdebenito *et al.*, 2009), y por la osmolaridad de la solución (Dzyuba *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2009; Morisawa *et al.*, 1983; Tabares *et al.*, 2005), de manera que dejan en segundo término el efecto del pH.

Estudios más recientes demuestran que los espermatozoides de peces se activan en soluciones extensoras con pH desde 5.5 hasta 10.5 (Cosson 2004; Ciereszko *et al.*, 2010; Dziewulska & Domagala, 2013), y el valor óptimo para la fertilización es entre 8.5 y 10 (Le *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2016; Magnotti *et al.*, 2018). Sanches *et al.* (2015) observaron que el pH no sólo puede afectar la movilidad de los espermatozoides, sino también la tasa de fertilización, la tasa de eclosión y el desarrollo larval. Woolsey e Ingermann (2003) observaron que, los espermatozoides de salmónidos preincubados con valores de pH extracelular menores a 7.4 no tienen movimiento tras la activación con agua, mientras que los espermatozoides mantenidos por encima de pH 8.0 muestran actividad alta. Para la trucha arcoíris, Cosson (2004) menciona que un pH alcalino mejora la movilidad.

Aguilar-Juárez (2010) evaluó el efecto del pH (5 a 10) en la activación de espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Everman, 1908), utilizando HCl o NaOH para pH ácido o alcalino, respectivamente, y amortiguó con Tris-HEPES como par ácido-base en los pH medios. Encontró que el pH óptimo para in-

activar los espermatozoides fue de 7, ajustado con Tris-HEPES, ya que fue donde se presentó la mayor movilidad al ser reactivados con agua. Debido a que no ha quedado clara la influencia del pH sobre la activación espermática en peces, en el presente estudio se evaluó el efecto del pH de cinco soluciones extensoras sobre la movilidad espermática en semen de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) y el efecto de la activación con tres soluciones activadoras.

MÉTODOS

Recolección de muestras de semen. Las muestras fueron recolectadas en dos granjas acuícolas: Tatakany, ubicada en el municipio de Santa Ana Jilotzingo, y La Cañada, en el municipio de Huixquilucan, ambas en el Estado de México, México. Se revisaron machos de trucha arcoíris ($n = 94$) sexualmente maduros con peso promedio de 1806 ± 43.2 g y longitud 51.4 ± 5.5 cm para la granja Tatakany y de 1221.76 ± 328.18 g y 47.6 ± 5.9 cm para la granja La Cañada. Las muestras fueron obtenidas por masaje abdominal sin anestesia; antes de recolectar la muestra se retiró la orina por masaje abdominal y el exceso de agua del poro genital para evitar la contaminación y activación. Las muestras se colocaron en recipientes de plástico con tapa, se transportaron al laboratorio en hieleras con temperatura de 4°C y fueron almacenadas en refrigeración a 5°C por 24 h hasta su revisión. Para el estudio se utilizaron 43 muestras que cumplieron con los criterios de inclusión: presentar movilidad y viabilidad superior al 90%, y tiempo superior a los 30 segundos.

Evaluación del semen. Para evaluar la movilidad de espermatozoides en semen fresco se colocaron $10\ \mu\text{L}$ de solución activadora (Tabla 1) sobre un portaobjetos, seguido de $1.0\ \mu\text{L}$ de concentrado de semen ($3.02 \times 10^9 \pm 2.94 \times 10^9$ cels/mL) y se observó al microscopio a 100 y 400 aumentos. La viabilidad fue determinada por medio de un frotis con tinción de eosina-nigrosina, de acuerdo con lo que refieren Peralta-Martínez *et al.* (2018).

Concentración espermática. La concentración de esperma se cuantificó utilizando una cámara Neubauer con doble conteo a una dilución de (1:1000 μL) semen y diluyente, respectivamente, para cada una de las muestras (Aguilar-Juárez, 2010). El número total de células presentes en un mL se calculó de acuerdo con Peralta-Martínez *et al.* (2018).

Volumen de muestra. Para el seguimiento del efecto de pH, se realizó un *pool* para obtener un volumen de 6 mL de semen por tratamiento (pH) y solución extensora.

Tabla 1. Diluyentes utilizados para evaluar el efecto del pH sobre la movilidad en espermatozoides de trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792).

Nombre	Composición iónica
Solución 306 (modificada de Cosson, 1999)	NaCl 136.9 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.09 mM y Tris 30 mM, 306 mOsmol/kg
Solución 512 (modificada de Cosson, 1999)	NaCl 228 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.81 mM y Tris 50 mM, 512 mOsmol/kg
Erdahl & Graham (1980)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.08 mM, Na_2HPO_4 1.49 mM, KCl 34.30 mM, ac. cítrico 0.52 mM, glucosa 55.5 mM, KOH 226 mM, bicina 324 mM, 333 mOsmol/kg
Mounib (1978)	Sacarosa 125 mM, glutatión reducido 6.5 mM, KHCO_3 100 mM. 200 mOsmol/Kg
Hanks (1975)	NaCl 136.9mM, KCl 5.4 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.09 mM, Na_2HPO_4 0.423 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, MgSO_4 0.81mM, NaHCO_3 1.16 mM y glucosa 55 mM, 300 mOsmol/kg

Capacidad amortiguadora en soluciones extensoras. Para asegurar que no se presentaran variaciones de pH durante del estudio y previo a la incubación del semen, se evaluó la capacidad amortiguadora de las cinco soluciones extensoras (Tabla 1) por un periodo de ocho días en soluciones esterilizadas y no estériles, y se monitoreó el pH diariamente del primero al octavo día de almacenamiento. Durante este periodo todos los extensores se guardaron en refrigeración a 5 °C y replicados dos veces.

Soluciones extensoras y de activación. Se prepararon 100 mL de cada solución extensora (Tabla 1): tres de composición sencilla (306, 512 y Mounib 1978) y dos de composición compleja (Erdahl & Graham 1980, y Hanks 1975), se ajustaron a pH de 7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0 y 8.2 con NaOH o HCl, y sólo para la solución de Hanks se ajustó con NaHCO₃ de acuerdo con lo expuesto por Hanks (1975), estos intervalos se basaron en lo reportado como óptimo para la inactivación del esperma por varios autores (Alavi & Cosson, 2005; Ingermann *et al.*, 2008; Ciereszko *et al.*, 2010; Nynca *et al.*, 2012; Dziejulska & Domagala, 2013; Ogretmen *et al.*, 2014; Inan & Ogretmen, 2015). Para la activación de espermatozoides después de ser diluidos en las cinco soluciones extensoras y a pH diferente, se prepararon 200 mL de solución DIA 532 y 200 mL de suero salino fisiológico (SSF) y se recolectaron 500 mL agua de estanque (Tabla 2).

Efecto del pH de soluciones extensoras en esperma. Para evaluar el efecto del pH de la solución extensora sobre la movilidad, se tomaron 10 µL de semen concentrado y se mezclaron con 30 µL de solución extensora; posteriormente se colocaron 10 µL de esta dilución sobre un portaobjetos y se le agregaron 20 µL de solución activadora. Se observó la movilidad en objetivo de 10 aumentos y objetivo ocular de 10 aumentos para un total de magnificación de 100 aumentos. Todas las muestras y experimentos se manejaron en un cuarto frío a temperatura de 14 °C.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza de dos vías (Ciereszko *et al.*, 2015) con las variables independientes extensor con pH diferente (Tabla 2) y soluciones activadoras (Tabla 1). Antes de realizar el análisis, los datos fueron transformados a la raíz cuadrada de arcoseno (Babiak *et al.*, 2001; Aguilar-Juárez, 2010). Para establecer las diferencias estadísticas entre los diferentes pH, se realizó una prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$ (Aguilar-Juárez 2006). Además se realizó un análisis de correlación lineal entre el pH y el porcentaje de movilidad para establecer si hay dependencia.

RESULTADOS

Evaluación del semen. La evaluación de la calidad espermática en los 94 machos de trucha presentó una movilidad promedio del 78.93 ± 26.28%, un tiempo promedio de movilidad del 36.36 ± 5.71

segundos, viabilidad del 79.23 ± 13.31%, concentración de 3.02 x 10⁹ ± 2.94 x 10⁹ cel/mL con volumen promedio del 4.19 ± 3.8 mL.

Capacidad amortiguadora en soluciones extensoras. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variaciones de pH en la evaluación de la capacidad amortiguadora de las cinco soluciones extensoras (Fig. 1a). No obstante, cuando las soluciones de composición compleja (Erdahl & Graham y Hanks) no son esterilizadas, presentan una disminución significativa de pH (7.99 a 3.98, y 7.66 a 5.82 respectivamente) desde el día 1 y hasta el día 8 ($p < 0.05$) (Fig. 1b).

Soluciones de activación. Las soluciones de activación (DIA 532, SSF y agua de estanque) activaron al 100% la movilidad en espermatozoides frescos. No obstante, al diluir el semen en las soluciones extensoras, la solución DIA 532 alcanzó un máximo de 52.6% de movilidad, mientras que el agua de estanque presentó el menor porcentaje de activación con un máximo de 10% (Figs. 2a-c).

Efecto en el esperma del pH de soluciones extensoras. En la evaluación del efecto del pH de la solución 306 sobre el movimiento de células espermáticas, se observó movilidad con todos los pH. La activación comenzó con un mínimo de 33% de movilidad a pH 7 e incrementó al 96% a pH 8.2. Se encontraron diferencias significativas entre los diferentes pH ($p < 0.05$) y una correlación positiva entre el pH y el porcentaje de movilidad ($R^2 = 0.85$) (Fig. 3). La solución que presentó los mejores porcentajes de activación fue DIA 532, con el 48% a pH 7.2 (Fig. 2a).

En la solución 512 no se observó movimiento de espermatozoides a pH 7 y 7.2. A partir de pH 7.4, y hasta pH 8.2, los espermatozoides presentaron movilidad al diluirse en la solución 512 con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) (Fig. 4). Se encontró una correlación positiva entre el pH y el porcentaje de movilidad ($R^2 = 0.93$). La solución DIA 532 activó el mayor porcentaje de células, con valores de 54, 53 y 51% con pH 7, 7.2 y 7.4, respectivamente, con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) (Fig. 2b).

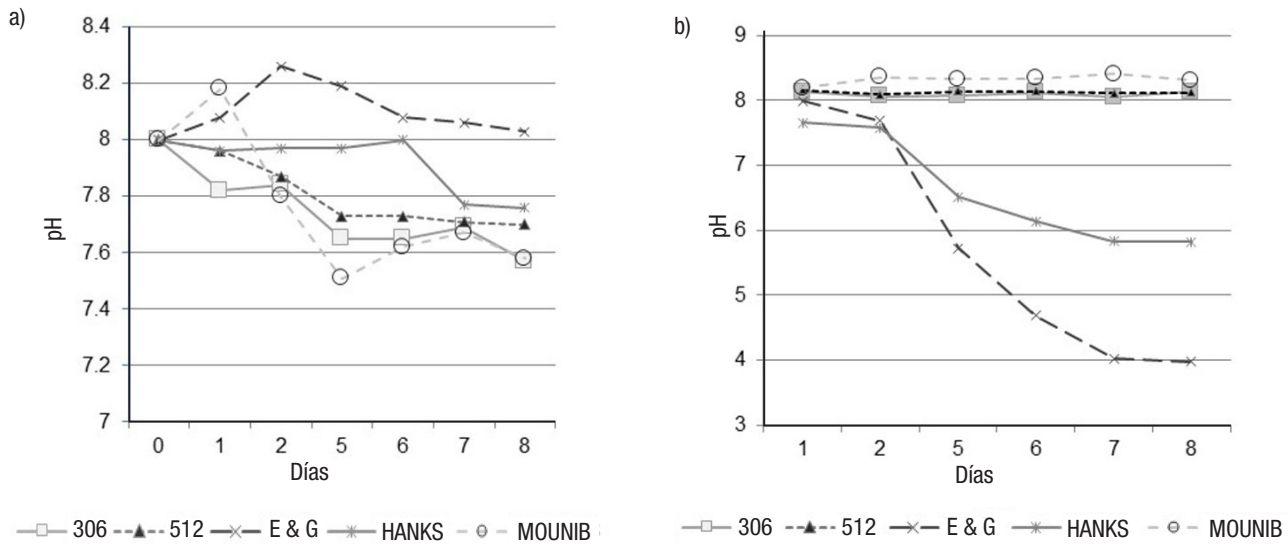
La solución de Hanks activó el movimiento de espermatozoides en todos los pH, con porcentajes que van desde el 42 hasta el 70% con pH de 7 y 7.8, respectivamente, pero no se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se encontró una correlación positiva media entre el pH y el porcentaje de movilidad ($R^2 = 0.64$). La solución de activación DIA 532 es la que presentó los mayores porcentajes de activación: 44, 51 y 51.5% con pH 7, 7.2 y 7.4, respectivamente, (Fig. 2c).

La solución de Erdahl y Graham no permitió el movimiento de los espermatozoides con ningún pH y el SSF fue el medio que mejor activó la movilidad espermática, con el 47% con pH 8 (Fig. 3a).

La solución de Mounib no activó la movilidad con ningún pH y el mayor porcentaje de activación se obtuvo con el SSF 18% (Fig. 3b).

Tabla 2. Soluciones activadoras utilizadas para la evaluación de movilidad espermática de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792).

Nombre	Composición
DIA 532 (Billard, 1977)	NaCl 8.72 mM, glicina 49.45 mM, Tris 20 mM, pH 9 y 87.39 mOsmol/kg
Suero salino fisiológico (SSF)	NaCl 14.54 mM en 100 ml H ₂ O bidestilada, pH 6 y 29 mOsmol/kg
Agua del estanque de cultivo	pH 7.6



Figuras 1a-b. Capacidad amortiguadora en las cinco soluciones extensoras esterilizadas (a) y no esterilizadas (b), almacenadas a 5 °C por un periodo de ocho días.

DISCUSIÓN

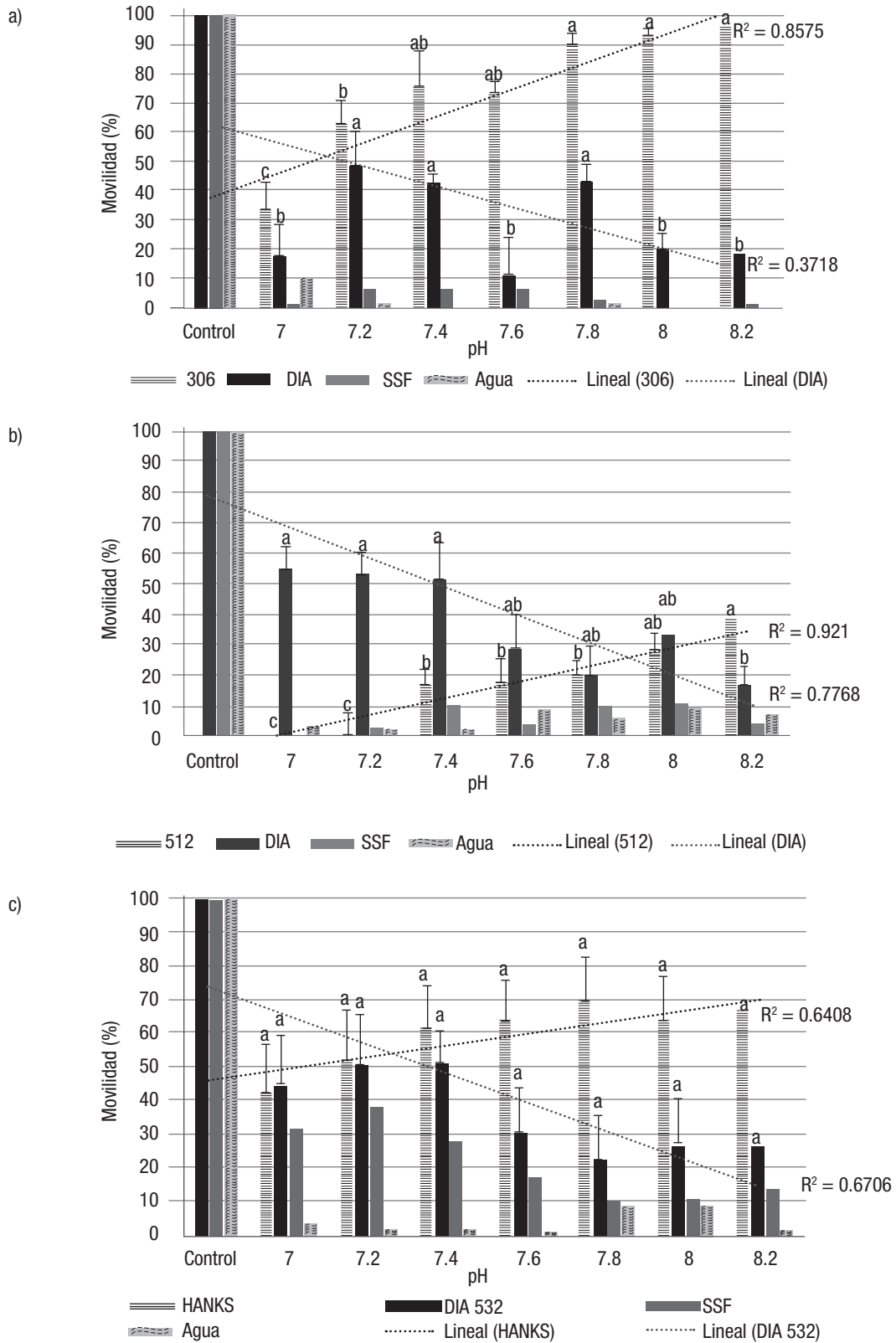
La capacidad amortiguadora de las soluciones extensoras no presentó diferencias significativas durante los ocho días de observación; no obstante, si las soluciones extensoras de Erdahl & Graham y Hanks no se esterilizan previo a su uso, pueden acidificarse debido a la proliferación de bacterias que son enriquecidas por la glucosa, y esa acidificación no permitirá la activación espermática, además de que causará daños en la célula. La forma disociada y altamente polar de los ácidos hace que atraviesen fácilmente la membrana plasmática de las células animales; una vez dentro de la célula, el ácido se disocia combinando el pH intracelular e interviene en el transporte de aminoácidos, así como en la carga eléctrica de la célula, lo que produce un aumento en los niveles de sodio y potasio. Este proceso aumenta la presión osmótica, eventualmente la membrana se rompe y la célula estalla (Alberts & Bray, 2006; Jiménez & Merchant, 2003).

Liu *et al.* (2016) reportan que la acidificación de la solución extensora disminuye gradualmente la movilidad y el pH durante el almacenamiento a largo plazo en semen de cabra (*Capra aegagrus s.e. hircus* Linnaeus, 1758) Chantzropoulos *et al.* (2015), señalan que la exposición de los espermatozoides a condiciones ácidas antes de su almacenamiento afecta la viabilidad y la movilidad durante la refrigeración. El uso de glucosa en extensores es común en técnicas de criopreservación como un protector externo que nutre la membrana celular; sin embargo, en procesos de conservación a corto y mediano plazo, se debe tener precaución al utilizarlo, ya que, como lo mencionan Jian-Hua *et al.* (2016), hay poca información sobre el impacto de los sustratos energéticos en los espermatozoides durante el almacenamiento del semen. De las tres soluciones activadoras que se probaron, DIA 532 es la que presentó un mayor porcentaje de activación (50%). Esto se debe principalmente a su pH alcalino, que modifica la capacidad amortiguadora del semen. De acuerdo con Ingerman *et al.* (2002), el semen de salmónidos posee una capacidad amortiguadora baja a pH altos y una capacidad amortiguadora alta a pH bajos. En este caso, al diluir el semen en el extensor, se vio afectado su pH externo, y por consecuencia,

su capacidad amortiguadora, por lo que fue más sensible al pH 9 de la solución DIA 532 y menos sensible a los pH del SSF (6) y del agua de estanque (7.6). Por otro lado, la correlación negativa que se observó en la activación de la movilidad con DIA 532 estuvo asociada al efecto de activación inducida por la solución extensora; es decir, las células que fueron activadas por la solución extensora no pudieron activarse nuevamente con la solución DIA 532. Cuando los mecanismos de señalización intracelular en la fosforilación del brazo externo de la dineína ATPasa se activan, no es posible volverlos a activar, ya que los elementos involucrados se utilizaron en esta acción (Gregorio & Pardo, 2010).

La correlación positiva encontrada entre el porcentaje de movimiento de células espermáticas y el pH de las soluciones 306, 512 y Hanks, mostró un efecto del pH en la activación de la movilidad. Woolsey e Ingerman (2004), mencionan que la dependencia entre movilidad y pH está relacionada con la sensibilidad de la dineína ATPasa al pH, ya que la actividad de esta enzima fue 3.5 veces mayor a pH 7.6 en comparación con pH 7. Esta correlación positiva entre la motilidad de los espermatozoides y el valor de pH del semen durante el almacenamiento también fue reportada por Liu *et al.* (2016).

Con la solución de Erdahl y Graham no se observó el efecto del pH, mientras que la mayor activación de la movilidad se obtuvo con el SSF (47%). De acuerdo con Aguilar-Juárez (2010), esta solución fue la más adecuada para la inactivación de espermatozoides de trucha *Oncorhynchus mykiss nelsoni* en procesos de preservación a mediano plazo, y el mayor porcentaje de movilidad espermática lo obtuvo con DIA 532 (80%). De igual forma, en este estudio dicha solución mantuvo inactivos los espermatozoides, pero el porcentaje de activación estuvo por debajo de lo encontrado por Aguilar-Juárez (2010). En este trabajo, el porcentaje de activación bajo pudo deberse a la esterilización de la solución, en donde el ácido cítrico, al igual que otros ácidos carboxílicos, cuando se calienta a más de 175 °C, se descompone y produce CO₂ y H₂O, lo que elimina su acción sobre la fijación de calcio en la membrana de los espermatozoides que, junto con los iones de Na⁺ y K⁺, mantienen el equilibrio osmótico al favorecer la movilidad de los espermatozoides (Cabrera *et al.*, 2011).

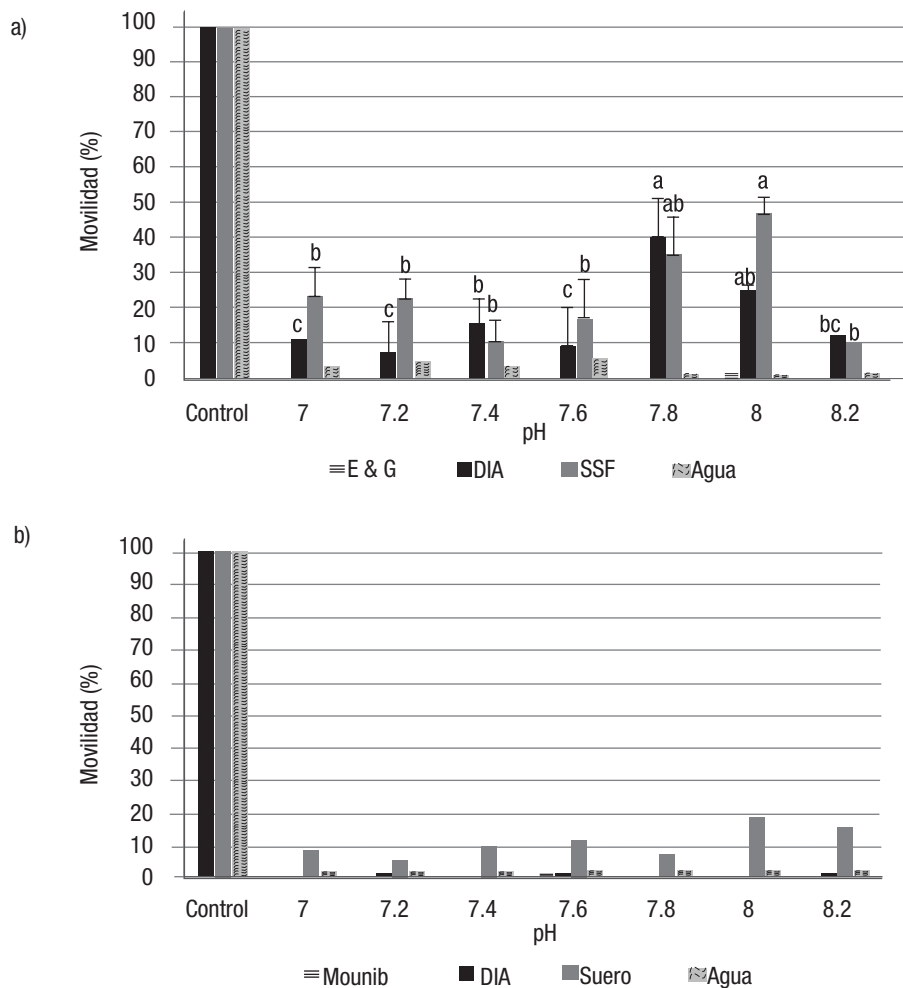


Figuras 2a-c. Movilidad de espermatozoides de *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) en extensor 306 (a), 512 (b) y Hanks (c), con pH variables y activación de movilidad con tres soluciones activadoras, DIA 532, SSF y agua de estanque. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, la solución de Mounib ha sido utilizada por varios autores para la criopreservación espermática en peces (Agarwal, 2011; Legendre & Billard, 1980; Pullin, 1972). En este estudio esta solución no activó la movilidad a ningún pH y la activación con SSF alcanzó sólo un 19%, lo cual puede atribuirse a la alta concentración de bicarbonato de potasio (KHCO₃) que contiene la solución (100 mM KHCO₃). Dziewulska & Domagala (2013) mencionan que a concentraciones de 8 mM de KCl hay nula movilidad; adicionalmente, encontraron una correlación negativa entre concentraciones del ion K⁺ y la movilidad. Por otro lado, aun cuando esta solución presenta una osmolaridad baja (200 mOsmol/kg), necesaria para la activación de esperma, esto no fue suficiente para permitir la movilidad de las células. De acuerdo con Boderenko (2014), la concentración de algunos iones, así como el pH, son críticos en cualquier condición osmótica, por lo tanto, es importante realizar más estudios que correlacionen la concentración iónica de los principales cationes que componen el fluido seminal con el pH de la solución.

Por lo anterior, la elaboración y uso de soluciones extensoras en almacenamiento de esperma a corto, mediano o largo plazo deben

presentar un equilibrio de concentración de iones y pH. En las células animales el pH interno se encuentra en un rango de 6.8 a 7.2; cuando el semen se diluye en una solución dentro de este rango, no hay hiperpolarización de la membrana celular, debido a que hay un equilibrio en la concentración de iones H⁺. Si el semen se diluye en soluciones ligeramente por encima o por debajo del pH interno, la capacidad amortiguadora de la célula aporta o libera iones H⁺ para reducir o aumentar el pH hasta llegar al equilibrio. Cuando esta capacidad amortiguadora es rebasada por el incremento o disminución de los iones H⁺, pueden ocurrir dos cosas: una concentración alta de iones H⁺ no permite la entrada de Na⁺, Ca²⁺ o Mg²⁺, por lo tanto, no hay un intercambio iónico y consecuentemente no se da la hiperpolarización de la membrana. Una baja concentración de iones H⁺ acelera la liberación de éstos desde el interior de la célula y, por consecuencia, la introducción de Na⁺, Ca²⁺ o Mg²⁺, con lo que ocurre el intercambio iónico que genera la hiperpolarización de la membrana y consecuentemente la creación de energía para la activación de los mecanismos que generan la movilidad del espermatozoide (Jiménez & Merchant, 2003; Lodish *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2006; López & Segura, 2008).



Figuras 3a-b. Movilidad de espermatozoides de *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) en extensor Erdahl & Graham (a) y Mounib (b), con pH variables y activación de movilidad con tres soluciones activadoras, DIA 532, SSF y agua de estanque. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Adicionalmente, es importante considerar las características individuales de cada especie, ya que la composición del fluido seminal puede diferir en la concentración de sus componentes (Dziewulska *et al.*, 2008), de manera que el efecto de la solución extensora o de almacenamiento puede tener resultados variables.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que con las soluciones 306, 512 y Hanks hay una relación positiva entre el pH y el porcentaje de movilidad en los espermatozoides de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), ya que al incrementarse el pH se incrementó la movilidad. En el caso de las soluciones de activación, se encontró una correlación negativa en la activación con DIA 532 con respecto al pH de la solución de almacenamiento. En las soluciones 306, 512 y Hanks, a menor pH, mayor porcentaje de activación.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Conacyt por la beca (267534) otorgada por medio del doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), a las granjas acuícolas La Cañada y Tatakany por el uso y manejo de reproductores y a Nanci Arana Brito por su apoyo en el procesamiento de muestras.

REFERENCIAS

- AGARWAL, N. K. 2011. Cryopreservation of fish semen. In: Bhatt, J. P., M. Thapliyal & A. Thapliyal (Eds.). *Himalayan aquatic biodiversity conservation & new tools in biotechnology*. Transmedia Publication, India. 194 p.
- AGUILAR-JUÁREZ, M. 2010. Introducción a la maduración gonádica y conservación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann, 1908). Tesis de doctorado en Ciencias (Ecología). Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. 275 p.
- ALAVI, S. M. & J. COSSON. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* 29: 101-110. DOI:10.1016/j.cellbi.2004.11.021
- ALAVI, S. M. & J. COSSON. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* 30: 1-14. DOI:10.1016/j.cellbi.2005.06.004
- ALAVI, S. M. H., J. COSSON, M. KARAMI, B. M. AMIRI & M. A. AKHOUNZADEH. 2004. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Society for Reproduction and Fertility* 128: 819-828.
- ALAVI, S. M. H., J. COSSON, M. KARAMI, B. M. AMIRI & M. A. AKHOUNZADEH. 2004. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Society for Reproduction and Fertility* 128: 819-828.
- ALBERTS, B. & D. BRAY. 2006. *Introducción a la Biología Celular*. 2a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 864 p.
- BAYNES, S. M., A. P. SCOTT & A. P. DAWSON. 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: Effects of and pH on motility. *Fishery Biology* 19 (3): 245-264.
- BILLARD, R. 1977. A new technique or artificial insemination for salmonids using a sperm diluent. *Fisheries* 2: 24-25.
- BONDARENKO, O., B. DZYUBA, J. COSSON, M. RODINA & O. LINHART. 2014. The role of Ca²⁺ and Na⁺ membrane transport in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) spermatozoa motility. *Fish Physiology and Biochemistry* 40 (5): 1417-1421. DOI:10.1007/s10695-014-9936-5
- BOITANO, S. & K. C. OMOTO. 1991. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. *Journal of Cell Science* 98: 343-349.
- CABRERA, V. P., L. A. AYULO & A. C. PANTOJA. 2011. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 22 (2): 105-113.
- CIERESZKO, A., G. J. DIETRICH, M. A. DIETRICH, J. NYNCA, H. KUZMINSKI, S. DOBOSZ & J. GRUDNIEWSKA. 2010. Effects of pH on sperm motility in several Salmoniformes species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta*, *Salmo salar* and *Thymallus thymallus*. *Applied Ichthyology* 26: 665-667.
- CIERESZKO, A., G. J. DIETRICH, J. NYNCA, S. DOBOSZ & J. KROM. 2015. Maturation of spermatozoa from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sex-reversed females using artificial seminal plasma or glucose-methanol extender. *Theriogenology* 83 (7): 1213-1218. DOI:10.1016/j.theriogenology.2014.12.028
- COSSON, J. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon, C. (Ed.). *The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications*. Cache River Press, pp. 161-186.
- COSSON, J. 2004. The Ionic and Osmotic Factors Controlling Motility of Fish Spermatozoa. *Aquaculture International* 12: 69-85.
- CHANTZAROPOULOS, A., C. NATHANAILIDES, L. KOKOKIRIS, A. BARBOUTI & T. ZHANG. 2015. A brief exposure to low pH prior to refrigerated storage reduces the motility and viability of goldfish sperm (*Carassius auratus*, Linnaeus, 1758). *Applied Ichthyology* 31 (1): 89-93.
- DA SILVA, J. C., A. S. VARELA JUNIOR, J. S. CALDAS, C. DA SILVA FREITAS, J. G. BOTELHO, E. P. COLARES & C. D. CORCINI. 2016. The effects of osmolality on sperm quality in *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes: *Anablepidae*). *Fish Physiology and Biochemistry* 42 (1): 93-102. DOI:10.1007/s10695-015-0120-3
- DZIEWULSKA, K., A. RZEMIENIECKI, J. DOMAGAŁA. 2008. Basic physico-chemical parameters of milt from sea trout (*Salmo trutta m. trutta*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology* 24 (4): 497-502. DOI:10.1111/j.1439-0426.2008.01133
- DZIEWULSKA, K. & J. DOMAGAŁA. 2013. Effect of pH and cation concentrations on spermatozoan motility of sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.). *Theriogenology* 79 (1): 48-58. DOI:10.1016/j.theriogenology.2012.09.008
- DZYUBA, B., J. COSSON, G. YAMANER, O. BONDARENKO, M. RODINA, D. GELA, V. BONDARENKO, A. SHALIUTINA & O. LINHART. 2013. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Cryobiology* 66 (2): 192-194. DOI:10.1016/j.cryobiol.2012.12.003
- ERDAHL, D. A. & E. F. GRAHAM. 1980. Cryopreservation of spermatozoa of the brook and rainbow trout. *CryoLetters* 1: 203-208.

- GARZON, D. L., D. S. PENARANDA, L. PÉREZ, F. MARCO-JIMÉNEZ, X. ESPERT, T. MULLER, M. JÓVER & J. F. ASTURIANO. 2008. Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on the cryopreservation of European eel sperm. *Reproduction in domestic animals* 43 (1): 99-105. DOI:10.1111/j.1439-0531.2007.00861.x
- GREGORIO, M. J. & S. PRADO-CARRASCO. 2010. Crioconservación de semen en peces: Efecto sobre la movilidad y fertilidad. *Acta Biológica Colombiana* 15 (2): 3-24.
- HEERDER, E. V., H. J. VJUREN & G. J. STEYN. 1993. Development and evaluation of sperm diluents for the artificial insemination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic, Living Resour* 6: 57-62.
- HU, J., Y. ZHANG, R. ZHOU & Y. ZHANG. 2009. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchoni*. *Theriogenology* 72 (5): 704-710. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.05.009
- INGERMANN, R. L., D. C. BENCIC & J. G. CLOUD. 2002. Low seminal plasma buffering capacity corresponds to high pH sensitivity of sperm motility in salmonids. *Fish Physiol Biochemistry* 24: 299-307.
- INGERMANN, R. L., M. HOLCOMB, M. D. ZUCCARELLI, M. K. KANUGA & J. G. CLOUD. 2008. Initiation of motility by steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: Membrane ion exchangers and pH sensitivity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151: 651-656.
- INAN, B. E. & F. OGRETMEN. 2015. Determination of differences in the biochemical properties of sperm activating and non-activating ovarian fluids and their influences on sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 448: 539-544.
- JIMÉNEZ, L. F. & H. MERCHANT. 2003. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación. México. 912 p.
- LEGENDRE, M. & R. BILLARD. 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction Nutrition Development* 20 (6): 1859-1868.
- LIU, C. H., H. B. DONG, D. L. MA, Y. W. LI, D. HAN, M. J. LUO, Z. L. CHANG & J. H. TAN. 2016. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Animal Reproduction Science* 164: 47-56. DOI:10.1016/j.anireprosci.2015.11.011.
- LI, P., Z.H. LI, M. HULAK, M. RODINA, & O.LINHART. (2012). Regulation of spermatozoa motility in response to cations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Theriogenology* 78: 102-109. DOI:10.1111/j.1439-0531.2010.01651
- LODISH, H., A. BERK, P. MATSUDAIRA, CH. A. KAISER, M. KRIEGER, M.P. SCOTT, S. L. ZIPURSKY & J. DARNELL. 2006. *Biología celular y molecular*. 5ª ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. 1088 p.
- LÓPEZ, M. L. & C. SEGURA. 2008. Nuevas vías de permeabilidad y regulación del pH intracelular como posibles blancos terapéuticos en *Plasmodium falciparum*. *Acta Biológica Colombiana* 13 (2): 3-21
- MEDINA-ROBLES, V. M., Y. M. VELASCO-SANTAMARÍA & P. E. CRUZ-CASALLAS. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleosteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18 (1): 34-48.
- MOHR, L. C. & S. M. CHALANCHUK. 1985. The effect of pH on sperm motility of white suckers, *Catostomus commersoni*, in the Experimental Lakes Area. *Environmental Biology of Fishes* 14 (4): 309-314.
- MORISAWA, M., M. OKUNO, K. SUZUKI, S. MORISAWA & K. ISHIDA. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *Experimental Biology* 107: 105-113.
- MOUNIB, M. S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *Reproduction and Fertility* 53 (1): 13-8.
- NYNCA, J., G. J. DIETRICH, H. KUZMINSKI, S. DOBOSZ & A. CIERESZKO. 2012. Sperm motility rate at pH 6.5 as a useful parameter for the evaluation of rainbow trout sperm quality and usefulness for short-time storage. *Applied Ichthyology* 28: 930-933.
- ÖGRETMEN, F., S. GOLBASI & B. E. INANAN. 2014. Inhibitory effect of K⁺ and Ca₂⁺ concentrations, pH, and osmolality of activation solution on motility of shabut (*Barbus grypus* Heckel 1843) spermatozoa. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 38: 245-252.
- PERALTA-MARTÍNEZ, M. A., J. VELAZCO-SARABIA, D. A. RETANA-ORTEGA. 2018. Evaluation of sperm quality in adult white fish (*Chirostoma estor*) Jordan 1879, Mexico. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6 (1): 121-125.
- PULLIN, R. S. V. 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures. *Aquaculture* 1: 279-283.
- ROSENGRAVE, P., H. TAYLOR, R. MONTGOMERIE, V. METCALF, K. MCBRIDE & N. J. GEMMELL. 2008. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*: 152: 123-129.
- SANCHES, E. A., G. NEWMANN., C. PEREIRA & R. A. BOMBADELLI. 2015. Effects of water pH on gamete activation, embryonic development, and larval normality in *Prochilodus lineatus*. *Ciências Agrárias, Londrina* 36 (4): 2871-2880. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n4p2871
- TABARES, C. J., A. M. TARAZONA & Á. M. OLIVERA. 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18 (2): 149-161.
- TAKEI, G. L., C. MUKAI & M. OKUNO. 2012. Transient Ca²⁺ mobilization caused by osmotic shock initiates salmonid fish sperm motility. *The Journal of Experimental Biology* 215: 630-641.
- VALDEBENITO, I., C. FLETCHER, V. VERA & J. FERNÁNDEZ. 2009. Factores físico-químicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria* 41: 97-106.
- VIVEIROS, A. T., Z. A. ISAU, D. CANEPELE & M. C. LEAL. 2012. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology* 78 (4): 803-810. DOI:10.1016/j.theriogenology.2012.03.028.
- YANG, H., L. HAZLEWOOD, R. B. WALTER & T. R. TIERSCH. 2006. Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Cryobiology* 52 (2): 209-218. DOI:10.1016/j.cryobiol.2005.11.002
- WOOLSEY, J. & R. L. INGERMANN. 2003. Acquisition of the potential for sperm motility in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*): effect of pH on dynein ATPase. *Fish Physiology and Biochemistry* 29: 47-56.