

Ensayos preliminares de preservación a corto plazo de semen de los bagres yaque (*Leiarius marmoratus*) y sierra (*Oxidoras sifontesi*)

Germán A. Poleo* y José A. Mora

Estación de Piscicultura, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Apartado 400, Barquisimeto, Venezuela.

Recibido: 24-10-06 Aceptado: 24-10-08

Resumen

Espermatozoides de los bagres yaque (*Leiarius marmoratus*) y sierra (*Oxidoras sifontesi*) suspendidos y mantenidos a 4 °C tanto en solución de Hank como en solución de hidratación oral (Oralite®) mantuvieron su capacidad de movilidad por al menos 5 días. En ensayos de fertilidad, espermatozoides de bagres yaque almacenados por 2 días a 4 °C en solución de Hank o en Oralite® fecundaron el 45% y el 70%, respectivamente, de los ovocitos a los que fueron expuestos. Espermatozoides de bagres sierra almacenados en las mismas soluciones y en similares condiciones fecundaron el 60% de los ovocitos a los que fueron expuestos. Estos resultados demostraron que soluciones salinas de fácil obtención pueden ser utilizadas para prolongar la viabilidad de los espermatozoides de dos especies de bagres de importancia comercial.

Palabras claves: bagres, preservación de espermatozoides, gameto, soluciones de extensión.

Preliminary trials of short-term sperm preservation of Yaque (*Leiarius marmoratus*) and Sierra (*Oxidoras sifontesi*) catfish

Abstract

Sperm cells from yaque and sierra catfish suspended at 4 °C in Hank's solution and in hydration oral solution (Oralite®) were capable of maintaining motility for at least 5 days. Fertility trials using sperm cells from yaque catfish suspended for 2 days at 4 °C in Hank's solution and in Oralite® showed fertilization rates of 45% and 70%, respectively. Sperm cells from sierra stored for 2 days at 4 °C in Hank's solution were capable of fertilizing around 60% of the exposed oocytes. These results demonstrate that a salt solution of easy acquisition could be used for short-term storage of sperm cells from two species of catfish with economic importance.

Key words: catfish, sperm cell preservation, gamete, extension solutions.

* Autor para la correspondencia. E-mail: gpoleo@ucla.edu.ve.

Introducción

Frecuentemente ocurre que la maduración de las gónadas de peces en estaciones piscícolas, tanto de machos como de hembras, se encuentra desfasada, situación que puede traer como consecuencia la disminución en la producción de alevines. En diferentes especies de peces en las que se practica la fecundación artificial, este inconveniente ha sido solucionado mediante la preservación del semen. El semen de peces se puede almacenar por períodos cortos de tiempo en soluciones de extensión (preservación a corto plazo) (1-6) o conservarse por períodos indefinidos mediante la criopreservación (3, 7-10). En la preservación de semen a corto plazo se utilizan soluciones fisiológicas que permiten mantener los gametos inactivos por horas o días antes de ser utilizados para la fecundación. Soluciones fisiológicas como la solución de Ringer (8) y la solución de Hank (6, 10, 11) han sido frecuentemente utilizadas para mantener inactivos y viables por varios días los espermatozoides de peces de agua dulce. Este tipo de preservación permite que el semen de un ejemplar pueda ser utilizado para fecundar diferentes hembras en diferentes días, disminuyendo los problemas de asincronía. Además de eliminar este inconveniente, las técnicas de preservación de semen permiten un manejo más cómodo al momento del desove y son frecuentemente utilizadas como herramientas en el mejoramiento genético, al facilitar el intercambio de gametos entre estaciones y la producción de híbridos.

Aunque la mayoría de los peces de aguas continentales que se encuentran en Venezuela con potencial para ser cultivados para el consumo tienen que ser desovados artificialmente, la preservación de espermatozoides no es aplicada en ninguno de ellos. Un posible problema que pudiera surgir al momento de establecer estas técnicas a escala comercial en el país es la disponibilidad de soluciones fisiológicas como la solución de Hank o de Ringer. La elaboración de estas

soluciones requiere de reactivos de alto grado de pureza y equipos costosos (balanzas, medidores electrónicos de pH), lo cual reduciría las posibilidades de aplicación por parte de pequeños productores.

El objetivo de este trabajo fue evaluar: 1) la solución de hidratación oral (Oralite®) como posible medio para la preservación a corto plazo de los espermatozoides de los bagres yaque (*Leiarius marmoratus*) y sierra (*Oxidoras sifontesi*); 2) el comportamiento en el tiempo de espermatozoides de bagres yaque y sierra almacenados en soluciones salinas, y 3) la capacidad de fecundación de los espermatozoides de los bagres yaque y sierra después de haber sido almacenados en solución de Hank y en Oralite®.

Materiales y métodos

Animales

Los peces utilizados en esta investigación forman parte del conjunto de reproductores de la Estación de Piscicultura adscrita al Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, la cual se encuentra a unos 500 m.s.n.m. en Guaremal, municipio Peña, estado Yaracuy. Los reproductores fueron alimentados diariamente con alimento concentrado (Cachavit, Vitalin, Chivacoa, Yaracuy) que contenía 28% de proteínas. La selección de los reproductores se hizo entre los meses de abril y junio. Se escogieron machos y hembras de las especies *Leiarius marmoratus* y *Oxidoras sifontesi* en etapa reproductiva para la extracción de los gametos, que fueron utilizados en los ensayos de preservación y fecundación.

Obtención de espermatozoides y suspensión en soluciones salinas

Cuatro machos de bagres sierra (*Oxidoras sifontesi*) que expulsaban semen fácilmente al presionar su abdomen fueron removidos de los estanques. La región urogenital se secó con toallas de papel absorbente para reducir la posibilidad de activación de los gametos. El semen expulsado por el poro

genital fue rápidamente colectado con una pipeta y colocado en 4 tubos (1 por pez) de microcentrífuga de 2,5 mL donde una alícuota de cada ejemplar se suspendió 1:1 en solución de Hank y otra, 1:1 en solución electrolítica de hidratación oral (Oralite®). La solución de Oralite® se preparó siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante (un sobre de Oralite® en 1 L de H₂O) y estaba constituida por 3,5 g/L de cloruro de sodio (NaCl), 2,9 g/L de citrato de sodio dihidratado, 1,5 g/L de cloruro de potasio (KCl), y 20 g/L de glucosa anhidra (C₆H₁₂O₆).

A diferencia de otros bagres de la familia Pimelodidae, el bague yaque no expulsa el semen cuando se le presiona el abdomen; por esta razón, es necesario remover los testículos. Tres reproductores de bagres yaque fueron anestesiados colocándolos en agua que contenía 0,17 mg/mL de metanosulfonato de tricaina (methyl-m-aminobenzoate, MS 222, Argent Laboratories, Inc., Redmond, Washington). Una vez anestesiados, se sacaron del agua y con un bisturí se les realizó una incisión en el abdomen. Los testículos de tres machos, seis testículos en total, fueron extraídos con cuidado para evitar contacto con sangre y se colocaron por separado dentro de 6 bolsas de plástico (Ziplock®). A tres bolsas se les agregó solución de Hank y a las otras tres, solución electrolítica Oralite®, en una relación 1 g de testículos por 20 mL de solución salina. El tejido se maceró dentro de las bolsas y el semen en suspensión fue trasvasado a *beakers*, los cuales se cubrieron con Envoplast® y se colocaron en la nevera a 4 °C hasta su utilización.

Valoración de la movilidad de los espermatozoides

Debido a la subjetividad en la estimación de la movilidad de los espermatozoides en peces, solo se consideraron móviles aquellos espermatozoides que mostraron un movimiento vigoroso y sostenido por más de 5 segundos (2). Para valorar la movilidad, se colocaron en un portaobjeto 10 µL de se-

men suspendido en las soluciones salinas; luego, los espermatozoides se activaron agregando 20 µL de agua destilada. La movilidad se observó a través de un microscopio con objetivo de magnificación 40X (Olympus Optical Co., LTD., Taiwán, modelo CHK). A espermatozoides de 3 bagres yaque y de 4 bagres sierra suspendidos tanto en solución de Hank como en Oralite® a 4 °C, se les calculó el porcentaje de movilidad diariamente hasta que no se observaron espermatozoides en movimiento.

Inducción hormonal

La inducción hormonal en hembras de bagres yaque y sierra se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kossowski y Madrid (12), con algunas modificaciones. El índice de maduración gonadal se constató utilizando el método de la cateterización intraovárica (13, 14). Aquellas hembras que presentaron el 70% de sus ovocitos con el núcleo migrando a la periferia, se seleccionaron y se trasladaron a tanques de espera con flujo continuo de agua y constante aireación. A las hembras, tanto de bagres yaque como de bagres sierra, se les inyectaron 3 dosis de extracto de hipófisis de carpa. Una primera dosis de 0,3 mg/kg de peso del animal; 24 h después, una segunda dosis de 0,6 mg/kg, y 12 h más tarde, una tercera dosis de 5,4 mg/kg. Luego de 8 h, los peces que con una leve presión en el abdomen expulsaban sus ovocitos fueron completamente removidos del agua. Los ovocitos se obtuvieron aplicando presión sobre el abdomen del pez, ejerciendo un movimiento continuo de la región anterior hacia la región caudal. Los gametos se colectaron en envases de plástico que contenían solución de Hank para evitar su activación. Un macho de bague sierra que expulsaba semen fue inyectado un día antes del desove con una sola dosis (1 mg/kg) de hipófisis de carpa para aumentar el volumen de semen. Este semen (control) se utilizó para comparar los porcentajes de fecundación con el semen preservado.

Fecundación artificial

La capacidad de fecundación de los espermatozoides de los bagres yaque y sierra suspendidos en las dos soluciones salinas (solución de Hank y Oralite®) por dos días a 4 °C se observó fecundando los ovocitos maduros obtenidos de un ejemplar de bagre yaque y de uno de bagre sierra. Los ovocitos se distribuyeron en tres grupos (uno por tratamiento) en cápsulas de Petri que contenían solución de Hank para evitar su activación. Un mililitro de semen preservado en cada una de las soluciones de extensión utilizadas y de semen recién extraído (control), se añadieron por separado a las cápsulas de Petri (tres por tratamiento). Se agregaron 4 mL de agua en cada cápsula para la activación de los gametos y se incubaron por 10 min. Posteriormente se llenaron las cápsulas con agua y se mantuvieron a temperatura ambiente (27 °C). La tasa de fecundación se valoró por la cantidad de ovocitos fecundados que alcanzaron el estadio de larvas.

Análisis estadístico

Los porcentajes de movilidad diarios de los diferentes tratamientos se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se consideraron significativos cuando $\alpha \leq 0,05$.

Resultados y discusión

Espermatozoides de tres ejemplares de bagres yaque obtenidos mediante disección y maceración de los testículos mostraron $70 \pm 16\%$ (media \pm DS, $n = 3$) de movilidad al momento de su extracción y suspensión en las soluciones de Hank y Oralite®. El porcentaje de movilidad decreció en el tiempo llegando a cero en el sexto día (figura 1). No se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los porcentajes de movilidad de los espermatozoides suspendidos en las dos soluciones salinas utilizadas.

El método de extracción y maceración utilizado para la obtención del semen del bagre yaque fue efectivo; sin embargo, fue inte-

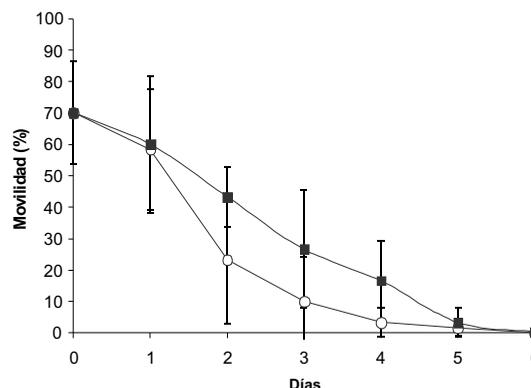


Figura 1. Estimación de la movilidad de los espermatozoides de bagres yaque suspendidos en solución de Hank (O) y Oralite (■) almacenados a 4 °C. Cada curva representa el promedio \pm DS del semen de 3 peces por separado.

resante notar que el porcentaje de movilidad observado fue relativamente bajo (70%). Esto puede estar relacionado con el método de extracción, ya que al macerar los testículos completos se obtiene una población de células germinales que está constituida por células en diferentes estadios de maduración (15). El que sea necesaria la extracción de los testículos del bagre yaque para obtener espermatozoides implica pérdida en términos económicos y biológicos, ya que el inventario de reproductores machos requiere ser renovado constantemente. Esta característica es una razón de peso para utilizar técnicas de preservación en esta especie, lo cual permitiría un uso más eficiente de los espermatozoides pues podrían ser utilizados en sucesivas fecundaciones y por varios días. Esto se comprobó cuando los espermatozoides de bagres yaque suspendidos a 4 °C por 2 días en la solución de Hank fecundaron el 45% de los ovocitos a los que fueron expuestos, mientras que los espermatozoides suspendidos en Oralite® fecundaron el 70% de ellos. La fecundación con semen fresco o control fue de 41%. Aunque no se puede concluir sobre cuál tratamiento fue más efectivo en este ensayo, lo importante de este

resultado es que la capacidad de fecundación del semen preservado se mantuvo en ambas soluciones por lo menos durante dos días luego de haber sido extraído.

En los experimentos con bagres sierra, los espermatozoides recién extraídos mostraron un porcentaje de movilidad de $97 \pm 4\%$ (media \pm DS, $n = 4$). Los espermatozoides suspendidos en solución de Hank mantuvieron su capacidad de movilidad hasta el día 6 y los suspendidos en Oralite® hasta el día 7 (figura 2). Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de movilidad entre los espermatozoides suspendidos en las dos soluciones los días 5 ($P = 0,02$) y 6 ($P = 0,03$) (figura 2). Parte de la disminución de la movilidad de los espermatozoides a medida que transcurre el tiempo ha sido relacionada con el crecimiento bacteriano y la forma de almacenamiento (6, 4, 16, 17). Por ejemplo, la utilización de antibióticos en las soluciones de extensión ha aumentado el período de viabilidad de los espermatozoides de distintas especies de peces (6, 18-19).

En los ensayos de fertilidad, los espermatozoides provenientes de bagres sierra que fueron suspendidos en solución de Hank y mantenidos a 4°C por dos días fecundaron el 59% de los ovocitos a los que fueron expuestos. Los espermatozoides suspendidos en Oralite® bajo las mismas condiciones fecundaron el 62% de los ovocitos. Este resultado contrasta con el porcentaje de fecundación que se alcanzó con espermatozoides frescos (13%), lo cual puede ser explicado por la variabilidad en la calidad de los gametos entre individuos. Subsecuentes investigaciones deberán aumentar el número de réplicas para poder llegar a una conclusión sobre la diferencia en la capacidad de fecundación entre espermatozoides preservados en soluciones salinas y aquellos recién extraídos.

Conclusiones

Tanto la solución de Hank como la de Oralite® mostraron su capacidad para ex-

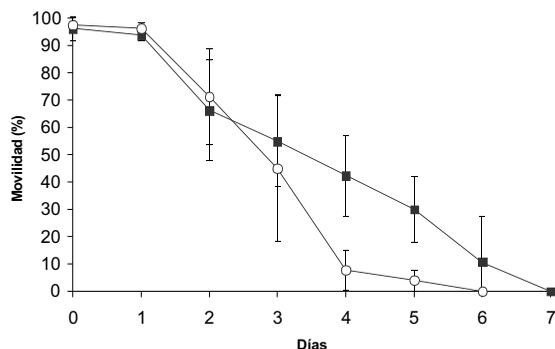


Figura 2. Estimación de la movilidad de los espermatozoides de bagres sierra suspendidos en solución de Hank (O) y Oralite (■) almacenados a 4°C . Cada curva representa el promedio \pm DS del semen de 4 peces por separado.

tender la viabilidad de los espermatozoides de bagres yaque y sierra por más de 4 días. Sin embargo, Oralite® presenta ciertas ventajas por ser un producto de fácil obtención y preparación. Cualquier solución de hidratación oral que contenga 3,5 g/L de NaCl, 2,9 g/L de citrato de sodio di-hidratado, 1,5 g/L de KCl, y 20 g/L de glucosa anhidra ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) serviría para extender la viabilidad de los espermatozoides de estos bagres. Aunque estos resultados son preliminares y mejoras sustanciales deben hacerse, esta investigación abre las puertas para la utilización de la preservación de espermatozoides a corto plazo en el desarrollo de la acuicultura venezolana. La utilización de estas soluciones hidratantes, como Oralite®, de fácil acceso en todo el país y fácil preparación, facilitaría la utilización de este tipo de prácticas por parte de los pequeños productores. Esto ayudaría al mejoramiento genético de peces de interés comercial al facilitar el intercambio de gametos entre poblaciones naturales y estaciones de piscicultura o entre diferentes estaciones (9, 18, 20). Con la utilización de esta tecnología se podría establecer en un futuro el uso de semen comercial mediante el desarrollo de centros de producción de semen o centros de transferencia

genética, de igual manera como se utilizan en diversos sectores pecuarios. Dichos centros tendrían la ventaja de tener un control más preciso sobre la calidad tanto del procesamiento del semen como de la genética de este, lo que llevaría a una mejora en la producción acuícola venezolana y suramericana. El potencial piscícola venezolano indica que este rubro de la agricultura crecerá en los próximos años, lo que implica que nuevas tecnologías tendrán que irse incorporando para la masificación de la producción, incluyendo entre ellas a la preservación de espermatozoides.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el Consejo Científico y Humanístico de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, proyecto 013-RAG-2003.

Referencias bibliográficas

1. MARQUES S., PEREIRA H. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 799-804, 2004.
2. STOSS J., BUYUKHATIPOGLU S., HOLTZ W. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 18: 1077-1082, 1978.
3. STOSS J., REFSTIE T. *Aquaculture* 30: 229-236, 1983.
4. PARK C., CHAPMAN F. *North American Journal of Aquaculture* 67: 52-57, 2005.
5. BATES M.C., WAYMAN, W.R., TIERSCH T.R. *T. Am. Fish. S.* 125: 798-802, 1996.
6. CHRISTENSEN J.M., TIERSCH T.R. *J. World. Aquaculture. Soc.* 27: 340-346. 1996.
7. TIERSCH T.R., GOUDIE C.A., CARMICHAEL, G.J.. *T. Am. Fish. S.* 123: 580-586, 1994.
8. RANA K.J., MCANDREW B.J. *Aquaculture* 76:335-345, 1989.
9. TIERSCH, T. R. *Cryopreservation in Aquatic Species*. (Eds. Tiersch T.R., Mazik P.M.) World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana (USA), pp. xix-xxvi, 2000.
10. KOPEIKA E., KOPEIKA J., ZHANG T. *Methods Mol. Biol.* 368: 203-217, 2007.
11. TIERSCH T.R., GOUDIE C.A., CARMICHAEL, G.J. *T. Am. Fish. S.* 123: 580-586, 1994.
12. KOSSOWSKI C., MADRID F. *Acta Científica Venezolana* 36: 284-285, 1985.
13. SHEHADEH Z.H., KUO C.M., MILISEN K.K. *J. Fish. Biol.* 5: 489-496, 1973.
14. KOSSOWSKI C. *Acta Científica Venezolana* 42:48-50, 1991.
15. PUDNEY J. *Micros. Res.* 32:459-497, 1995.
16. JENKINS J.A., TIERSCH T.R. *J. World Aquaculture Soc.* 28: 282-288, 1997.
17. SEGOVIA M., JENKINS J.A., PANIAGUA-CHAVEZ C., TIERSCH T.R. *Theriogenology* 53: 1489-1499, 2000.
18. TIERSCH T.R., WAYMAN R.W., FIGIEL C.R., GORMAN, O.T., WILLIAMSON, H.H., CARMICHAEL G.J. *N. Am. J. Fish. Manage.* 17: 167-173, 1997.
19. MARIA A.N., VIVEIROS A.T.M., FREITAS R.T.F., OLIVEIRA A.V. *Aquaculture* 260: 298-306. 2006.
20. CLOUD J.G., MILLER W.H., LEVANDUSKI M.J. *Progressive Fish-Culturist* 52: 51-53. 1990.