

Artículo Original

Tiempo de latencia para semen colectado de *Colossoma macropomum* "Gamitana" en solución sacarosa

[Latency time for semen collected from *Colossoma macropomum* "Gamitana" in sucrose solution]

Ehrlich Llasaca-Calizaya^{1*}, Juvenal Napuchi-Linares², Lorgio Verdi-Olivares², Jesús Núñez-Rodríguez³

¹Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Escuela de Post Grado, Cátedra CONCYTEC, Maestría en Acuicultura, Iquitos, Perú.

²Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Acuicultura, Pevas 5^{ta} Cuadra, Iquitos, Perú

³Instituto de Investigaciones para el desarrollo, IRD-UR 175, Francia.

*e-mail: Ehrlich2@hotmail.com

Resumen

El objetivo fue estimar el tiempo de latencia (almacenamiento), para el semen de *Colossoma macropomum*, "gamitana" en solución de 400 mM de Sacarosa. Se consideró aceptable los niveles de motilidad superiores al 40%, lo cual garantiza eficientes tasas de fertilización. Para el desarrollo del experimento se colectó 2 lotes de semen inmóviles de gamitana (inducidos con Conceptal®), los cuales posteriormente fueron activados con agua destilada. El primer lote estuvo constituido por semen en sacarosa 400 mM, puro, a temperatura ambiente y refrigerado (4°C). La motilidad fue evaluada, cada hora, hasta la 7^{ma} hora post colecta. El segundo lote con un semen en sacarosa 400mM a temperatura refrigerada y evaluada cada 12 horas. Los resultados del primer lote de semen demuestran que a partir de la 7^{ma} 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. El proceso de extraer y colocar repetidas veces la misma muestra en refrigeración, limita el tiempo de viabilidad de semen con sacarosa en 8 horas aproximadamente. La utilización de sacarosa como medio para almacenar semen inmotil viable de gamitana, ayuda a conservar los espermatozoides por tiempos relativamente cortos.

Palabras clave: *Colossoma macropomum*, tiempo de latencia, motilidad, sacarosa

Abstract

The aim was to estimate the latency time (storage) for semen of *Colossoma macropomum*, "gamitana" in solution of 400 mM sucrose. Levels of motility higher than 40% were considered as acceptable, because guarantee efficient fertility rates to fingerlings production. In order to develop this experiment, there were collected 2 lots of sperm immobiles of gamitana (induced with Conceptal®) which were subsequently activated using distilled water. The first batch consisted of semen in sucrose 400 mM, pure, at environment temperature and refrigerated (4 °C). The motility was evaluated, each hour until the 7th hour post collection. The second batch included one treatment with 4 replicates of semen in sucrose 400 mM at refrigerated temperature; this batch was evaluated each 12 hours. The results in the first batch of semen shown that after the 7th hour and forward, the motility levels in significant way dropped down below to 40%. For the second batch, the results demonstrate the feasibility of using sucrose solution as a means of preservation, to keep sperm refrigerated for 2 days, and activated with distilled water. Repeated process of extracting and loading from the refrigeration, the same samples, reduce in about 8 hours the viability period in semen with sucrose. We suggest that the use of sucrose as a substrate to store immotile sperm of gamitana helps preserving sperm for relatively short periods of time.

Keywords: *Colossoma macropomum*, Latency time, motility, sucrose

INTRODUCCIÓN

Los peces en la Amazonía tienen un importante valor económico y nutricional; como actividad productiva y de aseguramiento alimentario. Sin embargo esto es más importante para las comunidades que se encuentran apostadas en las riberas de los ríos, constituyéndose en mucho de los casos en su principal actividad económica. En este contexto *Colossoma macropomum* "gamitana", no ajeno a esta realidad. Y por ser una especie que su biología reproductiva está estrechamente vinculada con los fluctuaciones de los niveles de los ríos, van a presentar problemas, en la calidad y cantidad de semen, cuando se quiera reproducir en cautiverio. (Nizio et al., 2011; Aliaga et al., 2004).

Muchos trabajos en criopreservación se han desarrollado, tanto en peces tropicales, como marinos, todos ellos utilizando nitrógeno líquido para la congelación, lo cual permite el almacenamiento por largos períodos, para lo cual utilizan soluciones crioprotectoras para proteger a la célula del daño producido por el efecto de la temperatura. Sin embargo, todavía los resultados son muy variables. (Murgas et al., 2001; Liu, 2006; Martino, 2006; Otemé et al., 1996; Carolsfeld et al., 2003; Ribeiro & Godinho, 2003; Chereguini et al., 1992).

Por lo tanto es importante, generar datos que puedan ayudar a mejorar los protocolos de criopreservación para cada especie íctica y aumentar la fertilización, para semen descongelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones de Quistococha (CIQ), sede del Programa de Investigación para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC) del IIAP. El CIQ está ubicado en el Km. 4.5 de la carretera Iquitos- Nauta en el distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, Región Loreto.

Material Biológico

Se trabajó con lotes de 2 ejemplares de reproductores machos de gamitana, con un rango de peso promedio de 5 kg a 6 kg., con una edad de 5 años aproximadamente, provenientes del IIAP, inducidos con

Conceptal®, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a las características externas de un ejemplar que ha alcanzado madurez sexual, establecido por Alcántara et al., 2002.

Colecta y Evaluación de semen

La recolección de semen fue mediante ligera presión abdominal, descartando la presencia de orina. Luego se colectó el semen en una placa Petri, y luego se observó en el microscopio una pequeña muestra del semen colectado, para comprobar la inactivación y luego la activación de los espermatozoides, con agua destilada.

La evaluación del semen, fue realizada por observación directa al microscopio y se expresó en porcentaje aproximado de motilidad en relación a los espermatozoides observados, tomando como motilidad inicial, la adición de agua destilada, como activador. Despues de confirmar la muestra inactiva y viable, se procedió a mezclarlo con solución de Sacarosa 400mM y almacenar a 4°C, en jeringas de 5 ml.

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental de 4 tratamientos, con 4 réplicas por tratamiento: Tratamiento 1: semen con solución de sucrosa mantenidos en refrigeración; Tratamiento 2: semen sin solución de sucrosa mantenidos en refrigeración; Tratamiento 3: semen con solución de sucrosa mantenidos a temperatura ambiente y Tratamiento 4: semen sin solución de sucrosa mantenidos a temperatura ambiente y para el segundo lote de semen, sólo un tratamiento: semen con solución de sacarosa refrigerado. Para el primer lote se evaluó la motilidad a cada hora, hasta la 7^{ma} hora post colecta, quedando el segundo lote de semen, mantenido en refrigeración y sólo se extrajo del refrigerador la muestra a evaluar correspondiente, cada 12 horas. Los tratamientos se evaluaron mediante la prueba de ANOVA de un factor, utilizando el programa estadístico SPSS v.15.Y para el segundo lote de semen de gamitana, se registró el tiempo de almacenamiento máximo a temperatura de refrigeración (4°C.), en solución de Sacarosa 400 mM.

RESULTADOS

Ensayo experimental 1: Tiempo de almacenamiento (primer lote de semen), para los diferentes tratamientos de semen, mantenido en solución de Sacarosa 400 mM, a temperatura de 4°C.

Para el primer lote de semen, los resultados demuestran, que desde la primera hasta la 3^{ra} hora, no existe diferencia significativa entre los tratamientos, a partir de la 3^{ra} hasta la 5^{ta} hora, puede ser mantenido refrigerado sin solución de sacarosa (T4), a partir de la 5^{ta} hora hasta la 6^{ta} hora, puede ser mantenido con solución de sacarosa refrigerado (T1) y a partir de la 7^{ma} hora hacia delante la motilidad es inferior al 45%.

Ensayo experimental 2: Tiempo de almacenamiento (segundo lote de semen), para el tratamiento 1 para semen, mantenido en solución de Sacarosa 400 mM, a temperatura de 4°C.

Para el segundo lote, los resultados demuestran la viabilidad de utilizar solución de sacarosa, como medio de conservación, para mantener semen refrigerado a 4°C, por 2 días, activados con agua destilada.

Tabla 1. Efecto de la temperatura, en relación al tiempo de almacenamiento, para semen de gamitana (lote 1), en solución de Sacarosa 400 mM, para los diferentes tratamientos.

HORA	Lote semen 1			
	1	2	3	4
0	90	90	87,5	90
1	90	90	90	90
3	37	90	60	30
4	50	85	40	50
5	70	75	40	65
6	48	0	55	25
7	10	0	45	15

Tabla 2. Efecto de la temperatura, en relación al tiempo de almacenamiento, para semen de gamitana (lote 2), en solución de Sacarosa 400mM.

TRATAMIENTO	Lote semen 2					
	0	12	24	36	48	60
1	90	65	50	55	45	30

DISCUSIÓN

Trabajos de investigación, que almacenan semen de especies amazónicas y marinas, se vienen desarrollando, hasta el momento, sin embargo la gran mayoría utilizan nitrógeno líquido para tiempos de congelación largos, como lo reportan Nizio et al., (2011), Cabrita et al. (2010), Nascimento et al. (2010), María et al. (2006), Iñiguez & Renno, (2004), Navarro et al. (2004), Carolsfeld et al., (2003); Ribeiro & Godinho, (2003); Murgas et al (2001); Otemé et al (1996).

Pero en localidades donde se quiera optimizar, el manejo de gametos de gamitana y donde no se encuentre nitrógeno líquido, no es posible poder utilizar un lote de semen para varias fertilizaciones en diferentes tiempos (prolongados y relativamente cortos). Son escasos los trabajos de reportes del efecto de la temperatura sobre el tiempo de almacenamiento de semen en solución de Sacarosa. Sin embargo, resultados muy similares lo reporta Minardi et al. (2011), para gamitana, con el uso de diferentes diluyentes (BTS – Beltsville Thawing Solution , Yema de huevo, solución de Hanks, medio L-15, cafeína y sus combinaciones, mantenidos en refrigeración a $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$., obteniendo los mayores porcentajes de motilidad y vigor móvil, las soluciones que contenían glucosa a las 4 horas. Sin embargo este mismo autor reporta que los valores de motilidad, fue decayendo a las 52 horas de refrigerado, lo que tiene mucha relación con lo reportado por el presente trabajo.

Así también Minardi et al (2011), reporta 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 afectar el tiempo de almacenamiento, 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.

Para ambos lotes de semen, la solución de sacarosa a 400mM, tendría un desempeño favorable para el mantenimiento de los lotes de semen refrigerados, lo que tendría relación, con lo reportado por Minardi et al. (2011), que utilizó diluyente BTS – Beltsville Thawing Solution, el cual contenía glucosa. Lo que también, guarda relación, con lo reportado por Nascimento et al. (2010), para la especie *Piaractus brachypomus*, el cual utilizó glucosa y glicol de metilo como soluciones crio protectoras para nitrógeno líquido.

Sin embargo, la capacidad de motilidad en semen de gamitana puede también verse afectado por la concentración de iones presentes en la solución utilizada como activador de motilidad (agua destilada), considerando lo que reporta Hadi & Cosson (2006) y Martino (2006), que el grado de activación del agua destilada en comparación con el cloruro de sodio, es bajo. Considerando lo reportado por el presente trabajo y por trabajos anteriores indicados, podrían realizarse futuros estudios, para determinar la capacidad del coluro de sodio, para mejorar el poder de activación para semen de gamitana, descongelado de nitrógeno líquido y para semen refrigerado.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo, hacen posible concluir que la Sacarosa, es útil en el mantenimiento y conservación de la capacidad motil para semen de gamitana a temperaturas de refrigeración (4°C .), para tiempos relativamente cortos y que si se desea trabajar, varias fertilizaciones con un mismo lote de semen, los volúmenes deben de ser separados para cada fertilización, para evitar que el proceso de extraer y volver a refrigerar, dañen los espermatozoides.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto cátedra CONCYTEC, IIAP e IRD-Francia, por el financiamiento para la ejecución del presente estudio. Al personal profesional, técnico y practicantes de pregrado del CIQ-IIAP, por el apoyo en la ejecución del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga C, Iñiguez V, Renno J. 2004. Variabilidad genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus*, en la región del alto madera (Amazonía Boliviana) para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (EPIC – PCR). Universidad nacional Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias puras y naturales. Carrera de Biología. Instituto de Biología molecular y Biotecnología.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martinez-Paramo S, Robles V, Beira J, Pérez-Cerezales S, Herraéz M. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J Appl Ichthyol* 26: 623-635.
- Carolsfeld J.; H. Godinho; E. Zaniboni&B. Harvey.2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol* 63: 472-489.
- Chereguini O, Fernández P, Rasines I. 1992. Adaptación de la técnica de críopreservación de esperma para el Rodaballo (*Scoithalmus maximus*) y Besugo (*Pagellus bogaraveo*). Instituto español de Oceanografía. (117) 1-11 pp.
- Hadi S, Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* 30 (1): 1-14.
- Krone A, Wittbrodt J. 1997. A simple and reliable protocol for cryopreservation of Medaka (*Oryziaslatipes*) spermatozoa. *The Fish Biology Journal Medaka* 9: 47-48.
- Leung K, Jamieson B.1991. Live preservation of fish gametes. En: Jamieson BGM, editor. *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge: University Press: 245-69 pp.
- Liu Q, Li J, Zhang S, Ding F, Xu X, Xiao Z, Xu S. 2006. An Efficient Methodology for Cryopreservation of Spermatozoa of Red Seabream, *Pagrus major*, with 2-mL Cryovials. *Journal of the world Aquaculture Society* 37 (3): 289-297.
- Maria A, Viveiros A, Freitas R, Oliveira A. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260: 298-306.
- Martino G. 2006. Primeros ensayos sobre críopreservación de semen de Cachama *Colossoma macropomum* y Morocoto *Piaractus brachypomus*. IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 152 – 158.
- 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.
- Murgas L, Gualhanone A, Silva M, Mello C, Freitas R, Zangeronimo M. 2001. Calidad seminal del pez piracanjuba (*brycon orbignyanus*) post-descongelación. *An Vet (Murcia)* 17: 3-10.
- Nascimento A, Maria A, Pessoa N, Carvalho M, Viveiros A. 2010. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science* 118: 324-329.
- Navarro O, Velasco Y, Casallas P. 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev Col Cienc Pec* 17: 53-59.
- Nizio A, Costa H, Falanghe P. 2011. Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Comunicado técnico 112. MInistério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. 1º Ed. 1-8 pp.
- Otemé J, Nuñez J, Kouassi C, Agnese J, Hem S. 1996. Testicular structure and sperm cryopreservation of the african catfish *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840). *Aquaculture Research* 27: 805-813. doi:10.1111/j.1365-2109.1996.tb01239.x
- Ribeiro R, Godinho H. 2003. Criopreservação do semen testicular do teleósteo açu *Leporinus macrocephalus*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 55(1): 1-7.