

CALIDAD SEMINAL DEL PEZ PIRACANJUBA (*BRYCON ORBIGNYANUS*) POST-DESCONGELACIÓN

Semen quality of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*) after cryopreservation

Murgas¹, L.D.S.; Gualhanone², A; Silva³, M.O.B.; Mello⁴, C.B; Freitas⁵, R.T. F.; Zangeronimo⁶, M.G.

1. Médico Veterinario, D.S Profesor adjunto del Departamento de Medicina Veterinaria de UFLA
2. Zootecnista, Mestrando en Producción Animal FCAV-UNESP de Jaboticabal
3. Bióloga, M Sc. Convenio CEMIG-FAEPE-UFLA
4. Zootecnista, M Sc. Convenio CEMIG-FAEPE-UFLA
5. Zootecnista, D. S Profesor adjunto del Departamento de Zootecnia de la UFLA
6. Académico del curso de Medicina Veterinaria de la UFLA

Universidad Federal de Lavras-UFLA
Departamento de Medicina Veterinaria
Lavras-MG 37200.000 Brasil

RESUMEN

Este experimento fue realizado en la Unidad Ambiental de la Compañía Energética de Minas Gerais-Brasil y en el Laboratorio de Fisiología y Farmacología del Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Lavras (UFLA). El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de dos diluyentes (Glucosa 5% y agua de coco) en el semen del pez Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) después de congelado. Fueron utilizados como activadores de la motilidad espermática después de congelación el bicarbonato sódico al 0,5 y 1,0 % y agua destilada. Un modelo factorial de 2 x 3 fue utilizado para testar el efecto de los diluyentes de congelación y de los activadores de la motilidad espermática después de la congelación. La motilidad espermática media fue de 60% cuando se utilizó el agua de coco como diluyente, observándose diferencia significativa ($P < 0,01$) entre los activadores utilizados. La duración de la motilidad espermática no presentó diferencias ($P > 0,01$) entre los diluyentes utilizados pero fue mejor ($P < 0,01$) cuando se empleó el bicarbonato sódico como activador. El agua de coco usada como diluyente del semen para congelación y el bicarbonato sódico usado como activador de la motilidad espermática después de la congelación aumentan y prolongan, respectivamente, la motilidad espermática del semen de Piracanjuba.

Palabras clave: pez, *Brycon orbignyanus*, crioconservación, semen

ABSTRACT

One experiment was conducted in Environment Center of Energy Company of Minas Gerais-Brazil and in the Physiology and Pharmacology Laboratory of Veterinary Medicine Department of Lavras University (UFLA) in order to evaluate the effect of two extenders (Glucose 5% and Coconut water) in the freezing semen of Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). In the present study were used Sodium bicarbonate 0.5 and 1.0% and destilated water to activate sperm motility. An factorial 2 X 3 was used for test the effect of two extenders for freezing semen and three sperm motility activator in post-freezing semen. The sperm motility post-freezing was 60% in Coconut water and was observed significative effect ($P < 0.01$) for the motility activators used. The duration of sperm motility there was no significative difference ($P > 0.01$) in the two extenders used but was higher when Sodium bicarbonate activator was used. The Coconut water used as extender of freezing semen and Sodium bicarbonate used as sperm motility activator post-freezing semen increase and extend, respectively the sperm motility in Piracanjuba freezing semen.

Key words: fish, *Brycon orbignyanus*, cryopreservation, semen

INTRODUCCIÓN

Conocida popularmente como “piracanjuba”, del indígena “pira” (pez), “can” (hueso), “juba” (amarillo) (SILVA, 1992), esta especie de pez, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) es reofílica y se encuentra distribuida en la cuenca de los ríos Paraná-Uruguay, donde puede ser encontrada principalmente en los ríos Grande y Paraná en Sudamérica (CASTAGNOLLI, 1992).

Esta especie ha despertado gran interés en las Instituciones de Investigación en los últimos años, tanto por la excelente calidad de la carne, como por la dieta alimentaria en su hábitat natural, compuesta principalmente por frutos y semillas. Además, su rápido crecimiento y ganancia de peso, demostrados en criaderos experimentales, son buenos indicadores de la selección de esta especie como alternativa en el desarrollo de la piscicultura en las regiones Norte, Centro-Oeste, Sudeste, Nordeste y Sur del Brasil (VASQUES, 1997).

Según Castagnolli (1992), los briconideos son peces de piracema (reofílicos)

muy dependientes de alimentos alóctonos (frutos y semillas). Por tanto, fueron muy perjudicados por la construcción de barreras en los ríos y la deforestación de la vegetación ribereña.

Además del gran interés en la utilización de este briconideo para la repoblación de reservorios hidroeléctricos y pisciculturas comerciales, el desarrollo de la piscicultura con especies nativas es de gran interés para la conservación de la biodiversidad y se constituye como una prioridad de organismos nacionales e internacionales (CONTE, 1995).

La Piracanjuba puede llegar hasta 80 cm de longitud corporal y 10 Kg de peso (SANTOS, 1981). Presenta el cuerpo fusiforme, cabeza pequeña y la boca con posición apical. Su coloración es predominantemente plateada. En la cabeza, el lado dorsal es gris-verdoso; en el opérculo, presenta una coloración rosada. Después de la cabeza, todo el dorso es gris-verdoso. Las aletas presentan las siguientes coloraciones: dorsal, grisácea; ventrales, hialinas hasta blancas; anal, blanca; y caudal de color vino tinto (GODOY, 1975).

SANTOS (1981) relata que la carne de piracanjuba además de muy buen aspecto, presenta fino sabor, por lo que puede competir con los más sabrosos pescados de los ríos europeos. Es una especie arisca, pero muy apreciada en la pesca deportiva, motivo por el cual ha sido muy empleada para la repoblación de tanques en la pesca deportiva fluvial.

Debido a su heterogeneidad, el espermatozoide de los peces ocupa una posición importante en la historia de la criobiología. La diversidad evolutiva y las grandes diferencias en la nutrición y naturaleza, han provocado considerables diferencias en las propiedades fisiológicas, bioquímicas y morfológicas de los gametos de peces. Con esto, se hacen necesario estudios para desarrollar métodos eficientes de crioconservación de las diferentes especies de peces (DROKIN & BARTSCHERER, 1998).

De una forma general, los espermatozoides de los peces son inmóviles en las gónadas, iniciando su motilidad cuando están en contacto con el agua. En el caso de especies de agua dulce, la motilidad espermática se induce por una drástica reducción en la presión osmótica del medio y por un aumento en la concentración de potasio del plasma seminal (BGIP, 1990; STOSS & DONALDSON, 1982; MUIR & ROBERTS, 1993).

Una vez que los espermatozoides inician el movimiento, pierden rápidamente su reserva de energía aunque es posible mantenerles inmóviles cuando la presión osmótica del medio es suficientemente elevada (BGIP, 1990).

Por la carencia actual de trabajos objetivando la crioconservación del semen de piracanjuba, nos propusimos estudiar el proceso con la finalidad de verificar la viabilidad post-congelación de los espermatozoides en

esta especie de pez, utilizando la motilidad espermática y la duración de la motilidad espermática como parámetros de evaluación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los procesos de colecta y congelación del semen fueron realizados en la Unidad Ambiental de la Compañía Energética de Minas Gerais-CEMIG en Itutinga-MG, Brasil. La descongelación del semen, así como el análisis de sus características post-congelación fueron realizados en el Sector de Fisiología y Farmacología del Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Lavras - MG, Brasil.

Fueron utilizados 9 reproductores de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849) con peso corporal medio de 566,7 gramos, retirados de los viveros de la Estación Experimental de la CEMIG-Itutinga-MG, Brasil. El criterio de selección de los ejemplares fue basado en la liberación de espermatozoides después de una leve presión abdominal en sentido antero-posterior.

Colecta del Semen

Los peces seleccionados fueron sometidos a hipofisación, recibiendo 3 inyecciones intramusculares de extracto de hipófisis de carpas (EHC). La primera dosis, llamada "previa" fue de 0,25 mg de EHC/Kg de PV. Después de un intervalo de 8 horas, se administró una segunda dosis de 0,4 mg de EHC/Kg de PV llamada primera "aplicación efectiva" y 12 horas después se realizó una segunda "aplicación efectiva" de 4,0 mg de EHC/kg de PV. El semen fue extraído individualmente de cada reproductor a través de masaje abdominal

antero-posterior y colectado separadamente en tubos de ensayo graduados, que fueron colocados en agua a temperatura de 28 °C y protegidos de la luz.

Análisis del Semen Fresco

Inmediatamente después de la colecta el semen fue llevado al laboratorio donde fue realizada una evaluación física, para verificación de las condiciones ideales para congelación; y toma de muestras para lectura de la motilidad espermática y duración de la motilidad espermática en fresco, mediante microscopía óptica (400 X).

Dilución y Congelación del Semen

Para congelación del semen fueron utilizados dos diluyentes:

1. Diluyente 1 (D1) – Glucosa 5%, dimetil sulfóxido (DMSO) 10% y yema de huevo 5%;
2. Diluyente 2 (D2) – Agua de coco, DMSO 10% y yema de huevo 5%.

Después de la dilución, los parámetros de motilidad espermática y duración de la motilidad espermática fueron evaluados por microscopía óptica.

Posteriormente, el semen fue acondicionado en pajuelas 0,5 ml y sometido a vapores de nitrógeno líquido en recipiente criogénico “termo seco” canadiense. Al cabo de 24 horas las pajuelas fueron transferidas a tanques criogénicos convencionales con nitrógeno líquido donde fueron almacenadas durante 6 meses.

Descongelación y Análisis del Semen Post-congelación

Las pajuelas fueron retiradas del nitrógeno y sumergidas durante cinco segundos en un baño de agua a 60° C.

Fueron utilizados 3 activadores de motilidad espermática post-congelación: Activador 1 (A1) - bicarbonato sódico 0,5%; Activador 2 (A2) - bicarbonato sódico 1% y Activador 3 (A3) – agua destilada. Posteriormente, se procedió el análisis microscópico del material seminal sometido a D1 y D2 con cada uno de los activadores en microscopio óptico (400x). Los parámetros analizados fueron el porcentaje de espermatozoides móviles y la duración de la motilidad, en segundos.

Análisis Estadístico

Fue utilizado un diseño totalmente aleatorio con 9 repeticiones y los tratamientos dispuestos en una estructura factorial 2 x 3.

El modelo estadístico del experimento fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{(ij)k}$$

$$i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3 \quad k = 1, 2, \dots, 9$$

donde,

Y_{ijk} = valor observado (porcentaje de motilidad espermática o duración de la motilidad espermática post-congelación) del semen sometido al diluyente i y activador j , en la repetición k ;

μ = media general;

a_i = efecto del diluyente i ;

b_j = efecto del activador j ;

$(ab)_{ij}$ = efecto de la interacción entre el diluyente i y el activador j ;

$e_{(ij)k}$ = Error ocurrido en el valor observado del semen sometido al diluyente i y activador j , en la repetición k .

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico a través del Sistema para Análisis Estadísticos y Genéticas –SAEG (Universidad Federal de Viçosa-Brasil, 1988) y las medias fueron comparadas por el test de Newman- Keuls.

Resultados y Discusión

Los valores medios de la motilidad espermática y de duración de la motilidad espermática del semen en fresco fueron de 98 % y 183 segundos, respectivamente.

Los resultados de la motilidad espermática observada después de la congelación del semen usando como diluyente glucosa 5% y agua de coco están presentados

en la Tabla 1. No se encontraron diferencias significativas ($P>0,01$) para la motilidad espermática observada en los dos diluyentes utilizados en este experimento. El uso del bicarbonato de sodio como activador favoreció la motilidad espermática comparado con el agua destilada ($P<0,01$). La motilidad espermática no varió significativamente ($P>0,01$) cuando el bicarbonato sódico fue utilizado en las concentraciones de 0,5 y 1,0 %. El valor de la motilidad espermática observado cuando se usó el agua de coco como diluyente (60%) puede tener un significado muy importante, ya que, ese valor se aproxima al referido para el semen de mamíferos (cerdos) después de la congelación (GADEA *et al.*, 2001)

Tabla 1- Motilidad espermática observada en el semen de Piracanjuba después de congelación con diferentes diluyentes y activadores.

Activadores	Motilidad Espermática (%)	
	Glucosa 5% (D1)	Agua de coco (D2)
Bicarbonato de Sodio 0,5% (A1)	43,0 a	60,0 a
Bicarbonato de Sodio 1,0 % (A2)	53,0 a	60,0 a
Agua destilada (A3)	11,0 b	3,0 b

Medias seguidas de la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas al nivel de 1%.

Los resultados de la duración de la motilidad espermática registrada después de la congelación del semen usando como diluyente la glucosa 5% y el agua de coco están presentados en la Tabla 2. No se encontraron diferencias significativas ($P>0,01$) entre los tratamientos (diluyentes y activadores) para este parámetro. La duración de la motilidad fue mayor ($P<0,01$) cuando se usó el bicarbonato sódico como activador

espermático en comparación con el agua destilada. Estos datos de duración de la motilidad, serían de gran interés en la práctica ya que podrían emplearse en la programación de los trabajos de fertilización «in vitro» en esta especie.

Tabla 2- Duración de la motilidad espermática observada en el semen de Piracanjuba después de congelación con diferentes diluyentes y activadores.

Activadores	Duración de la motilidad Espermática (s)	
	Glucosa 5% (D1)	Agua de coco (D2)
Bicarbonato de Sodio 0,5% (A1)	97,0 a	125,0 a
Bicarbonato de Sodio 1,0 % (A2)	125,0 a	125,0 a
Agua destilada (A3)	57,0 b	63,0 b

Medias seguidas de la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas al nivel de 1%.

Recientemente se ha obtenido un importante avance en el desarrollo de técnicas para la preservación de gametos de peces, siendo el proceso criobiológico uno de los más eficientes (STOSS & DONALDSON, 1982). La conservación de los gametos puede ser de importancia, sobre todo favoreciendo la instalación de programas genéticos y posibilitando la formación de bancos genéticos en especies amenazadas de extinción (HARVEY, 1982).

Se deberían realizar otros trabajos objetivando la identificación de las tasas de fertilidad para verificar la viabilidad del semen de piracanjuba después de congelación, de la misma forma, se deben testar más diluyentes que puedan mejorar la calidad del semen de estos peces.

CONCLUSIÓN

El semen de la Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, VALLENCIENNES, 1849) después de congelación presentó una reducción en la motilidad espermática y en la duración de la motilidad espermática, sin embargo estos valores podrían ser compatibles con la práctica de la fertilización «in vitro» cuando

se utiliza el bicarbonato sódico como activador de la motilidad y el agua de coco como diluyente para crioconservación.

BIBLIOGRAFÍA

- BANCO GENÉTICO INTERNACIONAL DE PESQUERIAS (BGIP). 1990. **Conservación genética de peces: manual de entrenamiento**. Vitoria, BC, Canadá: International Fisheries Gene Bank.
- CASTAGNOLLI N. 1992. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, Sao Paulo. 189 pp.
- CONTE L. BOZANO, G.L.N., FERRAZ DE LIMA, J.A. 1995. Influência del sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba *Brycon orbignyanus*, em gaiolas. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, volumen 8.
- DROKIN H.S., BARTSCHERER, H. 1998. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta* F. fario). **Criobiology**, New York, 37: 263-70.

ZANGERONIMO, M.G.

- GADEA J., RUIZ S., SELLÉS E., ROMAR R., MATÁS C., COY P., POTO A., Y PEINADO B. 2001. El uso de la fecundación in vitro para la evaluación de los sistemas de congelación de semen porcino. IX Jornadas sobre producción animal, volumen extra, número 22 tomo II.
- GODOY M.P. 1975. **Peixes do Brasil**. 1. ed. Piracicaba: Franciscana. Sao Paulo. 309 pp.
- HARVEY B. 1982. Preservation of fish gametes. In.: International simposium on reproductive physiology of fish, Wageningen. **Anais...** Wageningen.
- MUIR J.F., ROBERTS R.J. 1993. **Recent advances en aquaculture IV**. Cambridge, MA: Blackwell Scientific Publications.
- SANTOS E. 1981. **Peixes de água doce**. Belo Horizonte, Minas Gerais: Itatiaia. v.2, pp. 58-60.
- SILVA A.L. 1992. **Dicionário Aruanã de pesca amadora**. 1 ed. São Paulo: Aruanã. 455 pp.
- STOSS J. & DONALDSON E.M. 1982. Preservation of fish gametes. In.: International simposium on reproductive physiology of fish, Wageningen,. **Anais...** Wageningen, 1982. pp. 114-22.
- VASQUES L.H. 1997. **Histologia da piracanjuba, Brycon orbignyanus (Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae): tecidos fundamentais**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista,. 79pp.