

Efecto de la Cafeína en la Motilidad y Fertilidad Espermática de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

Nemesio I. Valdebenito

Universidad Católica de Temuco, Facultad de Recursos Naturales,
Casilla 15-D, Temuco-Chile (e.-mail: ivisler@uctemuco.cl)

Resumen

En la presente investigación se evaluó el efecto en la motilidad y fertilidad espermática de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de una solución salina 0,98% de NaCl enriquecida con 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0mM de cafeína, utilizando como control una solución salina sin cafeína. Al utilizar cafeína en concentraciones de 10mM en la solución activadora se duplicó la duración de la motilidad espermática ($165,0 \pm 18,8s$) con respecto al control ($80,0 \pm 12,5s$). Se registró un aumento de la fertilidad al utilizar cafeína en el activador, aunque los valores no fueron estadísticamente significativos con respecto al control ($81,6 \pm 5,7\%$). Estos antecedentes demuestran la capacidad de la cafeína de prolongar la motilidad espermática en trucha arcoiris, aún cuando se debe continuar con nuevos ensayos que permitan determinar las dosis mínimas de cafeína requeridas para ser utilizadas en sistemas de producción masivos.

Palabras Claves: oncorhynchus mykiss, motilidad espermática, cafeína, fertilidad en truchas

Effect of Caffeine in the Motility and Fertility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Sperm

Abstract

The present investigation evaluated the effect in the motility and spermatic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fertility of a saline solution 0.98% NaCl enriched with 2.5; 5.0; 10.0 and 20.0mM of caffeine, using as control saline solution without caffeine. The use of caffeine at a concentration of 10mM in the activator solution duplicated the time of spermatic motility ($160.0 \pm 18,8s$) in contrast with the control ($80,0 \pm 12,5s$). Increased fertility was observed when caffeine was used in the activator, although the values were not statistically different in relation with the control ($81.6 \pm 5.7\%$). These results demonstrate the capacity of caffeine to enhance spermatic motility in rainbow trout. Further research must be conducted to elucidate the minimum concentrations of caffeine required in intensive production systems.

Keywords: oncorhynchus mykiss, sperm motility, caffeine, rainbow trout fertility

INTRODUCCIÓN

La fertilización artificial es utilizada en salmónidos desde hace varios siglos, pero el alto nivel tecnológico que en la actualidad ha alcanzado esta actividad en todo el mundo, obliga a los productores a optimizar los resultados hasta ahora obtenidos mediante el uso de activadores espermáticos con el fin de aumentar los porcentajes de fecundación. Stoss (1983) y Billard (1990), señalan que la utilización de diluyentes o activadores espermáticos en la fertilización artificial de salmónidos, mejora la motilidad con efectos favorables en las tasas de fertilización. Los solutos utilizados en la elaboración de los activadores espermáticos, permiten reducir el choque osmótico que sufre el espermatozoide en su contacto con el agua, le aportan energía y ajustan el pH (Ingram, 1985 y Billard, 1990). En trabajos relacionados con fecundación "in vitro" en mamíferos y seres humanos, se ha utilizado ampliamente en los activadores de motilidad espermática la epinefrina, hipotaurina y cafeína. Pocos antecedentes existen en la literatura del uso de estas sustancias con semen de salmónidos. Turner (1986) informa de la capacidad de la cafeína para intensificar la motilidad espermática en salmones, pero sin entregar mayores antecedentes sobre la técnica de utilización y su efecto en la fertilidad. Caylor et al. (1994), utilizan teofilina durante la fertilización artificial con semen criopreservado en *Rachycentron canadum*, pero no entrega antecedentes del efecto en la motilidad y fertilidad espermática. Valdebenito y Ratto (1996) determinan una alta correlación entre la concentración de cafeína del activador y la fertilidad en el semen de trucha arcoiris. Ciereszko et al. (1996) y Robles et al. (2003) utilizan metilxantinas para mejorar el uso del semen criopreservado de esturión y trucha arcoiris, respectivamente.

El objetivo de la presente investigación es evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cafeína sobre la motilidad y fertilidad espermática en trucha arcoiris al ser incorporada en el activador espermático utilizado para la fertilización artificial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los especímenes utilizados fueron 5 machos adultos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivados en la Estación

Experimental Piscicultura Los Laureles de la Universidad Católica de Temuco, ubicada a 39/02' Lat. S y 72/12' Long W. Luego de determinar su madurez plena, los especímenes fueron anestesiados con MS-222 y mediante una cánula de 2,3mm de espesor, se les extrajo una muestra de semen en la que se evaluó la motilidad según la escala de Sánchez-Rodríguez y Billard (1977) que utiliza el valor "0" cuando todos los espermatozoides se encuentran inmóviles y un valor "5" cuando se registra una actividad flagelar intensa en todos los espermatozoides. Con los individuos en que se observó una motilidad igual a 5, se realizó un pool que fue homogenizado suavemente y utilizando bolsas plásticas insufladas con oxígeno gaseoso, fueron trasladadas con temperaturas de entre 2 y 4°C y en ausencia de luz al laboratorio de reproducción ubicado a 70km de la Estación Experimental. Para activar la motilidad espermática se utilizó una solución salina (0,98% NaCl) preparada con agua destilada (Control). En base a ésta, se preparó cuatro soluciones que contenían cafeína en las siguientes concentraciones: 2,5mM (Tratamiento 1, T₁); 5,0mM (T₂); 10,0mM (T₃) y 20,0mM (T₄). Todas las soluciones registraron un pH = 9. Veinte alícuotas de semen de 1µL fueron mezcladas con igual volumen de cada uno de los activadores y se cronometró el tiempo en que todos los espermatozoides de un área de 0,1mm² quedaron inmóviles. Esta experiencia se realizó a temperatura ambiente de aproximadamente 10°C.

Para determinar el efecto de la cafeína en la fertilidad del espermatozoide, se realizó un pool de ovas obtenidas de tres hembras de segundo desove de trucha arcoiris cultivadas en la misma Estación Experimental. El pool de ovas se trasladó al laboratorio utilizando la misma técnica que para el traslado de semen. Las ovas fueron separadas en 15 grupos de 300 ovas. El líquido celómico fue reemplazado por 20ml de los activadores de cada tratamiento y con ellos se fertilizó tres grupos de ovas. Inmediatamente se agregó 0,01ml del pool de semen y se realizó la mezcla de los gametos manualmente. Luego de 5min se agregó agua a los gametos y se procedió a eliminar los restos de semen y otros contaminantes. Posteriormente, se dejó hidratar las ovas por un tiempo de una hora. La incubación se realizó a 10,3 ± 1,2°C en un sistema de flujo abierto. Después de 10 días

de incubación se determinó el porcentaje de fecundación utilizando una solución de ácido acético al 10% en la que se introdujo una muestra de 20 ovas de cada réplica. Todas aquellas ovas en las que se observó el tubo neural, fueron consideradas fecundadas. La densidad espermática del pool de semen se determinó en cuatro grupos mediante recuento con cámara de Neubauer según metodología descrita por Oppenheim (1973).

Los promedios de motilidad y fertilidad fueron contrastados mediante ANDEVA a un nivel de significancia de $p \leq 0,001$ y $0,05$, respectivamente.

RESULTADOS

Motilidad

La densidad espermática obtenida en el pool de semen fue de $12,7 \pm 1,6 \times 10^9$ espermatozoides por ml. El menor tiempo de motilidad se registró con la solución control ($80,8 \pm 12,5s$) y el mayor valor ($165,0 \pm 18,8s$) en el tratamiento de 10mM de cafeína, observándose un descenso del tiempo de motilidad con el tratamiento de 20mM (Fig. 1). Las diferencias fueron significativas entre el control y los tratamientos 2, 3 y 4. Se determinó además, diferencias significativas entre los tratamiento 1-3 y 2-3.

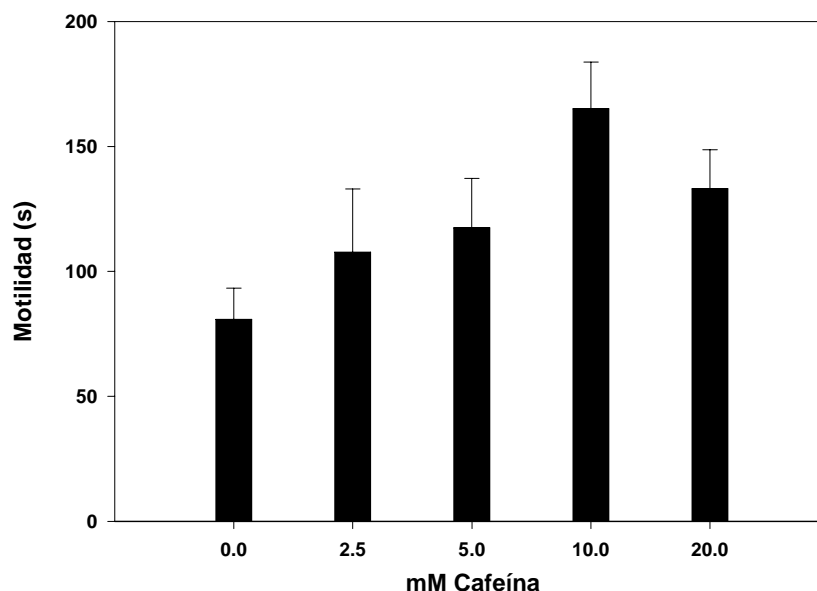


Fig. 1: Valores (promedios \pm Desviación estándar) de la motilidad (s) del espermatozoide de trucha arcoiris, obtenidos con diferentes concentraciones de cafeína.

Fertilidad

La densidad espermática utilizada para el proceso de fertilización fue de 423.333 espermatozoides por ova en todos los tratamientos y controles. Los porcentajes de fecundación obtenidos fueron de $81,66 \pm 5,7\%$ con el control; de $70,0 \pm 13,2\%$ con T_1 ; de $91,6 \pm 5,0\%$ con el T_2 ; de $95,0 \pm 5,0\%$ con el T_3 y $78,3 \pm 10,4\%$ con el T_4 (Fig. 2). Las diferencias registradas fueron estadísticamente significativas entre T_1 y T_3 para $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

El espermatozoide de salmónidos se caracteriza por estar inmóvil en el fluido seminal y sólo al tomar contacto con el agua y el Ca^{++} que contiene, se activa su motilidad sólo por aproximadamente 30s (Billard, 1990; Perchec et al., 1993; Darszon et al., 1999). Esto ha motivado el uso de soluciones activadoras que prolongan la motilidad espermática y además, mejoran su fertilidad protegiendo la célula de un choque osmótico y mejorando su capacidad de generación de energía (Baynes et al., 1981). Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran la capacidad de la cafeína de prolongar la motilidad espermática en truchas, ya que los valores de actividad registrados son muy superiores a los informados por la literatura

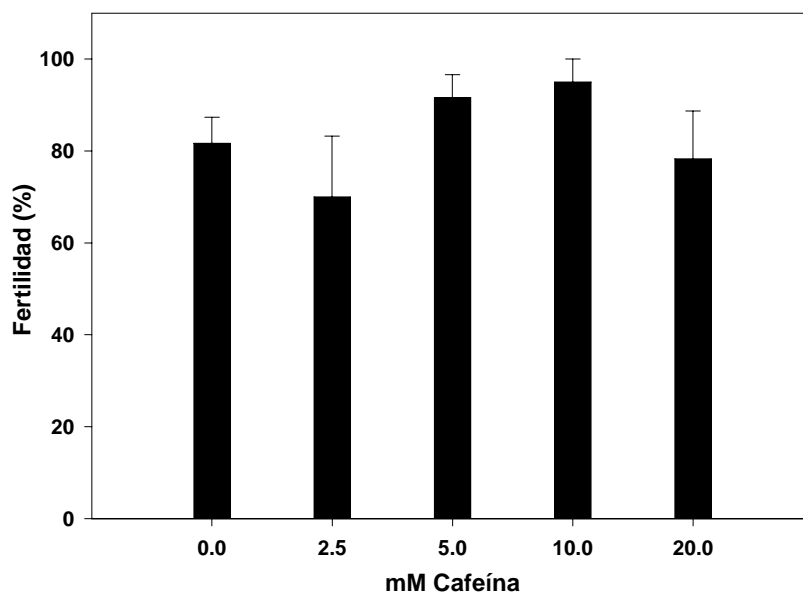


Fig. 2: Valores (promedios \pm Desviación estándar) de la fertilidad (%) del espermatozoide de trucha arcoiris, obtenidos con diferentes concentraciones de cafeína.

para salmónidos (Terner, 1986; Billard y Cosson 1989, y Billard, 1990). Además, corroboran lo informado por Terner (1986) y Valdebenito y Ratto (1995) quienes señalan que la motilidad del espermatozoide de salmónidos puede ser intensificada y prolongada agregando cafeína en el diluyente espermático. Este efecto se debe a que la cafeína inhibe a la enzima fosfodiesterasa permitiendo la acumulación de nucleótidos cíclicos, especialmente del AMPc intracelular, provocando un aumento de la actividad flagelar (Aitken et al., 1983; Morisawa, 1994).

La adición de cafeína durante la fertilización, mejoró significativamente la duración de la motilidad, pero no la fertilidad del semen, esto coincide con lo reportado por Robles et al. (2003) quienes informan que el semen criopreservado de trucha arcoiris activado con soluciones que contenían metilxantinas, usualmente incrementaron la motilidad y fertilidad, pero no significativamente con respecto a los controles. Ciereszko et al. (1996) determina que dosis de 5mM de teofilinas evitan la reducción de la motilidad espermática en esturiones hasta cinco minutos después de la activación.

Aas et al. (1991), determinan una correlación de 0,52 entre fertilidad y densidad espermática, razón por la cual en la presente investigación se fertilizó con una densidad espermática de 423.333 espermatozoides

por ova. Valor menor a los 620.000 espermatozoides por ova utilizados por Aas et al. (1991) en salmón Atlántico, pero superior al señalado por Billard (1990) para la fertilización artificial en salmónidos, quien recomienda densidades de entre 100.000 y 300.000 espermatozoides por ova.

El incremento significativo de la motilidad espermática que produce la cafeína debiera reflejarse en un incremento de la fertilidad para justificar su incorporación en los activadores espermáticos de salmónidos, por lo que se deben realizar nuevas investigaciones que lo confirmen.

CONCLUSIONES

La cafeína a una concentración de 10mM en el medio isotónico de fertilización de ovas de trucha arcoiris, permite incrementar significativamente la motilidad espermática en trucha arcoiris.

AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada por el Proyecto DIUCT 99.3.01.

REFERENCIAS

Aas G.H., T. Refstie y D. Gjerde, Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95:125-132 (1991).

- Aitken, R.J., F. Best, D.W. Richardson, R. Schats y G. Simm, Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*. 67:19-27 (1983).
- Baynes, S.M., A.P. Scott y A.P. Dawson, Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *Journal of Fish Biology*, 19:259-267 (1981).
- Billard, R., Artificial insemination in fish. In *Marshall's Physiology of reproduction*. G.E. Lamming (Ed.), 2: 870-888 (1990).
- Billard, R. y M.P. Cosson, Sperm motility in rainbowtrout, *Parasalmo mykiss*; effect of pH and temperature. *Les Colloques de l'INRA*, 44:161-167 (1988).
- Billard, R. y M. Cosson, Measurement of sperm motility in trout and carp. In *Aquaculture - A Biotechnology in Progress*. N. de Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors, N. Wilkins (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium: 499-503 (1989).
- Billard, R. y B. Jalabert, L'insJmination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*, 14:601-610 (1974).
- Bouck, G.R. y J. Jacobson, Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Transaction of the American Fisheries Society*, 105:534-535 (1976).
- Caylor, R.E., Biesiot P.M. y J.S. Franks, Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture* 125:81-92 (1994).
- Ciereszko, A., G.P. Toth, S. A Christ y K. Dabrowski, Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Theriogenology* 45(3):665-672 (1996).
- Cosson, M.P., R. Billard, J.L. Gatti y R. Christen, Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*, 46:71-75 (1985).
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. y F. Espinosa, Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews* 79(2): 481-510 (1999).
- Ingram, M., Egg and milt. *High Technology Broodstock Management*. Clearwater Publishing Ltd., Surby, Port Erin, Isle of Man, British Isles, 111 (1985).
- Levanduski, M.J. y J.G. Cloud, Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of non motile sperm on fertility. *Aquaculture*, 75:171-179 (1988).
- Morisawa, M, Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoological Science* 11:647-662 (1994).
- Oppenheim, I., Manual para técnicos de laboratorio. Editorial Panamericana. Bs. As. 188 (1973).
- Perchec, G., J. Cosson, F. AndrJ. y R. Billard. Lamotilité des spermatozoïd de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology*, 9:129-149 (1993).
- Robles, V., E. Cabrita, S. Cuñado y P. Herráez, Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture* 224(1-4):203-212 (2003).
- Sánchez-Rodríguez, M. y R. Billard, Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperme de truite arc en el ciel maintenu a des temperatures voisines de 0°C. *Bulletin Francais de Pisciculture*, (265):143-152 (1977).
- Stoss, J., Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (Eds), *Fish Physiology*, Vol. IXB., Academic Press, London, 305-350 (1983).
- Terner, Ch., Evaluation of salmonid sperm motility for cryopreservation. *The progressive Fish-Culturist* 48:230-232 (1986).
- Valdebenito I. y M. Ratto, Efecto de la cafeína en la motilidad y fertilidad del espermatozoide de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). A. Silva y G. Merino (Eds.), *Acuicultura en Latinoamérica*. Asoc. Latinoamericana de Acuicultura. Coquimbo Chile: 370-373 (1996).