

DETERMINACION DE LA MORFOLOGIA ESPERMATICA
DE *ODONTESTHES BONARIENSIS* (CUVIER Y VALENCIENNES, 1835)
MEDIANTE EL USO DE ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES

Odontesthes bonariensis (Cuvier & Valenciennes, 1835) sperm morphology
valorated by image analysis assay

GUILLERMO R. LÓPEZ^{1,2}, MIGUEL A. RIVOLTA³, CRISTINA A. BENTOS¹, SUSANA H. SAMPIETRO²,
ARIEL RE³ Y HUMBERTO CISALE³

RESUMEN

Se investigaron muestras seminales del pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis*, (Cuvier y Valenciennes, 1835) provenientes de una laguna pampásica mediante microscopía digitalizada de imágenes. Se determinó el área, el diámetro mayor y el perímetro promedio de la cabeza de los espermatozoides. El patrón morfológico normal de estos espermatozoides pudo ser establecido, lo que permite contar con un parámetro estándar de evaluación de fertilidad en machos de esta especie.

ABSTRACT

Seminal samples of the "Buenos Aires pejerrey", *Odontesthes bonariensis*, captured from a pampasic lagoon, were studied with a microscopic digital image system. The mean area, major diameter and perimeter of the sperm head was measured. The normal morphology of this sperm was determined, which allowed to have a standard parameter to evaluate the fertility of the males of this species.

KEYWORDS: Sperm morphology, *Odontesthes bonariensis*, Image analysis.

INTRODUCCION

La evaluación de la calidad seminal de un individuo se realiza en laboratorio a través del estudio de distintos parámetros, cuyo objetivo es predecir la fertilidad de esa muestra seminal. Una de las determinaciones básicas es la caracterización morfológica de los espermatozoides, a fin de establecer el grado y tipo de anomalías que podrían al-

terar la calidad fecundante del semen. La caracterización morfológica puede realizarse mediante la valoración dimensional del área, la diagonal mayor y el perímetro promedio de la cabeza de los espermatozoides.

En la última década se han desarrollado técnicas microscópicas objetivas de alta resolución para el estudio de material biológico, permitiendo la obtención de valores morfológicos ajustados. Estos estudios, basados en el análisis digital de imágenes, permiten definir poblaciones celulares, que caracterizan la morfología normal de una especie (Davis y Gravance, 1993; Abaigar *et al.*, 1999).

Dada la inexistencia de un protocolo estándar para la evaluación de las características morfológicas de los eyaculados de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), utilizado en prácticas de fecundación

¹Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (CONICET). Av. Angel Gallardo 470, 1405 Buenos Aires, Argentina.

²Area Acuicultura e Ictiopatología, Fac. Ciencias Veterinarias, Univ. de Buenos Aires, Argentina.

³Laboratorio de Espermatozoología, Area Física Biológica, Fac. Ciencias Veterinarias, Univ. de Buenos Aires, Chorroarín 280, 1427 Buenos Aires, Argentina.

artificial *in vitro* (Kleerecooper, 1946; Huaquin *et al.*, 1987; Strüssmann, 1989; Renard *et al.*, 1994), se decidió desarrollar un estudio sistematizado sobre muestras seminales obtenidas de animales provenientes de una laguna pampásica.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar el patrón morfológico normal de los espermatozoides de pejerrey bonaerense, a fin de contar con un parámetro estándar para la evaluación de muestras a utilizar tanto en inseminación artificial, como para su conservación en períodos prolongados.

MATERIALES Y METODOS

Los estudios se realizaron con treinta ejemplares adultos y sexualmente maduros, provenientes de la laguna Safada de Monasterio (35°47'S; 57°52'W), ubicada en la localidad de Monasterio, perteneciente al partido de Chascomús (Provincia de Buenos Aires), durante la época de freza (octubre-noviembre) de 1999. El agua de la laguna presentó un valor medio de temperatura de 17,6°C, pH 8,11 y salinidad 0,99 (valores convertibles, Margalef, 1983).

Para la captura se utilizó una red de espera del tipo agallera, de 35 mm entre nudo y nudo, que fue revisada cada 2 horas, a fin de obtener ejemplares vitales. Una vez obtenidos se los conservó vivos en contenedores de 50 litros de capacidad, con agua de la laguna y aireación artificial, hasta el momento de la extracción de semen.

Dada la falta de información sobre la manera más apropiada de obtener muestras útiles de semen para la toma de imágenes a digitalizar, la extracción se realizó de tres formas diferentes, con el propósito de evaluar la más práctica y eficiente. Las maniobras ensayadas fueron: a) Compresión abdominal antero-posterior ("masaje"), previa higiene de la región genital con papel absorbente, en animales vivos; b) Presión directa del testículo eviscerado, en dirección al conducto espermático; c) Punción directa del testículo eviscerado, en individuos recién sacrificados.

Las muestras obtenidas fueron colectadas en tubos de hemólisis, que se conservaron a la temperatura del agua de la laguna. A efectos de determinar la dilución adecuada para la observación, éstas se realizaron en agua de la laguna, desde 1:1 hasta 1:256. Las observaciones directas se hicieron en extendidos sin teñir con un microscopio de contraste de fase y óptica plana. En el caso de no poder realizar obser-

vaciones directas de los espermatozoides por su transparencia, se recurrió a la técnica de doble tinción con Eosina y Nigrosina (Scott y Baynes, 1980).

Para la obtención de imágenes digitalizadas se acopló al sistema óptico una cámara CCD (BURLE) de alta resolución, conectada a una computadora con una plaqueta de adquisición de imágenes. El análisis estadístico de los valores obtenido incluyó: cálculo de valores medios, medianas, desvíos estándar (DE), coeficientes de variación (CV), y rangos para: el área, la diagonal mayor, y el perímetro de la cabeza de los espermatozoides, con un programa estadístico computarizado.

RESULTADOS

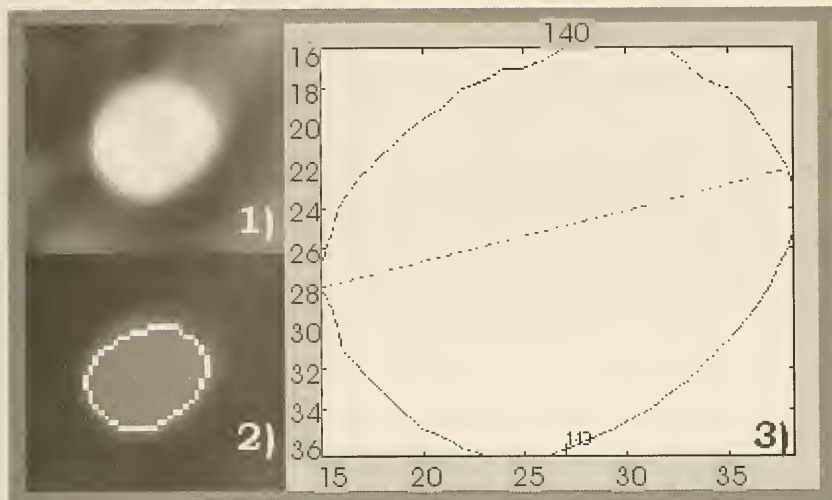
Se determinó que la dilución óptima para una buena observación y obtención de imágenes para procesamiento digital es aquella que permite el examen de aproximadamente 20 espermatozoides por campo. El uso de contraste de fase y la dilución adecuada permite observar las células directamente, evitando la necesidad de tinciones que podrían modificar los tamaños celulares. Las mediciones se realizaron sobre extendidos frescos, sin teñir.

Debido a que se observaron distintos grados de absorbancia en las células, solamente se tomaron en cuenta para la medición espermatozoides obtenidos por masaje y con densidad óptica homogénea.

El estudio determinó que *Odontesthes bonariensis* presenta un espermatozoide con una cabeza aplanada dorso-ventralmente de contorno circular, un cuello poco definido o ausente, y una cola formada por una porción intermedia pequeña y una porción principal ocho a diez veces mayor que el diámetro de la cabeza. La cola de los espermatozoides presentó una longitud variable entre 16 y 25 micrones (Figura 1). Los resultados morfológicos de la cabeza de los espermatozoides (diámetro, perímetro y área: n=162) se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Parámetros medidos en la cabeza espermática de *Odontesthes bonariensis* (n = 162)

Variable	Media	DE	Mediana	CV	Rango
Área [μ^2]	1,26	0,42	1,14	0,33	0,70 - 2,30
Diag. Mayor [μ]	1,40	0,22	1,36	0,16	1,02 - 1,93
Perímetro [μ]	3,97	0,70	3,78	0,18	2,86 - 5,60



FIGURAS 1). Imagen digital de un espermatozoide de pejerrey. 2) Imagen procesada con el borde marcado. 3) Esquema con el borde y la diagonal mayor.

DISCUSION

Los valores morfológicos obtenidos pueden ser considerados como un patrón de comparación en los estudios a realizarse sobre las características de motilidad progresiva. La capacidad de natación de estas células está íntimamente relacionada con la morfología de la cabeza espermática (Cisale, 1988).

La diferente absorbancia observada en las imágenes espermáticas podría indicar un diferente grado de maduración, que se manifestaría por la distinta condensación nuclear observada en las muestras obtenidas por punción testicular frente a aquellas obtenidas por masaje gonadal. Esta hipótesis se basa en que a medida que los espermatozoides maduran, la cromatina nuclear aumenta su ordenamiento y su densidad óptica (Cisale *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Los valores determinados a la fecha son la primera contribución sobre la morfología espermática de peces de agua dulce argentinos, y constituyen una primera etapa para establecer un protocolo de

evaluación de la calidad espermática en *O. bonariensis*. Estas determinaciones pueden ser utilizadas para establecer un modelo de manejo y conservación del material seminal que mejore la eficiencia de los sistemas productivos actuales, y las prácticas de fecundación *in vitro* para piscicultura de repoblamiento. Adicionalmente los resultados pueden ser transferidos a sectores industriales para optimizar la tecnología de conservación seminal por períodos prolongados.

AGRADECIMIENTOS

A Estela Menchaca (UBA) por la lectura crítica del primer manuscrito, a Hugo Fernández (UBA) por el apoyo en las investigaciones, y al personal de la laguna Salada de Monasterio por la colaboración en la obtención de las muestras.

BIBLIOGRAFIA

- Abaigar, T., W.V. Holt, R.A.P. Harrison & G. del Barrio. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60: 32-41.

- Ciereszko, A. & K. Darbrowski. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109: 367-373.
- Cisale, H. 1988. Motilidad Espermática. In: *Memorias I Simposio Internacional de Biología Celular y Molecular de la Reproducción*, Universidad Nac. Río IV. Córdoba, pág. 10.
- Cisale, H., C. Blasi y H. Fernández. 2000. Características morfológicas del espermatozoide bovino. *Veterinaria Argentina* 17(163): 173-177.
- Davis, R.O. & C.G. Gravance. 1993. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertility and Sterility*, 59(2): 412-417.
- Huaquin, L., M. Perez de Tudela y R. Correa. 1987. Características ultraestructurales de las gametas del pejerrey (*Basilichthys australis*, Eigenmann) y la respuesta de ovocitos fecundados in vitro. En: *Asociación Argentina de Acuicultura (Ed.) I Reunión Argentina de Acuicultura*. San Carlos de Bariloche, págs. Kleerecooper, H. 1946. A preliminary note on the preservation of egg and sperm of peixe - rei (*Odontesthes brasiliensis*, Val.), and atherinide of southern Brazil, Uruguay and Argentine. *Bol. Agrom.* 119-120.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Omega, Barcelona, 1010 págs.
- Renard, P., C. Strüssmann, H. Ling & F. Takashima. 1994. Evaluation of extenders for pejerrey *Odontesthes bonariensis* sperm. *Fisheries Science* 60(6): 661-666.
- Scott, A.P. & S.M. Baynes. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17: 707-739.
- Strüssmann, C. 1989. Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Ph. D. Dissertation Thesis Department of Aquatic Biociences. Tokyo University of Fisheries, Japan. 351 págs.