

## Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial<sup>#</sup>

Cold storage of sperm of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect on motility, intracellular superoxide, plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential

O Berríos\*, I Valdebenito, F Treulén, A Ubilla

Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.

### SUMMARY

In teleostei, as opposed to what happens in mammals, most of the studies that evaluate the quality storages of semen are oriented toward the exposure of spermatozoa to some reactive oxygen species (ROS), the utilization of antioxidants in the diet, or the incorporation of these in seminal plasma. There is no available the literature covering the presence of superoxide ions ( $O_2^-$ ), or the function of these on the interior of the spermatozoa that have been stored. In this study, we evaluated the effect of storage on intracellular  $O_2^-$ , motility, plasmatic membrane integrity, and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi^{Mit}$ ) of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Semen was extracted and put into storage for 12 days at 4 °C. Spermatozoa motility, ( $\Delta\Psi^{Mit}$ ), plasmatic membrane integrity were evaluated every 4 days, and intracellular  $O_2^-$  was detected. It was found that 82.59% of the cells were positive for the staining of  $O_2^-$  on the day of sample extraction, while sperm motility,  $\Delta\Psi^{Mit}$  and plasmatic membrane integrity only showed deterioration after the eighth day of storage. Only  $\Delta\Psi^{Mit}$  is correlated negatively with  $O_2^-$  starting from the eighth day of storage ( $r = -0.56$   $P < 0.05$ ). Regarding motility and plasmatic membrane integrity, these were not affected by intracellular  $O_2^-$ , although the deterioration observed in these last two indicators, could have been caused by the prolonged contact of the spermatozoa with contaminating agents that were not evaluated in this study.

*Palabras clave:* almacenamiento, superóxido intracelular, trucha arcoiris, espermatozoides.

*Key words:* storage, intracellular superoxide, rainbow trout, spermatozoa.

### INTRODUCCIÓN

Es habitual en especies de cultivo utilizar el almacenamiento de semen fuera del ambiente testicular, en caso de diagnóstico ictiosanitario o por ubicación de los reproductores a grandes distancias del sitio en que se realiza la incubación. Generalmente, este procedimiento es fácil de ejecutar y no requiere de implementación costosa ni de conocimientos avanzados, por lo que frecuentemente se practica en centros de cultivo.

Una forma de evitar el deterioro de los espermatozoides almacenados es diluir el semen en soluciones salinas isotónicas o diluyentes que imitan el medio en que se encuentran dentro del testículo. Los beneficios de estas soluciones están centrados principalmente en mantener las condiciones de humedad y control bacteriano del semen, permitiendo conservar las potencialidades fecundantes de los espermatozoides por largos periodos de tiempo (Babiak y col 2006).

En atención a lo anterior, se han identificado algunos agentes que perjudican la viabilidad y motilidad de los espermatozoides almacenados *in vitro*, entre estos se cuentan las condiciones propias de los reproductores como la edad de maduración, o factores relacionados con el medio de almacenamiento como temperatura, exposición a  $CO_2$ , pH, concentración de oxígeno o contaminación con orina (Billard y col 1993, Billard y col 1997, Ohta y Izawa 1996, Bencic y col 2001, Ingermann y col 2002, Liley y col 2002, Valdebenito y col 2009).

Los estudios relacionados con calidad del semen de teleosteos almacenado *in vitro* en su mayoría están orientados a evaluar algunas características como color, consistencia (Estay y Téllez 1994), densidad espermática, motilidad (Billard 1988, Aas y col 1991, Estay y Téllez 1994) o composición del plasma seminal (Lahnsteiner y col 1998) y, a diferencia de lo que ocurre con mamíferos, poco se ha estudiado el deterioro estructural o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en espermatozoides mantenidos fuera del testículo.

En relación a lo anterior, en mamíferos se ha observado un evidente incremento en la concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS), como resultado de patologías o por criopreservación de las células espermáticas (Chatterjee y col 2001, Agarwal 2004).

Aceptado: 03.03.2010.

# Proyecto FONDEF DO6I1020. Casilla 15-D Temuco, Chile; oberrios@uct.cl

Las ROS son una serie de radicales con carga negativa, y por ser altamente inestables tienden a reaccionar con otras moléculas dentro de la célula, las más frecuentes son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical peroxilo ( $ROO^-$ ) y anión hidroxilo ( $OH^-$ ). Además, existen otras ROS que no son radicales, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En mamíferos, estos elementos se producen naturalmente en bajas concentraciones dentro de la célula, interviniendo en procesos como capacitación, hiperactivación espermática, reacción acrosómica y en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida (Sharma y Agarwal 1996, de Lamirande y col 1997, Cuquerella y col 2003).

La producción en exceso de ROS por la célula recibe el nombre de estrés oxidativo, fenómeno que origina daño a la membrana plasmática causando peroxidación lipídica, alteraciones de fluidez, fragmentación en el ADN, apoptosis vinculada a la activación de algunas caspasas y también se asocia a disminución de la motilidad por descenso en la fosforilación de proteínas del axonema (Connell y col 2002, Paasch y col 2004, Martin y col 2004) y aun cuando el plasma seminal cuenta con sistemas enzimáticos y no enzimáticos para reducir el efecto, en caso de estrés estos mecanismos no son suficientes (de Lamirande 1997, Peeker y col 1997).

Al respecto, se ha encontrado que concentraciones de ROS sobre las normales coinciden con deterioro de la membrana plasmática, disminución del potencial de membrana mitocondrial y motilidad de los espermatozoides. Para disminuir experimentalmente los niveles de ROS con frecuencia se han utilizado antioxidantes similares a aquellos presentes en el semen natural. Esta técnica ha mostrado mejorar los parámetros de calidad espermática, logrando a veces buenos resultados (Baumber y col 2000, Michael y col 2007).

En peces se desconoce si existe presencia de  $O_2^-$  intracelular cuando el semen se encuentra almacenado *in vitro*, o como consecuencia de contaminación con desechos al momento de su extracción; además tampoco se encuentra literatura sobre el efecto del almacenamiento del semen en la integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial, no obstante, los escasos trabajos publicados sobre el tema en su mayoría están orientados principalmente a la evaluación indirecta de ROS o a la inclusión de antioxidantes en la dieta (Mansour y col 2006, Mirzoyan y col 2006, Zhou y col 2006).

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto del almacenamiento refrigerado en la permanencia de motilidad,  $O_2^-$  intracelular, integridad de la membrana plasmática y  $\Delta\Psi^{Mit}$  de espermatozoides de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

## MATERIAL Y MÉTODO

### OBTENCIÓN DE SEMEN

Se extrajo semen de veinte machos maduros de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de dos años de edad

provenientes de la Piscicultura Los Laureles perteneciente a la Universidad Católica de Temuco. Antes de la extracción, los peces fueron anestesiados con BZ-20 al 0,015%, procediendo posteriormente a vaciar la vejiga urinaria. Luego, mediante masaje abdominal o *stripping* se extrajo la muestra de semen, la cual fue oxigenada y depositada en contenedores plásticos herméticamente cerrados.

En el laboratorio, el semen fue diluido en una proporción 1:2 (semen: diluyente espermático), este último compuesto de NaCl 18,8 g/L,  $CaCl_2 \cdot 3H_2O$  2 g/L, KCl 72 gr/L,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  4,1 g/L,  $NaHCO_3$  1 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  2,3 g/L y glucosa 1g/L.

Todos los procedimientos fueron realizados a 4 °C. Diariamente los tuestos con las muestras se agitaron y se airearon inyectándoles oxígeno comprimido.

### ANÁLISIS CITOMÉTRICO

Las lecturas de fluorescencia fueron realizadas en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson) controlado por el software Cell-Quest pro. Las células pasaron a través del instrumento a aproximadamente 600-1.000 cel/s y se registraron datos de 10.000 células. La excitación de las células fue a 488 nm usando un láser de argón. La coloración fluorescente del SYBR-14 fue detectada utilizando un filtro con banda de 520 nm (FL1); la fluorescencia del ioduro de propidio (IP) y dihydroethidium (DHE) fue detectada con filtro de 610 nm de banda (FL3); todos sobre escalas logarítmicas.

### EVALUACIÓN DE MOTILIDAD

En un portaobjeto dispuesto sobre hielo se depositaron 10  $\mu$ l de semen de trucha arcoiris; el portaobjeto con la muestra rápidamente fue montado sobre un microscopio de contraste de fase Olympus BX 41. Una vez enfocada la muestra, se aplicaron sobre ésta 20  $\mu$ l de agua de pozo, la cual activa el movimiento de los espermatozoides. Luego se procedió a evaluar el tiempo desde que comenzó el movimiento espermático, hasta que la totalidad de las células del campo visual dejaron de moverse.

### DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO INTRACELULAR

Para medir el anión superóxido se utilizó la técnica propuesta por De Iuliis y col (2006) modificada, la cual utiliza el colorante fluorescente dihydroethidium (DHE) (Molecular Probe). Este compuesto tiene la particularidad de aceptar radicales superóxido ( $O_2^-$ ) transformándose en 2-hydroxyethidium. La técnica consistió en centrifugar a 470 g por 5 min una suspensión espermática conteniendo  $3 \times 10^6$  espermatozoides en diluyente espermático. Se retiró el sobrenadante y el *pellet* fue disuelto en 400  $\mu$ l de diluyente conteniendo una concentración final de DHE 2  $\mu$ M. Las células fueron incubadas en oscuridad durante 15 min a 4 °C, y nuevamente centrifugadas a 470 g por 5 min; se

retiró el sobrenadante y el *pellet* fue diluido en 400  $\mu$ l de diluyente espermático, para evaluación citométrica.

#### DETERMINACIÓN DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para la detección de la disminución del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$ ) de los espermatozoides se utilizó el kit comercial (Biomol<sup>®</sup> Research Laboratories, AK-116), cuyo colorante activo es 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzamidazolocarboyanin iodide (JC-1). Éste posee una estructura de carga positiva y lipofílica que le permite ingresar fácilmente a las células y mitocondrias. La carga negativa de la membrana mitocondrial interna produce agregación del colorante JC-1, el cual forma dímeros que emiten fluorescencia de color rojo cuando existe un alto potencial mitocondrial. Cuando en la célula el  $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$  disminuye, el reactivo ingresado asume una forma monomérica que emite fluorescencia verde (Marchetti y col 2004). Ambos colores son detectados por citometría.

Para la experimentación se adicionaron  $3 \times 10^6$  espermatozoides a 1 ml de diluyente, la suspensión se centrifugó a 470 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego, el *pellet* fue disuelto en una concentración final de 10  $\mu$ g JC-1/ml diluyente. Para que actuara el colorante la suspensión se incubó 15 minutos a 4 °C protegido de la luz, y se centrifugó nuevamente a 470 g por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y los espermatozoides contenidos en el *pellet* fueron disueltos en 400  $\mu$ l de diluyente para ser evaluados al citómetro.

#### EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

La integridad de la membrana plasmática se evaluó con el kit Live/Dead<sup>®</sup> Sperm Viability Kit (L-7011) (Molecular Probes), el cual está compuesto por dos colorantes fluorescentes, uno para la tinción de ácidos nucleicos (SYBR 14 dye) y otro para viabilidad celular (ioduro de propidio (IP)). Esta tinción permite la identificación de células con la membrana íntegra (color verde) y aquellas muertas (color rojo).

Para la experimentación se adicionaron  $3 \times 10^6$  espermatozoides a 1 ml de diluyente espermático, se centrifugó a 470 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* fue diluido en 1 ml de solución compuesta por SYBR14-IP a una concentración final de 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M respectivamente, e incubado por 15 minutos a 4 °C protegido de la luz. Posteriormente, la suspensión compuesta por espermatozoides, diluyente y colorante fue centrifugada a 470 g por 5 minutos, eliminando luego el sobrenadante. Por último, el *pellet* resultante fue diluido en 400  $\mu$ l de diluyente para ser evaluado al citómetro.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad con la

prueba de Levene. Se aplicó análisis de varianza ANDEVA con respecto a los días de almacenamiento. Cuando éste resultó significativo se utilizó la prueba de Tukey para la separación de medias con  $P < 0,05$ . Para ver si los días de almacenamiento con los parámetros evaluados se correlacionaban, se utilizó la correlación de Pearson con  $P < 0,05$ . También se utilizó esta prueba para ver la existencia de correlación entre la producción de superóxido con potencial de membrana mitocondrial e integridad de membrana plasmática. Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico XLSTAT versión 7.5.2.

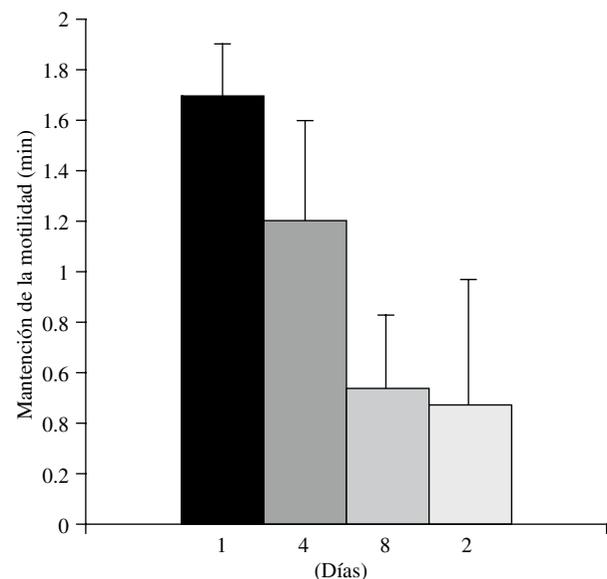
## RESULTADOS

### MOTILIDAD

El tiempo que permanecieron en movimiento los espermatozoides el primer día de almacenamiento fue de  $1,7 \pm 0,2$  min. Sin embargo, a partir del octavo día la motilidad disminuye a menos de un minuto ( $0,53 \pm 0,3$  min), encontrando que el movimiento espermático es de solo  $0,47 \pm 0,5$  min el último día de encontrarse los espermatozoides almacenados (figura 1).

### SUPERÓXIDO INTRACELULAR

La tinción con DHE para detectar  $O_2^-$  intracelular reveló un alto porcentaje de espermatozoides que son teñidos con DHE, desde el primer día de almacenamiento  $82,59 \pm 26,57\%$  del semen, aumentando hacia el último día de evaluación, donde se detecta  $O_2^-$  a un  $96,7 \pm 3,4\%$



**Figura 1.** Mantención de la motilidad de espermatozoides de trucha arcoiris (*O. mykiss*) almacenados *in vitro*. Valores promedio  $\pm$  DE.

Maintenance of motility of spermatozoa of rainbow trout (*O. mykiss*) stored *in vitro*. Mean values  $\pm$  SD.

de los espermatozoides (figura 2). El análisis de varianza ANDEVA mostró diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides que presentaron  $O_2^-$  solo el último día de evaluación ( $P < 0,05$ ), no obstante, se encontró alta correlación entre los días de almacenamiento del semen y el porcentaje de espermatozoides que presentaba  $O_2^-$  ( $r = 0,8$   $P < 0,05$ ).

Los gráficos de dispersión de la figura 3 muestran en la región superior izquierda la población de aquellos espermatozoides que se tiñeron positivamente con DHE. Se observa que este grupo de células se mantuvo más o menos constante a partir del primer día de evaluación.

#### INTEGRIDAD DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

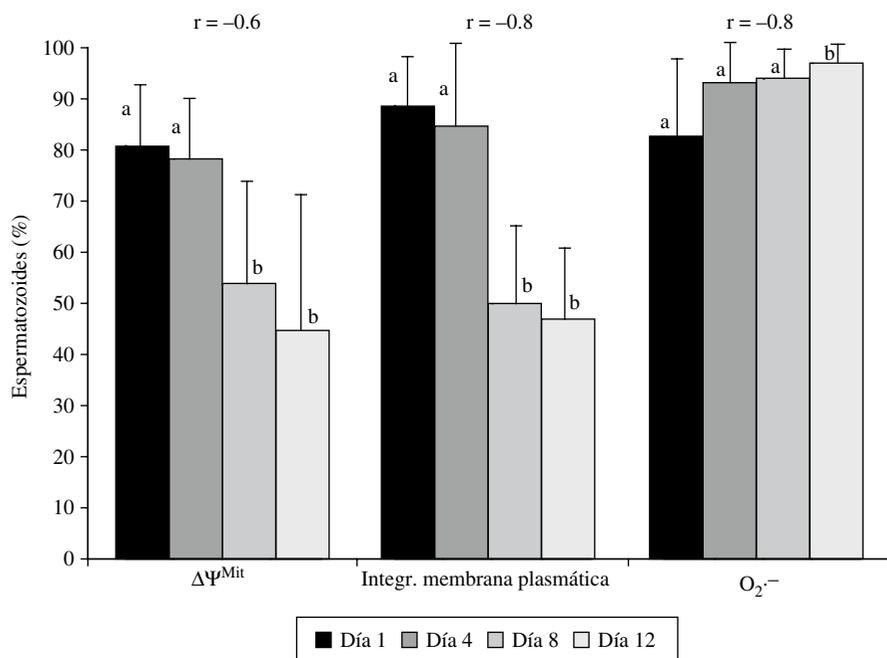
La integridad de la membrana plasmática también se vio afectada con el almacenamiento del semen; al respecto, se encontró que el  $88,6 \pm 9,3\%$  de los espermatozoides registrados en el citómetro presenta la membrana íntegra el día de extracción (figura 2). Este porcentaje se ve disminuido a la mitad,  $50,3 \pm 14,9\%$ , el octavo día de almacenamiento; y después de doce días de encontrarse los espermatozoides fuera del testículo se observa el  $47,0 \pm 13,7\%$  de los espermatozoides con la membrana intacta, caracterizada por la fluorescencia de color verde. Al igual que el  $\Delta\Psi^{Mit}$ ,

el análisis de varianza ANDEVA muestra diferencias significativas de la integridad, a partir del octavo día de almacenamiento ( $P < 0,05$ ). Correlacionando los días de almacenamiento con la integridad de la membrana, se encontró que la permanencia de los espermatozoides fuera del testículo la afecta negativamente ( $r = -0,8$   $P < 0,05$ ). Al correlacionar el  $O_2^-$  con la integridad, para observar algún grado de relación, no se encuentra correlación entre ambos ( $P > 0,05$ ).

El gráfico de dispersión muestra el desplazamiento de la población celular desde el cuadrante inferior derecho de células con la membrana íntegra hacia el cuadrante superior derecho, donde se detectan las células con la membrana deteriorada o muertas, teñidas con IP (figura 4).

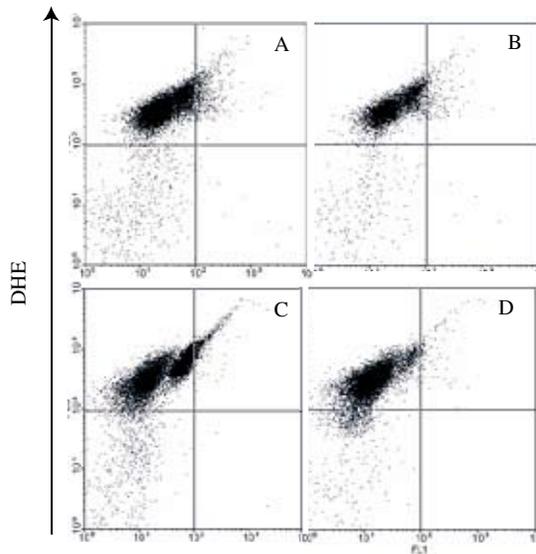
#### POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Se observó gran porcentaje de espermatozoides con alto  $\Delta\Psi^{Mit}$  el primer día de evaluación ( $80,8 \pm 11,6\%$ ), disminuyendo a la mitad los espermatozoides con alto  $\Delta\Psi^{Mit}$  el octavo día ( $53,8 \pm 20,3\%$ ). Finalmente la evaluación correspondiente al duodécimo día reveló un  $44,9 \pm 26,1\%$  de espermatozoides con alto  $\Delta\Psi^{Mit}$  (figura 2). Por otro lado, el test de comparaciones múltiples (T-Tukey) muestra diferencias significativas del  $\Delta\Psi^{Mit}$  entre los días 1 y 4



**Figura 2.** Porcentaje de espermatozoides de trucha arcoiris (*O. mykiss*) con  $\Delta\Psi^{Mit}$  alto, membrana citoplasmática íntegra y con superóxido intracelular. En la parte superior se exhibe el coeficiente de correlación con respecto a los días de almacenamiento y la significancia, aquí letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Los resultados se dan en promedio  $\pm$  DE. El recuadro muestra los días de las evaluaciones.

Percentage of spermatozoa of rainbow trout (*O. mykiss*) with high  $\Delta\Psi^{Mit}$ , cytoplasmic integral membrane and with intracellular superoxide. At the top is displayed the correlation coefficient with respect to days of storage, and the significance, here different letters show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). The results are average  $\pm$  SD. The box shows the days of the evaluations.



**Figura 3.** Comportamiento de los espermatozoides de trucha arcoiris (*O. mykiss*) respecto de la tinción de DHE para superóxido. Se observa a la mayoría de los espermatozoides ubicados en el cuadro superior izquierdo, que corresponde a las células con  $O_2^-$  intracelular, durante todos los días que permanecieron almacenadas. A = día 1, B = día 4, C = día 8 y D = día 12.

Behavior of spermatozoa of rainbow trout (*O. mykiss*) after DHE staining for superoxide. Note the majority of sperm located in the upper left box, which corresponds to the cells with intracellular  $O_2^-$ , every day they remained in storage. A = 1st, B = 4 days, C8 days and D = 12 days.

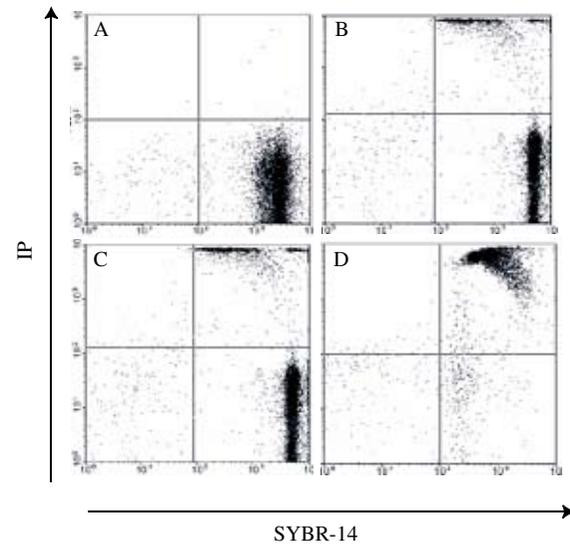
con los días 8 y 9 ( $P < 0,05$ ). Al correlacionar los días de almacenamiento versus el porcentaje de espermatozoides con alto  $\Delta\Psi^{Mit}$  se encuentra correlación negativa entre ambos ( $r = -0,6 P < 0,05$ ), al igual que al correlacionar el porcentaje de células con tinción positiva para  $O_2^-$  y  $\Delta\Psi^{Mit}$ , donde también se obtiene un índice de correlación negativo  $r = -0,56 P < 0,05$ .

El test de comparaciones múltiples entre el porcentaje de espermatozoides con tinción positiva para  $O_2^-$  y el porcentaje de espermatozoides con alto  $\Delta\Psi^{Mit}$  nuevamente muestra diferencias significativas entre los días 1 y 4 con los días 8 y 12.

En el gráfico de dispersión de la figura 5 se aprecia un desplazamiento evidente de las células desde el cuadrante inferior derecho, donde se encuentran los espermatozoides con alto  $\Delta\Psi^{Mit}$ , hacia el cuadrante superior derecho donde se encuentran las células con bajo  $\Delta\Psi^{Mit}$ , este último grupo aumenta notoriamente los días 8 y 12.

## DISCUSIÓN

El tiempo que permanece almacenado el semen fuera del ambiente testicular produce efectos perjudiciales en los espermatozoides. La presencia del anión superóxido ( $O_2^-$ ) intracelular, una especie reactiva de oxígeno (ROS), anteriormente había sido detectado en espermatozoides



**Figura 4.** Tinción de SYB14 - IP para integridad de membrana plasmática de trucha arcoiris. Se observa el desplazamiento de los espermatozoides desde el cuadro inferior derecho, que corresponde a la membrana íntegra, hacia el cuadro superior derecho correspondiente a la tinción de yoduro de Propidio, este último tiñó las células muertas. A = día 1, B = día 4, C = día 8 y D = día 12.

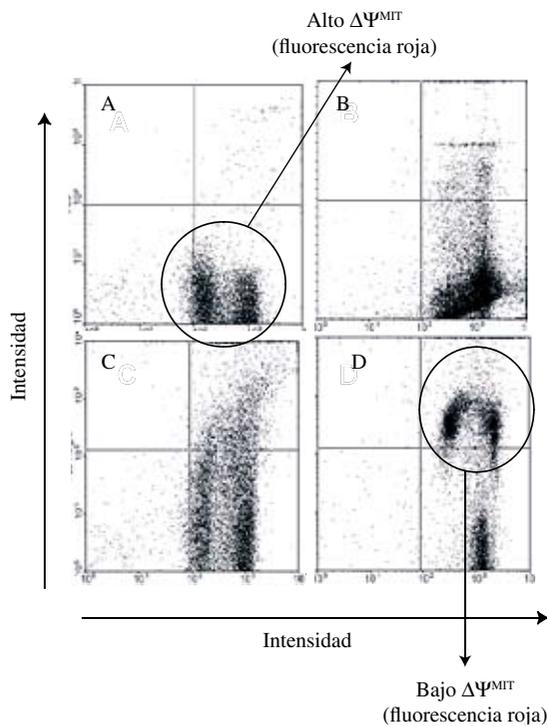
Staining SYB14 - IP for plasma membrane integrity of rainbow trout. It shows the movement of sperm from the lower right square that corresponds to the integral membrane, towards right upper square for the propidium iodide staining, the latter stained dead cells. A = 1st, B = 4 days, C8 days and D = 12 days.

humanos y equino sometidos a criopreservación (De Iuliis y col 2006, Burnaugh y col 2007).

En espermatozoides de mamíferos, el  $O_2^-$  intracelular es consecuencia de los procesos metabólicos que habitualmente ocurren en la mitocondria (de Lamirande 1997, Sanocka y Kurpisz 2004); aquí este radical es generado y liberado al citoplasma donde es transformado a  $H_2O_2$ , el cual finalmente difunde hacia el espacio extracelular (de Lamirande 1997, Koppers y col 2008).

En humanos, habitualmente es baja la concentración de  $O_2^-$  disponible al interior de la célula, el cual formaría parte de una cascada de eventos que finalizaría con la capacitación espermática (de Lamirande 1998).

No se encuentran trabajos disponibles que traten la producción de superóxido intracelular y la función que éste cumple al interior del espermatozoide de peces. Los escritos publicados están orientados a la utilización de antioxidantes en la dieta, su aplicación en el plasma seminal o la exposición de los espermatozoides a otros tipos de ROS, donde se pone énfasis en la evaluación de la motilidad, capacidad fecundante, lipoperoxidación y daño del ADN de los espermatozoides por efecto de antioxidantes (Ciereszko y Dabrowski 1995, Kiron y col 2004, Mansour y col 2006, Zhou y col 2006, Canyon y Akhan 2008).



**Figura 5.** Comportamiento del  $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$  durante el almacenamiento. Se observa la mayoría de los espermatozoides en el cuadro inferior derecho, indicando un alto  $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$  los primeros días de evaluación, mientras que en las dos últimas evaluaciones se produjo desplazamiento de la mancha hacia la parte superior derecha donde se encuentran los espermatozoides con bajo  $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$ , caracterizados por una mezcla de ambos colores. Las flechas de los ejes indican intensidad de la fluorescencia. A = día 1, B = día 4, C = día 8 y D = día 12.

$\Delta\Psi^{\text{Mit}}$  behavior during storage, observed the majority of sperm in the lower right square indicating a high  $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$  first days of evaluation, while in the last two assessments were moving toward the part upper right in which are spermatozoa with low  $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$ , characterized by a mixture of both colors. The arrows indicate the axes of the fluorescence intensity. A = day 1, B = day 4, C = day 8 and D = day 12.

A diferencia de lo observado en espermatozoides de humanos y jabalí (Guthrie y Welch 2006), en el presente estudio se detectó  $\text{O}_2^-$  intracelular en gran porcentaje de los espermatozoides desde el día de extracción del semen. Sin embargo, no se advirtió que este radical afectara la motilidad, integridad de la membrana plasmática o el  $\Delta\Psi^{\text{Mit}}$  los primeros siete días de almacenamiento. Lo anterior podría indicar la inocuidad de los radicales superóxido cuando se encuentran al interior celular, al igual que lo observado en espermatozoides incubados en medios con xantina-xantina oxidasa (XA-XO), donde el daño a la motilidad y estructuras celulares es producido principalmente por el exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado del metabolismo de los  $\text{O}_2^-$  y no directamente por la presencia de este radical (Aitken y col 1993, Baumber y col 2000, Guthrie y Welch 2006, Martínez-Pastor y col 2009).

La motilidad espermática es un indicador que habitualmente se evalúa en los experimentos con semen de

peces (Alavi y col 2004, Alavi y Cosson 2005, Alavi y col 2007). Una particularidad que tienen los espermatozoides de salmónidos, entre los que se encuentra la trucha arcoiris, es la carencia de movimiento cuando se hallan dentro del testículo o en el líquido seminal, característica que permite mantenerlos inactivos *in vitro*, recurriendo a soluciones isoosmóticas con una concentración de potasio similar a la del semen, puesto que este ion es el principal responsable de inhibir el movimiento dentro del testículo (Morisawa y Morisawa 1986). Inversamente, cuando se requiere evaluar motilidad, los espermatozoides deben ser activados depositándolos en agua o medios salinos isoosmóticos, con una concentración de potasio inferior al líquido seminal, donde, al igual que en la naturaleza, el movimiento finalizará 15 a 30 s después que la célula haya sido activada (Christen y col 1987).

En este estudio, el movimiento espermático presentó un evidente descenso a partir del octavo día, observándose solo la mitad de los espermatozoides con movimiento en esta evaluación. Considerando el largo periodo de tiempo transcurrido antes de que la motilidad fuera afectada, al parecer ésta no estuvo influenciada negativamente por los radicales  $\text{O}_2^-$  intracelulares, y el perjuicio podría deberse a otros factores externos que no fueron evaluados en este trabajo, como puede ser la contaminación con orina o microorganismos (Dreanno y col 1998, Ochsendorf 1999).

Los espermatozoides obtienen la energía para el movimiento del flagelo a partir del adenosin-trifosfato (ATP) (Christen y col 1987). La forma como adquieren esta molécula puede variar entre las diferentes especies, así en *Cyprinus carpio* o carpa común, por ejemplo, los espermatozoides obtienen parte de la energía para el movimiento por vía glicolítica, en trucha arcoiris, en cambio, obtiene prácticamente la totalidad de la energía a partir de respiración aeróbica, con participación de las mitocondrias, las cuales generan más  $\text{O}_2^-$  a medida que aumenta el movimiento flagelar (Ziğtar y col 2009). En este aspecto, llama la atención el alto porcentaje de células que presentaron tinción positiva para  $\text{O}_2^-$ , aun cuando durante los ensayos los espermatozoides permanecieron en soluciones que no activaron su motilidad, lo cual debería disminuir considerablemente la generación de este radical en las mitocondrias. Lo anterior hace presumir que los  $\text{O}_2^-$  observados en gran porcentaje de espermatozoides podrían provenir de otro compartimento distinto a las mitocondrias (De Iuliis y col 2006) o tener un origen extracelular como se ha observado en algunos mamíferos (Marklund 1984).

La importancia de la membrana plasmática radica principalmente en funciones de transporte, reconocimiento de señales, balance hídrico y capacidad fecundante de la célula espermática (Boitano y Omoto 1991, Cabrera y col 2001). En este estudio, se entregan los primeros antecedentes sobre integridad de membrana en espermatozoides de trucha arcoiris almacenados. No obstante, en espermatozoides de mamíferos sometidos a criopreservación ha sido ampliamente estudiada (De Baulny y col 1997, Rasul y Anzar 2001).

Una característica de la membrana plasmática de trucha arcoiris es su alto contenido en colesterol (Pustowka 2000), lo cual permite a la célula regular funciones como la fluidez y permeabilidad (Sanocka y Kurpysz 2004). En este trabajo no se observó relación entre la integridad de la membrana y  $O_2^-$  presente en el interior celular, ya que al correlacionar ambos no hubo asociación. Sin embargo, cuando se correlacionó integridad con días de almacenamiento sí se encontró elevada correlación negativa,  $r = -0,8$ , lo que podría indicar perjuicio del almacenamiento, tal vez debido a otros radicales generadores de oxígeno, como por ejemplo, peróxido de hidrógeno generado a partir de  $O_2^-$  al transcurrir los días de almacenamiento o por otros agentes contaminantes, ya por un tema de protección al medio ambiente; la solución salina isoosmótica que se utilizó para la conservación de los espermatozoides carecía de cualquier tipo de antibiótico, razón por la cual es muy probable que la muestra de semen haya contado con una gran carga de microorganismos, algunos de los cuales podrían haber producido peróxido de hidrógeno (Ochsendorf 1999), dañando la membrana y alterando la motilidad espermática durante el almacenamiento.

Otro agente que frecuentemente se puede encontrar en la extracción del semen es la orina, y aunque se tomaron algunas precauciones para evitar su extracción junto con la muestra de semen, probablemente éstas no fueron suficientes. La orina en el semen altera la molaridad y concentración de potasio, además influye en la concentración de ATP y motilidad espermática (Dreanno y col 1998).

El  $\Delta\Psi^{Mit}$  es el único indicador que fue afectado por  $O_2^-$  intracelular, lo cual se demuestra en la correlación negativa obtenida ( $r = -0,56$ ) al asociar ambos indicadores. De acuerdo a los resultados, los espermatozoides también fueron afectados por los días de almacenamiento, presentando una disminución en el potencial a partir del octavo día. Esto último probablemente debido a la interacción directa y prolongada entre  $O_2^-$  y algunas moléculas que son productos de la cadena respiratoria en la mitocondria (Koppers y col 2008), ya que, a diferencia del ROS intracelular, el extracelular (principalmente peróxido de hidrógeno) no produce daño peroxidativo a corto plazo en la membrana, ni afecta el  $\Delta\Psi^{Mit}$  (Baumber y col 2000), inversamente a lo encontrado en espermatozoides de jabalí, donde el exceso de  $O_2^-$  sí provoca disminución del potencial mitocondrial y motilidad, a pesar de encontrarse este radical en un escaso número de espermatozoides (Guthrie y Welch 2006).

En conclusión, en nuestro estudio se observó un alto porcentaje de espermatozoides que presentaron  $O_2^-$  intracelular. De acuerdo a los análisis estadísticos, este anión no afectó la motilidad ni la integridad de la membrana plasmática. Sin embargo, el potencial de membrana mitocondrial sí es afectado, lo cual podría deberse a la exposición directa y prolongada de  $O_2^-$  con moléculas generadas como producto de la respiración dentro de la mitocondria.

Por otro lado, teniendo en cuenta los días de almacenamiento, se observó deterioro en todos los indicadores aquí evaluados, no obstante, dos de ellos (motilidad e integridad de la membrana citoplasmática) no son efecto directo de los  $O_2^-$ , sino que al parecer de otros factores no evaluados en

esta investigación, como puede ser el peróxido de hidrógeno generado a partir de la contaminación bacteriana o por efecto de la contaminación involuntaria con orina.

Finalmente, considerando la importancia que tiene la reproducción de peces en cautiverio y silvestres, resulta conveniente profundizar la investigación en aspectos celulares y así proporcionar información útil para la elaboración de medios de cultivos y otros insumos utilizados en el manejo de gametos.

## RESUMEN

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en teleosteos la mayoría de los estudios que evalúan la calidad del semen almacenado están orientados a la exposición de los espermatozoides a algunas especies reactivas de oxígeno (ROS), a la incorporación de antioxidantes en la dieta o a la aplicación de éstos en el plasma seminal. No se encuentran trabajos disponibles que traten la presencia del radical superóxido ( $O_2^-$ ), ni la función que éste cumple al interior del espermatozoide cuando se encuentran almacenados. En la presente investigación se evaluó el efecto del almacenamiento en el  $O_2^-$ , motilidad, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi^{Mit}$ ) en espermatozoides de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello se extrajo el semen, el cual fue almacenado durante 12 días a 4 °C. Cada 4 días se evaluó motilidad,  $\Delta\Psi^{Mit}$ , integridad de la membrana plasmática y se detectó  $O_2^-$  intracelular en los espermatozoides. Se encontró un 82,59% de células con tinción positiva para  $O_2^-$  el día de extracción de la muestra, mientras que la motilidad,  $\Delta\Psi^{Mit}$  y la integridad de la membrana plasmática, solo mostraron deterioro después del octavo día de almacenamiento. Únicamente el  $\Delta\Psi^{Mit}$  se correlaciona negativamente con  $O_2^-$  a partir del octavo día de almacenamiento ( $r = -0,56$   $P < 0,05$ ). Respecto a la motilidad e integridad de la membrana plasmática no fueron afectadas por el  $O_2^-$  intracelular, no obstante el deterioro observado en estos dos últimos indicadores podría deberse al contacto prolongado de los espermatozoides con agentes contaminantes no evaluados en el presente trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Investigación de la Universidad Católica de Temuco, por su colaboración.

## REFERENCIAS

- Aas GH, T Refsti, B Gjerde. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture* 95, 125-132.
- Agarwal A. 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Rep BioMed on line* 8, 616-627.
- Aitken RJ, D Harkiss, D Buckingham. 1993. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Rep Fert* 98, 257-265.
- Alavi SMH, J Cosson, M Karami, BM Amiri, M Al Akhoundzadeh. 2004. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction* 128, 819-828.
- Alavi H, J Cosson. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biol Internal* 29, 101-110.
- Alavi MH, M Rodina, T Policar, P Kozak, M Psenicka, O Linhart. 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology* 68, 276-283.
- Babiak I, O Ottesen, G Rudolfson, S Johnsen. 2006. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L.: I: Optimizing the protocol. *Theriogenology* 66, 2025-2035.
- Baumber J, B Ball, C Gravance, V Medina, M Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility,

- viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation *J Andro* 21, 895-902.
- Bencic DC, RL Ingermann, JG Cloud. 2001. Does CO<sub>2</sub> enhance short-term storage success of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) milt? *Theriogenology* 56, 157-166.
- Billard R. 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. *Marin Behav Physiol* 14, 3-21.
- Billard R, J Cosson, LW Crim. 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquat Liv Resour* 6, 67-75.
- Billard R, O Linhart, L Fierville, J Cosson. 1997. Motility of European catfish *Silurus glanis* spermatozoa in testes and in milt. *Pols Arch Hydrobiol* 44, 112-122.
- Boitano S, CK Omoto. 1991. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. *J Cell Sci.* 98, 343-349.
- Burnaugh L, K Sabeur, B Ball. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 67, 580-589.
- Cabrera E, L Anel, MP Herráez. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm *Theriogenology* 56, 623-635.
- Canyurt M, S Akhan. 2008. Effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Fisher Aquat Sc* 8, 171-175.
- Chatterjee S, C Gagnon. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Rep Dev* 59, 451-458.
- Christen R, J Gatti, R Billard. 1987. Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur J Biochem* 166, 667-671.
- Ciereszko A, K Dabrowski. 1995. Sperm quality and ascorbic concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: And across-season study. *Biol Rep* 52, 982-988.
- Connell N, C McClure, M Lewis. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 17, 704-709.
- Cuquerella M, I Peinado, I Ruiz, W Mohand, S Mayoral, A Romeo. 2003. Influencia de los factores ambientales en la generación de especies reactivas de oxígeno. Papel en la infertilidad humana. *Rev Iberoam Fert* 20, 369-376.
- De Baulny BO, Y Le Vern, D Kerboeu, G Maisse. 1997. Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Activity and Membrane Integrity in Fresh and Cryopreserved Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spermatozoa. *Cryobiol* 34, 141-149.
- De Iuliis GN, K Wingate, J Koppers, A McLaughlin, R Aitken. 2006. Definitive Evidence for the Nonmitochondrial Production of Superoxide Anion by Human Spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 91 1968-1975.
- de Lamirande E, P Leclerc, C Gagnon. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Rep* 3, 175-194.
- de Lamirande E, A Harakat, C Gagnon. 1998. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion *J Androl* 19, 215-225.
- Dreanno C, M Suquet, E Desbruyères, J Cosson, H Le Delliou, R Billard. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 169, 247-262.
- Estay F, V Téllez. 1994. Biología del desarrollo y reproducción artificial en la trucha arcoiris. Publicado gracias al aporte del proyecto "Manejos reproductivos aplicados a la producción de salmónidos", CONICYT-FONDEF, realizado entre 1993-1996. Serie Publicaciones para la Acuicultura N° 1.
- Guthrie HD, GR Welch. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 84, 2089-2100.
- Ingermann R, M Holcomb, L Robinson, JG Cloud. 2002. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *J Exp Biol* 2885-2890.
- Kiron V, J Puangkaew, K Ishizaka, S Satoh, T Watanabe. 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture* 234, 361-379.
- Koppers AJ, GN De Iuliis, JM Finnie, EA McLaughlin, RJ Aitken. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endoc Metab* 93, 3199-3207.
- Lahnsteiner F, B Berger, T Wisman, RA Patzner. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* 163-181.
- Liley P, P Tamkees, R Tsai, D Hoysak. 2002. Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on *in vitro* fertilization. *Can J Fish Aquat Sci* 59, 144-152.
- Mansour N, A McNiven, G Ricardson. 2006. The effect of dietary supplementation with blueberry,  $\alpha$ -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology* 66, 373-382.
- Marchetti C, N Jouy, Beroy-Martin, A Defossez, P Formstecher, P Marchetti. 2004. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod* 10, 2267-2276.
- Marklund L. 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 222, 649-655.
- Martin G, O Sabido, P Durand, R Levy. 2004. Cryopreservation induces and apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71, 28-37.
- Martínez-Pastor F, E Aisen, MR Fernández-Santos, MC Estes, A Maroto-Morales, O García-Álvarez, JJ Garde. 2009. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Rep* 137, 225-235.
- Michael A, C Alexopoulos, E Pontiki, D Adjipavlou-Litina, P Saratsis, C Boscos. 2007. Effect of Antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 68, 204-212.
- Mirzoyan AV, NA Nebesikhina, NV Voinova, VA Chistyakov. 2006. Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*). *Intern J Refrig* 29, 374-378.
- Morisawa S, M Morisawa. 1986. Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. *J Exp Biol* 126, 89-96.
- Ochsendorf FR. 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Rep Upd* 5, 399-420.
- Ohta H, T Izawa. 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* 142, 107-118.
- Paasch U, R Sharma, A Gupta, S Grunewald, E Mascha, A Thomas, H Glander, A Agarwal. 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 71, 1828-1837.
- Peeker R, R Abramsson, L. Marklund. 1997. Superoxide dismutase isoenzyme in human seminal plasma and spermatozoa. *Molec Hum Reprod* 3, 1061-1066.
- Pustowka C, MA McNiven, GF Richardson, SP Lall. 2000. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquaculture Res* 31, 297-305.
- Rasul Z, N Ahmad, M Anzar. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22, 278-283.
- Sanocka D, M Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Rep Biol Endoc* 2, 1-7.
- Sharma RK, A Agarwal. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urolog* 48, 835-850.
- Valdebenito I, C Fletcher, V Vera, J Fernández. 2009. Factores físico-químicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Arch Med Vet* 41, 97-106.
- Zhou B, W Liu, W Siu, D O'Toole, P Lam, R Wu. 2006. Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress. *Aquat Toxicol* 77, 136-142.
- Ziętara MS, A Biegniewska, E Rurangwa, J Swierczynski, F Ollevier, E Skorkowski. 2009. Bioenergetics of fish spermatozoa during semen storage. *Fish Physiol Biochem* 35, 607-614.