

UNIVERSIDAD CATOLICA DE LA SANTISIMA CONCEPCION
FACULTAD DE INGENIERIA
INGENIERIA CIVIL EN BIOTECNOLOGIA ACUICOLA



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA
ASOCIADO A LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE GLUCOSA
EN ESPERMATOZOIDES DE TRUCHA ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS
MYKISS*) Y SU ASOCIACIÓN CON LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA.**

ÓSCAR IGNACIO BENAVENTE CARRILLO.

INFORME DE PROYECTO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA ACUICOLA

Profesor Guía : Lorena Mardones L.

Profesor
Informante : Catterina Sobenes V.

Concepción, Septiembre 2016.

RESUMEN.

El cultivo del pez trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) constituye una industria con crecimiento exponencial. Existe gran interés por investigar y desarrollar estrategias que permitan aumentar la eficiencia de manejo, producción y cultivo del recurso, sobretodo en lo que respecta a la mejora de la motilidad espermática que favorezca al éxito reproductivo y aumento de productividad de las empresas de acuicultura. Un factor clave para regular la motilidad espermática es la captación de glucosa para la generación del ATP usado para impulsar el movimiento flagelar del espermatozoide, proceso mediado por proteínas transportadoras facilitativas de glucosa (GLUTs) y co-transportadores sodio-glucosa (SGLT). En el presente trabajo se caracterizó funcionalmente el transporte de glucosa asociado a los transportadores facilitativos de glucosa (GLUTs) expresados en espermatozoides de trucha arcoíris (*O. mykiss*) mediante captación del análogo radioactivo ^3H -2-desoxiglucosa (DOG). Se evaluó el efecto de otros carbohidratos que podían actuar como competidores y de citocalasina B, un inhibidor clásico de los GLUTs, y se comparó la captación de DOG entre células espermáticas de machos juveniles y reproductores.

Los experimentos de captación de DOG en tiempo de 60 minutos revelaron que sólo hasta los 10 minutos existe linealidad en el transporte, con una velocidad media promedio de $7,8 \pm 5,0$ y $14 \pm 2,1$ pmoles DOG/ 10^8 células por minuto para reproductores y juveniles respectivamente. Los experimentos con competidores y citocalasina B se realizaron a los 5 minutos en muestras espermáticas de machos juveniles y revelaron que galactosa y manosa alcanzan una inhibición máxima del transporte de un 40 y 80% a concentraciones de 10 y 500 mM, respectivamente, mientras que fructosa no tuvo mayor efecto. Además, citocalasina B provocó una inhibición de sobre un 80% a una concentración de $1 \mu\text{M}$. Al realizar un análisis no paramétrico con el test de Mann-Whitney entre las pendientes obtenidas de la curva de progreso a tiempos cortos (10 minutos) de células espermáticas de juveniles y reproductores, se encontró que no existe diferencia significativa en la captación de glucosa.

Los resultados preliminares de esta investigación indican que las células espermáticas de trucha arcoíris transportan glucosa a través de transportadores GLUT1 y GLUT3, sin existir diferencias significativas en la captación de glucosa entre machos juveniles y reproductores.

Esta investigación centra las bases para nuevos estudios e investigaciones aplicadas a la industria acuícola, pues estos conocimientos permitirán identificar los GLUT_s involucrados en la captación de glucosa en espermatozoides de trucha arcoíris y luego diseñar estrategias para modular la captación de glucosa en espermatozoides y eventualmente aumentar la fecundidad en cultivo de esta especie.

ABSTRACT.

Rainbow trout farming is an industry that has experienced exponential growth in the area of production. There is a lot of interest in investigating and developing strategies that increase the efficiency of the handling, production, and farming of this resource, above all in regard to the improvement of sperm motility. A key factor in regulating sperm motility is glucose capture to generate the ATP used to impel the flagellar movement of the sperm cell, a process mediated by facilitative protein transporters of glucose (GLUTs) and sodium-glucose co-transporters (SGLT). In this work the glucose transport associated with the facilitative transporters of glucose (GLUTs) expressed in sperm cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) was functionally characterized through the capture of the similar, but radioactive ^3H -2-Deoxyglucose (DOG). The effect of other carbohydrates that could act as competitors and cytochalasin B, a classic inhibitor of the GLUTs, was evaluated and the capture of DOG between sperm cells of juvenile males and broodstock was compared.

The experiments of DOG capture in 60 minute time periods revealed that the linearity of the transportation exists only up to 10 minutes, with an average initial velocity of $7,8 \pm 5,0$ y $14 \pm 2,1$ $\mu\text{moles DOG}/10^8$ cells per minute for juveniles and broodstock, respectively. The experiments with competitors and cytochalasin B were performed at 5 minutes in sperm samples of juvenile males and revealed that galactose and mannose reached a maximum inhibition of transportation of 40 and 80% at concentrations of 10 and 500 mM, respectively, while fructose did not have a greater effect. Also, cytochalasin B caused an inhibition of above 80% in a concentration of 1 μM . When doing an analysis that wasn't parametric with the Mann-Whitney test between the slopes obtained from the progress curve of short periods (10 minutes) of sperm cells of juveniles and broodstock, it was found that there is no significant difference in the capture of glucose.

The preliminary results indicate that the sperm cells of the Rainbow Trout transport glucose through GLUT1 and GLUT3 transporters, without significant differences between the glucose capture in juveniles and broodstock.

Dedicatoria y Agradecimientos.

El camino universitario que me ha tocado recorrer hasta el momento digo “hasta” porque no pretendo detenerme en seguir estudiando, ha sido unas de la experiencias más gratificantes que he podido vivir. Con risas, llantos, bailes y otras cosas, me he encontrado con más de una encrucijada que me ha costado solucionar, pero es precisamente eso, los problemas, con difícil solución, las cuales me permitieron convertirme en un verdadero profesional.

He trabajado muy duro para llegar a este momento, es por eso que tome hoy el computador, un 16 de enero del 2016, porque creo que me siento digno de poder escribir con plena confianza esta dedicatoria. Cuando menciono esfuerzo, me refiero sobre todo a mis últimos 4 años universitarios, ya que en medio de esta jungla de vida conocí a la persona que cambiaria mi vida para siempre, MI ESPOSA. En gran parte estoy en estos momentos finales de mi carrera universitaria gracias a ella, fue el soporte donde otros no fueron, fue la luz donde solo encontraba niebla. En la actualidad, me ha dado un regalo que impulsa mi vida de forma positiva y donde los caminos parecen encontrarse en la plaza más hermosa de todas, creo que los que me conocen saben a quién me refiero y los que no y están leyendo estas palabras podrán saberlo con un poco de reflexión.

También quiero agradecer a todos los docentes que han sido parte de mi formación académica, al profesor Christian Díaz por sus buenas charlas ya sea dentro y fuera del aula, de las cuales muchas de ellas quedaron en mi temple, a la profesora Catterina Sobenes por su ejemplo de profesionalismo y buenas prácticas, al profesor Víctor Faundez por sus consejos y contacto para la realización de esta tesis. Tambien quiero a agradecer en especial al profesor Marcelo Villagrán el cual confió en mi entusiasmo y mis ganas para realizar esta investigación y por último a mi profesora guía Lorena Mardones por su eterna sonrisa y buen ánimo para trabajar, lo cual siempre podre recordar de ella.

Un agradecimiento especial a Don Ricardo Quiroz y su centro de acuicultura Pangué por permitirnos las muestras de trabajo de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	OBJETIVO GENERAL.....	3
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
4.	DELIMITACION DEL PROBLEMA.	4
5.	ESTADO DEL ARTE.	5
6.	MARCO DE INVESTIGACIÓN.....	13
6.1	Ubicación.	13
6.2	Obtención de Líquido Seminal.	13
6.3	Conteo espermático.	14
6.4	Ensayo de transporte de D-glucosa.	15
6.5	Ensayos de Captación de DOG en el tiempo.	16
6.6	Ensayo de transporte de D-glucosa en presencia de competidores de transportadores facilitativos de hexosas GLUT.....	17
6.7	Ensayo de transporte de D-glucosa en presencia de citocalasina B inhibidor, de transportadores facilitativos de hexosas GLUT.....	17
6.8	Análisis de datos.....	18
7.	RESULTADOS.....	19
7.1	Captación de DOG en el tiempo.	19
7.2	Transporte de D-glucosa en presencia de competidores e inhibidores de transportadores facilitativos de hexosas GLUT.....	23
7.3	Evaluación de diferencias en el transporte de glucosa en células espermáticas entre machos reproductores y juveniles de Trucha arcoíris (O. mykiss).	26
8.	DISCUSIÓN.	28
9.	CONCLUSIONES.....	34
10.	PROYECCIONES.....	34
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	35
12.	ANEXOS.	40

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura N° 1: Trucha arcoíris.....	6
Figura N° 2: Producción anual total de trucha arcoíris en Chile.	6
Figura N° 3: Producción mundial de trucha arcoíris en toneladas.	7
Figura N° 4: Dendrograma de la familia de los sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT) del humano en función de la similitud de su secuencia.	9
Figura N° 5: Esquema general, método de análisis de transporte de D-glucosa en la Especie <i>Oncorhynchus mykiss</i>	16
Figura N° 7: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermatozoides de Trucha arcoíris para 2 Reproductores.	19
Figura N° 8: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 10 minutos en espermatozoides de Trucha arcoíris para 2 Reproductores.	20
Figura N° 9: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermatozoides de Trucha arcoíris para 2 Juveniles.	21
Figura N° 10: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 10 minutos en espermatozoides de Trucha arcoíris para 2 Juveniles.	22
Figura N° 11: Inhibición de la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en presencia de competidores.	23
Figura N° 12: Inhibición de la captación de 1 μ M de 2-desoxiglucosa en presencia de citocalasina B a 1 y 10 μ M.	24
Figura N° 13: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 10 minutos en espermatozoides de Trucha arcoíris para 2 Reproductores y 2 Juveniles.	26
Figura N° 14: Modelo propuesto para la estructura secundaria de los transportadores de glucosa	40

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Características funcionales de los GLUTs	10
Tabla 2: Prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes.	27
Tabla 3: Datos para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermas de Trucha arcoíris para 2 reproductores.	41
Tabla 4: Datos para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermas de Trucha arcoíris para 2 juveniles.....	42

NOMENCLATURA.

ATP:	Adenosín trifosfato.
DMSO:	Dimetil sulfóxido.
DOG:	2-desoxi-D-glucosa.
FAO:	Food and Agriculture Organization.
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfónico.
K_m:	Constante de Michaelis.
rpm:	Revoluciones por minuto.
SDS:	Dodecilsulfato de sodio.
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminometano.

1. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) es una industria que ha presentado crecimiento exponencial desde los años 50 llegando a 855.951 ton en el año 2012 (FAO, 2015). Debido a su relevancia comercial, existe gran interés por investigar y desarrollar estrategias que permitan aumentar la eficiencia de manejo, producción y cultivo del recurso. (FAO, 2015; Subpesca, 2015).

A nivel mundial, se han realizado estudios para conocer los patrones de motilidad espermática de peces en cultivo ya que es una herramienta fundamental para la optimización de la fecundación (Bastardo, 1992). Un factor clave para regular la motilidad espermática es la captación de glucosa para la generación de energía a la forma de ATP para ser usada para impulsar el movimiento flagelar de los espermatozoide. Estudios señalan que el usos de diluyentes o activadores espermáticos en la fertilización artificial de salmónidos, mejora la motilidad con efectos favorables en la tasas de fertilización (Steinberg et al. 1995; Valdebenito, 2007).

En plasma seminal de la trucha arcoíris se ha determinado que los principales nutrientes son la glucosa y fructosa, las que se encuentran en un rango de 20-220 y 58-63 (mg/l) (Garde et al., 1996), respectivamente. Se ha estudiado el uso de diluyentes que imitan el contenido del plasma seminal de peces de importancia comercial, principalmente truchas y salmones (Truscott & Idler, 1969; Erdahl & Graham 1987; Valdebenito et al., 2009). Entre los componentes de estos diluyentes se encuentran glucosa, fructosa siendo el conocimiento del transporte de estas moléculas fundamental en el metabolismo energético de éstos, su motilidad y por ende en la eficiencia de la fecundación en las pisciculturas.

El ingreso de estos carbohidratos desde el medio extracelular al interior de las células está mediado por los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT) y proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUTs), la cual se compone de una familia de 14 miembros desde GLUT1, hasta GLUT14, que son muy conservados evolutivamente. En mamíferos se conoce que GLUT1 y GLUT8 se encuentran expresados en los espermatozoides y permiten la captación de glucosa y que GLUT5 permite la captación de fructosa. Sin embargo, en espermias de salmónidos no se conoce cuales son los transportadores responsables de la captación de glucosa y fructosa (Castrejón et al., 2007; Bermúdez et al., 2007).

En el presente proyecto se propone caracterizar funcionalmente el transporte de glucosa asociado a los transportadores facilitativos glucosa (GLUTs) expresadas en los espermias de trucha arcoíris (*O. mykiss*). A futuro, dicha información permitirá diseñar estrategias para modular la captación de glucosa en espermatozoides y eventualmente aumentar la fecundidad en la trucha arcoíris y de esta manera aumentar su fecundidad en cultivo.

2. OBJETIVO GENERAL.

- Caracterizar el transporte de glucosa en células espermáticas de la especie (*Oncorhynchus mykiss*) en machos reproductores adultos y juveniles.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la capacidad de captación de glucosa en células espermáticas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) en machos adultos y juveniles.
- Evaluar el efecto de competidores e inhibidores de transportadores facilitativos de hexosas GLUT en el transporte de glucosa de células espermáticas de trucha arcoíris (*O. mykiss*).
- Evaluar posibles diferencias en el transporte de glucosa en células espermáticas entre machos juveniles y reproductores de trucha arcoíris (*O. mykiss*).

4. DELIMITACION DEL PROBLEMA.

La investigación se realizará en el marco de un proyecto FONDECYT 11121367 “Rol del transportador facultativo de glucosa GLUT8 en la glándula mamaria durante embarazo y lactancia” liderado por la Dra Lorena Mardones L, con la participación del Dr Marcelo Villagrán en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción campus San Andrés en la ciudad de Concepción, Chile.

Las muestras experimentales (Semen) serán obtenidas a partir de peces machos maduros de 1 a 3 años de la especie *Oncorhynchus mykiss* desde la piscicultura Pangue ubicada a unos 20 km al Este de Concepción.

Las principales delimitaciones son, en primer lugar el tiempo, ya que la obtención de espermas sólo se realiza en una determinada temporada asociada a la época reproductiva que ocurre principalmente en los meses de junio y julio. En este periodo, la piscicultura realiza sus trabajo de reproducción artificial con machos reproductores seleccionados para los siguientes lotes productivos.

Segundo, los recursos de reactivos son limitados, pues la mayor parte de los recursos están dirigidos a financiar el tema principal del proyecto, “Rol del transportador facultativo de glucosa GLUT8 en la glándula mamaria durante embarazo y lactancia”, en este caso la investigación de esta tesis tiene como objetivo principal caracterizar funcionalmente el transporte de glucosa asociado a los transportadores facilitativos glucosa (GLUTs) expresadas en los espermas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) el cual no cumple con los objetivos de proyecto principal.

5. ESTADO DEL ARTE.

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es nativa de las cuencas que drenan al Pacífico en Norte América, abarcando desde Alaska a México. Desde 1874 ha sido introducida en todos los continentes excepto la Antártica, tanto para la pesca deportiva como para la acuicultura. Su producción se expandió de manera progresiva a partir de 1950 con el desarrollo de los alimentos peletizados. Las pesquerías de trucha son mantenidas, o cultivadas, en las cuencas altiplánicas de muchos países tropicales y sub-tropicales de Asia, Este de África y Sudamérica. Se han desarrollado varios linajes o cepas locales, mientras alguna de la cuales han surgido a través de selección masiva y entrecruzamiento para mejorar la calidad de los peces para cultivo y su producción intensiva (NSW, 2014; FAO, 2015).

La Trucha arcoíris es un pez carnívoro de agua fría, que posee variedades acondicionadas a vivir sólo en agua dulce y otras que pueden desarrollar su vida tanto en agua dulce como salada. Se caracteriza por poseer una banda rosada a lo largo de la línea lateral, una coloración azul a verde oliva sobre esta línea y una banda plateada por debajo. El lomo, los costados, la cabeza y las aletas están cubiertos con pequeños puntos negros y su aleta adiposa usualmente presenta un borde negro. La coloración de la Trucha arcoíris varía con el hábitat, el tamaño, y la condición sexual. Los que residen en corrientes y las hembras desovantes tienden a presentar una coloración más oscura y más intensa, mientras que los residentes de lagos son más brillantes y más plateados. La Trucha arcoíris no presenta tubérculos nupciales, pero los machos presentan cambios menores en la cabeza, la boca y el color. Esta especie posee un cuerpo de forma alargada (Figura 1), fusiforme con 60-66 vértebras, 3-4 espinas dorsales, 10-12 rayos dorsales blandos, 3-4 espinas anales, 8-12 rayos anales blandos, 19 rayos caudales con una longitud promedio de 50 cm en su etapa adulta (NSW government, 2014; FAO, 2015).



Figura N° 1: Trucha arcoíris. Fuente: NSW Government, 2014.

La industria del cultivo de la Trucha arcoíris ha mostrado un crecimiento exponencial desde 1950 (Figuras 2 y 3), especialmente en Europa y a partir de 1970 en Chile, siendo su distribución de cultivo en la zona sur del país entre las regiones VIII y XII. Actualmente se encuentran inscritos en el Registro Nacional de Acuicultura 1000 centros de cultivo en mar y 266 en tierra. Chile es uno de los principales productores mundiales de truchas de cultivo y muchos de sus aspectos son altamente eficientes tales como el proceso de producción, formulaciones de dietas y las tasas de crecimiento. Sin embargo, la investigación y el desarrollo actual intentan aumentar la eficiencia de producción y manejo, así como crear nuevas estrategias de cultivo (FAO, 2015; Subpesca, 2015).

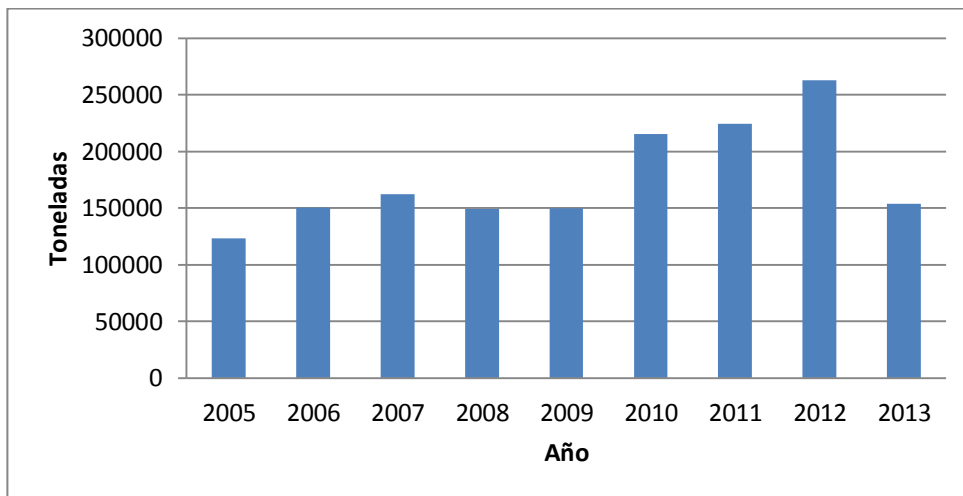


Figura N° 2: Producción anual total de trucha arcoíris en Chile. Fuente: Elaboración propia, Salmonchile 2013.

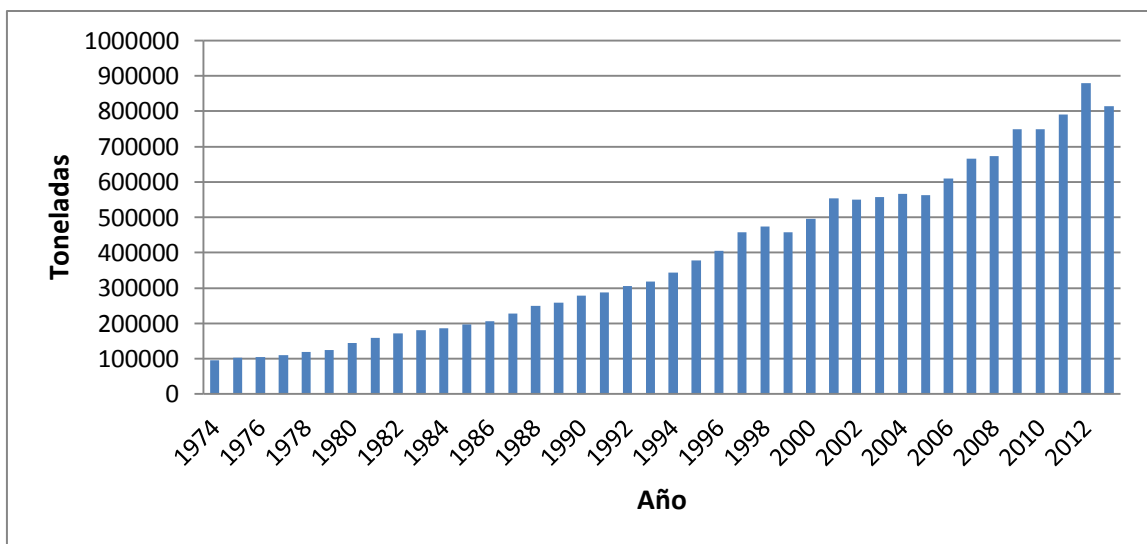


Figura N° 3: Producción mundial de trucha arcoíris en toneladas. Fuente: Elaboración propia, FAO 2015.

Desde los inicios del cultivo intensivo, ha existido preocupación por estudiar el semen de los peces, especialmente de los salmónidos (Bastardo, 1992) ya que, la motilidad espermática en peces de cultivo es una herramienta clave para la optimización del uso del semen en las actividades de piscicultura, con el fin de obtener altos porcentajes de fecundación. El único parámetro utilizado para determinar la calidad seminal en peces es la motilidad, valorando la intensidad de movimiento (Sánchez- Rodríguez y Billard, 1977), la duración de la motilidad (Carpentire y Billard, 1978) o la combinación de ambos valores. Por ejemplo (Steinberg et al., 1995) señala que el semen de trucha arcoíris bajo criopreservación alcanzar una eficiencia de fertilidad de hasta un 83,8%. Por otra parte Valdebenito (2007) sugiere que el uso de diluyentes o activadores espermáticos en la fertilización artificial de Salmónidos, mejora la motilidad con efectos favorables en las tasas de fertilización. Como por ejemplo, el efecto de la cafeína a una concentración de 10 mM en el medio isotónico de fertilización de ovas de trucha arcoíris, permite incrementar significativamente la motilidad espermática de esta especie, lo que se traduce en un aumento del porcentaje de fecundación desde un 81,66% a un 95%.

Se ha estudiado el efecto del uso de diluyentes que imita el contenido del plasma seminal de peces de importancia comercial sobre la fecundación, principalmente Truchas y Salmones. (Valdebenito et al, 2009). (Erdahl y Graham., 1987) Almacenaron semen de Trucha por 24 horas y usaron como componente de almacenamiento glucosa, cloruro de sodio, de potasio y de magnesio, mientras que (Truscott e Idler, 1969) reportan motilidad de los espermatozoides de Salmón del Atlántico después de 6 días de almacenamiento con un diluyente que contenía Fructosa.

La glucosa es el principal monosacárido en la naturaleza que proporciona energía a las células de todos los organismos, desde los más simples como las bacterias y la levadura, hasta los más complejos como el ser humano. Esto hace que el transporte de este azúcar al interior celular constituya un proceso esencial para el metabolismo energético y en consecuencia, para los procesos que mantienen la vida (Castrejón et al., 2007). En plasma seminal de la especie *O. mykiss* se encuentra la glucosa en un rango de 20-220 (mg/l) y la fructosa en los rangos de 58-63 (mg/l) (Garde et al., 1996) lo que implica que los conocimientos en el transporte de estas moléculas en espermatozoides juega un rol fundamental en el metabolismo energético de estos, su motilidad y por ende en la eficiencia de la fecundación.

El transporte de la glucosa a través de la membrana celular se lleva a cabo por dos familias de proteínas de membrana: los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT) y las proteínas Transportadoras Facilitativas de Glucosa (GLUT). Los primeros se expresan principalmente en epitelios que se encargan de la absorción y de la reabsorción de nutrientes, esto es, el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal respectivamente. Los GLUT se expresan en todas las células del organismo y permiten mover la glucosa de un compartimento a otro a favor de una gradiente de concentración

Se han identificado 14 proteínas Transportadoras Facilitativas de Glucosa (GLUT 1-GLUT 14) divididas en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales, como su especificidad al sustrato (glucosa, fructosa y/ o galactosa), sus valores K_m o constante de Michaelis-Menten la cual corresponde a la afinidad de la proteína por un sustrato, o su respuesta a los bloqueadores específicos citocalasina B y forskolina (Figura 4).

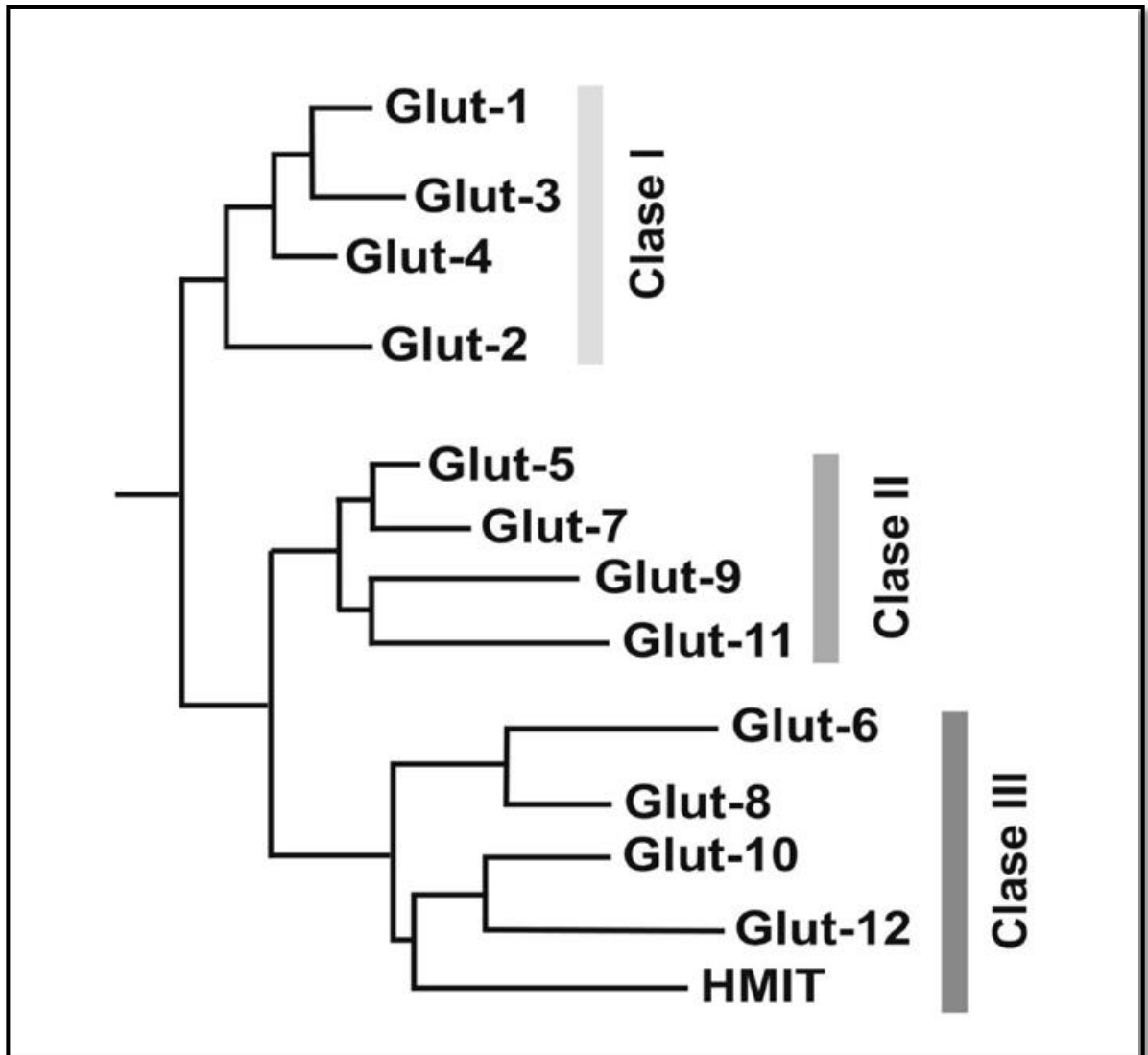


Figura N° 4: Dendrograma de la familia de los sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT) del humano en función de la similitud de su secuencia. Fuente: Bermúdez et al., 2007.

Tabla 1: Características funcionales de los GLUTs

Transportador	Transporta	Km	Localización Tisular
GLUT1 (SLC2A1)	Glucosa y galactosa manosa	1 mM 20 mM 30 mM	Eritrocitos, células endoteliales del cerebro, neuronas, riñón, linfocitos
GLUT2 (SLC2A2)	Glucosa y Fructosa	17 mM	Células β pancreáticas , hígado, riñón, intestino delgado
GLUT3 (SLC2A3)	Glucosa y galactosa manosa	2 mM	Sistema nervioso central, placenta, hígado, riñón, corazón, linfocitos
GLUT4 (SLC2A4)	Glucosa	5mM	Tejidos sensibles a la insulina, linfocitos
GLUT5 (SLC2A5)	Fructosa	10 mM	Intestino delgado, testículo, riñón
GLUT6 (SLC2A6)	Glucosa	5 mM	Cerebro, bazo, leucocitos
GLUT7 (SLC2A7)	Glucosa y fructosa	0.3 mM 0.06 mM	Intestino delgado, colon, testículo, próstata
GLUT8 (SLC2A8)	Glucosa y fructosa	2 mM	Testículo y tejidos dependiente de insulina
GLUT9 (SLC2A9)	Fructosa	No descrita	Riñón, hígado, intestino delgado, placenta, pulmones, leucocitos
GLUT10 (SLC2A10)	Glucosa	0.3 mM	Hígado, páncreas
GLUT11 (SLC2A11)	Fructosa y glucosa	Alta afinidad a fructosa y baja afinidad a glucosa	Corazón, músculo esquelético, riñón, tejido adiposo, placenta, páncreas
GLUT12 (SLC2A12)	Glucosa	Alta afinidad a glucosa	Músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado
GLUT13 (SLC2A13)	Mio-inositol acoplado a H ⁺	100 μ M	Cerebro
GLUT14 (SLC2A14)	Glucosa	No descrita	Testículo

Fuente: Elaboración propia, (Lodish et al., 2006; Bermúdez et al., 2007; Castrejón et al., 2007).

Respecto a estudios de transportadores facilitativos de glucosa en espermias, estos son escasos y su mayoría se refiere a mamíferos. Angulo et al., (1998) analizaron la expresión de los transportadores de hexosa en los testículos de humanos, rata y toro. Los análisis de reacción en cadena de la polimerasa demostraron que el testículo humano adulto expresa los transportadores de GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 y GLUT5, mientras que experimentos inmunolocalización confirma la presencia de GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5, y bajos niveles de GLUT4 en espermatozoides. De esta forma, los autores concluyen que los espermatozoides en humano, rata y de toro expresan varias isoformas de los GLUTS que les permiten la eficiente captación de glucosa y fructosa.

Gawlik et al., (2008) mencionan que GLUT8 se expresa predominantemente en los testículos y también presente en el cerebro, corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, glándula suprarrenal, y el hígado. En ratones, el apareamiento de heterocigotos para el GLUT8 (GLUT8^{+/-}) genera un menor número de crías, lo cual asociaron una reducción significativa en la motilidad de los espermatozoides, niveles más bajos de ATP, y de potencial de membrana mitocondrial. Estos datos indican que GLUT8 juega un papel importante en el metabolismo energético de las células de esperma. Además, Schürmann et al., (2002) señala que la expresión específica y localización de GLUT8, sugiere que este transportador desempeña un papel importante en el suministro de carbohidratos de espermatozoides maduros.

En peces, existe escasa información sobre los transportadores facilitativos de glucosa, se han identificado y caracterizado algunas isoformas de GLUTs y la mayoría en salmónidos. (Teerijoki., 2002) clonaron GLUT1 y GLUT2 proveniente de trucha arcoíris y carpa en ovocitos de *xenopus*, los resultados de los estudios filogenéticos sugieren que esta la probabilidad de nuevas isoformas de GLUTs y, estudios funcionales mostraron que estas proteínas son totalmente funcionales y similares a GLUT1 de mamíferos en su cinética y selectividad de sustrato. (Planas et al., 2000) clonaron un transportador de glucosa del músculo esquelético de Salmon Trutta que actualmente es denominado btGLUT4 y que presentó una homología elevada a los GLUT4 de mamíferos. Según estos autores, el patrón de expresión tisular del btGLUT4 está en función de las zonas de captación de glucosa, así el btGLUT presenta una mayor expresión en tejidos como el músculo esquelético y las branquias. Por otra parte (Capilla et al., 2002) sugiere que la expresión del btGLUT4 es regulada por los niveles de insulina plasmática en el músculo rojo, revelando similitud funcional y estructural con GLUT4 humano. Similares resultados encontró Rojas (2005) en el músculo rojo.

En la actualidad no existe evidencia de estudios de expresión de transportadores de glucosa en espermatozoides de peces. Esta información permitirá diseñar estrategias para modular la captación de glucosa en espermatozoides y eventualmente aumentar la fecundidad en la Trucha arcoíris y de esta manera aumentar su fecundidad en cultivo.

6. MARCO DE INVESTIGACIÓN.

6.1 Ubicación.

El trabajo experimental se realizó en la Facultad de Medicina que se encuentra en las dependencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, situada en la ciudad de Concepción, Región del Bío Bío

Se inició la experiencia a partir del sábado 9 de mayo del 2015, en primera instancia se obtuvo semen de peces machos reproductores y juveniles de la especie *O. mykiss* desde la piscicultura Pangue ubicada a unos 20 km al Este de Concepción. Luego las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC).

6.2 Obtención de Líquido Seminal.

Se anestesiaron los peces con BZ-20 al 0.015%, una vez anestesiados se procedió a vaciar la vejiga urinaria. Posteriormente, mediante masajes abdominales o *stripping* se extrajo las muestras de semen en envases plásticos que después fueron traspasados a tubos cónicos herméticos estériles de 15 ml. Finalmente se guardaron las muestras dentro de un contenedor térmico a 4°C para transportarlos al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UCSC y almacenarlos en un refrigerador a 4°C hasta su uso.

6.3 Conteo espermático.

Las células espermáticas se lavaron con buffer de transporte (Hepes 15 mM pH 7,6; NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 0,8 mM; CaCl₂ 1,8 mM) a una temperatura ambiente mediante centrifugación por 5 minutos a 3500 rpm, este proceso se repitió 3 veces.

Una vez las lavadas muestras, se procedió a realizar 3 diluciones seriadas de 1:10. Ya diluida la muestra, se depositaron 10 µl en una cámara de Neubauer, sobre un microscopio de contraste de fase Olympus BX 40. Una vez enfocada la muestra, se realizó el conteo de espermatozoides considerando sólo las células que están dentro de cada cuadrado mediano y aquellas ubicadas a los lados superiores y derecho de dicho cuadrado. Una vez que el recuento fue realizado, se obtuvo el recuento total, considerando la dilución inicial y el factor de dilución, según la siguiente fórmula

$$\begin{aligned}\text{Factor de dilución} &= N \times 10^4 = 10^7 \\ N &= \text{dilución de la muestra} = 10^3\end{aligned}$$

$$\text{Número Total de células} = \text{Número de células contadas} \times \text{factor de dilución} \text{ cél/ml}$$

$$\text{Número Total de células} = \text{Número de células contadas} \times 10^7 \text{ cél/ml}$$

6.4 Ensayo de transporte de D-glucosa.

Se realizaron estudios de captación de 2-[1,2-³H]-desoxi-D-glucosa en espermatozoides maduros de la especie *O. mykiss* aislados en el Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, a continuación se describe el protocolo y en la figura 6 se encuentran representados sus distintas etapas.

- a) Inicialmente, luego del lavado, las células espermáticas se dejaron incubando por 30 minutos en buffer de transporte (Hepes 15 mM pH 7,6; NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 0,8 mM; CaCl₂ 1,8 mM) a temperatura ambiente.
- b) Previo al ensayo de captación, las células espermáticas se centrifugaron por 45 segundos a 3000 rpm, eliminando el sobrenadante.
- c) Los ensayos de transporte se realizaron utilizando el análogo de glucosa no metabolizable 2-desoxiglucosa (DOG) a la concentración de 1 mM, complementado con 1 μCi/ml de 2-[1,2-³H]-desoxi-D-glucosa (26,2 Ci/mmol, NEN-DuPont).
- d) El experimento de transporte fue finalizado mediante la adición de 0,5 ml de buffer de detención (Hepes 15 mM pH 7,6; NaCl 135 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 0,8 mM; CaCl₂ 1,8 mM, HgCl₂ 0,2 mM) a 4 °C, centrifugando por 45 segundos a 3000 rpm.
- e) Después de realizar tres lavados con el buffer de detención, las células fueron lisadas con 200 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, SDS 0,2 %).
- f) Las muestras ya lisadas fueron traspasadas a viales de centelleo de capacidad 7 ml y se les agregara 1ml de líquido de centelleo (Ecoscint, National Diagnostics).
- g) Luego, se procedió a medir la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido LS 6500 Liquid Scintillation Counting System, Beckman Coulter.

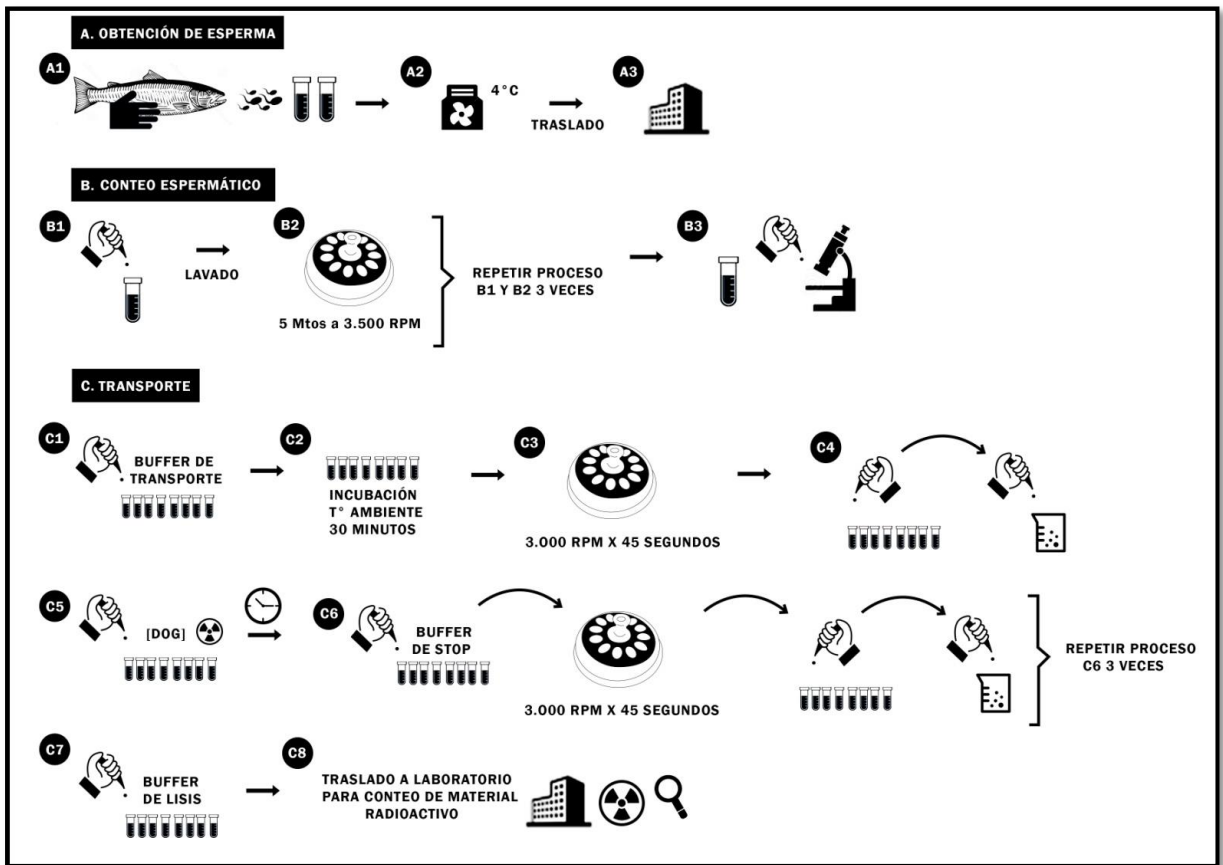


Figura N° 5: Esquema general, método de análisis de transporte de D-glucosa en la Especie *Oncorhynchus mykiss*. Fuente: Elaboración propia.

6.5 Ensayos de Captación de DOG en el tiempo.

La captación de DOG 1 mM se realizó en experimentos de progresión en el tiempo. De acuerdo al protocolo de transporte en espermias de otras especies, se utilizará un tiempo de 60 minutos (Angulo et al., 1998), realizando las captaciones iniciales cada 2 minutos en los primeros 10 minutos y cada 10 minutos en los siguientes 50 minutos, lo que permitirá generar una curva de progreso de nmoles DOG captados por 10^8 espermios/ml *v/s* tiempo. Los ensayos se realizaron en duplicado para cada espécimen.

6.6 Ensayo de transporte de D-glucosa en presencia de competidores de transportadores facilitativos de hexosas GLUT.

Se procedió a realizar transporte de 2-desoxiglucosa 1mM en espermatozoides maduros de la especie *O. mykiss* aislados siguiendo el mismo protocolo descrito previamente, pero en este caso, el transporte fue realizado a los cinco minutos y se sometió en presencia de hexosas descritos como competidores de GLUT1, GLUT3, GLUT5 y GLUT8 (Lodish et al., 2006; Castrejón et al., 2007), como Fructosa, Manosa y Galactosa. Se utilizaron concentraciones de, 10 y 100 mM para Fructosa, y de 10, 100 y 500 mM para Manosa y Galactosa. Los competidores se agregaron a la mezcla de transporte en forma simultánea con el DOG. Los ensayos se realizaron en duplicado para cada espécimen y fueron expresados en porcentaje de captación respecto al valor obtenido en muestras controles, en ausencia de competidores.

6.7 Ensayo de transporte de D-glucosa en presencia de citocalasina B inhibidor, de transportadores facilitativos de hexosas GLUT.

Se procedió a realizar transporte de 2-desoxiglucosa 1mM en espermatozoides maduros de la especie *O. mykiss* aislados siguiendo el mismo protocolo descrito previamente, pero en este caso, el transporte se realizó a los cinco minutos y se realizaron en presencia de citocalasina B, un inhibidor específico para los transportadores facilitativos de glucosa (Zoccoli et al., 1978; Walmsley et al., 1994). Se utilizaron concentraciones de 1 y 10 μ M de citocalasina B disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y un tiempo de pre-incubación de 5 minutos. Los ensayos se realizaron en duplicado para cada espécimen y fueron expresados en porcentaje de captación respecto al valor obtenido en muestras controles, en ausencia del inhibidor.

6.8 Análisis de datos.

Para facilitar la interpretación de los datos los cuales están expresados como su promedio \pm la desviación estándar de los duplicados para cada uno de los puntos, se realizaron gráficos de dispersión y de barras en Microsoft Excel y para análisis estadísticos se utilizó software estadístico IBM SPSS Statistics.

Para la realización de gráficos de dispersión, se evaluaron las variables Captación de 2-desoxiglucosa 1mM en tiempos de 60 minutos para los machos reproductores y juveniles luego de eso se observó en que tiempo la captación de DOG posee una tendencia lineal, de manera de elaborar gráficos en tiempos cortos de captación de DOG en espermias de truchas arcoíris para machos reproductores y juveniles. También se construirán gráficos de barras para los ensayos de captación de D-glucosa en presencia de competidores Fructosa, Manosa y Galactosa, e inhibidor citocalasina B de transportadores facilitativos de hexosas GLUT

Finalmente, para la evaluación y análisis estadístico de posibles diferencias en el transporte de glucosa en células espermáticas entre machos juveniles y reproductores de Trucha arcoíris se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney, correspondiente a dos muestras independientes. Por lo tanto, una vez obtenidas las tasas de captación de ($\text{nmolDOG/cel} \cdot 10^8/\text{min}$) por cada reproductor y juvenil, se comparó las medias entre como muestras independientes.

7. RESULTADOS.

7.1 Captación de DOG en el tiempo.

A partir de los experimentos realizados de captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermias de trucha arcoíris para 2 reproductores y 2 juveniles para la caracterización de los transportadores facilitativos glucosa, se realizaron captaciones iniciales cada 2 minutos en los primeros 10 minutos, y cada 10 minutos en los siguientes 50 minutos, los resultados obtenidos se muestran en las figuras 7 y 8.

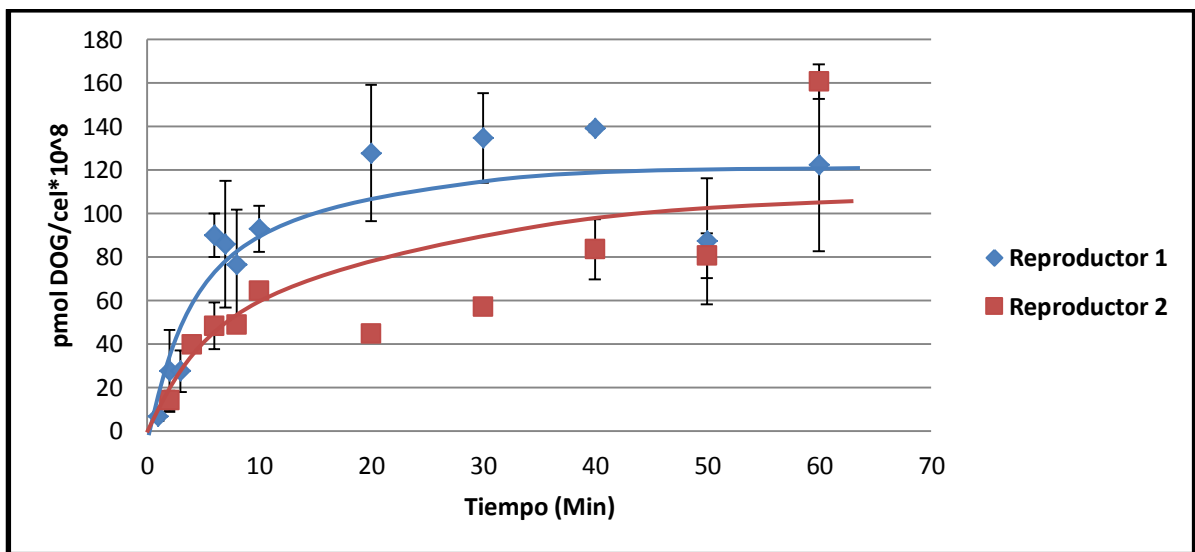


Figura N° 6: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 Reproductores. Los diamantes azules corresponden a Reproductor 1 y los cuadrados rojos a Reproductor 2. Los datos están expresados como su promedio \pm la desviación estándar de los duplicados de cada uno de los puntos.

Se observa en la figura N°7 una curva de progreso de captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 Reproductores, en los primeros 10 minutos la captación muestra un aumento lineal uniforme, y luego hasta el minuto 60 posee un comportamiento asintótico. En los primeros 10 minutos, el reproductor 1 alcanza un máximo 90 ± 9 (pmolDOG/cel*10⁸) y el reproductor 2 un máximo de 64 ± 3 (pmolDOG/cel*10⁸).

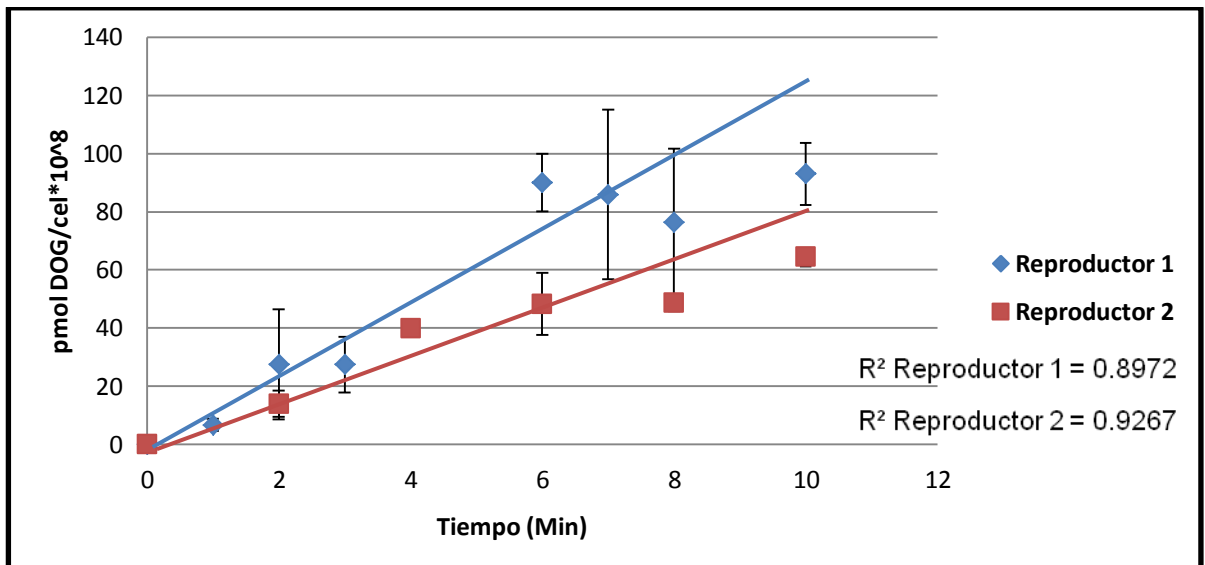


Figura N° 7: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 10 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 Reproductores. Los datos corresponden diamantes azules Reproductor 1, cuadrados rojos Reproductor 2, los datos están expresados como su promedio \pm la desviación estándar de los duplicados para cada uno de los puntos.

En la figura N°8 se observa rectificado de la figura N°7, en tiempo de 10 minutos. El grafico muestra una tendencia lineal para ambas muestras, se obtuvieron los valores de las tasas de captación de DOG para el reproductor 1 con un valor de 10,3 (pmolDOG/cel*10⁸/min) y para el reproductor 2 con un valor de 6,2 (pmolDOG/cel*10⁸/min).

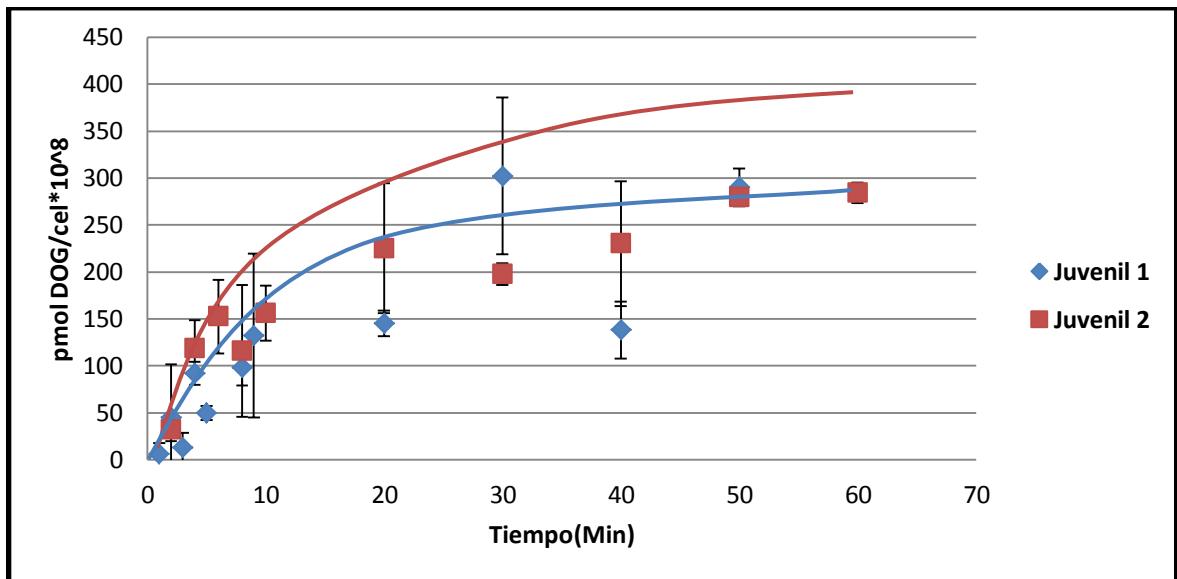


Figura N° 8: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 Juveniles. Los datos corresponden diamantes azules Juvenil 1, cuadrados rojos Juvenil 2, los datos están expresados como su promedio \pm la desviación estándar de los duplicados para cada uno de los puntos.

Se observa en la figura N°9 una curva de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 juveniles, en el cual en los primeros 10 minutos muestra un crecimiento lineal, y luego hasta el minuto 60 posee un comportamiento asintótico. En los primeros 10 minutos el juvenil 1 alcanza a un máximo 132 ± 87 (pmolDOG/cel*10⁸) y el juvenil 2 a un máximo de 152 ± 39 (pmolDOG/cel*10⁸).

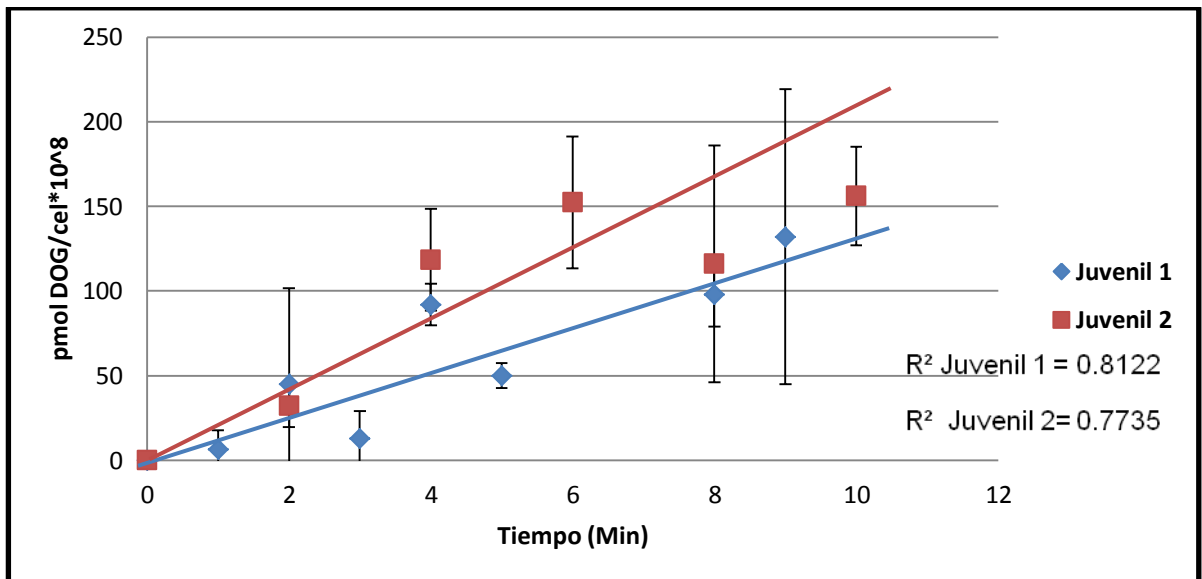


Figura N° 9: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 10 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 Juveniles. Los datos corresponden diamantes azules Juvenil 1, cuadrados rojos Juvenil 2, los datos están expresados como su promedio \pm la desviación estándar de los duplicados para cada uno de los puntos.

Se observa en la figura N°10 un rectificado de la figura N°9 que en los primeros 10 minutos muestra un crecimiento lineal, se obtuvieron los valores de la pendiente para el juvenil 1 de 13 (pmolDOG/cel*10⁸/min) y para el juvenil 2 un valor 15 (pmolDOG/cel*10⁸/min).

7.2 Transporte de D-glucosa en presencia de competidores e inhibidores de transportadores facilitativos de hexosas GLUT.

Se realizaron experimentos de captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 5 minutos en una muestra espermatozoos de Trucha arcoíris JUVENIL en presencia de competidores, fructosa en concentraciones de 10 y 100 mM, Manosa y Galactosa en concentraciones de 10, 100 y 500 mM.

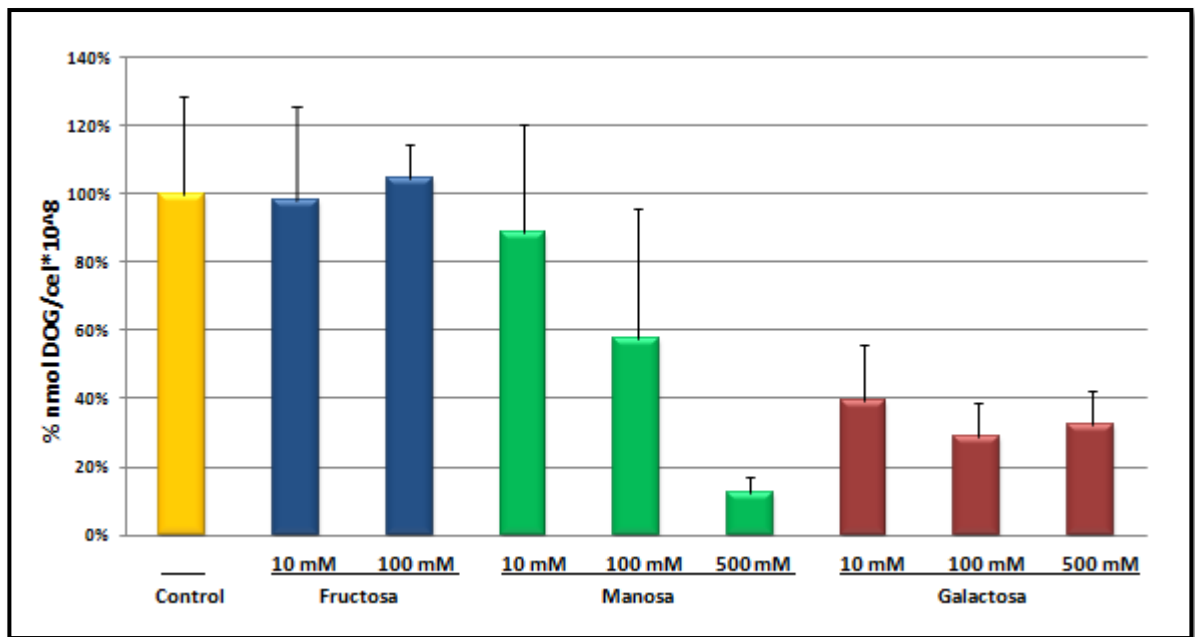


Figura N° 10: Inhibición de la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en presencia de competidores. Fructosa (barras azules) a 10 y 100 mM, Manosa (barras verdes) a 10, 100 y 500 mM y Galactosa (barras rojas) a 10, 100 y 500 mM. Los datos corresponden al promedio \pm la desviación estándar de determinaciones realizadas en duplicado.

La Figura N°11, presenta el efecto de la presencia de distintos azúcares (Fructosa, Manosa y Galactosa) sobre el transporte de 1 mM de 2-desoxiglucosa. La Fructosa presenta un efecto mínimo en la captación de DOG, provocando sólo un 2% de disminución del transporte respecto al control, sin presentar mayores diferencias al aumentar la concentración 10 veces. Para el caso de la Manosa, este presentó mayor inhibición en la captación de DOG respecto a control, a una concentración 10 mM, con una disminución en la captación de DOG de 11%. El aumento de la concentración de Manosa 10 veces

(100 mM), disminuye el porcentaje de captación de DOG en un 42%, mientras que al aumentar la concentración 50 veces (500 mM), la captación de DOG disminuye en un 87%. Respecto a la Galactosa se obtuvo 60% de disminución en el transporte de DOG para una concentración 10mM, los valores no muestran mayores diferencias en la captación DOG al aumentar la concentración 10 y 50 veces (100mM y 500mM), con valores de 71% y 68% respectivamente.

Se procedió a evaluar la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 5 minutos en una muestra espermas de Trucha arcoíris en presencia de citocalasina B un inhibidor específico del Transportador Facilitativo de Glucosa, a concentraciones 1 y 10 mM.

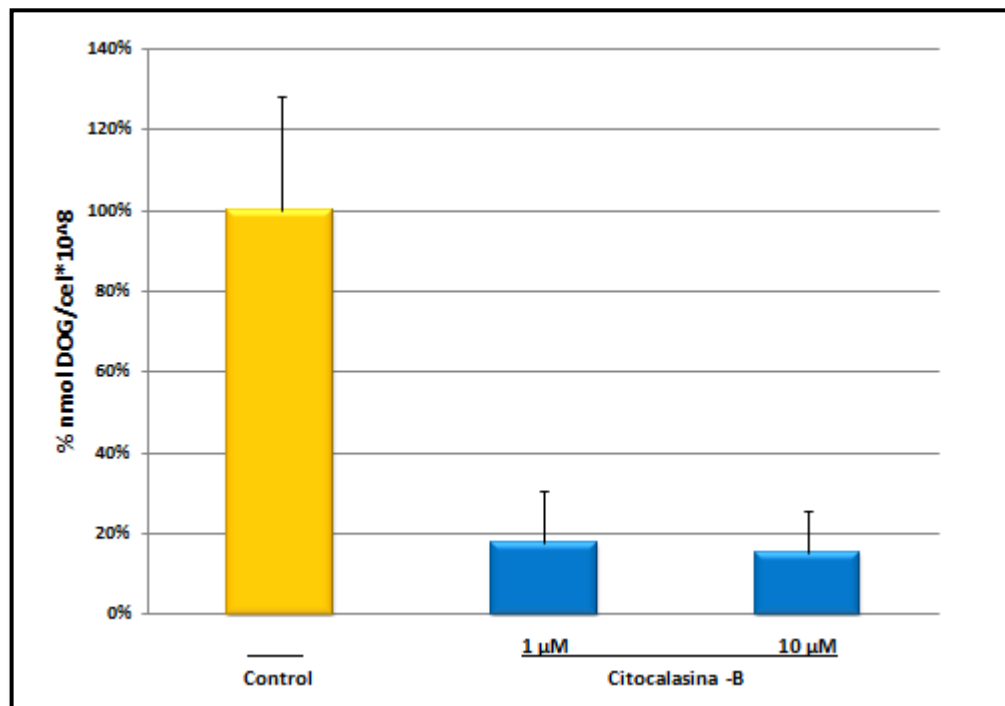


Figura N° 11: Inhibición de la captación de 1 μM de 2-desoxiglucosa en presencia de citocalasina B a 1 y 10 μM (barras azules). Los datos corresponden al promedio ± la desviación estándar de determinaciones realizadas en duplicado.

En la Figura N°12 se observa que la inhibición del transporte de DOG en presencia de citocalasina B. es muy alta, pues con una concentración 1 μM se reduce la captación de DOG en porcentaje de un 82%, sin presentarse mayores diferencias al aumentar la concentración del citocalasina B 10 veces a (10 μM), ya que el porcentaje de captación de DOG observado fue de un 85%.

7.3 Evaluación de diferencias en el transporte de glucosa en células espermáticas entre machos reproductores y juveniles de Trucha arcoíris (*O. mykiss*).

Para analizar los resultados, y evaluar las posibles deferencias en la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempos cortos de 10 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 reproductores y 2 juveniles, se obtuvo un grafico general a partir de los las figuras N°8 y N°10 luego se determinaron sus respectivas tasas de captación en (pmolDOG/cel*10⁸/min). Una vez obtenidos los valores de pendiente para cada uno los individuos, se sometieron los datos a una prueba estadística no-parametrica para 2 muestras independientes de Mann-Whitney.

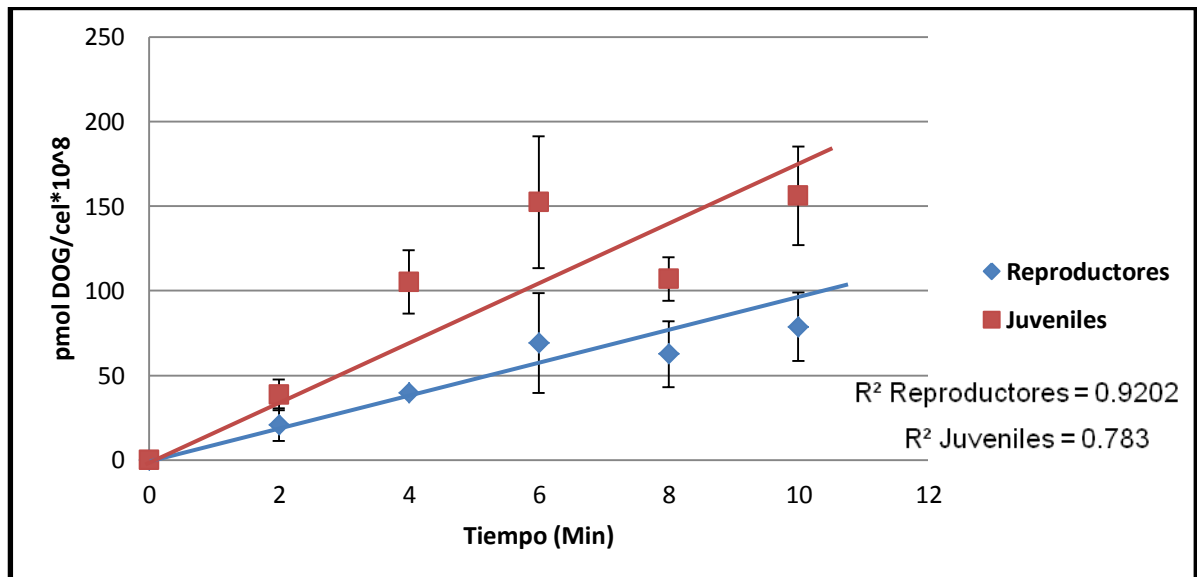


Figura N° 12: Curvas de progreso para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 10 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 Reproductores y 2 Juveniles. Los datos corresponden al promedio de ambos Reproductores y Juveniles \pm la desviación estándar para cada uno de los puntos.

En la figura N°13 se observa el rectificado para la media de los 2 reproductores y los 2 juveniles hasta un tiempo de 10 minutos. Los valores de la pendiente para la recta correspondiente a los reproductores es de 7,8 (pmolDOG/cel*10⁸/min) y para los juveniles es de 14 (pmolDOG/cel*10⁸/min).

Tabla 2: Prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes.

CAPDOG valor de las pendientes en (pmolDOG/cel*10⁸/min) obtenidas de los individuos reproductores y juveniles

GRUPO. Variable independiente categorizada en esta prueba estadística

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de CAPDOG es la misma entre las categorías de GRUPO.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	0.333	Retener la hipótesis nula

El nivel es de 0.05

Ho: Las medias $\alpha_1 = \alpha_2$; Igualdad de medias para las captaciones de (pmolDOG/cel*10⁸/min) en grupos de 2 reproductores y 2 juveniles.

H1: Las medias $\alpha_1 \neq \alpha_2$

Se decide retener la hipótesis nula (Ho) para la igualdad de medias de captacion de DOG (CAPDOG). La interacción de estas variables señala que la media de las pendientes CAPDOG no es significativamente distinta para los 2 GRUPOS de 2 reproductores y 2 juveniles. Los resultados nos permiten concluir que no hay un efecto significativo de la edad reproductiva (reproductor y juvenil) sobre la captación de DOG en espermatozoides de trucha arcoíris.

8. DISCUSIÓN.

En esta investigación se realizó una caracterización funcional de los transportadores facilitativos de glucosa expresados en espermatozoides maduros aislados de trucha arcoíris, lo que constituye un aporte novedoso al conocimiento en esta especie. En primer lugar, se determinó la capacidad de captación del análogo de glucosa 2-desoxiguocsa (DOG) en células espermáticas, tanto en machos juveniles como en reproductores, de manera de obtener curvas de progreso de captación en el tiempo. Se realizaron estudios de captación de DOG en presencia de competidores (fructosa, manosa y galactosa) e inhibidores (citocalasina B) de transportadores facilitativos de hexosas GLUT. Una vez ya obtenidas las curvas de progreso de DOG en el tiempo, se determinaron cuáles fueron los tiempos donde el comportamiento de la curva poseía un crecimiento lineal, de manera de comparar estadísticamente si existe diferencia significativa entre las pendientes de captación de DOG entre los machos reproductores y juveniles.

Los resultados obtenidos indican que existe participación de los transportadores facilitativos de glucosa en la capacidad de captación de DOG, ya que se genera una curva de progreso en el tiempo expresada ($\text{pmolDOG/cel} \cdot 10^8/\text{min}$). Los ensayos de captación DOG por los espermatozoides mostraron un crecimiento lineal en los primeros 10 minutos tanto en reproductores como juveniles, lo cual es similar a experiencias realizadas con espermatozoides de toro (Angulo et al., 1998) con humano y rata (Grootegoed & Den Boer., 1990), pero menores en las velocidades máximas, mostrando valores de 16 y 51 ($\text{nmolDOG/cel} \cdot 10^8/\text{min}$) en dichos estudios y, en el caso de esta investigación se obtuvieron valores promedio de 77 y 142 ($\text{pmolDOG/cel} \cdot 10^8/\text{min}$), para espermatozoides de truchas reproductores y juveniles, respectivamente.

En la actualidad, los datos disponibles demuestran que los espermatozoides de mamíferos son capaces de utilizar la glucosa como fuente normal de energía (Bucci et al., 2011) pero que al mismo tiempo por el hecho de ser especies de fecundación interna y que la concentración de glucosa en el tracto reproductor femenino es similar al plasma seminal podrían utilizarla como una fuente de energía tanto en su maduración, como en su almacenamiento y migración por el tracto genital femenino (Paz et al., 1977; Patel et al., 1988). Sin embargo, en peces, que son de fecundación externa, la única fuente energía para mantener la actividad celular, así como también sus funciones específicas, tales como la motilidad y capacidad de fertilización es el plasma seminal, donde, además sufre el proceso de capacitación (Tabares et al., 2005). Por lo tanto, los espermatozoides de peces se sometan a diferentes concentraciones extracelulares de glucosa durante su ciclo de vida (Angulo et al., 1998; Tabares et al., 2005).

La capacidad de los transportadores GLUT de utilizar otras hexosas (fructosa, manosa y galactosa), representan una adaptación funcional para el transporte de distintos sustratos para la producción de energía (Lodish et al., 2006; Castrejón et al., 2007). En el caso de los espermatozoides de trucha arcoíris, se encontró que manosa y galactosa inhiben la captación de DOG, mientras que fructosa prácticamente no produjo efecto (Figura 11). En Salmónidos (Planas et al., 2000; Diaz et al., 2008) han localizado GLUT1 y GLUT4 en tejidos sensibles a la insulina como músculo rojo y linfocitos pero no en espermatozoides.

Debido a las similitudes en la expresión y la regulación GLUT1 de GLUT4 entre los peces y los mamíferos, es evidente que estos mecanismos han sido extraordinariamente bien conservados durante la evolución de los vertebrados, lo que apunta a la importancia de la mantenimiento de la homeostasis de la glucosa a lo largo de los vertebrados (Teerijoki., 2002). Esta información abre paso a nuevas alternativas de investigaciones aplicada en el marco de la industria acuícola, como el estudio de transferencia de genes para la síntesis de glucosa y/o ácido ascórbico, los análisis en las actividades enzimáticas de los individuos con transferencia de genes mostraron de mejoras en la utilización de carbohidratos y síntesis de ácido ascórbico, aunque la interpretación de los efectos metabólicos de los

individuos mosaicos complicó la interpretación, los datos mostraron una tendencia de mejora en la utilización de carbohidratos en individuos transgénicos (Krasnov et al., 1999).

Estudios más detallados indican que GLUT1, GLUT2, GLUT3, y bajos niveles de GLUT4 están presentes en espermatozoides humanos, rata, y bovinos (Angulo et al., 1998), de los cuales sólo GLUT2 es capaz de transportar fructosa. Los experimentos de competencia con fructosa obtenidos en esta investigación en espermatozoides de Trucha nos hacen descartar la expresión de GLUT2, GLUT7, GLUT8, GLUT11 pues estos transportan glucosa y fructosa y en este estudio no se observó inhibición por fructosa. Como GLUT1 y GLUT4 presentan similitud respecto a especificidad de sustrato en peces y mamíferos (Teerijoki., 2002; Diaz et al., 2008) los otros GLUT_s debieran comportarse de manera similar. No es posible descartar GLUT5 pues este último presenta especificidad únicamente a la fructosa, de manera que para estudiar su expresión en espermatozoides de trucha arcoíris es necesario hacer estudios de captación con fructosa radioactiva.

GLUT1 y GLUT3 se encuentran en la mayoría de las células y presentan con un K_m de 1 a 2 mM para DOG (Bermúdez et al., 2007; Castrejón et al., 2007), siendo también capaces de transportar D-manosa y D-galactosa, que difieren de la D-glucosa en la configuración en tan solo un átomo de carbono. Sin embargo, GLUT1 es bastante específico, y tiene afinidad mucho mayor por D-glucosa (K_m 1 mM), que para manosa (K_m 20 mM) o para la galactosa (K_m 30 mM). (Lodish et al., 2006; Bermúdez et al., 2007). Esta información apoya los resultados obtenidos a partir de los ensayos de transporte de DOG en presencia de los competidores galactosa y manosa, ya que a una concentración de 10 mM de galactosa disminuye la captación de DOG en casi un 60% y al aumentar la concentración 10 y 50 veces, no hubo mayores diferencias en la captación de DOG. Con estos datos concluimos que los espermios no solo expresan transportadores GLUT que transportan galactosa (GLUT1 y/o GLUT3), sino que también otro(s) GLUT que transportan glucosa, pero no galactosa. En los resultados de transporte de DOG en presencia de manosa, una concentración de 10 mM de manosa inhibe la captación de DOG en tan solo un 11%, pero aumentando la concentración 10 y 50 veces, disminuye la captación de DOG en un 42% y un 87%

respectivamente, lo cual es congruente con la presencia de GLUT1, que presenta menor afinidad para manosa que para galactosa. Los datos de competencia con manosa llevan a concluir que los transportadores de hexosas presentes en espermatozoides de trucha arcoíris transportan también manosa, aunque con menor afinidad, los que podrían corresponder a GLUT1 y/o a GLUT3. Debido a que no se logro una inhibición completa del transporte de DOG en presencia de concentraciones de 100 y 500 mM de galactosa, proponemos que existen otros transportadores GLUT en espermios de trucha que transportan glucosa y manosa, pero no galactosa. Debido a que no hay estudios detallados de capacidad de transportar manosa y galactosa por otros transportadores GLUT_s distintos de GLUT1 y GLUT3, no podemos descartar que los espermatozoides de Trucha expresen, GLUT6, GLUT7, GLUT8, GLUT10, GLUT11, GLUT12 y/o GLUT14 (Bermúdez et al., 2007; Castrejón et al., 2007) Sin embargo, si consideramos la ubicación de los transportadores en los distintos tejidos de un organismo (Tabla 1), de estos, solo GLUT8 se presenta en células de esperma, donde cumple un papel importante en el metabolismo energético (Schürmann et al., 2002; Gawlik et al., 2008), pero en el caso de esta investigación, nuestros resultados no permiten confirmar dicha evidencia.

La citocalasina B es un inhibidor específico para los transportadores facilitativos de glucosa mostrando resultados de inhibición para todos los GLUT_s (Zoccoli et al., 1978; Walmsley et al., 1994; Bernhardt, 2003; Castrejón et al., 2007). Los datos de transporte de DOG en presencia de citocalasina B revelan una inhibición sobre un 80% respecto al control, datos que son coherentes con la información existente (Angulo et al., 1998; Bernhardt, 2003; Castrejón et al., 2007)

En acuicultura, la toma de decisiones considera distintos aspectos de la biología reproductiva de machos trucha arcoíris, uno de ellos es la edad de maduración (Bastardo et al., 2004). Estudios de características del semen de trucha arcoíris de diferentes edades bajo condiciones de cultivo indican que no existe diferencia significativa en la viabilidad, pero a menor edad muestran significativamente un menor volumen y sobre los 5 años descende la calidad del semen. Desde el punto de vista productivo es más beneficioso

mantener los machos de Trucha arcoíris solo hasta los cuatro años de edad. (Bastardo et al., 2004). Sin embargo, esta investigación se marcó como objetivo evaluar posibles diferencias en el transporte de glucosa en células espermáticas entre machos juveniles y reproductores de trucha arcoíris. Los resultados estadísticos obtenidos indican que no existe diferencia significativa en la captación de glucosa en espermatozoides de machos juveniles y reproductores bajo un tamaño de muestra de 2 reproductores y 2 juveniles. Debido a que en la actualidad, no existen estudios disponibles que nos permita discutir acerca de una evaluación de la captación de glucosa en diferentes etapas del ciclo de vida espermatozoides, consideramos que sería interesante estudiarla y utilizarla para la optimización del uso del semen en la especie trucha arcoíris o salmónidos en general.

A partir de los resultados obtenidos de que los machos reproductores no muestran diferencias significativas en la captación de DOG, postulamos que tampoco el tiempo de motilidad espermática se modifica, estudios de fertilización en trucha arcoíris indican que entre machos juveniles y reproductores no existen diferencias significativas en los tiempos de motilidad (Liley et al., 2011). Sería interesante como proyección a esta investigación correlacionar estadísticamente los tiempos de motilidad espermática con la captación de DOG en la especie *O. mykiss*, ya que la medición del tiempo de motilidad espermática es parámetro directo para determinar la calidad en semen para la reproducción de especies en acuicultura (Sánchez- Rodríguez & Billard, 1977; Carpentire & Billard, 1978; Steinberg et al., 1995).

Otro tema importante de estudiar, sería el transporte de vitamina C en espermatozoides de Trucha. Hay algunas isoformas de GLUTs que son transportadores de vitamina C (ácido ascórbico) (Mardones, 2005), y autores como (Ciereszko & Dabrowski, 1995) indican que la calidad del semen (motilidad y concentración) está influenciada por el contenido de ácido ascórbico en la dieta (pues Salmónidos no son capaces de sintetizarla), una deficiencia de esta vitamina reduce tanto la concentración como la movilidad de los espermatozoides, afectando la fertilidad de la Trucha arcoíris. Por otra parte, la vitamina C juega un rol en la absorción, metabolismo y excreción de elementos esenciales como por ejemplo Magnesio, Hierro, Calcio y sodio, y no-esenciales como la fibra dietética, la cual

no es absorbida por el tracto digestivo en peces (Sanz, 2009). Además estudios avalan que una dieta rica en vitamina C en cultivo intensivo disminuye el riesgo en enfermedades de deformación de vertebras u otro tipo de patologías como exoftalmia (Maage et al, 1990; Lovell, 2009).

Esta investigación centra las bases para nuevos estudios e investigaciones aplicadas a la industria acuícola como por ejemplo estudiar la expresión de transportadores de Hexosas por RT-PCR y su inmunolocalización en espermatozoide de trucha, como fue realizado en otras especies (Angulo et al., 1998). Estos conocimientos permitirán identificar los GLUT_s involucrados en la captación de glucosa en espermatozoides de trucha arcoíris y luego diseñar estrategias para modular la captación de glucosa en espermatozoides y eventualmente aumentar la fecundidad en cultivo de esta especie.

9. CONCLUSIONES.

- Los espermatozoides de trucha arcoíris poseen capacidad de captación de DOG
- La inhibición del transporte de DOG en presencia de manosa y galactosa, pero no de fructosa sugieren la expresión de GLUT 1 y GLUT3 en células espermáticas de trucha arcoíris,
- El transporte de DOG en presencia del inhibidor citocalasina B confirma la expresión de transportadores facilitativos de hexosas GLUT en espermatozoides de trucha arcoíris.
- No existen diferencias significativas en el transporte de DOG en células espermáticas entre machos juveniles y reproductores de trucha arcoíris.

10. PROYECCIONES.

- Esta investigación centra las bases para el diseño de estrategias para modular la captación de glucosa en espermatozoides y, eventualmente aumentar la fecundidad en cultivo de trucha arcoíris o salmónidos en general.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Angulo, C., Rauch, M., Droppelmann, A., Reyes, A., Slebe, J., Delgado, F., Guaiquil, V., Vera, J., Concha, I. 1998. Hexose Transporter expression and function in mammalian spermatozoa: Cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *Journal of Cellular Biochemistry*. 71:189–20.
- Bastardo, H. 1992. Semen de la trucha arcoíris, (*Oncorhynchus mykiss*): concentración y volumen durante un periodo reproductivo. *Veterinaria Tropical* 17:53-66
- Bastardo, H., Guedez, C., Leon, M. 2004. Características del semen de Trucha arcoíris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 22: 277-288.
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Valdelamar, L., Rodríguez, M., Seyfi, H., Amell, A., Carrillo, M., Silva, C., Acosta, C., Añez, J., Andara, C., Angulo, V., Martins, G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: Clasificación, estructura y distribución. Universidad del Zula. Facultad de Medicina. 26: 76-86
- Bernhardt, I. 2003. *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*. Springer.
- Capilla, E., Diaz, M., Gutierrez, J., Planas, J. 2002. Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Physiol Endocrinol Metab*. 283: 44-49.
- Carpentire, P., Billard, R. 1978. Conservation à court terme des gamètes de salmonidés à des températures voisines de OOC. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys*. 18
- Castrejón, V., Carbó, R., Martínez, M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. 26: 49-57.
- Ciereszko, A. y K. Dabrowski. 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction*, 52:982-988.

- Diaz, M., Vraskou, Y., Gutierrez, J., Planas, J. 2008. Expression of rainbow trout glucose transporters GLUT1 and GLUT4 during in vitro muscle cell differentiation and regulation by insulin, and IGF-I. Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 296: 794–800.
- Erdahl, A., Graham, E. 1987. Fertility of teleost sperm is affected by dilution and storage in a seminal plasma mimicking medium. University of Minnesota. 60: 311-321.
- FAO. 2015. Programa de información de especies acuáticas *Oncorhynchus mykiss*. Departamento de pesca y acuicultura.
- Garde, J., Gallego, L. 1996. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. 233 pp.
- Gawlik, V., Schmidt, S., Scheepers, A., Wennemuth, G., Augustin, R., Aumüller, G., Moser, M., Al-Hasani, H., Kluge, R., Joost, H., Schürmann, A. 2008. Targeted disruption of Slc2a8 (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa.
- Grootegoed, J., den Boer, J. 1990. Energy metabolism of spermatids: a review. In Hamilton DW, Waites GMH (eds). Scientific Basis for Fertility Regulation. Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis. Cambridge: Cambridge University Press, pp 193–216
- Krasnov, A., Pitkanen, T., Molsa, H. 1999. Gene transfer for targeted modification of salmonid fish metabolism. 15: 115-119.
- Liley, N., Tamke, P., Tsai, R., Hoysak, D. 2011. Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 59: 144-152
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L., Darnell, J. 2006. Biología Celular y Molecular. pp 250.

- Lovell, R. 2009. Essentiality of Vitamin C in feeds for intensively fed caged channel Catfish. Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University.
- Maage, A., Waagbo, R., Olsson, P., Julshamn, K., Sandnes, K. 1990. Ascorbate-2-sulfate as a dietary Vitamin C source for Atlantic Salmon (*Salmo Salar*): 2. Effects of dietary levels and immunization on the metabolism of trace elements. Department of Zoophysiology, University of Goteborg. 8: 429-436.
- Mardones, L. 2005. Transportadores de vitamina C en hepatocitos y células de hepatoma: Identificación molecular, caracterización funcional y regulación bajo condiciones de estrés oxidativo. Biología molecular y celular, Universidad de Concepción. pp 22.
- NSW government. 2014. Primary Industries Fishing and aquaculture (en línea). Fecha de consulta 20 de septiembre de 2015, <http://www.dpi.nsw.gov.au/fisheries/recreational/freshwater/fw-species/rainbow-trout>.
- Patel, M., Skandhan, P., Mehta, B .1988. Seminal plasma fructose and glucose in normal and pathological conditions. Acta Eur Fertil 19:329–332.
- Paz, F., Sofer, A., Homonnai, T., Kraicer, F .1977. Human semen analysis: Seminal plasma and prostatic fluid compositions and their interlations with sperm quality. Int J Fertil 22:140–147.
- Planas, J., Capilla, E., Gutiérrez, J. 2000. Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. . Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Federation of European Biochemical Societies. 481: 266-270
- Rojas, P.2005. Efecto de la dieta sobre niveles plasmáticos de insulina y glucagon en Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y Dorada (*Sparus aurata*) y caracterización del transportador de glucosa de dorada. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 165 pp.
- Sánchez-Rodríguez, M. y R. Billard.1977. 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.

- Sanz, F. 2009. La nutrición y alimentación en piscicultura. Madrid, España. 1: 281-286.
- Schürmann, A., Axer, H., Scheepers, A., Doege, H., Joost, H. 2002. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell and Tissue Research*. 307, pp 237-242.
- Steinberg H, Hedder A, Baulain R, Holtz W. 1995. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws. *Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. University of Texas at Austin. 147pp.
- Salmonchile .2013. Asociación de la industria del Salmon de Chile A.G (en línea). Fecha de consulta 20 de septiembre de 2015, <http://www.salmonchile.cl/es/produccion.php>
- Subpesca. 2015. Subsecretaria de pesca y acuicultura. Gobierno de Chile (en línea). Fecha de consulta 25 de septiembre de 2015, <http://www.subpesca.gov.cl/institucional/602/w3-article-865.html>.
- Teerijoki, H. 2002. Fish glucose transporters, molecular cloning and functional characterization. University of Kuopio.
- Truscott, B., Idler, D. 2011. An Improved extender for freezing Atlantic Salmon Spermatozoa. *Fisheries Research Board Canada*. 26: 3254- 3258.
- Valdebenito, I. 2007. Efecto de la cafeína en la motilidad y fertilidad espermática de Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Facultad de Recursos Naturales. Universidad Católica de Temuco. 18: 61-65.
- Valdebenito, I., Fletcher, V., Vera, V., Fernández, J. 2009. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: Aspectos básicos y aplicados Una revisión. *Archivos de medicina Veterinaria*. 41: 97-107.
- Walmsley, A., Lowe, A., Henderson, J. 1994. The kinetics and thermodynamics of the binding of cytochalasin B to sugar transporters. *Eur J Biochem* 221: 513-22.

- Zoccoli, M., Baldwin, S., Lienhard, E. 1978. The monosaccharide transportsystem of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem* 253: 6923-30.

12. ANEXOS.

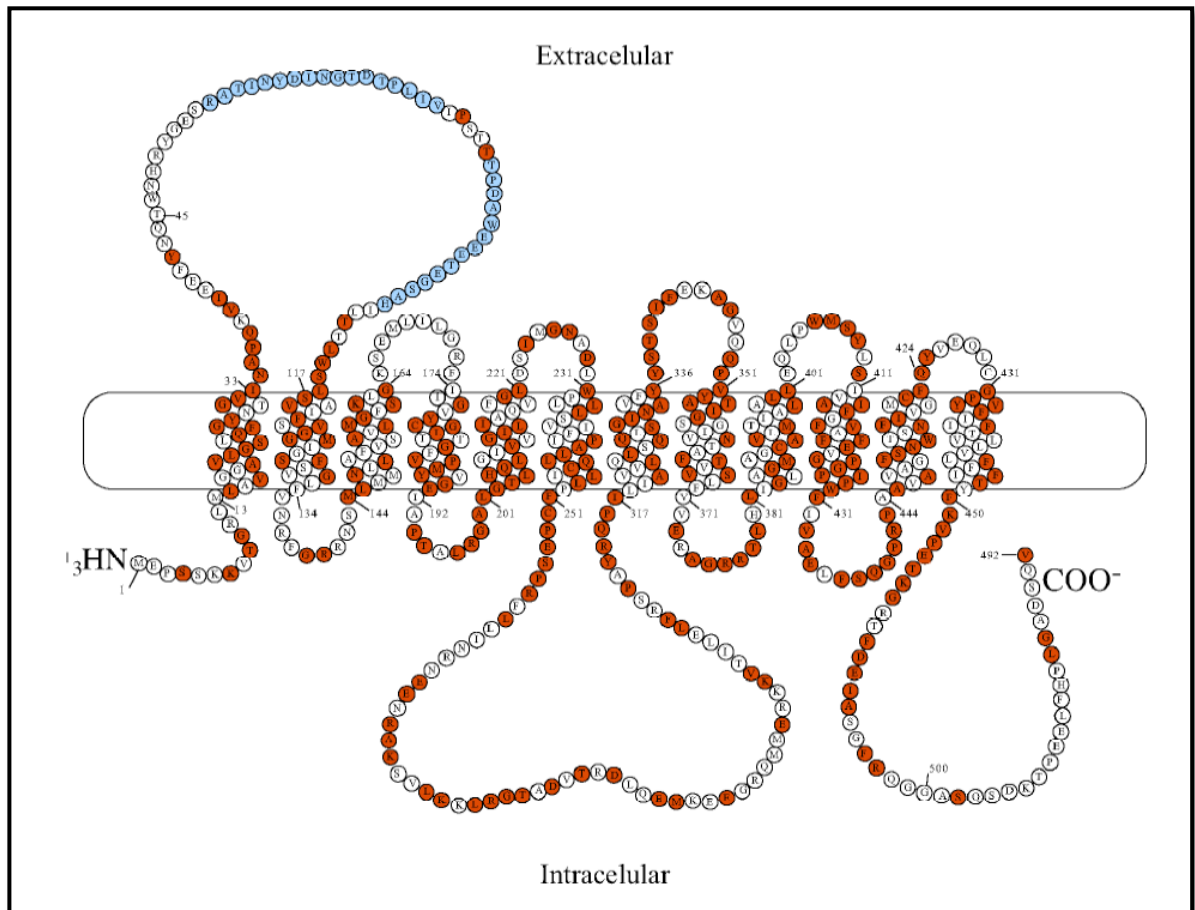


Figura N° 13: Modelo propuesto para la estructura secundaria de los transportadores de glucosa. Fuente: Mardones, 2005.

Tabla 3: Datos para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 reproductores.

Tiempo (Min)	Reproductor 1		Reproductor 2	
	pmol DOG/cel*10⁸	DS pmol DOG/cel*10⁸	pmol DOG/cel*10⁸	DS pmol DOG/cel*10⁸
1	6.682	2.054	-----	-----
2	27.564	18.868	13.9866	4.427
3	27.499	9.586	-----	-----
4	-----	-----	39.759	2.379
5	-----	-----	-----	-----
6	89.9591	9.8752	48.309	10.737
7	85.88	29.154		
8	76.286	25.316	48.765	2.891
9	-----	-----	-----	-----
10	92.993	10.575	64.428	3.205
20	127.671	31.376	44.572	1.883
30	134.697	20.618	56.929	3.138
40	138.99	1.735	83.385	13.859
50	87.151	28.88	80.582	10.291
60	122.27	39.683	160.405	7.912

Tabla 4: Datos para la captación de 1 mM de 2-desoxiglucosa en tiempo de 60 minutos en espermias de Trucha arcoíris para 2 juveniles.

	Juvenil 1		Juvenil 2	
Tiempo (Min)	pmol DOG/cel*10 ⁸	DS pmol DOG/cel*10 ⁸	pmol DOG/cel*10 ⁸	DS pmol DOG/cel*10 ⁸
1	6.216	11.437	-----	-----
2	44.778	56.958	31.967	12.206
3	12.884	16.157	-----	-----
4	91.993	12.301	118.404	29.998
5	50.004	7.390		
6	-----	-----	152.440	38.934
7	-----	-----	-----	-----
8	97.981	18.887	116.062	70.115
9	132.014	87.285	-----	-----
10	-----	-----	156.063	29.116
20	145.036	13.556	225.287	69.195
30	302.270	83.326	197.571	11.639
40	138.216	30.159	230.132	66.360
50	290.089	19.938	279.697	5.801
60	-----	-----	284.449	10.907