



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO EN GENÉTICA Y ECOFISIOLOGÍA



BIOLOGÍA, FISIOLÓGIA ESPERMÁTICA BÁSICA Y EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LA FISIOLÓGIA E INTEGRIDAD DE LAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DEL BAGRE TROPICAL

Rhamdia laticauda



TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

LIC. EN BIOL. JUAN CARLOS LÓPEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

LENIN ARIAS RODRIGUEZ (DACBIOL-UJAT, MÉXICO)
MICHAEL TOBLER (KANSAS STATE UNIVERSITY, U.S.A)

CIUDAD DE VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO A JULIO DEL 2017.



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**



JUNIO 09 DE 2017

**C. JUAN CARLOS LÓPEZ HERNÁNDEZ
PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"BIOLOGÍA, FISILOGÍA ESPERMÁTICA BÁSICA Y EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LA FISILOGÍA E INTEGRIDAD DE LAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DEL BAGRE TROPICAL *Rhamdia laticauda*"**, asesorado por el Dr. Lenin Arias Rodríguez y Dr. Michael Tobler, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el M. en C. Salomón Páramo Delgadillo, Dr. Manuel Pérez de la Cruz, Dr. Lenin Arias Rodríguez, Dr. Carlos Manuel Burelo Ramos y M. en C. Alain Lois D'Artola Barceló.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"BIOLOGÍA, FISIOLÓGIA ESPERMÁTICA BÁSICA Y EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LA FISIOLÓGIA E INTEGRIDAD DE LAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DEL BAGRE TROPICAL *Rhamdia laticauda*"**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 15 de Junio de 2017.

AUTORIZO



JUAN CARLOS LÓPEZ HERNÁNDEZ

DEDICATORIA

A DIOS quien me ha permitido alcanzar tal logro.

*A mis padres, quienes han dedicado sus vidas, brindado su confianza
y amor, el cual ha sido el motor para seguir siempre hacia adelante y
nunca decaer*

A ti mi querido complemento

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, mi más sincero agradecimiento al **Dr. Lenin Arias Rodríguez**, por su constante apoyo en la realización del presente trabajo de investigación y sabios consejos; los cuales hicieron de esta investigación un completo éxito con grandes resultados, descubrimientos y aportes para la biología de la especie estudiada. De igual manera por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación y brindarme esa confianza que solo a un amigo se da. Además, de mostrarme que inclusive cuando las cosas no están a favor, el rendirse no es una opción y el continuar es la mejor alternativa, para progresar aún y con lo básico; que da cabida a lo especial, único y extraordinario que es el aprendizaje.

Por otro lado es importante reconocer, agradecer el apoyo, las sugerencias que sirvieron de base para el desarrollo y culminación del presente trabajo de tesis brindadas por el Dr. Michael Tobler de la universidad de Kansas, quien codirigió la presente tesis.

De igual manera agradezco a cada uno de mis sinodales el MC. Salomón Páramo Delgadillo, el Dr. Manuel Pérez de la Cruz, el Dr. Carlos Manuel Burelos y el MC. Alain Lois D'artola Barcelo, por su ardua labor en la revisión de esta tesis, ya que sin sus críticas constructivas este trabajo no tendría la excelencia que lo caracteriza. De igual manera al MC. Gabriel Márquez Couturier, quien fue pionero en la revisión de este trabajo, por sus aportes y palabras de apoyo.

A mis amigos de laboratorio: Emmanuel Damián, Salvador Jiménez, Adriana Osorio, Alejandro Trinidad, Anna Karen, los cuales fueron parte importante en la captura, mantenimiento y realización de los experimentos del presente trabajo de investigación. Además, por aquellas noches de desvelo, las cuales fueron productivas y no tan solitarias, pues el compañerismo es la esencia del trabajo en equipo.

A cada uno de mis compañeros de generación, Aarón Torres, Jesús Bautista, José del Carmen Gerónimo, Carlos Morales, los cuales me brindaron siempre

su amistad, apoyo emocional y gratos momentos en el transcurso de esta etapa de mi vida. Porque ellos son siempre alegría y nunca tristeza.

Al Dr. Robert Cêrny y al Dr. Martin Minarik de la República Checa, por su apoyo, asesoría y por las herramientas y equipos de microscopia electrónica. Además, por tan gentil trato durante mi estancia en su laboratorio de biología craneofacial, en la universidad de Charles en Praga, República Checa.

El apoyo brindado por la Dra. Joanna Kelly de la universidad estatal de Washington, fueron indudablemente cruciales para la determinación del nivel de ploidía de las células espermáticas derivadas del presente estudio.

A la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez del CICESE, por su apoyo para el análisis osmométrico de las muestras espermáticas.

A la universidad Juárez Autónoma de Tabasco y al Laboratorio en Genética y Ecofisiología de la División Académica de Ciencias Biológicas, por el apoyo brindado para el uso de las instalaciones que culminaron en la realización de los experimentos y mantenimiento de los reproductores. Así como el apoyo a estudiantes de posgrado, con la beca PISA, la cual fue indispensable para culminar el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo a estudiantes de posgrado, por la cual me permitió obtener la beca de manutención para la conclusión de este proyecto de tesis.

Por último y por ser lo más importante; A ti mi querido complemento, que en momentos de oscuridad has sido luz. Gracias por ese amor, cariño y apoyo sincero, por continuar caminado a mi lado y no dejarme caer en la soledad.

A todos ustedes.... ¡mis más profundos agradecimientos!

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Pero la sabiduría de lo alto es primeramente pura, después pacífica, amable, condescendiente, llena de misericordia y de buenos frutos, sin vacilación, sin hipocresía.

Santiago 3:17

CONTENIDO GENERAL

CAPITULO I.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. GENERALIDADES.....	5
1.2.1. Generalidades de los Siluriformes	5
1.2.2. Características Generales de la Familia Heptapteridae.....	5
1.2.3. Clasificación Taxonómica de la Especie	6
1.2.4. Distribución Geográfica y Hábitat de <i>R. laticauda</i>	8
1.2.5. Importancia Económica de los Bagres en México.....	9
1.2.6. Reproducción Básica en Peces	11
1.2.7. Fisiología de los Espermatozoides en Peces.....	12
1.2.8. Espermatogénesis en Peces.....	13
1.2.9. Inactivación Genética de Gametos en Organismos Acuáticos con Luz Ultravioleta ..	15
1.2.10. Técnicas Tradicionales Para la Evaluación de la Calidad Espermática.....	15
1.2.11. Técnicas Avanzadas Para la Evaluación de la Calidad Espermática.....	18
1.2.12. Soluciones Reguladoras de la Vitalidad Espermática (SRVE).....	21
1.2.13. La Apoptosis o Muerte Celular Programada	22
1.2.14. Evaluación de las Microestructuras Espermáticas por Microscopia Óptica (MOP)..	23
1.2.15. Evaluación de las Microestructuras Espermáticas por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	24
1.2.16. Evaluación de las Microestructuras Espermáticas por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)	25
1.2.17. Contenido Total de ADN y Nivel de Ploidía.....	26
1.2.18. Parámetros Químicos, Bioquímicos y Lipídicos del Plasma Seminal.....	27
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	28
1.4. OBJETIVOS.....	30
1.4.1. Objetivo General.....	30
1.4.2. Objetivos Particulares de los Estudios de Biología y Fisiología Básica.....	30
1.4.3. Objetivos Particulares en la Evaluación del Efecto de la Luz UV	30
1.5. SECCIÓN EXTENSA DE MATERIALES Y MÉTODOS	32

1.5.1. Sitio de Recolecta, Transporte y Mantenimiento de los Especímenes	32
1.5.2. Generalidades de los Estudios de Biología, Fisiología y Experimentos con UV	32
1.5.3. Obtención de Gametos	33
1.5.4. Biología y Fisiología Espermática Básica	35
1.5.4.1. Evaluación de la Motilidad y Movimiento Espermático.....	35
1.5.4.2. Conteo del Número de Espermatozoides	36
1.5.4.3. Morfometría Espermática por Microscopia Óptica (MOP)	37
1.5.4.4. Descripción de las Microestructuras Espermáticas por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	38
1.5.4.5. Descripción de la Ultraestructura Espermática por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).....	39
1.5.4.6. Descripción de los Componentes Químicos, Bioquímicos y Lipídicos del Plasma Seminal.....	40
1.5.4.7. Osmolaridad del Plasma Seminal.....	40
1.5.4.8 Citometría Fluorescente Para Determinar el Contenido Total de Nucleótidos y Tamaño Total del Genoma.....	41
1.5.4.9. Establecimiento del Tamaño de la Cabeza Espermática por Citometría Multiparamétrica	44
1.5.5. Evaluación del Efecto de la Luz UV Sobre la Fisiología e Integridad Espermática ...	46
1.5.5.1. Diseño Para el Experimento con Luz Ultravioleta.....	46
1.5.5.2. Evaluación de la Calidad Espermática y Mezclado en la SSIM	47
1.5.5.3. Radiación del Esperma con Luz Ultravioleta (UV).....	47
1.5.5.4. Calidad Espermática de las Muestras Control y Aquellas Tratadas con Luz UV .	50
1.5.5.5 Viabilidad Espermática por Citometría Fluorescente Multiparamétrica (Vivos/Muertos/Apoptosis).....	50
1.5.5.6. Viabilidad Espermática por Microscopia Óptica y Tinción con Giemsa.....	50
1.5.5.7. Identificación del Daño Espermático por MEB	50
1.5.5.8. Análisis de Dispersión de ADN Total en Minigeles de Agarosa.....	51
1.5.5.9. Análisis Estadístico	52
CAPITULO II.....	53
Biología y Fisiología Espermática Básica del Bagre Tropical <i>Rhamdia laticauda</i> : Motilidad, Morfología, Tamaño Celular, Contenido de ADN, Osmolaridad, Química y Bioquímica.....	53

2.1. RESUMEN	53
2.2. INTRODUCCIÓN.....	54
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
2.3.1. Recolección y Mantenimiento de los Reproductores	55
2.3.2. Tratamiento Hormonal y Recolección de Semen	56
2.3.3. Conteo Espermático Manual y Actividad Espermática	56
2.3.4. Morfometría Espermática por Microscopía Óptica	57
2.3.5. Descripción Morfométrica por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	57
2.3.6. Descripción de la Ultraestructura Espermática por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	58
2.3.7. Tamaño Celular Espermático por Citometría Multiparamétrica	59
2.3.8. Componentes Químicos, Bioquímicos, Lipídicos y Osmolaridad del Plasma Seminal	59
2.3.9. Contenido Total de Nucleótidos por Citometría Fluorescente de Flujo y Tamaño Total del Genoma	60
2.3.10. Análisis Estadístico.....	61
2.4. RESULTADOS	62
2.4.1. Generalidades Reproductivas, Fisiología de los Machos y Esperma	62
2.4.2. Morfometría Espermática por Microscopía Óptica (MOP).....	62
2.4.3 Análisis Celular Espermático por Microscopía Electrónica de Barrido	63
2.4.4. Análisis Celular Espermático por Microscopía Electrónica de Transmisión	64
2.4.5. Osmolaridad y Componentes Químicos y Bioquímicos del Plasma Seminal	64
2.4.6. Tamaño de las Células Espermáticas y Contenido de ADN por Citometría	65
2.5. DISCUSIÓN.....	71
2.7. ANEXO I.....	81
2.7.1 ANEXO II	82
CAPITULO III	83
Efecto de la Luz Ultravioleta Sobre los Espermatozoides de <i>Rhamdia laticauda</i> : Basada en Estudios de Fisiología Extracelular e Intracelular	83
3.1. RESUMEN	83
3.2. INTRODUCCIÓN.....	84
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85

3.3.1. Recolecta y Mantenimiento de los Reproductores	85
3.3.2. Tratamiento Hormonal y Recolecta de Semen	86
3.3.3. Evaluación de la Calidad Espermática y Mezclado en la SSIM.....	86
3.3.4. Irradiación del Esperma con Luz UV	87
2.3.5. Análisis Celular Espermático por Microscopia Óptica (MOP)	87
3.3.6. Análisis Celular Espermático por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	88
3.3.7. Muerte Espermática Programada por Apoptosis (Muertos/Vivos/Apoptosis)	88
3.3.8 Análisis de Dispersión de ADN Total en Minigeles de Agarosa	89
3.4 RESULTADOS	91
3.4.1 Calidad Espermática de las Muestras Control y Aquellas Tratadas con Luz UV	91
3.4.2 Muerte Espermática Programada por Apoptosis (vivos/muertos/apoptóticos)	92
3.4.3 Evaluación del Efecto del UV por MOP y MEB.....	92
3.4.4 Analisis de Dispersión de ADN en Minigeles	93
3.5. DISCUSIÓN.....	105
3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

La biología, fisiología y genética, son áreas del conocimiento necesarias para la comprensión de los procesos naturales en los organismos y en las células individuales, como todas aquellas que integran los tejidos y órganos. Así también, los que se forman y liberan de las gónadas como son los óvulos y espermatozoides. En tales células los estudios que se realizan son muy reducidos debido a las dificultades para su análisis. Pocos organismos tienen la docilidad y facilidad para el manejo de ciertos tipos de células, en tal contexto los peces tienen la particularidad de fácil manejo, y en muchas especies se han desarrollado protocolos para el control en cautiverio que permite por ejemplo, la obtención de células gaméticas como los espermatozoides, que son un importante medio biológico para comprender los mecanismos fisiológicos que dan inicio y conllevan a la fertilización y hasta para su empleo como modelo biológico para la evaluación de condicionantes ambientales, como la temperatura, fuentes de radiación, etc. (Arias-Rodriguez, 2016).

La radiación involucra reacciones físicas que comprenden la emisión, propagación y absorción de energía por la materia orgánica e inorgánica viva o inerte. En ello, existen dos tipos de radiación: ionizante y no ionizante (Brandan *et al.* 1995). La radiación no ionizante, como es la luz ultravioleta (UV), constituye uno de los agentes físicos que se ha demostrado es causante de mutaciones en diversos organismos y está ligada a procesos de fotocarcinogénesis (Kozmin *et al.* 2003). Tales efectos son debido a que la luz UV ejerce acción a nivel de exposición subtóxica y las lesiones provocadas pueden resultar en modificación de las características hereditarias o inactivación del ácido desoxirribonucleico (ADN), producido por ruptura del ADN y el mal funcionamiento celular (Herschenfeld y Gilchrest, 1998).

La luz ultravioleta es la porción del espectro electromagnético que se encuentra entre los rayos X y la luz visible, siendo así que se han definido cuatro regiones del espectro como son: UV entre 100-200nm, UVC entre 200-280nm, UVB entre 280-315nm, y UVA entre 315-400nm (Meulemans, 1986). La radiación UVB, puede interactuar con átomos y moléculas en las células y promover radicales libres; los cuales pueden producir daño en componentes importantes de la célula, generando efectos biológicos graves sobre aquellos compuestos que

absorben los fotones directamente como son los ácidos nucleicos (Bryan *et al.* 2011; Hessen *et al.* 2012; Kienzler *et al.* 2013; Ravanat *et al.* 2001; Vargas *et al.* 2011).

Para la evaluación del efecto de la radiación ultravioleta, se han empleado diversos modelos biológicos como han sido células procariontes y eucariontes; en el caso particular de los organismos eucariontes, los espermatozoides de los peces han sido el grupo con mayor número de estudios pues el efecto de las ondas UVB y UVA, las cuales presentan mayor longitud de onda difieren entre sí (Lu y Wu, 2005). Las ondas UVB, promueven la formación de fotoproductos (dímeros de timina) que provocan lesiones en la membrana espermática, mientras que las ondas UVA producen productos-oxidativos que provocan la ruptura del ADN y el mal funcionamiento mitocondrial (Lu y Wu, 2005; Pruski *et al.* 2009). Sin embargo, a pesar del daño producido por la luz UV sobre las estructuras celulares, esta fuente de radiación ha sido empleada en procesos biotecnológicos para inactivar genéticamente células gaméticas (óvulos y espermatozoides) en diversas especies de peces (Flynn *et al.* 2006; Hassanzadeh and Hallajian, 2014; Ji *et al.* 2010; Luckenbach *et al.* 2004; Molina-Luzón *et al.* 2015; Purdom, 1983; Rougeot *et al.* 2005; Tvedt *et al.* 2006).

La inactivación genética espermática mediante UV, se produce por la desnaturalización del ADN, que forma dímeros de timina, aunque dichos daños pueden ser revertidos en algunas especies exponiendo las células a luz visible (fotorreactivación) siempre y cuando la especie cuente con la enzima “fotoliasa” que permite dicha renaturalización (Shima and Setlow, 1984; Valcárcel *et al.* 1994). Irónicamente, la mayoría de los estudios con UV, en peces se han enfocado a la evaluación de aspectos de carácter fisiológico y muy pocos, al estudio de los efectos a nivel intraestructural y extraestructural de las células espermáticas (Arias-Rodriguez *et al.* 2016). Si bien, en algunas especies de peces, la fertilización externa ha permitido la manipulación de sus gametos (Purdom, 1968; 1983) y con ello, ciertas características genéticas mediante la inducción de ginogénesis y androgénesis artificial (Arai, 2001; Komen y Thorgaard, 2007). En ambas, los huevos y espermatozoides son inactivados genéticamente con radiación gamma, rayos X o luz UV. Para la inducción de ginogénesis artificial, se requiere primero fertilizar un huevo normal (no irradiado) con espermatozoides con el ADN inactivado; mientras para la androgénesis, se realiza lo contrario, un huevo con ADN inactivo, es fertilizados por espermatozoides normales y viables. La primera consecuencia de tales procedimientos es el desarrollo de embriones conteniendo ADN con nivel genómico haploide, lo que ocasiona altos porcentajes de abortos y baja sobrevivencia hasta la primera

alimentación; posterior a ello no hay reportes de sobrevivientes. Lo anterior, impulsó el desarrollo de procedimientos para restaurar la condición diploide, mediante choques de temperatura extremos al régimen fisiológico normal de la especie en estudio, por ello existen tratamientos de choque “frío” o “caliente”, con lo que se evita la expulsión del segundo cuerpo polar ovocitario y se logra el desarrollo de un organismo ginogénético diploide o bien se evita la primera división mitótica del embrión androgénético con lo que se logra restaurar la condición diploide (mitoandrogenéticos) (Arai, 2000, 2001; Lasher y Rugh, 1962; Purdom, 1968; Thorgaard, 1983).

La radiación UV, ha sido empleada con éxito en varias especies de peces para inactivar el ADN espermático (inerte genéticamente) sin afectar la capacidad fisiológica para la fertilización (Arias-Rodriguez *et al.* 2004; Dunham, 2004; Felip *et al.* 2001; Grozea *et al.* 2006; Morgan *et al.* 2006). Tales tratamientos conducen al desarrollo haploide de embriones, con abortos tempranos antes o después de la eclosión (Chourrout *et al.* 1980), aunque en algunos caso se ha observado la sobrevivencia de larvas hasta la primera alimentación (Arias-Rodriguez *et al.* 2004). La ginogénesis ha sido utilizada en peces y otros organismos acuáticos para producir poblaciones de solo un sexo, poblaciones isogénicas (descendencia genéticamente iguales entre ellos ó meioginogénéticos) y líneas semiclónales (mitoginogénesis) (Purdom, 1983). Así como, para la obtención de caracteres de interés para acuicultura como resistencia a enfermedades, para la mejora dirigida por selección genética (Arias-Rodriguez *et al.* 2004; Purdom, 1983).

El creciente interés mundial en el cultivo de peces como alternativa para la obtención de proteína de origen animal a bajo costo, principalmente en países en vías de desarrollo como México, ha motivado la creciente atención de los acuicultores del mundo por dominar la reproducción, la proporción de sexos de algunas especies de peces (hembras o machos) mediante biotecnologías que implican el uso de radiaciones no ionizantes como la luz UV y que no requieren de la inserción de genes extraños o ajenos (Arias-Rodriguez, 2001).

Las características biológicas de un pez, como la tasa de crecimiento, eficiencia en la conversión alimenticia, adaptabilidad a condiciones de cultivo, posibilidad de reproducción en cautiverio, etc. Así como, la capacidad tecnológica para realizar su cultivo, afecta los costos de producción y por ende determinan la elegibilidad de la especie para ser cultivada (Aguilera *et al.* 1990). Los bagres (peces gatos) se han convertido en especies explotadas en las pesquerías y algunas en la acuicultura; por ser especies de fácil cultivo, resistentes a condiciones

adversas, además de ser una fuente importante de alimento por su carne blanca, sabrosa y consistente, (SAGARPA, 2011; Xenarthra, 2008). En México, este grupo se encuentra representado por cuatro familias: Ictaluridae, Aridae, Lacantuniidae y Heptapteridae (Hernández *et al.* 2005; Miller *et al.* 2009), siendo la familia Heptapteridae una de las más grandes y diversas con cuatro especies representativas; *Rhamdia guatemalensis*, *R. laticauda*, *R. macuspanensis*, *R. parryi* y *R. reddelli* (Miller *et al.* 2009). Las especies de bagres principalmente de origen marino han sido de las más explotadas, especialmente en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Campeche, Tabasco y Yucatán (SAGARPA, 2007). El bagre tropical *R. laticauda*, es primariamente dulceacuícola y no es considerado una fuente importante de alimento a nivel nacional sino solo local en Tabasco. En la citada especie pocos estudios han permitido el conocimiento y discernimiento de algunos aspectos de su biología, ecología, genética y reproducción (España-García, 2012; Jiménez-Trinidad, 2016; López-Hernández, 2013), y al igual que a otras especies de bagres, su fácil cultivo, resistencia a condiciones adversas, además, de su carne blanca y consistente, la convierten como un buen candidato como modelo biológico para estudios encaminados a su aprovechamiento y conservación.

Pocos han sido los estudios que se han realizado en relación al efecto de la luz UV sobre la morfología intracelular y extracelular de los espermatozoides en los experimentos de inducción de ginogénesis artificial, así como, el daño sobre el ADN, composición química y bioquímica del plasma seminal e integridad de la membrana, sabiendo que estos son de vital importancia para garantizar el éxito de fertilización en las especies y por ende niveles altos de sobrevivencia. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue el de describir la fisiología y estructura básica extracelular e intracelular espermática y también la de evaluar el efecto de once dosis (0.1-1.1 J/cm²) de radiación UV sobre la capacidad reproductiva de la células espermáticas de *R. laticauda* basado en estudio de fisiología extracelular e intracelular, que permitan determinar la viabilidad espermática, la identificación de células apoptóticas (vivas/muertas/apoptóticas) por citometría fluorescente, el daño directo al ADN mediante electroforesis de una célula y daño a la estructura espermática por microscopia electrónica de barrido, microscopia óptica y pruebas de dispersión de ADN.

1.2. GENERALIDADES

1.2.1. Generalidades de los Siluriformes

El orden de los Siluriformes o comúnmente llamados peces gatos, es uno de los grupos más diversificados y ampliamente distribuidos de peces ostariófisidos en el mundo. La diversidad más amplia se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales, especialmente de Sudamérica, África y Sudeste Asiático, este grupo comprende alrededor de 36 familias, 477 géneros y más de 3088 especies siendo, después de los charácidos, el grupo con mayor número de especies de agua dulce en América (Ferraris, 2007).

Dentro de este orden se incluyen especies de gran tamaño con interés deportivo y económico, así como, especies pequeñas de alrededor de 12 cm de longitud estándar; cuya relevancia se relaciona fundamentalmente con las redes tróficas de ríos y arroyos principalmente de regiones tropicales (Nelson, 2006). Morfológicamente, el grupo se caracteriza por carecer de escamas, la cabeza con barbillas en la región oral, nasal y/o mentoniana, cuando las aletas pélvicas están presentes, se ubican en posición abdominal, pueden tener o no aleta adiposa (Miller *et al.* 2009). Los dientes dispuestos en formas de parches almohadillas, cintura escapular bien desarrollada y unida al cráneo, cuerpo desnudo o con placas o escudos óseos, cuerpo cilíndrico, o muy alargado y anguiliformes; algunas especies presentan veneno en las aletas pectorales, que utilizan como sistema de defensa contra depredadores (Álvarez del Villar, 1970).

1.2.2. Características Generales de la Familia Heptapteridae

Los bagres o juiles de la familia Heptapteridae, son peces dulceacuícolas de tamaño mediano a grande de los trópicos de América, pero algunos alcanzan los 600 mm de longitud que constituye la base de la industria pesquera en Sudamérica (Bussing, 2002). Esta familia es muy numerosa en formas, en Sudamérica; habitan en estanques, cenotes, ciénagas, lagos, arroyos rocosos y cuevas (poblaciones ciegas), unos cuantos se presentan en aguas salobres (Bussing, 2002; Páramo-Delgadillo, 1986). Los juiles son bentónicos y generalmente nocturnos; durante el día, buscan escondites entre raíces, maleza en lugares oscuros. La mayoría de las especies son omnívoras y comen insectos acuáticos, lombrices y materia

orgánica. En el territorio mexicano solo vive el género *Rhamdia* (Álvarez del Villar, 1970). Los barbudos de esta familia se distinguen por carecer de escamas, la aleta adiposa es relativamente grande, la longitud de su base aproximadamente igual o un poco mayor que la aleta anal, los barbillones maxilares y mentonianas están siempre presentes, en la mayoría de las especies; el primer radio de la aletas dorsal y pectoral es rígida y punzante (Miller *et al.* 2009).

1.2.3. Clasificación Taxonómica de la Especie

La clasificación taxonómica de *R. laticauda* (Heckel, 1858), de acuerdo a Nelson (2006) y Miller *et al.* (2009), es de la siguiente manera:

Reino: Animalia
Phylum: Chordata
Subphylum: Vetebrata
Grado: Pisces
Superclase: Gnathostomata
Clase: Actinopterygii
División: Teleostei
Orden: Siluriformes
Familia: Heptapteridae
Género: <i>Rhamdia</i>
Especie: <i>Rhamdia laticauda</i> (Heckel, 1858)
Nombre común: Fil, juil, bagre tropical (Figura 2).

Figura 1. Clasificación taxonómica del juil tropical *R. laticauda*

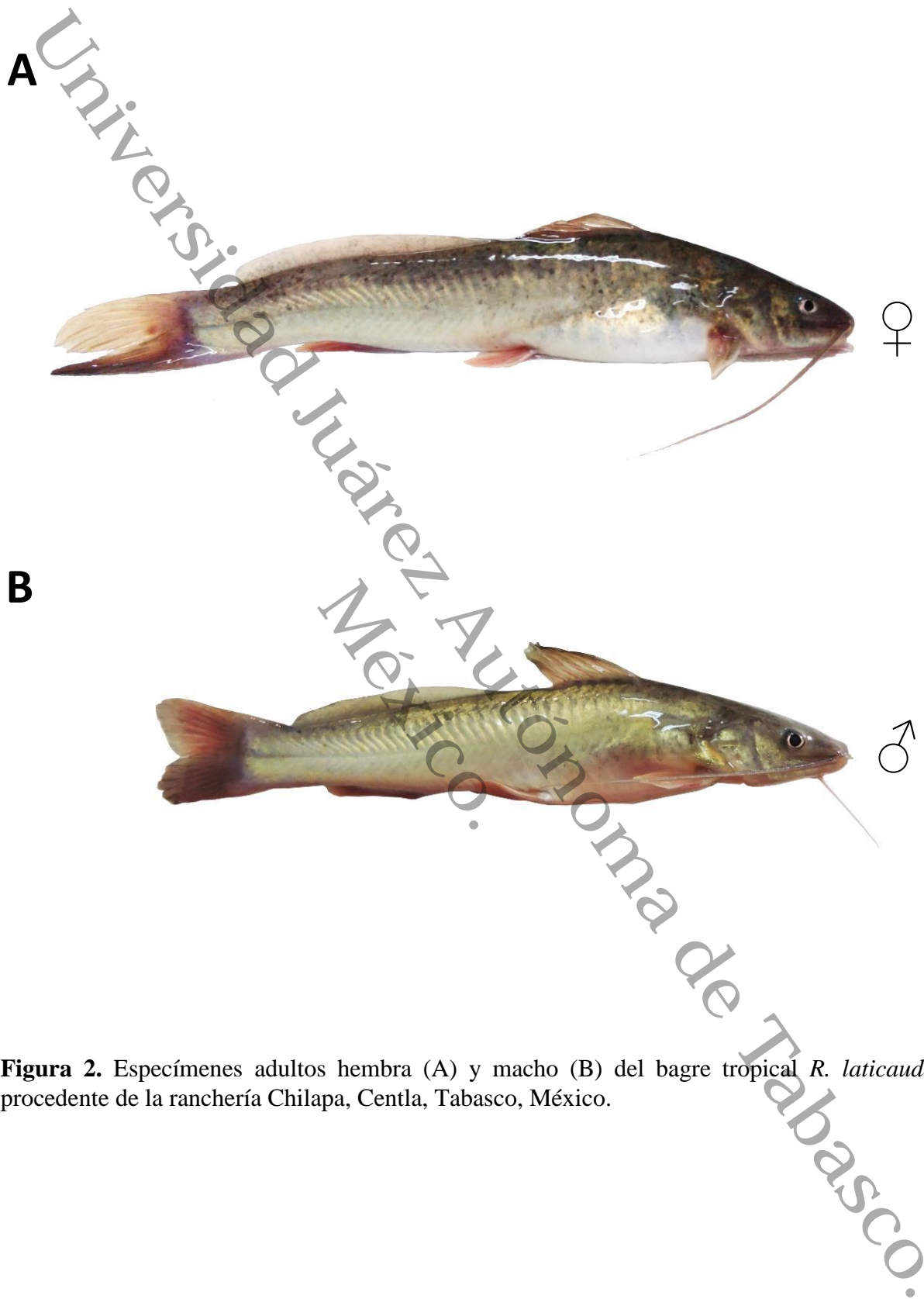


Figura 2. Especímenes adultos hembra (A) y macho (B) del bagre tropical *R. laticauda* procedente de la rancharía Chilapa, Centla, Tabasco, México.

1.2.4. Distribución Geográfica y Hábitat de *R. laticauda*

El bagre tropical *R. laticauda* tiene distribución en México desde la vertiente del Atlántico, en la cuenca del río la Antigua, unos 20 km al noreste de Veracruz, hacia el este (excluyendo el lago de Catemaco) y al sur hasta el noreste de Honduras y el Río Hondo, Quintana Roo (Schmitter-Soto, 1998) (**Figura 3**). Su hábitat típico son los rápidos rocosos y con aguas blancas, abruptos en arroyos y a lo largo de la orilla de los lagos, lagunas con el fondo típicamente arenoso o lodoso, con algunos cantos rodados y guijarros (Miller *et al.* 2009). Sin embargo, durante la realización de la presente investigación, ejemplares del juil tropical fueron capturados en ríos con agua turbia con fondo arcilloso-arenoso, flujo de corriente lento, con presencia de vegetación riparea semisumergida en los márgenes.

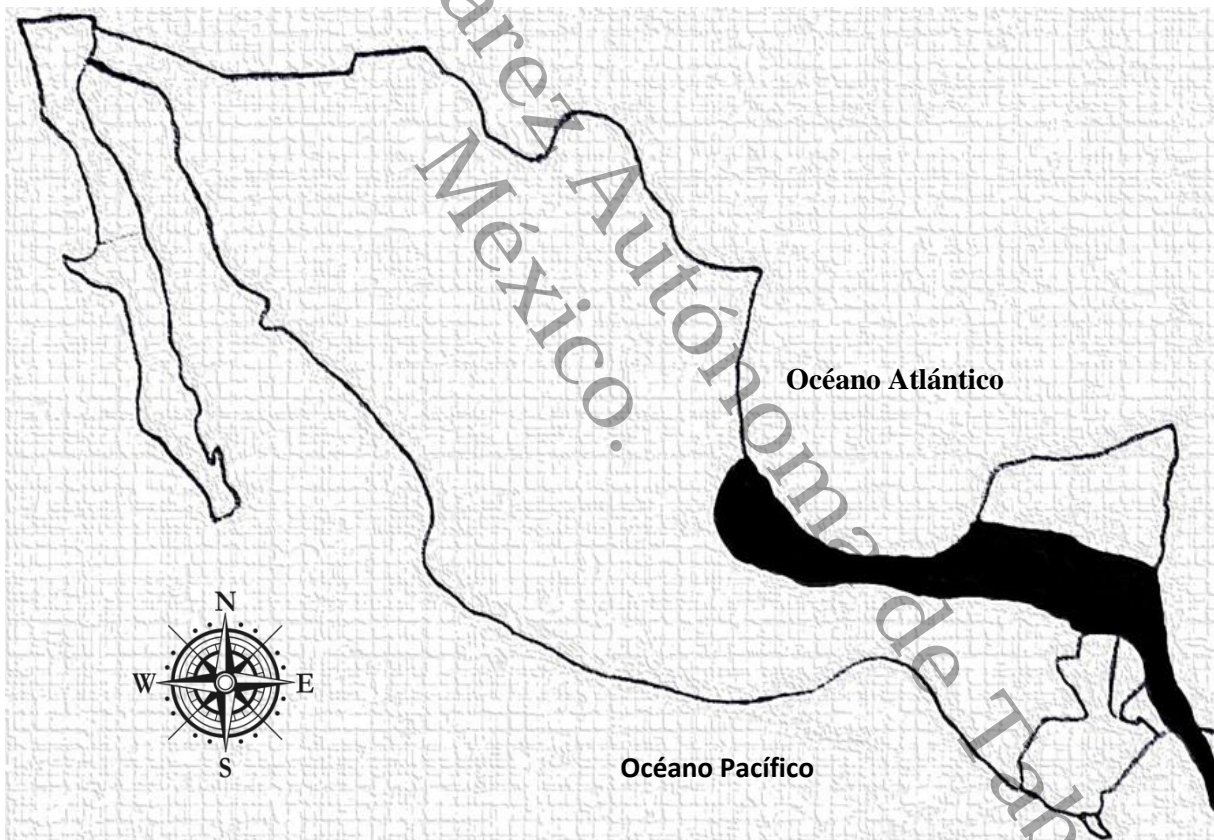


Figura 3. Distribución geográfica del juil tropical *R. laticauda* en México (Miller *et al.* 2009).

1.2.5. Importancia Económica de los Bagres en México

La pesca en México tiene valor económico, social y alimentario con fuerte impacto regional, en la que su elevado potencial de producción ha contribuido con la solución temporal de problemas alimentarios y generando empleos (Juárez *et al.* 2007). Por la geografía que caracteriza al país, las áreas pesqueras se han dividido en tres grandes regiones (pesquería del Pacífico, pesquería de aguas continentales y pesquerías del Golfo de México) cada una caracterizada por un número particular de especies (SAGARPA, 2007). En los últimos años, el cultivo de bagres ha tomado importancia a nivel nacional, debido a las características que los distinguen como especies de fácil cultivo, resistencia a condiciones adversas y como fuente de alimento, por su carne blanca, sabrosa y consistente (Xenarthra, 2008; SAGARPA, 2011). En México se encuentran varias especies de bagres, que son explotados con fines de pesca y en algunos casos acuícolas como el bagre de canal *Ictalurus punctatus* (**Tabla 1**) que es el más cultivado por la talla que alcanza en estadio adulto (250g a 600g). Sin embargo, es una especie no endémica (Moreno, 1976). Los estados en los cuales se registra la mayor cantidad de producción del bagre de canal (toneladas/año) son: Guerrero, Michoacán y Tamaulipas con más de 3000 toneladas al año (SAGARPA, 2011).

El análisis sobre la situación pesquera en México, revela que únicamente el 10% de las especies de peces tienen perspectiva de desarrollo para su uso con fines de cultivo, mientras que el 70% se encuentra en proceso de explotación y el 20% está en sobrepesca (Guzmán y Fuentes, 2006). Dentro de los cuatro grupos comercialmente explotables de peces en aguas continentales y territoriales, en los que se divide la pesquería mexicana como son; especies pelágicas o masivas, especies demersales, crustáceos-moluscos y especies de cría, los bagres se posicionan dentro de las especies de crías, convirtiéndolas en una de las especies con fuerte perspectiva comercial (Juárez *et al.* 2007). Sin embargo, se requiere de muchos esfuerzos para la producción masiva de crías y el desarrollo de biotecnologías de engorda y mejora genética.

Tabla 1. Listado de bagres que habitan en las aguas de los Estados Unidos Mexicanos, de origen marino y dulceacuícola (Modificado de Xenarthra, 2008).

Nombre común	Nombre científico	Hábitat
Bagretete ó cuatete	<i>Aríopsis seemani</i>	Marino
Bagre	<i>Aríopsis felis</i>	Marino
Bagre bandera	<i>Bagre marinus</i>	Marino
Bagre maya	<i>Aríopsis assimillis</i>	Marino
Bagre prieto	<i>Cathorops melanopus</i>	Marino
Chile apestoso	<i>Synodus foetens</i>	Marino
Chivorayuelo	<i>Upeneus parvus</i>	Marino
Serrano arenero, bolo	<i>Diplectrum fomosum</i>	Marino
Bagre chihuil, tacazonte	<i>Bagre panamensis</i>	Marino
Bagre	<i>Ictalurus furcatus</i>	Dulceacuícola
Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	Dulceacuícola
Boboliso	<i>Ictalurus meríodinalis</i>	Dulceacuícola
Bagre lacandon	<i>Potamarius nelsoni</i>	Dulceacuícola
Bagre de duges	<i>Ictalurus dugesii</i>	Dulceacuícola
Bagre	<i>Ictalurus ochoterenai</i>	Dulceacuícola
Juil tropical	<i>Rhamdia laticauda</i>	Dulceacuícola
Liso	<i>Rhamdia guatemalensis</i>	Dulceacuícola
Bagre ciego	<i>Rhamdia parri</i>	Dulceacuícola
Bagre	<i>Rhamdia ridelli</i>	Dulceacuícola
Bagre de Chiapas	<i>Lacantunia aenigmatica</i>	Dulceacuícola
Bagre del Usumacinta	<i>Potamarius usumacintae</i>	Dulceacuícola

1.2.6. Reproducción Básica en Peces

En los peces las estrategias reproductivas son variadas y complejas (Coward *et al.* 2002) y es la reproducción sexual el modo típico (Farrell, 2011). En la mayoría de los peces teleósteos, la fertilización es externa (Jamieson, 1991). Sin embargo, en algunas especies de peces de la familia Poeciliidae la fertilización es de tipo interna, en la cual los espermatozoides se mantienen viables en el receptáculo espermático dentro de la hembra por largo tiempo, permitiendo procrear más de una ocasión sin copula (Llanos y Scotto, 2014). El hermafroditismo, es una forma de reproducción muy peculiar que difiere del patrón de reproducción sexual con fertilización externa o interna, esta ha sido observada en peces de arrecife y de fondo marino o de cultivo como es *Sparus aurata*, donde ambos órganos sexuales están presentes en el mismo organismo. El hermafroditismo, ha sido también observado en algunas especies de esturiones como en *Acipenser guldensadtii* (Hoar *et al.* 1983). Sin embargo, este no es el patrón de reproducción básica en dichas especies (Cabrita *et al.* 2009). En la mayoría de las especies de peces, la reproducción está regulada por la vía cerebral, mediante la liberación de las hormonas gonadotropinas, folículo estimulantes y luteinizantes, provenientes del hipotálamo las cuales son clave en el control reproductivo endocrino (Cabrita *et al.* 2009; Jamieson, 2009^a; Mylonas y Zohar, 2001). El ciclo reproductivo de un pez se divide en dos fases principales; la proliferación, crecimiento y diferenciación de los gametos, constituyen la primera fase (vitelogénesis y espermatogénesis); mientras que la maduración de los huevos, espermatozoides y preparación para la liberación constituyen la segunda (espermiación y ovulación) (Mylonas y Zohar, 2001). El control de la reproducción, es un tópico importante en acuicultura y es uno de los factores limitantes del éxito reproductivo; en ello la calidad de los gametos de machos y de hembras es crucial (Bobe y Labbé, 2010). Los métodos para el control y manejo de la reproducción en peces, son muy diversos; estos incluyen almacenamiento de gametos, reversión sexual, manipulación del tiempo de reproducción, esterilización, separación de reproductores, entre otros (Schreck y Moyle, 1990). El control de la función reproductiva en cautiverio, es esencial para la sustentabilidad de la producción acuícola comercial (Mylonas *et al.* 2010), ya que muchas especies no pueden desovar en cautiverio, pero sus gametos alcanzan la maduración final y estos pueden ser recolectados o removidos directamente de las gónadas (Pavlov, 2006). Por ello, el desarrollo de tecnologías reproductivas para el manejo sustentable de peces, requiere del conocimiento

de factores que afectan la calidad de los gametos y sus modos de reproducción (Browne *et al.* 2015).

1.2.7. Fisiología de los Espermatozoides en Peces

Los gametos de los peces muestran variedad de morfologías y ultraestructuras, que los caracterizan como grupos taxonómicos (Jamieson, 1991). En los peces, al igual como en la mayoría de los vertebrados, los espermatozoides tiene doble función; la activación de las divisiones del huevo y la transmisión paterna del material hereditario (Kunz, 2004). Los espermatozoides de los teleósteos son de estructura simple, cabeza sin acrosoma, pieza media y flagelo, siendo estas las únicas estructuras en común; a diferencia de los mixinos, lampreas, peces espátula y esturiones, donde la presencia de un acrosoma es característico de la cabeza espermática (Jamieson, 1991; 2009^a; Psenicka *et al.* 2007). Sin embargo, en algunas especies de teleósteos como la trucha arcoíris, se ha observado una estructura en forma de acrosoma durante el proceso de espermatogénesis, pero solo de forma temporal (Billard, 1986). Debido a la ausencia del acrosoma en los espermatozoides de los teleósteos, la presencia de un micrópilo en el huevo compensa el hecho, por ello, una estructura acrosomal no es necesaria para entrar al huevo durante la fertilización (Hoar *et al.* 1983). Las características de la morfología espermática, están asociadas a los tipos de fertilización adoptadas por las especies. Por ejemplo, en peces de fertilización externa, la forma de la cabeza es básicamente redondeada, con una pieza media pequeña y flagelo; mientras que en peces con fertilización interna, un incremento en el tamaño del área de la pieza media y cabeza elongada ha sido observado (Coward *et al.* 2002; Kunz, 2004). En la mayoría de los peces teleósteos, la pieza media es pequeña, conteniendo a las mitocondrias y centríolos, los cuales a su vez están inmersos en un canal citoplasmático que separa la región de la pieza media del flagelo (Hoar *et al.* 1983). El número y forma de las mitocondrias es variable entre las especies de peces, desde una sola como en *Perca fluviatilis*, hasta 20 como en *Leuciscus idus* (Jamieson, 2009^a). En otras especies, particularidades como el tipo de flagelo, también han sido observados. En *Mormoriformes* la ausencia del flagelo es característico, mientras que en algunas especies de Ictaluridos (*Ictaluros punctatus*) un doble flagelo ha sido reportado (Hoar *et al.* 1983). Por el tipo de reproducción que presentan, los espermatozoides han sido clasificados como; acuaespermatozoides; espermatozoides que son liberados dentro del agua (peces de

fertilización externa) e introspermatozoides; con espermatozoides que no se liberan en el ambiente acuático que son típicos de la fertilización interna (Jamieson, 1991).

1.2.8. Espermatogénesis en Peces

La espermatogénesis es un proceso del desarrollo reproductivo durante el cual un pequeño número de células madres o espermatogoniales diploides, producen espermatozoides haploides altamente diferenciados, llevando genoma haploide recombinado (Schulz *et al.* 2010). La duración de la espermatogénesis es corta en peces y en mamíferos (Billard, 1986). En los peces teleósteos, la espermatogénesis ocurre en el epitelio germinal testicular, dicho proceso biológico inicia con la proliferación mitótica de las espermatogonias, precedida de dos divisiones meióticas y concluye con la espermatogénesis, durante el cual las espermátidas haploides se transforman en espermatozoides motiles que son los vectores del genoma paterno (Vázquez *et al.* 2012). En los teleósteos, tres tipos de espermatogénesis han sido definidas basado en la migración del flagelo con respecto al núcleo (Quagio-Grassiotto y Olivera, 2008). En la espermatogénesis de **tipo I**, las espermátidas tempranas tienen núcleo central, con dos centriolos y uno o más mitocondrias, el centriolo migra en dirección del núcleo y con ellos el flagelo y la membrana celular crea el canal citoplasmático. El núcleo desarrolla una fosa, que rota 90° con respecto al axonema del flagelo, el cual es perpendicular al núcleo. Los centriolos se mueven parcial o completamente dentro de la fosa (**Figura 4**) (Wootton y Smith, 2015). En la espermatogénesis de **tipo II**, no hay rotación nuclear, los centriolos migran en dirección del núcleo, pero no entran en la fosa y el flagelo es tangencial al núcleo. Este tipo de espermatogénesis es típico de peces Perciformes (Quagio-Grassiotto y Olivera, 2008). En la espermatogénesis de **tipo III**, el flagelo es central y sin rotación nuclear (**Figura 4**) (Quagio-Grassiotto y Olivera, 2008; Wootton y Smith, 2015).

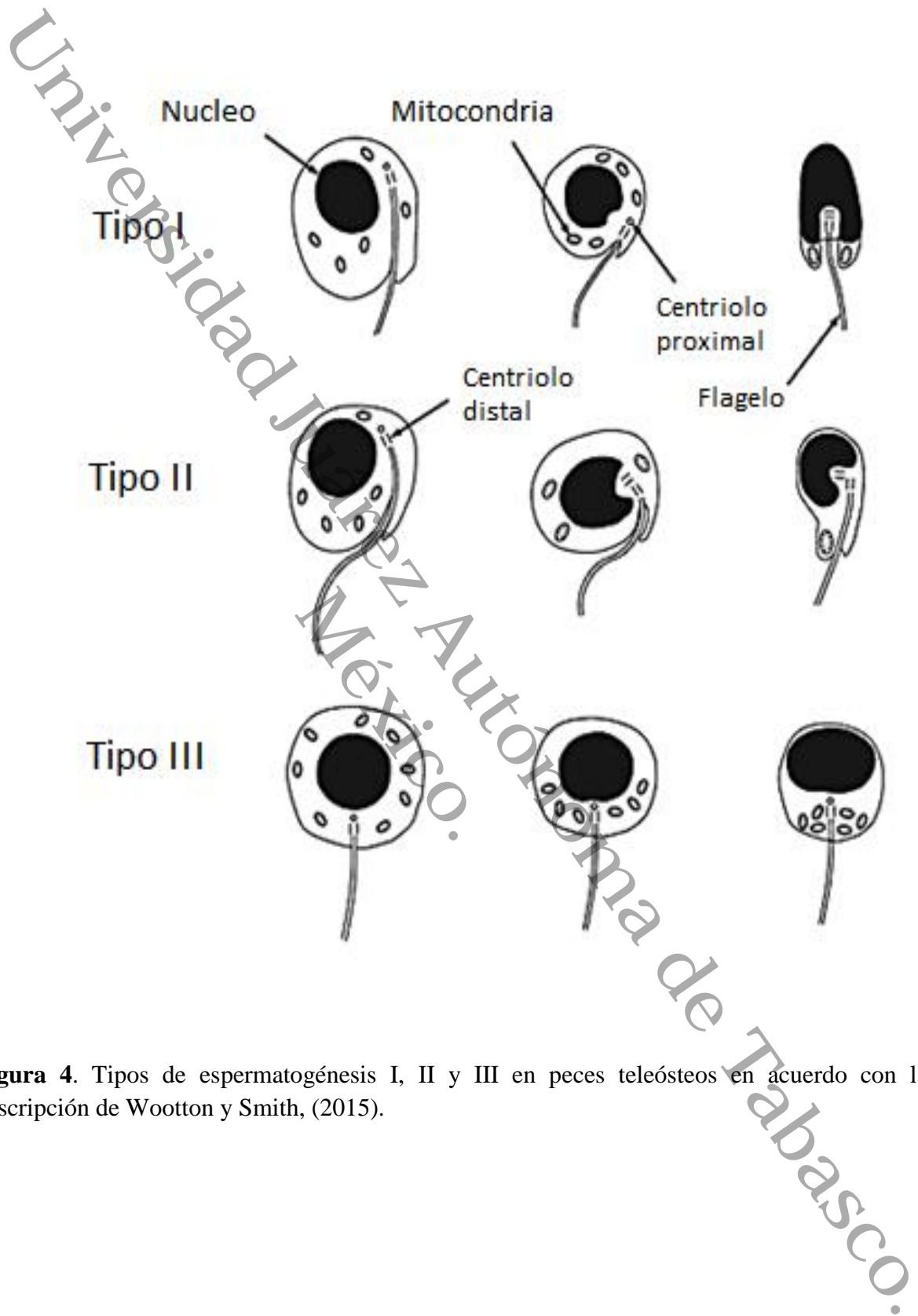


Figura 4. Tipos de espermatogénesis I, II y III en peces teleósteos en acuerdo con la descripción de Wootton y Smith, (2015).

1.2.9. Inactivación Genética de Gametos en Organismos Acuáticos con Luz Ultravioleta

El empleo de luz ultravioleta (UV) para la inducción artificial de ginogénesis y androgénesis, se ha utilizado ampliamente para experimentos de inactivación genética de los espermatozoides y huevos de varias especies de organismos acuáticos (**Tabla 2**), como son los peces, moluscos y crustáceos. En cada especie, los niveles de radiación varían, siendo en algunos casos radiación alta como en *Silurus glanis L* con 4.8 J/cm^2 (Fopp-Bayat y Woznicki, 2009) o baja de 0.007 J/cm^2 en *Hypophthalmichthys molitrix* (Mirza y Shelton, 1988). El éxito en la inactivación de las células espermáticas, consiste en el correcto empleo de un medio isosmótico (Soluciones Reguladoras de la Vitalidad Espermática) que permiten mantener la viabilidad espermática y reducir el número de células expuestas que homogeniza la exposición a la luz UV, lo que garantiza mayor efectividad, menor variación y porcentajes apropiados de fertilización (Arias-Rodriguez *et al.* 2004).

1.2.10. Técnicas Tradicionales Para la Evaluación de la Calidad Espermática

El control de la calidad espermática es un tema relevante en la industria acuícola, ya sea para la producción de especies comerciales establecidas o para la introducción de nuevas especies con alto interés comercial (Cabrita *et al.* 2014). La calidad espermática puede ser definida como la habilidad de un espermatozoide para fertilizar exitosamente un huevo y subsecuentemente permitir el desarrollo de un embrión normal (Bobe y Labbé, 2010). En el apareamiento, los gametos con buena cantidad y calidad son liberados en el agua (peces de fertilización externa), luego se da la fertilización, en ello el ambiente de fusión de gametos determina el éxito de la fertilización (Fauvel *et al.* 2010).

La calidad espermática puede ser evaluada mediante el análisis de diferentes parámetros como son: Concentración espermática, morfología, motilidad espermática, integridad de la membrana, contenido energético y pruebas muy complejas que incluyen herramientas moleculares (Cabrita *et al.* 2014; Fauvel *et al.* 2010). El desarrollo de herramientas para evaluar cambios en la calidad de los gametos mediante la función o estadio gonadal, es un tema clave para el establecimiento de protocolos específicos para el buen manejo de gametos (Fabbrocini *et al.* 2016).

La evaluación de la motilidad espermática y los porcentajes de fertilización, han sido los parámetros de mayor uso para determinar la calidad del semen en mamíferos y en algunas especies acuáticas (Paniagua-Chavéz *et al.* 2006; Pavlov, 2006). Sin embargo, en la actualidad métodos más objetivos de análisis han surgido como: Análisis Espermático Asistido por Computadora (AEAC o CASA), electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa), apoptosis por citometría fluorescente, Microscopia Electrónica de Barrido, de Transmisión, ensayo túnel, metabolismo de ATP; por mencionar solo algunos (Beirao *et al.* 2009; Cabrita *et al.* 2014). El análisis previo de la calidad espermática, es un factor clave en los sistemas de producción para asegurar un buen producto. Gracias al surgimiento de nuevas herramientas, para la evaluación rápida y confiable de la calidad espermática, nuevas especies han sido aprovechadas con fines acuícolas (Cabrita *et al.* 2014).

Tabla 2. Dosis de radiación ultravioleta, empleadas para la inactivación genética del esperma en varias especies de organismos acuáticos. Las dosis fueron ajustadas a Julios/cm² (J/cm²) para propósitos comparativos del presente estudio.

Autor	Dosis de radiación optima	Especie	Dosis en J/cm ²
Arai <i>et al.</i> 1984	1260-2520 erg mm ⁻²	<i>Patinopecten yessoensis</i>	0.1-0.2 J/cm ²
Arias-Rodriguez <i>et al.</i> 2004	0.7 Jcm ²	<i>Spherooides annulatus</i>	0.7 J/cm ²
Arias-Rodriguez, 2007	90 µJ/cm ²	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	0.9 J/cm ²
Colombo <i>et al.</i> 1995	3,300–6,600 erg mm ⁻²	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0.3-0.6 J/cm ²
Christopher <i>et al.</i> 2009	7500 erg mm ⁻²	<i>Heteropneustes fossilis</i>	0.75 J/cm ²
Don and Avtalion, 1988	3,070 µw/cm ²	<i>Oreochromis aureus</i> y <i>O. niloticus</i>	0.27 J/cm ²
Felip <i>et al.</i> 1999	35,000–40,000 erg mm ⁻²	<i>D. labrax</i>	3.5-4.0 J/cm ²
Fopp-Bayat and Woznicki, 2007	48 000 erg mm ⁻²	<i>Silurus glanis</i> L.	4.8 J/cm ²
Fopp-Bayat, 2010	4800 J/cm ²	<i>S. glanis</i>	4.8 J/cm ²
Gomelsky <i>et al.</i> 1998	8,000 ergmm ⁻²	<i>Morone chrysops</i>	0.8 J/cm ²
Gigliotti <i>et al.</i> 2011	3689 µW/cm ²	<i>Gadus morula</i> L.	0.3 J/cm ²
Hussain <i>et al.</i> 1993	300 µw cm ²	<i>O. niloticus</i>	0.02 J/cm ²
Huerta, 1999	0.5-0.6 J/cm ²	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	0.5-0.6 J/cm ²
Ijiri, 1980	540 J* m ⁻²	<i>Oryzias latipes</i>	0.05 J/cm ²
Kijima, 1992	1350 erg/ mm ⁻²	<i>Haliotis discus hannai</i>	0.13 J/cm ²
Kucharczyk <i>et al.</i> 2004	1920 Jm ⁻²	<i>Abramis brama</i> L.	0.1 J/cm ²
Li <i>et al.</i> 2000	720 µw cm ²	<i>P. yessoensis</i>	0.06 J/cm ²
Luckenbach <i>et al.</i> 2004	70 J/cm ²	<i>Paralichthys lethostigma</i>	70 J/cm ²
Luczynski <i>et al.</i> 2007	3072 J·m ⁻² x 8 min	<i>Esox lucius</i> L.	0.03 J/cm ²
López-Hernández, 2013	0.6-1.0 J/cm ²	<i>R. laticauda</i>	0.6-1.0 J/cm ²
Lebeda <i>et al.</i> 2014	200 J/m ²	<i>Acipenser baerii</i>	0.2 J/cm ²
Mirza and Shelton, 1988	70 µw cm ⁻²	<i>H ypophthalmichthys molitrix</i>	0.007 J/cm ²
Molina-Luzón <i>et al.</i> 2015	32 mJ*cm ⁻²	<i>Solea senegalensis</i>	0.03 J/cm ²
Nam <i>et al.</i> 2001	4050 ergs mm ⁻²	<i>Silurus asotus</i>	0.4 J/cm ²
Nowosad <i>et al.</i> 2015	3,456 J m ⁻²	<i>Tinca tinca</i> L.	0.3 J/cm ²
Peruzzi and Chatain, 2000	32,000 erg mm ⁻²	<i>D. labrax</i> L.	3.2 J/cm ²
Piferrer <i>et al.</i> 2004	30,000 erg mm	<i>Scophthalmus maximus</i>	2.96 J/cm ²
Sugama <i>et al.</i> 1990	3,000 erg mm ⁻²	<i>Pagrus major</i>	0.30 J/cm ²
Siraj <i>et al.</i> 1993	2337 erg mm ⁻²	<i>Puntius gonionotus</i>	0.45 J/cm ²
Saber and Hallajian, 2014	473 mW/cm ⁻²	<i>Acipenser nudiventris</i>	0.04 J/cm ²
Saber <i>et al.</i> 2014	473 mW/cm ⁻²	<i>Acipenser nudiventris</i>	0.04 J/cm ²
Varcarcel <i>et al.</i> 1994	149.83 x 10 ³ erg * min ⁻¹ * mm ⁻²	<i>Rhamdia sapo</i>	14.9 J/cm ²
Volckaert <i>et al.</i> 1997	0.453 J cm ²	<i>Clarias gariepinus</i>	0.04 J/cm ²
Van Eenennaam <i>et al.</i> 1996	1200 µw cm ²	<i>Acipenser transmontanus</i>	0.10 J/cm ²
Xu <i>et al.</i> 2007	75 J cm ⁻²	<i>Pseudosciaena crocea</i>	0.07 J/cm ²
Zhang <i>et al.</i> 2011	3,600 mJ/cm ²	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	3.6 J/cm ²

J= julios, cm= centímetros, erg= ergio= min= minutos, mm=milímetro, µW= micro-Watts

1.2.11. Técnicas Avanzadas Para la Evaluación de la Calidad Espermática

El desarrollo de técnicas accesibles y su disponibilidad, proveen de nuevos recursos para evaluar objetivamente la calidad espermática en peces (Fauvel *et al.* 2010). Métodos modernos como: Microscopia Electrónica de Transmisión y Barrido, sistemas computarizados (CASA, ASMA), ensayos de dispersión de ADN (ensayo cometa), citometría fluorescente para determinar la viabilidad celular por tinción con Ioduro de propidio y Anexina V, han permitido el análisis detallado del efecto de diversos agentes como son: Luz UV, crioprotectores, diluyentes espermáticos, metales pesados, contaminantes, etc., empleados en algunas ocasiones con propósitos biotecnológicos y de conservación (Cabrita *et al.* 2014; Fauvel *et al.* 2010).

Desde el punto de vista biológico, la calidad de los gametos puede determinarse por la capacidad de fertilizar (espermatozoides) o ser fertilizado (huevo) y subsecuentemente promover el desarrollo de un embrión normal (Bob y Labbé, 2010). Es sabido que la integridad espermática, se encuentra asociada con los porcentajes de fertilización, siendo óptimos cuando la calidad espermática es buena y pobre cuando la calidad es baja (Ciereszco *et al.* 2005; Costache *et al.* 2012; Labbe *et al.* 2001).

En la industria acuícola, la producción de semilla de buena calidad para la engorda y reproducción es prioridad (Rurangwa *et al.* 2004). Por ello, la calidad de los gametos es un factor primordial (Charnov, 2015). Las herramientas mostradas en la **Tabla 3**, han permitido la evaluación de la calidad espermática en varias especies de peces, previo a la fertilización “*in vitro*” o la evaluación de algún agente que pueda dañar la integridad celular espermática. La evaluación de la calidad espermática, es indispensable para la obtención de descendencia con altos estándares de calidad reproductiva y genética.

Tabla 3. Técnicas empleadas para la cuantificación y evaluación del daño espermático producido por diversos agentes.

Autor	Especie	Fuente de daño	Tipo de ensayo o técnica de evaluación empleada
Au <i>et al.</i> 2002	<i>Anthocidaris crassispina</i>	Radiación UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema computarizado (CASA) • Porcentajes de fertilización
Arias-Rodriguez <i>et al.</i> 2004	<i>Sphoeroides annulatus</i>	Radiación UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad) • Porcentajes de fertilización • Supervivencia de embriones y estadios de desarrollo
Alavi <i>et al.</i> 2009	<i>Esox lucius L.</i>	Osmolaridad	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) • Calidad espermática
Beirao <i>et al.</i> 2008	<i>Solea senegalensis</i>	Especies capturadas del medio silvestre	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Tinción con Anexina-V
Cabrita <i>et al.</i> 2005	<i>Oncorhynchus mykiss</i> y <i>Sparus aurata</i>	Críopreservación	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa
Ciereszko <i>et al.</i> 2005	<i>Petromyzon marinus</i>	Radiación UV-B y peróxido de hidrogeno	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Porcentajes de fertilización
Dietrich <i>et al.</i> 2005	<i>O. mykiss</i>	Radiación UV y peróxido de hidrogeno	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad)
Dietrich <i>et al.</i> 2010	<i>O. mykiss</i>	Mercurio y cadmio	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Sistema computarizado (CASA) • Vivos-Muertos (ioduro de propidio) • Porcentajes de eclosión
Espinoza <i>et al.</i> 2010	<i>Argopecten purpuratus</i>	Críopreservación	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia óptica • MEB
Jiménez-Trinidad, 2016	<i>Rhamdia laticauda</i>	Soluciones Reguladoras de la Vitalidad Espermática	<ul style="list-style-type: none"> • Citometría fluorescente, tinción con Anexina-V • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad)
Li <i>et al.</i> 2000	<i>Patinopecten yessoensis</i>	Radiación UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia electrónica de barrido • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad)
Labbe <i>et al.</i> 2001	<i>O. mykiss</i>	Críopreservación	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Porcentajes de fertilización • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad) • Desarrollo embrionario

Lu <i>et al.</i> 2005	<i>Anthocidaris crassispina</i>	Radiación UV-A y UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Citometría de flujo • Ensayos fluorescentes • Porcentajes de sobrevivencia
Lu <i>et al.</i> 2005	<i>A. crassispina</i>	Radiación UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad) • Porcentajes de fertilización • Citometría de flujo • Peroxidación de lípidos por espectrofotometría
Li <i>et al.</i> 2008	<i>Polyodon spathula</i>	Críopreservación	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Sistema computarizado (CASA)
López-Fernández <i>et al.</i> 2009	<i>Tinca tinca</i>	Evaluación del medio de activación	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Tinción fluorescente para dispersión de cromatina
López-Hernández, 2013	<i>R. laticauda</i>	Efecto de la radiación UV-C	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad espermática (tiempo, tipo y % de motilidad)
Nahon <i>et al.</i> 2009	<i>S. granularis</i>	Radiación UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentajes de fertilización • Desarrollo embrionario • Porcentajes de sobrevivencia
Orfão <i>et al.</i> 2011	<i>Brycon opalinus</i>	Críoprotectores y soluciones extendedoras	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad)
Piferrer <i>et al.</i> 2004	<i>Scophthalmus maximus</i>	Radiación UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad) • Porcentajes de fertilización • Sobrevivencia de embriones y estadios de desarrollo
Pruski <i>et al.</i> 2009	<i>S. granularis</i>	Radiación UV-B	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) • Ensayo cometa
Shaliutina <i>et al.</i> 2013	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> y <i>A. baerii</i>	Almacenamiento temporal (líquido)	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad) • Ensayo cometa • Espectrofotometría
Xu <i>et al.</i> 2007	<i>Pseudosciaena crocea</i>	Radiación UV	<ul style="list-style-type: none"> • Motilidad espermática • Porcentajes de fertilización
Xu <i>et al.</i> 2013	<i>P. crocea</i>	Críopreservación	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa
Zilli <i>et al.</i> 2003	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Críopreservación	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo cometa • Calidad espermática (tiempo y % de motilidad) • Porcentajes de fertilización

1.2.12. Soluciones Reguladoras de la Vitalidad Espermática (SRVE)

La preservación espermática (temporal) es una herramienta importante para la conservación de especies en peligro de extinción (Orfao *et al.* 2011). Uno de los principios básicos de la conservación espermática, es disponer siempre de gametos para producir crías en cualquier temporada (Muchlisin *et al.* 2004).

El objetivo de la conservación temporal, es mantener muestras espermáticas vivas con buena calidad durante corto periodo de almacenamiento (Muchlisin *et al.* 2004). El almacenamiento temporal o de corto período, considera de horas a semanas de mantenimiento y es aplicada generalmente en las poblaciones naturales para superar problemas de asincronía en la maduración, transporte de gametos o uso selectivo de reproductores (Hoar *et al.* 1983). El método de mayor uso para mantener muestras espermáticas con buen porcentaje de motilidad y tiempo de vitalidad es la mezcla en las Soluciones Reguladoras de la Vitalidad Espermática (SRVE). Una SRVE usualmente imita la composición total del medio iónico del plasma seminal y mantiene inmóvil a los espermatozoides; como si estuvieran dentro del testículo del macho (Arias-Rodriguez *et al.* 2004). Los espermatozoides se activan cuando son liberados en el ambiente acuático, como es agua dulce, agua de mar o fluido ovárico por cambios iónicos y osmóticos en la membrana (Alavi *et al.* 2009; Lahnsteiner, 2011; Tan Fermin *et al.* 1999).

Es conocido que dos componentes principales del plasma seminal, están involucrados en prevenir la activación de la motilidad espermática; altas concentraciones de iones de potasio (K^+) como en Salmónidos y la osmolaridad como en caso de los Ciprínidos (Alavi *et al.* 2009). Algunas SRVE como, la solución Ringer o Solución Fisiológica, han sido de las más empleadas para diluir el semen de algunas especies de peces de agua dulce; aunque algunas modificaciones han sido realizadas para la mezcla de muestras de semen en especies marinas (Muchlisin, 2005). El uso incorrecto de las SRVE, puede resultar en la modificación de la calidad espermática por el daño originado sobre los componentes espermáticos (membrana celular y flagelo), reduciendo los tiempos de motilidad y porcentajes de fertilización (Alavi *et al.* 2009; Jiménez-Trinidad, 2016; Yasui *et al.* 2014). Por ello, la correcta evaluación de la osmolaridad los componentes químicos y bioquímicos del plasma seminal, son un requisito indispensable previo a procesos de conservación temporal de semen y de la correcta preparación de una SRVE específica.

1.2.13. La Apoptosis o Muerte Celular Programada

La homeóstasis es mantenida en organismos multicelulares por el balance entre la proliferación celular y la muerte celular (Krisko *et al.* 2008). El término apoptosis o muerte celular programada, se define como un programa de muerte celular genéticamente codificado, el cual es morfológicamente y bioquímicamente distinto de la necrosis o muerte accidental (Vermes *et al.* 2000). Tipos diferentes de muerte celular han sido descritos: Apoptosis (tipo I), muerte celular asociada con autofagia y pérdida de la integridad de la membrana plasmática (tipo II) y fuga del contenido intracelular (necrosis o tipo III) (Darzynkiewicz *et al.* 1992; Krisko *et al.* 2008; Sgonc and Gruber, 1998). La apoptosis es un mecanismo de renovación de células no deseadas por el sistema inmune, esta es caracterizada por la condensación de cromatina, reducción del volumen celular y división del ADN por endonucleasas en fragmentos grandes de oligonucleosomas; además es acompañada por la pérdida de asimetría fosfolípida de la membrana (Koopman *et al.* 1994). Existen diversas técnicas para determinar y cuantificar el fenómeno apoptótico, dentro de las metodologías más comunes para la detección de apoptosis se encuentran; electroforesis en gel, en la cual el ADN fragmentado puede ser observado como bandas de tamaño equivalente a múltiples oligonucleosomas o de un único nucleosoma y la viabilidad por tinción mediante marcadores como: Anexina V, yoduro de propidio, eosina-nigrosina, azul de tripano, etc. (Zamai *et al.* 1993). Además, métodos como pérdida de la viabilidad celular o condensación de ADN, han sido también empleadas en el monitoreo de la apoptosis. Sin embargo, los cambios morfológicos y la degradación de la cromatina son la base de tales ensayos y ocurren después de la apoptosis (Rodriguez y Schaper, 2005; Zhang *et al.* 1997).

En los primeros estadios de la apoptosis un cambio en la superficie de la célula es observado, está es la translocación de fosfatidilserina del interior de la membrana plasmática, al exterior, quedando expuesta en la superficie de la célula (Vermes *et al.* 1995). La Anexina “V” es una proteína de unión-fosfolípida dependiente de Ca^{+} , con alta afinidad por la fosfatidilserina y es una de las más usadas para detectar apoptosis mediante el análisis citométrico fluorescente; marcando la pérdida de simetría de la membrana, durante el inicio del proceso apoptótico (Engeland *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1997).

El análisis por citometría fluorescente de células, es objetivo, ya que mide la cantidad de tinción fluorescente asociada o hibridizada con las células de una manera más completa, está

puede analizar millones de células en segundos y pueden evaluar múltiple tinciones fluorescentes, asociados con espermatozoides individuales (Graham, 2001). La citometría de flujo, es una técnica atractiva, debido a que permite la caracterización de cada espermatozoide en términos de función celular e integridad de sus diferentes compartimentos; así como, también la identificación de subgrupos sobre un gran número de células (Ogier de Baulny *et al.* 1997). Por medio del análisis de citometría de flujo, la detección de moléculas involucradas en la muerte apoptótica, análisis del ciclo celular y determinación de la actividad de las caspasas han sido también evaluadas con éxito en células espermáticas (Pérez, 2006).

1.2.14. Evaluación de las Microestructuras Espermáticas por Microscopia Óptica (MOP)

El análisis de la morfología espermática es el criterio más importante para evaluar la calidad de una muestra de semen (García-Herreros *et al.* 2006). La correcta evaluación depende del modo de preparación, fijación y método de tinción de las células gaméticas (Horst y Maree, 2009; Maree *et al.* 2010).

Una técnica de tinción debe causar el menor cambio en las dimensiones y formas como sea posible, con el fin de evaluar de forma confiable las características morfométricas de cada componente celular (Maree *et al.* 2010). Las diferentes morfologías espermáticas por microscopia óptica, son usualmente establecidas por la tinción de las muestras de semen y examinando la laminilla bajo un microscopio, con los objetivos de 40X o 100X con contraste de fases negativo, ajustando correctamente el brillo del campo, seguido por el análisis de las imágenes capturadas (Tuset *et al.* 2008^b). Técnicas de tinción diferentes, han sido desarrolladas, para el análisis espermático por microscopia óptica como: Hematoxilina-eosina, azul de toluidina, giemsa, Wright, naranja G, tinción con azul de eosina-anilina, método de Shorr, papanicolao, método de Berg, tinción verde claro, naranja de acridina y tinción verde de Janus (Aksoy *et al.* 2012; Sousa *et al.* 2013; Serafini, 2014). Sin embargo, el desarrollo del Análisis Automatizado para la Morfología Espermática (AAME) o el Sistema de Análisis Espermático Integrado (SAEI), han llevado al incremento en el número de estudios sobre la morfología en espermatozoides de animales, principalmente en mamíferos mediante el empleo de tinciones que dan un mejor contraste de fondo (Tuset *et al.* 2008^b).

El empleo combinado por sistemas computarizados y métodos de tinción como Diff-Quick, Hemacolor, Spermac, SpermBlue, actualmente permiten el análisis automático de rutina de la

forma de los espermatozoides y fomenta el desarrollo del análisis de imágenes para caracterizarlos de manera rápida (Horst y Maree, 2009; Tuset *et al.* 2008^a, 2008^b). Sin embargo, la morfología de los espermatozoides en peces, es tan variada que requiere de la estandarización de la forma celular para cada especie previo a procesos de medición (Marco-Jiménez *et al.* 2006). Por ello, los métodos subjetivos por microscopía óptica y el empleo de las nuevas tinciones, permiten de igual manera la evaluación de espermatozoides en tiempo real, siendo este un método barato y de fácil acceso (Aksoy *et al.* 2012; Estes *et al.* 2015).

1.2.15. Evaluación de las Microestructuras Espermáticas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La MEB es una herramienta poderosa, que permite la observación y caracterización de materiales orgánicos e inorgánicos heterogéneos y superficies a escala local (Yacamán y Reyes-Gasga, 1998). El área examinada o el microvolumen analizado, son irradiados con un fino haz de electrones focalizados, la cual puede ser estática o mediante un barrido a través de la superficie del espécimen (Goldstein *et al.* 1992). Con la ayuda de esta herramienta, gran número de estudios sobre la fisiología espermática, han sido desarrollados en peces (Marco-Jiménez *et al.* 2006; Madhavi *et al.* 2015; Xin *et al.* 2014). En general los espermatozoides de los peces, se han diferenciado en tres partes mayores por MEB; una cabeza, una pieza media y flagelo (Alavi *et al.* 2009; Madhavi *et al.* 2015). El conocimiento sobre los espermatozoides en peces, ha incrementado considerablemente desde décadas pasadas (Jamieson, 2009^a). Dichos estudios se han enfocado a las diferencias morfológicas y estructurales entre especies, las cuales sirven como criterio para estudios evolutivos y taxonómicos (Jamieson, 2009^a; Madhavi *et al.* 2015; Psenicka *et al.* 2007). Además, el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido provee de información detallada sobre la ultraestructura sub-celular espermática, esta permite entender la morfología normal de los espermatozoides, la cual es valiosa en el desarrollo de métodos de críopreservación y la evaluación de posible daño celular, por la exposición hacia algún agente contaminante previo a procesos de fertilización artificial (He y Woods III, 2004; Li *et al.* 2000; Xin *et al.* 2014). El surgimiento de análisis por computadoras (AAME y CASA) en combinación con el análisis espermático por MEB, proveen de una opción versátil para el reemplazamiento de las técnicas de microscopía tradicional, por su fácil

operación y objetividad de análisis (Boonthai *et al.* 2016; Marco-Jiménez *et al.* 2006). Sin embargo, la adquisición de tales programas y equipos son altamente costosos.

1.2.16. Evaluación de las Microestructuras Espermáticas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El estudio de la ultraestructura espermática por MET de los diferentes grupos de peces, ha sido un tema popular desde décadas pasadas, debido principalmente a sus diferencias morfológicas específicas que reflejan variación en capacidades funcionales y filogenéticas entre especies (Jaimenson, 1991; Luo *et al.* 2011; Psenicka *et al.* 2008). El estudio ultraestructural de los espermatozoides de muchas especies de peces, ha mostrado que la organización de los orgánulos espermáticos es muy conservativa en miembros de la misma familia o subfamilia (Gusmão-Pompiani *et al.* 2005; Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008; Verma *et al.* 2009). Sin embargo, en los teleósteos es muy difícil correlacionar filogenéticamente la ultraestructura espermática con modelos taxonómicos; ya que los espermatozoides de este grupo muestran gran variedad de tipos y formas incluso dentro de la misma familia sistemática (Furbokc *et al.* 2009; Mattei, 1970, 1991; Zhang *et al.* 2014). Los análisis por MET, han permitido describir de manera más detallada el proceso de espermatogénesis en un gran número de peces, y en las que características únicas han sido observadas, entre especies, así como, correlaciones filogenéticas con otros grupos taxonómicos (Jamieson, 2009^a). En Siluriformes, las características morfológicas espermáticas son exclusivas del orden en comparación a otros grupos de teleósteos (Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008). En algunas familias como Pimelodidae, Doradidae y Heptapteridae por ejemplo, un tipo especial de espermatogénesis ha sido caracterizado por MET, la cual no es compartida con ningún otro orden (Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008; Quagio-Grassiotto *et al.* 2011). El análisis de la morfología y ultraestructura espermática por MET, ha sido también empleada para la evaluación de la fertilidad en peces, cuando son expuestos a algún agente químico o cuando son manipulados para bancos de genoma mediante criopreservación (Billard *et al.* 2000; Verma *et al.* 2009).

1.2.17. Contenido Total de ADN y Nivel de Ploidía

Las variaciones en el contenido nuclear o de ADN en animales, proveen evidencia útil sobre el nivel de ploidía, la cual puede ayudar a comparar especies parcialmente relacionadas (Jianxun *et al.* 1991). El contenido de ADN en cada célula, es constante en la mayoría de las células somáticas de un organismo y las células espermáticas, contienen solo la mitad de dicho material (Hardie y Hebert, 2004; Pinkel *et al.* 1982). La relación entre el ADN y el tamaño del número de genes es confusa, pero la relación entre el contenido de ADN de una célula y el tamaño es análogo, ya que cuando las células homólogas son comparadas; a mayor contenido de ADN, mayor tamaño celular se observa (Mirsky y Ris, 1950). En los peces teleósteos y principalmente en Siluriformes, el tamaño del genoma es muy variado, el cual va desde 1.13 pg en *Pimelodella sp.*, en condición diploide hasta 4.9 pg en *Hypostomus sp.* (Fenerich *et al.* 2004). Estos cambios del tamaño del genoma se han asociado a procesos de especiación, entre diversos grupos (Hardie y Hebert, 2004). Sin embargo, pequeñas variaciones de ADN, se han relacionado con las metodologías empleadas durante el cálculo del tamaño real del genoma (Ciudad *et al.* 2002). La citometría de flujo, es una de las técnicas más sensibles que ha sido empleada para cuantificar el contenido total de ADN celular, en muchas especies de animales, incluyendo los vertebrados desde peces, mamíferos y algunos moluscos (Birstein *et al.* 1993; Ciudad *et al.* 2002; Rodríguez-Juiz *et al.* 1996). Sin embargo, esta requiere del empleo de una muestra estándar del contenido de total de ADN de una especie conocida, la cual en ocasiones no está relacionada con las especie que se quiere trabajar (Ciudad *et al.* 2002). Gracias a su precisión, objetividad, alta velocidad y relativa simplicidad, el análisis por citometría de flujo ha sido también empleado en la cuantificación del genoma en especies de peces con nivel de ploidía mayor (3N, 4N, 5N, etc.) a la condición normal (2N); con valores estrechamente relacionados con respecto al tamaño celular, así como, en la identificación de cromosomas sexuales en algunas especies de peces (Thorgaard *et al.* 1982; Zhang y Arai, 1996).

1.2.18. Parámetros Químicos, Bioquímicos y Lipídicos del Plasma Seminal

En la mayoría de los peces la espermatogénesis es de tipo quística y los espermatozoides son liberados dentro del sistema de ductos eferentes en el testículo, donde son sujetos a la fase de maduración al final de la espermatogénesis, o llamada espermiogénesis o espermiación (Hoar *et al.* 1983). Durante esta fase, el epitelio testicular produce el plasma seminal, como un fluido de componentes bioquímicos múltiples que rodean a los espermatozoides (Billard, 1986). El papel principal del plasma seminal, es crear un medio óptimo para almacenar los espermatozoides, también evitar la activación, mantiene el metabolismo que preserva la viabilidad y energía para activar la motilidad (Shaliutina, 2013). Además de la morfología celular, la densidad, el volumen, la motilidad y la capacidad de fertilización, la osmolaridad y composición del plasma seminal han sido unos de los parámetros más empleados para medir la calidad espermática en peces (Alavi *et al.* 2008). En la mayoría de los peces teleósteos, los espermatozoides están inactivos en el plasma seminal en los testículos. Factores como la osmolaridad en Ciprínidos; la presión osmótica, concentración de K^+ , concentración de glucosa y pH del plasma seminal \geq a 7.0 en Salmónidos y proteínas específicas del plasma seminal con 120 kDa en cíclidos; son factores que inhiben la motilidad espermática en peces dulceacuícolas (Tabares *et al.* 2005; Taati *et al.* 2010; Verma *et al.* 2009).

En los peces, variaciones de parámetros químicos, bioquímicos y lipídicos se presentan en la misma familia y especies (Verma *et al.*, 2009). Tales variaciones se encuentran asociadas principalmente, a los procesos de reproducción anual (Rouxel *et al.* 2008; Kuradomi *et al.* 2016), o en ciclos reproductivos a lo largo del año (Borges *et al.* 2005). El conocimiento de los componentes del plasma seminal en peces, ha sido empleado para el desarrollo de SRVE, las cuales permiten la manipulación de los gametos con fines de reproducción artificial, manipulación cromosómica o criopreservación (Aramli *et al.* 2013; Martínez *et al.* 2011; Psenicka *et al.* 2008). En la acuicultura el adecuado conocimiento de las características químicas y físicas del semen, permiten el control y la producción exitosa de larvas en los sistemas de cultivo (Borges *et al.* 2005).

1.3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevos procedimientos y herramientas para su empleo en biología y genética, ha proporcionado nuevas metodologías para el buen uso, manejo apropiado de los recursos provenientes del medio natural y de la acuicultura, tales herramientas han provisto de beneficios que han favorecido la producción masiva y cultivo de organismos acuáticos (Arai, 2001; Purdom, 1983). El discernimiento de los fenómenos y aspectos básicos de la biología y fisiología reproductiva de los espermatozoides, como son activación, motilidad, morfología, tamaño, contenido de ADN, condición del núcleo, entre otras, son una condicionante de suma importancia para el empleo de células espermáticas y óvulos con fines reproductivos, de mejoramiento genético; de su empleo en ciencia básica y aplicada. Una de esas herramientas, es la encaminada a la inactivación genética de los gametos (espermatozoides/óvulos) mediante algún tipo de tratamiento, sea químico (azul de toluidina, dimetil-sulfoxido, etc) o físico (rayos gamma, rayos X y rayos UV) y a la creación de poblaciones de peces con material genético de origen materno (ginogénesis) y paterno (androgénesis) (Arias-Rodriguez *et al.* 2004; Komen y Thorgaard, 2007). Entre tales opciones para la inactivación genética de espermatozoides, la luz UV, ha favorecido seguridad de operación, bajos costos en su empleo y eficiencia en la destrucción del ADN espermático (Arai *et al.* 1984; Arias-Rodriguez *et al.* 2004; Cristopher *et al.* 2009; Li *et al.* 1999; Varcарcel *et al.* 1994). El objetivo de hacerse de los beneficios de la correcta inactivación del genoma paterno ha permitido la generación de poblaciones de un solo sexo, poblaciones isogénicas (descendencia parecida a la madre, pero no entre ellas) y líneas clónales, que tienen particularidades por su interés en acuicultura (Komen y Thorgaard, 2007; Kang *et al.* 2015; Nowosad *et al.* 2015). El éxito en la inducción artificial de ginogénesis se ha relacionado principalmente con la capacidad de fertilización de los espermatozoides, después de la exposición a la luz UV, la evaluación de parámetros como: Motilidad, volumen espermático, concentración de espermatozoides, parámetros químicos y bioquímicos del plasma seminal y morfología espermática, han sido empleados como indicadores de una buena calidad espermática y éxito de fertilización (Aral *et al.* 2007). Sin embargo, pocos han sido los estudios enfocados a evaluar los efectos sobre la fisiología reproductiva de los espermatozoides cuando son tratados con luz UV; considerando los efectos directos sobre la microestructura espermática (flagelo, región espermática media y cabeza) y el funcionamiento extracelular (membranas y receptores de membrana) e intracelular (núcleo

y mitocondrias) cuando se induce la ginogénesis artificial, ya que tales estructuras son indispensables para lograr la fertilización. El bagre tropical *R. laticauda*, es una especie endémica del sureste mexicano, además de su capacidad de habitar medios poco favorables y rápido crecimiento, puede ser una alternativa para fines como la acuicultura y manipulación de gametos. Sin embargo, el desconocimiento de aspectos de su biología y fisiología no han permitido tal propósito. Por ello, el objetivo principal del presente trabajo fue estudiar diversos aspectos de la biología y fisiología reproductiva de los espermatozoides del bagre tropical *R. laticauda* como son: Tiempo de motilidad, porcentajes de motilidad, tipo de movimiento, análisis estructural espermático por MOP, MEB, MET, componentes químicos y bioquímicos del plasma seminal, contenido total de ADN, tamaño del genoma espermático y tamaño de la cabeza espermática por citometría multiparamétrica. Así mismo, establecer las mejores dosis de radiación ($0.1-1.1 J/cm^2$) por luz UV para la correcta inactivación del material paterno, como primer paso para la inducción artificial de ginogénesis en la especie, basados en estudios de fisiología como; tiempo de motilidad, porcentajes de motilidad, tipo de movimiento, análisis estructural espermático por MOP, MEB, porcentajes de células vivas/muertas y en apoptosis, así como, el daño al ADN mediante el ensayo de dispersión de ADN en minigeles de agarosa.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Describir la biología, la fisiología espermática básica y el efecto de la radiación ultravioleta sobre la fisiología y la integridad extracelular e intracelular de las células espermáticas del bagre tropical *R. laticauda*.

1.4.2. Objetivos Particulares de los Estudios de Biología y Fisiología Básica

1. Determinar el tiempo de motilidad, los porcentajes de motilidad y el número promedio de espermatozoides en la especie.
2. Establecer el tamaño de las microestructuras de las células espermáticas por Microscopía Óptica (MOP).
3. Describir detalladamente las microestructuras y morfología espermática en la especie por Microscopía Óptica (MOP), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).
4. Describir los parámetros químicos, bioquímicos y lipídicos del líquido seminal de la especie.
5. Establecer el tamaño de la cabeza espermática por citometría fluorescente.
6. Determinar el contenido total de ADN, de las células espermáticas por citometría de flujo.

1.4.3. Objetivos Particulares en la Evaluación del Efecto de la Luz UV

1. Evaluar la calidad espermática de las muestras control y aquellas tratadas con luz UV, basada en los porcentajes de células activas, tiempos de motilidad y tipos de movimiento.
2. Calcular el daño extracelular de las muestras control y de aquellas tratadas con luz UV, basada en el análisis por microscopía óptica después de la tinción con giemsa.
3. Discernir la viabilidad espermática (muertas/vivas/apoptóticas) de las muestras control y aquellas tratadas con luz UV, basado en citometría multiparamétrica fluorescente.

4. Calcular el daño extracelular de las muestras control y aquellas tratadas con luz UV, basada en el análisis con MEB.
5. Valorar el daño intracelular y extracelular por medio del método de dispersión proteica y de ADN.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

1.5. SECCIÓN EXTENSA DE MATERIALES Y MÉTODOS

1.5.1. Sitio de Recolecta, Transporte y Mantenimiento de los Especímenes

Los especímenes fueron capturados en la ribera del río Grijalva en la comunidad de Chilapa en el municipio de Centla, Tabasco, México. (18°11'30.93"N, 92°42'43.64"O) mediante pesca artesanal por anzuelo y carnada a base de vísceras de pollo. Posteriormente, fueron transportados vivos a las instalaciones del Laboratorio en Genética y Ecofisiología (LGE), de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACBiol-UJAT); en contenedores térmicos con aireación constante mediante bombas portátiles. Al arribo a las instalaciones del LGE, los reproductores fueron aclimatados en el área de control fototérmico ambiental (agua/aire) que consiste en una habitación cerrada y equipada con sistema de recirculación (filtros de agua y luz UV) y 10 tanques con capacidad de 1,800 litros, aireación constante y ciclo de (6/6 horas) luz/oscuridad a 31.2 ± 0.2 °C. A cada tanque, se le suministro 5 ml de antibiótico (Inverfer B12. CIFER, S.A. de C.V) con el fin de eliminar patógenos que pudieran provocar daños a los reproductores. Durante la temporada de reproducción baja, los reproductores fueron mantenidos en tanques de geomembrana con capacidad de 85,000- ochenta y cinco mil-litros. Los peces, fueron alimentados dos veces al día, con dieta a base de pelletizado preparado comercialmente (Growfish Api-Tilapia 2, 35% de proteína, Malta-Clayton®) y crías vivas de tilapia. La recolecta se basó en el permiso de pesca de fomento, bajo el cual fueron capturados los especímenes para los experimentos; **PRMN/DGOPA-009/2015/01170** con número de oficio **100.6/8/4/27/01170** que fue emitido por la SAGARPA-CONAPESCA.

1.5.2. Generalidades de los Estudios de Biología, Fisiología y Experimentos con UV

El desarrollo de la presente tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, contempló la cobertura de varios estudios de biología, fisiología y experimentos con UV; que permitieron cumplir con los objetivos planteados en este documento. Para ello fue necesario describir la fisiología y biología de las células espermáticas del bagre tropical con lo cual fue posible establecer los parámetros de la motilidad espermática (porcentajes de células motiles, tipo de movimiento y tiempo de motilidad en segundos) por MOP, la morfología espermática (por

MOP y citometría fluorescente), la ultraestructuras de las células espermáticas (por MEB y MET), el contenido de ADN, tamaño del genoma, osmolaridad seminal, química y bioquímica del fluido espermático, tamaño de la cabeza por citometría multiparamétrica (**Tabla 4**). Por otro lado, también se evaluó el efecto de once dosis de radiación ultravioleta (UV) sobre los parámetros fisiológicos y biológicos estructurales de las células espermáticas del bagre tropical por MOP, MEB, porcentajes de células vivas/muertas y en apoptosis por citometría multiparamétrica fluorescente. Así como, el daño al ADN mediante el análisis de dispersión de ADN en minigeles. Como esquema general, se emplearon tres tratamientos (**A, B y C**) cada uno con tres replicas (**Tabla 4 y 6**) para evaluar el efecto de la luz UV, en acuerdo con lo recomendado por Arias-Rodríguez *et al.* (2010).

1.5.3. Obtención de Gametos

La obtención de las muestras espermáticas se realizó, con base en lo recomendado por Arias-Rodríguez *et al.* (2016). Los reproductores fueron seleccionados al azar y anestesiados con Metasulfonato de Tricaina (MS222) 0.22g/litro de agua. Posteriormente fueron inyectados con 150 UI por kilogramo de peso de Gonadotropina Coriónica Bovina (GCB) (Loeffler®), con el fin de obtener mayor cantidad de semen, los reproductores se colocaron en un tanque rectangular con capacidad de 5,000 litros por 24 horas aproximadamente a 30.0°C ±1.0°C. Para la colecta de semen, se aplicó ligera presión sobre el abdomen del pez, con dirección cabeza a cola, teniendo siempre en cuenta que las muestras de semen no entraran en contacto con excreta u orina lo cual pudiera activar a los espermatozoides y reducir la calidad de las muestras de semen; para ello las muestras fueron recolectadas con una jeringa estéril de insulina con capacidad de 1 ml (completamente secos) y colocadas en un contenedor térmico a 4°C hasta el inicio de los experimentos y no mayor a 30 min después de la recolecta (Arias-Rodríguez *et al.* 2004; Jiménez-Trinidad, 2016).

Tabla 4. Generalidades de los experimentos empleados para la evaluación de la biología, fisiología y efecto de la luz UV sobre las células espermáticas del juil tropical *R. laticauda*.

Parámetros	Número de especímenes empleados	Replicas por espécimen	Número total de células analizadas
Fisiología básica			
Tiempo de motilidad, porcentajes de motilidad, tipo de motilidad y número de espermatozoides.	50	3	5,679,650,000 (solo para el número de espermatozoides)
Morfometría espermática por MOP.	17	30	510
Descripción espermática por MEB.	3	30	90
Ultraestructura espermática por MET.	3	30	90
Tamaño de la cabeza espermática por citometría multiparamétrica.	10	8	3,297,085
Descripción química y bioquímica del plasma seminal.	10	3	
Contenido total de ADN, nivel de ploidía y tamaño del genoma.	10	3	51,372
Subtotal	103	107	5,682,999,147
Efecto de la radiación UV			
Tiempo de motilidad, porcentajes de motilidad, tipo de motilidad y número de espermatozoides	30	3	1,522,232,500 (solo para el número de espermatozoides)
Daño espermático del UV por MOP	7	30	210
Daño espermático del UV por MEB	5	30	150
Viabilidad espermática por citometría fluorescente multiparamétrica	5	8	9,820,000 células/ml
Análisis de dispersión de ADN	5	30	150
Subtotal	52	101	1,532,053,010
Total	155	101	7,215,052,157
UV= luz ultravioleta, MOP= Microscopia Óptica, MEB= Microscopia Electrónica de Barrido, MET= Microscopia Electrónica de Transmisión.			

1.5.4. Biología y Fisiología Espermática Básica

1.5.4.1. Evaluación de la Motilidad y Movimiento Espermático

Muestras de semen de 50 machos fueron recolectadas como se describió en el apartado 1.5.3. La evaluación de la actividad espermática fue realizada por la mezcla de 1µl de semen, colocado en un tubo de 1.5 ml y activado con 50µl de agua corriente (1:50), rápidamente 10 µl de la mezcla fue colocada en un portaobjetos y cubierto por un cubreobjetos. El tiempo de motilidad y tipo de movimiento, fue registrado desde la activación espermática hasta la completa cesación del movimiento de los espermatozoides del campo observado en acuerdo con lo señalado por Acosta *et al.* (1990) (**Tabla 5**).

Adicionalmente se evaluó el porcentaje de células activas de acuerdo a lo sugerido por Arias-Rodriguez (2001), definiéndose el porcentaje de células motiles en escala del cero al 100%, con intervalos de 10 (p.e 10%, 20%, 30% y hasta 100%). Para todos los experimentos, solo fueron consideradas útiles las muestras de semen de machos con motilidad inicial de cuatro, de acuerdo a la escala de Acosta *et al.* (1990) y mayor al 90% de células activas (Arias-Rodriguez, 2001). Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (Olympus®, BH-2) con los objetivos 40X (400 aumentos) y filtro de interferencia azul.

Tabla 5. Escala gradual del tipo de movimiento para evaluar la calidad espermática señalada por Acosta *et al.* (1990).

Grado 4	Máximo movimiento progresivo de los espermatozoides.
Grado 3	Disminución del movimiento progresivo de los espermatozoides, junto con el incremento de los movimientos laterales que promedian aproximadamente de dos a tres anchos el cuerpo del espermatozoide.
Grado 2	Poco o ningún movimiento progresivo y movimientos laterales, de una o dos veces el ancho del cuerpo del espermatozoide.
Grado 1	Muy poco movimiento de la cabeza de los espermatozoides, junto con el decremento del movimiento del flagelo.
Grado 0	No motilidad ni movimiento progresivo (hacia adelante) de los espermatozoides.

1.5.4.2. Conteo del Número de Espermatozoides

Para el conteo espermático, las muestras fueron fijadas en la solución diluyente (bicarbonato de sodio 5.0 gr + formol 1ml + agua destilada 94ml), en proporción 1:1000 (1 μ l de semen: 999 μ l de solución diluyente) (Coffin, 1986) y mantenidas a 4°C hasta el momento del análisis microscópico con el objetivo 40X (400 aumentos) y filtro de interferencia azul. Para cada conteo, se utilizaron cuatro trayectorias (**Figura 5**) de acuerdo con Arias-Rodriguez, (2001).

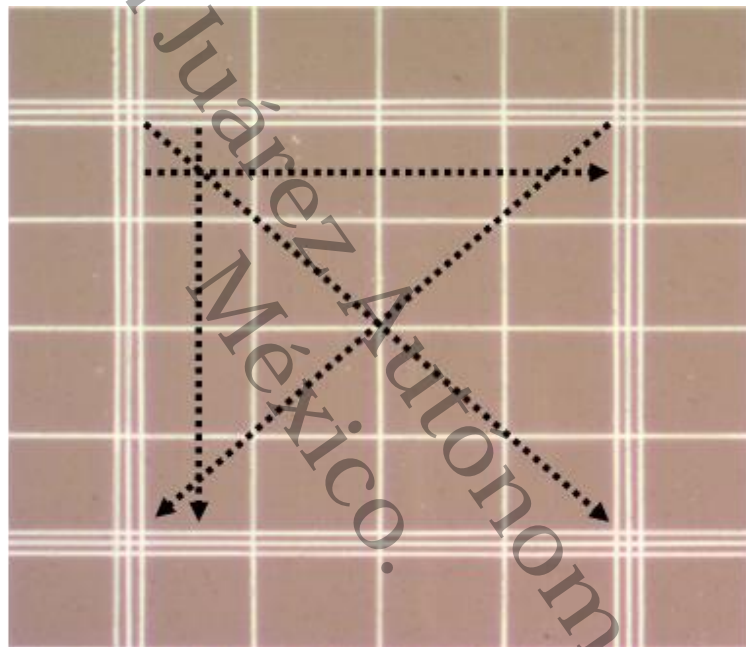


Figura. 5. Esquema representativo de los cuadrantes de una de las cámaras de un hematocimetro y las trayectorias (flechas) que se emplearon en los conteos de los espermatozoides.

El número de espermatozoides por mililitro, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Número de espermatozoides/ml de semen} = (\bar{X}) (4) (1000) (1000)$$

Dónde:

\bar{X} = Número promedio de espermatozoides por muestra.

4 = Número de cuadros contados en cada trayectoria.

1000 = Volumen total de muestra.

1:1000 = Dilución de conteo empleada o volumen total.

Ejemplo:

Número de espermatozoides = (18.5) (4) (1000) (1000)

Número de espermatozoides = 74,000,000 /ml

1.5.4.3. Morfometría Espermática por Microscopia Óptica (MOP)

Para establecer el tamaño de las microestructuras espermáticas por MOP, se empleó el método propuesto por Arias-Rodriguez *et al.* (2016). Muestras de semen de 17 machos, fueron recolectadas en apego a lo descrito en el apartado 1.5.3; 1 µl de semen puro fue tomado de cada macho y mezclado en 100 µl de glutaraldehído al 2.5% preparado en buffer de fosfatos a 0.1 M (pH 7.4) y mantenido a 4 °C. Luego 10 µl de la muestra espermática, fue depositada en uno de los extremos de un portaobjetos con el fin de realizar un frotis delgado y homogéneo, con mucho cuidado ya que los espermatozoides presentan zonas muy delicadas que pudieran dañarse, se dejó secar a temperatura ambiente (22±1 °C). Dichas muestras, fueron teñidas con la solución de giemsa al 10% por 10 minutos, que se preparó con buffer de fosfatos a pH 7.4. Las preparaciones espermáticas, fueron lavadas suavemente con abundante agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las muestras fueron almacenadas en un portalaminillas hermético, en ausencia de luz y mantenido en refrigeración a 4°C, hasta el momento del análisis bajo el microscopio óptico. Para el análisis de las preparaciones espermáticas, se

empleó el microscopio óptico Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®), equipado con una cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®). Las estructuras de 30 células espermáticas (ancho de la cabeza, largo de la cabeza, área de la cabeza, área de la pieza media, ancho del flagelo y longitud del flagelo) de cada macho fueron analizadas con las herramientas del programa ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016) y expresadas en micrómetros (μm).

1.5.4.4. Descripción de las Microestructuras Espermáticas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La estructura fina de las células espermáticas fueron analizadas siguiendo la metodología empleada por Arias-Rodriguez *et al.* (2010). Muestras de semen de tres machos seleccionados aleatoriamente, fueron recolectadas como se describió en el apartado 1.5.3. Las muestras de semen fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% neutralizado en 0.1 M de buffer de fosfatos (pH 7.4) en proporción 10:1000 (10 μl de semen puro: 990 μl de glutaraldehído al 2.5%) y mantenida en refrigeración a 4^oC hasta el análisis. Las muestras fueron lavadas tres veces con buffer de fosfatos (PBS) con el fin de eliminar los restos del fijador, para ello las muestras fueron centrifugadas a 1000 r.p.m durante cinco min y eliminado el sobrenadante hasta completar tres lavados.

Una gota de muestra espermática limpia, fue montado en un portaobjeto tipo Superfrost Plus® (Thermo Scientific®) y secado a temperatura ambiente. Las muestras fueron deshidratadas en una serie de etanol (25, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%) por 5 min en cada etapa. Posteriormente fueron colocadas en etanol al 100% antes de ser sometidas al punto crítico de secado con el equipo CPD-030 Dryer (Bal-Tec AG Balzers, Liechtenstein). Posterior al secado, las muestras fueron recubiertas con oro-paladio, mediante dispersión con la recubridora SCD-050 Sputter Coater (Bal-Tec AG Balzers, Liechtenstein). Las preparaciones espermáticas se escanearon y digitalizaron con el Microscopio Electrónico de Barrido 6380-LV (JEOL Ltd. Japan) a 25 V que se encuentra en las instalaciones del Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencia en la Universidad de Charles en la ciudad de Praga de la República Checa en la Unión Europea. Las estructuras finas de 30 células espermáticas, fueron analizadas y expresadas en micrómetros como sigue: Ancho de la cabeza, largo de la cabeza, área de la cabeza, área de la pieza media, ancho del flagelo y longitud total del flagelo con las herramientas del software ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016).

1.5.4.5. Descripción de la Ultraestructura Espermática por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

El análisis de la morfología y ultraestructura de los espermatozoides del juil tropical, fue realizado mediante la observación por MET de acuerdo a la metodología descrita por Madhavi *et al.* (2015). Para ello, tres machos fueron seleccionados aleatoriamente, el semen fue recolectado tal como se describe en el apartado 1.5.3. Las muestras de semen fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% neutralizado en 0.1 M de buffer de fosfatos (pH 7.4) en proporción 10:1000 (10 μ l de semen puro: 990 μ l de glutaraldehído) y mantenidos en refrigeración a 4°C. Luego, las muestras fueron lavadas tres veces con buffer de fosfatos (PBS) con el fin de eliminar los restos del fijador. Posteriormente fueron deshidratadas en una serie de acetonas (25, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%), 10 min en cada etapa. Después las muestras de semen fueron embebidas en resina de EPON la cual se preparó en proporción 2:1 (solución A: Epon 812 62 ml/DDSA 100 ml y Solución B: Epon 812 100 ml/nmA 89ml). Posteriormente las muestras fueron colocadas en moldes rellenas con resina fresca y almacenada en una estufa con temperatura creciente 36°C, 45°C, 50°C y 60°C por 60 min en cada etapa hasta completar la polimerización. La microtomea fue realizada mediante el empleo del ultramicrotomo Ultracut EM UC7 (Leica®). Secciones ultradelgadas de 60 a 80 nm de espesor, fueron cortadas, colocadas sobre rejillas de cobre y secadas a temperatura ambiente. Las muestras fueron teñidas en una solución al 2% de acetato de Uranilo, diluido en 50% de alcohol por 10 min y en la solución de Reynolds de nitrato de plomo por 10 min, secada en una estufa a 37°C. Las microfotografías de las ultraestructuras, fueron tomadas empleando el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 1011 (JEOL Ltd. Japan), en ello 30 células fueron analizadas con la ayuda de las herramientas del programa ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016) y expresadas en nanómetros (nm).

1.5.4.6. Descripción de los Componentes Químicos, Bioquímicos y Lipídicos del Plasma Seminal

Para determinar los componentes químicos, bioquímicos y lipídicos del plasma seminal se empleó el equipo A25 Random Access Analyzer (Byosystems®) siguiendo la metodología recomendada por el fabricante. Las muestras de semen de 10 especímenes maduros del bagre tropical fueron recolectadas en apego a lo descrito en el apartado 1.5.3. El plasma seminal de cada macho, fue tomado después de centrifugar el semen puro a 6000 r.p.m por 10 min, dos veces para evitar la contaminación del plasma seminal con células espermáticas o sanguíneas. Las muestras del plasma seminal, fueron almacenadas en críoviales estériles de 1.5 ml a -20°C hasta su análisis. De cada muestra 100 µl del plasma seminal fueron colocado en cada cubeta del equipo A25 Random Access Analyzer (Byosystems®). Los siguientes parámetros fueron seleccionados para el análisis automatizado: Nitrato NO₃ (ppm), nitrito NO₂ (ppm), calcio (mg/dl), sodio (mM/L), potasio (mM/L), cloro (mM/L), magnesio (mg/dl), pH, dureza (ppm), alcalinidad (ppm), ácido úrico (mg/d), urea (mg/dl), nitrógeno urea (mg/dl), bilirrubina total (mg/dl), bilirrubina conjugada (mg/dl), albumina sérica (g/dl), alanina (UI/L), aspartato (UI/L), fosfatasa alcalina (UI/L), lactato deshidrogenasa (UI/L), creatinina (mg/dl), proteína total (g/dl), glucosa (g/dl), triglicéridos (mg/dl) y colesterol (mg/dl). De cada parámetro, tres replicas fueron programadas por cada macho empleado.

1.5.4.7. Osmolaridad del Plasma Seminal

Muestras triplicadas de semen de 10 especímenes fueron elegidas aleatoriamente y la recolecta del semen se realizó como se describió en el apartado 1.5.3. La osmolaridad se evaluó con el equipo Vapro 5520 Osmometer® (Wescor. Inc. U.S.A), el protocolo que se siguió fue el del fabricante. Previamente se cercioró que la cámara del portamuestra del equipo estuviera completamente seca y limpia. Un disco de papel fue colocado en la depresión central del portamuestras del osmómetro, en este punto se verificó que únicamente se colocara un disco de papel para evitar confusión durante la lectura de las muestras. Con una punta limpia y seca, se tomó una gota (10 µl) de semen y se colocó sobre el disco de papel teniendo siempre en cuenta que la punta de la micropipeta no hiciera contacto con el disco y que esta fuera absorbida por completo. Cargada la cámara del portamuestra, se prosiguió con la lectura que

lleva en promedio 20 seg. El análisis se realizó de modo automático y la unidad de medida fue expresada en mOsmol/kg.

1.5.4.8 Citometría Fluorescente Para Determinar el Contenido Total de Nucleótidos y Tamaño Total del Genoma

En el análisis de citometría fluorescente de flujo, se procedió con las recomendaciones de Arias-Rodriguez (2007). Las muestras de sangre fueron obtenidas de tres hembras/cinco machos (diploides), que fueron recolectadas y mantenidas conforme al apartado **1.5.3**; y adicionalmente también se obtuvieron muestras de semen de dos machos maduros de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, cuyo origen fue el lote de reproductores de la Instalación Acuícola de la Universidad Estatal de Washington, Campus Pullman, en los Estados Unidos de Norteamérica; todas ellas se emplearon como muestras de calibración y control. Las muestras de semen se obtuvieron de cinco machos maduros del juil tropical. En todos los casos, los especímenes fueron anestesiados conforme a lo señalado en el apartado **1.5.3**; las muestras de sangre se obtuvieron con el empleo de jeringas estériles de plástico de 3 ml tipo 23Gx25mm, para uso pediátrico (DL Médica ®) por punción de la vena caudal. Mientras que las de semen, fueron recolectadas conforme a lo señalado en el apartado **1.5.3**. Las muestras de sangre y semen, fueron centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 5 minutos, con el propósito de separar el paquete celular del plasma sanguíneo o espermático; posteriormente los paquetes celulares fueron fijados durante 10 minutos en 500 µl de glutaraldehído al 2.5% en 0.1 M de BFS y pH 7.4 a 4°C, luego se centrifugaron por tres minutos a 6000 r.p.m., consecutivamente se extrajo el sobrenadante y se agregaron 1000 µl de la solución de glutaraldehído para resuspender las células, remplazar el fijador y eliminar restos de plasma; finalmente se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

Durante el análisis citométrico, se tomaron 50 µl de la suspensión celular y esta fue teñida con 5 µl de yoduro de propidio durante 60 segundos. Posteriormente, fueron resuspendidas en 5 ml de buffer de fosfatos (BFS o PBS) y se analizaron en el citómetro de fluorescencia automática, BD-FACSCalibur™ Flow Cytometer (Becton-Dickinson© 2007), mediante la BD FACStation™ (Becton-Dickinson© 2007) y con el empleo del programa BD CellQuest Pro FACStation para la adquisición y análisis general de los datos (Becton-Dickinson™).

Para determinar el tamaño del genoma y el contenido total del ADN, inicialmente fueron analizadas las muestras control o de calibración del semen de dos especímenes macho de la trucha arcoíris *O. mykiss*; posteriormente se analizaron las células mitóticas de origen hematopoyético de los especímenes del juil tropical y finalmente se analizaron las muestras de semen de los machos del juil tropical. Cada muestra examinada se hizo por triplicado y en acuerdo con las recomendaciones de estudios previos.

El contenido total de nucleótidos (ADN total) se calculó siguiendo la fórmula ajustada en acuerdo con Hinegardner (1976); Hartley y Horne, (1985); Tiersch *et al.* (1989); (1998); (1992); (1994); (2003); Hardie *et al.* (2004).

Para determinar el contenido (1C=haploide) de ADN nuclear espermático haploide se empleó la siguiente fórmula (en picogramos=pg)= (Contenido control diploide de ADN en picogramos de las células sanguíneas de *O. mykiss*/2) x (Número de canal de la muestra espermática de *R. laticauda*)/Número de canal de la muestra espermática control de *O. mykiss*; y para el contenido (2C=diploide) de ADN nuclear eritrocitario diploide (pg)= (Contenido control diploide de ADN en picogramos de las células sanguíneas de *O. mykiss*) x (Número de canal de la muestra sanguínea de *R. laticauda*)/(Número de canal de la muestra espermática control de *O. mykiss*) X (2).

El valor-2C de 5.5 picogramos estimado como estándar de la trucha arcoíris *O. mykiss* (Hartley y Horne, 1985; Tiersch *et al.* 1989), fue empleado como muestra de referencia para el cálculo del contenido haploide y diploide de ADN en el bagre tropical.

El tamaño del genoma o valor-C en picogramos (o masa de ADN en picogramos), que representa una copia de la información genética nuclear (equivalente a 1C), fue determinada considerando que 1 pg de ADN es igual 0.978×10^9 pares de bases (bp) (Doležel *et al.* 2007). Por lo anterior el tamaño del genoma o valor-C en picogramos fue calculado empleando la fórmula propuesta por Doležel *et al.* (1992), (1994), (1998), (2003) y a como sigue: Tamaño del genoma de *R. laticauda* en pares de bases (bp)= (0.978×10^9) (contenido haploide y diploide de ADN en pg de *R. laticauda*).

Ejemplo para el contenido total de ADN en pg para células espermáticas 1N:

$$2C (pg) = \frac{5.5 \times G1}{G2}$$

$$2C (pg) = \frac{5.5 \times 92.5}{200} = 2.54 pg$$

2C= Contenido total de ADN nuclear en picogramos (pg) desconocido

5.5= Valor del contenido diploide de ADN nuclear de referencia de la trucha arcoíris

G1= Valor del canal de la muestra espermática del bagre tropical

G2= Valor del canal de la trucha arcoíris

Ejemplo para el tamaño del genoma para células espermáticas 1N:

$$TG (pb) = (0.978 \times 10^9) \times 2C$$

$$TG (pb) = 0.978 \times 10^9 \times 2.54$$

$$TG (pb) = 2.484 \times 10^{10} pb \text{ o } (2,487,787,500 pb)$$

TG= Tamaño del genoma haploide o diploide en pares de bases (pb) desconocido.

0.978×10^9 = Valor absoluto del peso molecular de un par de nucleótidos.

2C= Valor del contenido total de ADN de los espermatozoides o eritrocitos de *R. laticauda*

1.5.4.9. Establecimiento del Tamaño de la Cabeza Espermática por Citometría Multiparamétrica

Para determinar el tamaño de la cabeza de los espermatozoides se empleó el citómetro Tali™ Image Based Cytometer (Invitrogen™). El cual se encuentra integrado por tres canales luminosos (campo claro, lámpara de fluorescencia verde (Green channel LED: 458±20nm) y lámpara de fluorescencia roja (Red channel LED: 530±20nm) con filtros verdes (Green Channel: 466/40 EX, 495 LP Di, 525/50 EM) y rojo (Red channel: 543/22 EX, 580 LP Di, 585 LP EM). La plataforma de ensayo utiliza óptica en campo claro y fluorescente, mediante el análisis algorítmico de las imágenes de las células en suspensión con el programa Tali™ Image Based Cytometer Firmware ver. 1.0.3 (Invitrogen™). Para el análisis de las muestras, se siguió las recomendaciones del Tali™ Apoptosis Assay Kit-Anexin “V” Alexa Fluor® 488 and Propidium Iodide (Invitrogen™) con algunas modificaciones. Las muestras espermáticas de 10 machos, fueron recolectadas de acuerdo a lo señalado en el apartado 1.5.3; 10 µl de semen fue diluido en 500 µl de la Solución Salina Inmovilizadora de la Motilidad (SSIM) la cual mantiene a los espermatozoides inmóviles sin afectar la sobrevivencia y estructura celular (López-Hernández, 2013; Jiménez-Trinidad, 2016). Dependiendo de la concentración celular espermática de cada espécimen (sección 1.5.4.2. conteo espermático) de la alícuota (semen/SSIM), se tomó el volumen necesario que contenía en promedio 1×10^5 (100,000 células/ml), concentración requerida por el protocolo Tali™ Apoptosis Assay Kit-Anexin “V” Alexa Fluor® 488 Propidium Iodide (Invitrogen™). Las muestras fueron cosechadas por centrifugación a 6000 r.p.m. por 30 segundos. Posteriormente fue retirado el sobrenadante, que fue sustituido con 50 µl de la SSIM, a dicha mezcla se le colocó 2.5 µl de Anexina “V” Alexa Fluor® 488 y se mantuvo en agitación por 20 minutos mediante el empleo del agitador orbital a 15 rpm en ausencia total de luz y temperatura ambiente $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Concluido el tiempo de hibridación con la Anexina “V” Alexa Fluor® 488, se prosiguió a centrifugar a 6000 r.p.m por 30 segundos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células con 50 µl de la SSIM, seguidamente se le adicionó 1 µl de yoduro de propidio (Tali Invitrogen™), después las muestras fueron trasladadas a una cámara oscura y mantenidas en agitación constante a 15 r.p.m por 5 minutos a temperatura ambiente $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, se prosiguió a cargar 25 µl de la muestra en una de las cámaras del porta muestras de análisis celular (Tali Invitrogen™) evitando la formación de burbujas, pues

la carga se realiza por acción capilar. A continuación se prosiguió a insertar el porta muestras, con la carga celular en el puerto del Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™). Antes de cargar la cámara porta muestras en el Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™), el equipo fue previamente encendido porque las lámparas de fluorescencia requieren de precalentamiento. Durante el análisis óptico de las muestras, fueron seleccionados 20 campos para su análisis por cámara y siguiendo lo especificado en el Tali Image Based Cytometer Firmware 1.0.3 (Invitrogen™). Los conteos de células y el tamaño de la cabeza se analizaron siguiendo las instrucciones y ajustes del programa Tali Image Based Cytometer Firmware 1.0.3 (Invitrogen™). Los resultado del análisis de cada lectura por macho, se agruparon en una base de datos con el programa Microsoft Excel 2010, con ello se les calculó el promedio y desviación estándar.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

1.5.5. Evaluación del Efecto de la Luz UV Sobre la Fisiología e Integridad Espermática

1.5.5.1. Diseño Para el Experimento con Luz Ultravioleta

Los experimentos con UV requirieron del empleo de tres tratamientos (**A**, **B** y **C**) cada uno con tres replicas (**Tabla 6**), en acuerdo con lo recomendado por Arias-Rodriguez *et al.* (2001) y Arias-Rodriguez *et al.* (2004).

Tabla 6. Tratamientos empleados en 52 ejemplares machos del juil tropical *R. laticauda* en los experimentos para evaluar el efecto de la luz UV sobre las células espermáticas.

Tratamientos	Concentración espermática por réplica	Réplicas	Variables
Tratamiento "A" Semen puro sin diluir (Control).	1µl	3	<ul style="list-style-type: none">• Tiempo de motilidad.• Porcentajes de motilidad.• Tipo de movimiento.
Tratamiento "B" Semen puro + solución salina inactivadora de la motilidad [SSIM] (Control).	500,000/ml	3	<ul style="list-style-type: none">• Tiempo de motilidad.• Porcentajes de motilidad.• Tipo de movimiento.
Tratamiento "C" Semen puro + SSIM + dosis de radiación UV (Tabla 7).	500,000/ml	3	<ul style="list-style-type: none">• Tiempo de motilidad.• Porcentajes de motilidad.• Tipo de movimiento.• Análisis del daño espermático del UV por MOP.• Viabilidad espermática por citometría multiparamétrica fluorescente.• Análisis del daño espermático del UV por MEB.• Análisis de dispersión del ADN espermático.

1.5.5.2. Evaluación de la Calidad Espermática y Mezclado en la SSIM

En las muestras de semen puro (o sin diluir en la **SSIM**) y en las muestras individuales de semen de 30 machos mezcladas en la **SSIM**, se evaluaron los parámetros de calidad espermática como se describió en el apartado **1.5.5**, sobre la biología y fisiología espermática básica. Únicamente fueron consideradas útiles para los experimentos las muestras de semen puro con motilidad en **Grado-4** y porcentajes de células activas $\geq 90\%$, las muestras fueron diluidas en la solución **SSIM** en proporción 1:100 (semen puro: **SSIM**) que se preparó con los siguientes compuestos: (NaCl 0.875 gr, KCl 0.150 gr, CaCl 0.022, MgSO₄ 0.013 gr, Tris 0.242 gr, todo diluido en 100 ml de agua bidestilada) (Lahnsteiner y Patiner, 1998). La **SSIM**, fue previamente probada en la especie, y cumple con el requisito de mantener la viabilidad de los espermatozoides a 4°C (López-Hernández, 2013; Jiménez-Trinidad, 2016). Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (Olympus®, BH-2 Japan) con el objetivo 40X (400 aumentos) y filtro de interferencia azul. Es importante señalar que la dilución espermática en la **SSIM**, fue de aproximadamente 500,000 espermatozoides/ml de solución, en acuerdo con las recomendaciones de López-Hernández, (2013). Para ello, se efectuó el conteo del número de espermatozoides como se describió en el apartado **1.5.6** y se ajustó el número de espermatozoides en acuerdo a lo requerido.

1.5.5.3. Radiación del Esperma con Luz Ultravioleta (UV)

Las dosis de radiación UV (**Tabla 7**), se calcularon siguiendo el modelo matemático de Christensen y Tiersch (1994) y a como sigue:

$$E = (n) (w) (t) / (d^2) (\pi^2)$$

En donde:

E= Exposición total en julios/cm².

n= Número total de lámparas (1).

W= Rendimiento de la lámpara a 254 nm (3.3 Watts).

t= Duración de la exposición en segundos (X).

d^2 = Distancia de la muestra en relación con la lámpara (10 cm).

$$\pi^2= 3.1416$$

Ejemplo:

$$E= (1) (3.3 \text{ W}) (60 \text{ seg}) / (13.499 \text{ cm})^2 (3.1416)^2$$

$$E= 198 \text{ W*seg} / (182.223 \text{ cm}^2) (9.869)$$

$$E= 198 \text{ W*seg} / 1798.358 \text{ cm}^2$$

$$E= 0.1 \text{ J/cm}^2$$

Se evaluaron 11 dosis de radiación UV en las muestras de semen de 30 machos (tres replicas por cada macho), para dicha actividad se empleó una cámara UV que fue construida con una lámpara germicida de 15W (General Electric, G15T8) (Construcción por Salomón Páramo-Delgadillo, 2012, DACBIOL-UJAT) y a la cual se le implemento un agitador orbital (Orbit M60, Labnet).

Tabla 7. Dosis de radiación ultravioleta (UV) en Julios/cm² y tiempos de exposición a la radiación UV.

Tiempo en seg.	27	51	76	102	127	152	178	203	228	255	279
J/cm ²	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1

Seg= segundos, J/cm²= Julios/centímetro cuadrado

Las dosis de radiación que se observan en la **Tabla 7**, se aplicaron sobre las muestras experimentales (tratamiento “C”) por selección aleatoria. Para analizar cada una de las dosis de radiación, se utilizaron 2 ml de la mezcla (semen + SSIM) por replica y se colocaron en tres cajas petri individuales de vidrio de 5 cm de diámetro interior. El grosor de la película de la muestra (semen + extender) de semen de 0.102 cm, se calculó de acuerdo con Arias-Rodriguez, (2001) con la siguiente fórmula:

$$h= v/ \pi r^2$$

Dónde:

h= Altura de la película (cm)

v= Volumen total de la muestra por caja Petri de 5 cm (2 ml)

π = Valor de pi = 3.1416

r^2 = Radio de la caja Petri elevado al cuadrado (2.5 cm)

Ejemplo

$$h = 2 / (3.1416) (2.5)^2$$

$$h = 2 / 19.635$$

$$h = 0.102 \text{ mm}$$

La (s) muestra (s) de semen irradiadas, fueron previamente situadas en cada caja petri, sobre una plataforma de madera (apropiada para el cabezal del agitador) y con orientación paralela a la de lámpara UV. Las muestras de semen, se mantuvieron en la cámara UV en movimiento continuo a 20 r.p.m y durante el tiempo de exposición estimado para cada dosis UV a $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1$.

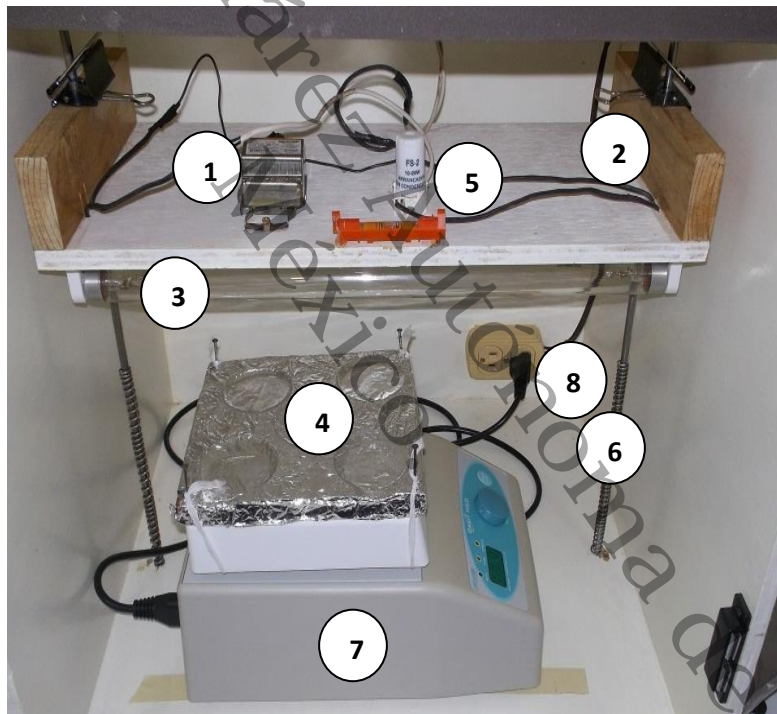


Fig. 6. Componentes internos de la cámara de radiación UV, que fue empleada para la inactivación genética del esperma del bagre tropical *R. laticauda*. 1= balastro, 2= base de la lámpara UV, 3= lámpara UV, 4= bases para cajas petri, 5= arrancador, 6= soporte con elevador ajustable de altura de lámpara, 7= mezclador y 8= fuente de energía.

1.5.5.4. Calidad Espermática de las Muestras Control y Aquellas Tratadas con Luz UV

A las muestras de los tres tratamientos “A, B y C” se les evaluó, el tiempo de motilidad, el porcentaje de células activas y el tipo de movimiento; como se describió en el apartado 1.5.5 en el estudio sobre la biología y fisiología espermática básica.

1.5.5.5. Viabilidad Espermática por Citometría Fluorescente Multiparamétrica (Vivos/Muertos/Apoptosis)

Para la evaluación de la viabilidad espermática (vivos/muertos/apoptóticos), considerando los vivos, muertos y la proporción de muerte espermática programada por apoptosis, se empleó el citómetro Tali™ Image Based Cytometer (Invitrogen™) en cinco machos de la especie. Para el análisis de las muestras, se siguió las recomendaciones del Tali™ Apoptosis Assay Kit-Anexin V Alexa Fluor® 488 and Propidium Iodide (Invitrogen™) tal como se describió en el apartado 1.5.13.

1.5.5.6. Viabilidad Espermática por Microscopía Óptica y Tinción con Giemsa

Para identificar el efecto de la radiación UV sobre las microestructuras celulares espermáticas (perdida de simetría celular), se empleó el análisis por microscopía óptica y tinción con giemsa en siete machos de la especie, para ello se empleó la metodología y criterio recomendado por Arias-Rodriguez (2016) en apego a lo descrito en el apartado 1.5.7; empleado en el estudio sobre la biología y fisiología espermática básica.

1.5.5.7. Identificación del Daño Espermático por MEB

Para identificar y analizar el efecto de la luz UV sobre la estructura fina (pérdida de simetría celular) y componentes ultraestructurales externos de los espermatozoides en cinco machos del bagre tropical, fue necesario el empleo del análisis por MEB, para ello la metodología propuesta por Arias-Rodriguez *et al.* (2010) fue empleada tal como se describió en el apartado 1.5.8.

1.5.5.8. Análisis de Dispersión de ADN Total en Minigeles de Agarosa

Para valorar el efecto de la luz UV sobre el contenido de ADN de las células espermáticas, el ensayo de dispersión de ADN en minigeles de agarosa fue empleado conforme a lo recomendado por Dietrich *et al.* (2005) con ligeras modificaciones, muestras de cinco machos de la especie fueron empleados para este ensayo. Un volumen de 10 μ l de muestra fue tomada después de cada dosis de radiación UV probadas y suspendida en 500 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% preparado en buffer de fosfatos (pH 7.0) y mantenido a $45\pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, 75 μ l de la alícuota (semen+SSIM+ dosis UV/ agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%) fue tomada y colocada sobre un portaobjetos previamente recubierto con agarosa de punto de fusión normal al 0.5% y mantenido a 4°C por 5 min.

Las preparaciones fueron sometidos a lisis (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris base, Sodio Lauril Sarcocinate al 1%, DMSO al 1% y de Triton X 100 1%) por 60 min a 4°C en ausencia total de luz. Finalizado el tiempo de lisis, las muestras fueron colocados en una solución alcalina que contenía 300 mM NaOH y 1 mM EDTA a pH >13 , por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La electroforesis fue realizada en la cámara de electroforesis de 25cm X 20cm (BioRad®), esta fue cargada con buffer alcalino (300 mM NaOH y 1 mM EDTA) a pH >13 . La corrida se realizó a 25V y 300 mA por 30 min y a temperatura ambiente $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ en ausencia de luz.

Concluida la electroforesis, las laminillas fueron deshidratadas en una serie de alcoholes en volúmenes creciente (50, 60, 70, 80, 90 y 100%) por 5 min en cada alcohol, secadas a temperatura ambiente y almacenadas en oscuridad a 4°C hasta su análisis. Las observaciones y digitalización de las imágenes, se realizaron mediante el empleo del microscopio binocular con fluorescencia Primo Star (Carl Zeiss®) equipado con una cámara digital Axiocam ERc5s HD (Carl Zeiss®) en conjunto con el programa ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016), para ello, las muestras fueron teñidas con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 25 μ g/ml. Un total de 100 campos espermáticos por cada dosis de radiación fue necesario, de los cuales se seleccionaron aleatoriamente un total de 100 espermatozoides a los cuales se les midió la longitud de la cola, el área de dispersión de ADN y el tipo de cometa formado con las herramientas del programa ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016).

1.5.5.9. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en cada experimento (fisiología, biología y el efecto de la luz UV sobre las células espermáticas), se agruparon en bases de datos independientes con el programa Microsoft® Excel 2010, donde se les calculó el promedio y la desviación estándar. En algunos casos los valores fueron expresados en porcentajes. Posteriormente, dichos datos se integraron a la base de datos que soporta el programa STATISTICA 8® con el fin de realizar las pruebas de homogeneidad y homocedasticidad, y en dependencia de los resultados, se empleó el análisis paramétrico de varianzas de una vía (ANVA) o en caso contrario, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En ambos casos con nivel de probabilidad y confianza de $P > 0.05$. Al haber diferencias significativas en una u otra prueba, se aplicaron los análisis a posteriori mediante la comparación múltiple de Tukey o Dunnet, respectivamente ($P > 0.05$) con el programa STATISTICA 8®.

CAPITULO II

Biología y Fisiología Espermática Básica del Bagre Tropical *Rhamdia laticauda*: Motilidad, Morfología, Tamaño Celular, Contenido de ADN, Osmolaridad, Química y Bioquímica

2.1. RESUMEN

En el presente estudio se describen diversos aspectos de la biología y fisiología básica del semen del juil tropical *R. laticauda*. El tiempo de motilidad, número de espermatozoides, descripción de la microestructura y ultraestructura espermática por MOP, MEB y MET, análisis de los componentes químicos y bioquímicos del plasma seminal, tamaño de la cabeza por citometría multiparamétrica, contenido total de ADN y tamaño del genoma fueron determinados para la especie. El tiempo de motilidad y el número de espermatozoides promedio fue de 50.86 ± 6.20 seg y $113.5 \pm 30.69 \times 10^6$ espermatozoides/ml, respectivamente. El análisis espermático por MOP y MEB, mostró la presencia de espermatozoides con las características típicas de los peces teleósteos con fertilización externa; una cabeza acrosomal, una pieza media y un solo flagelo. El promedio de las medidas para cada microestructura fue variable entre machos y la presencia de polimorfismo fue observado. La frecuencia de espermatozoides polimórficos difirió entre los machos que presentaron tal condición, siendo para el primero, una frecuencia de: 88.612%, 7.473% y 3.914%, mientras que para el segundo fue de 91.935%, 2.150% y 5.913%, para células espermáticas haploides, diploides y tetraploides, respectivamente. La comparación de células espermáticas redondas y ovaladas observadas por MEB difirieron en tamaño ($P=0.001$). Sin embargo, para el ancho del flagelo (0.184 ± 0.019 μm y 0.174 ± 0.022 μm , $P=0.0808$) y longitud del flagelo (30.617 $\mu\text{m} \pm 0.843$ y 30.251 ± 2.861 μm , $P=0.504$) no se observaron diferencias. El análisis espermático por MET, permitió observar un número de 5-7 mitocondrias, un axonema con la típica estructura de (9+2), un único flagelo sin extensiones membranosas, centriolos posicionados de manera desigual, vacuolas bordeando la pieza media y un núcleo con cromatina muy condensada y sin acrosoma. Los componentes químicos, bioquímicos y lipídicos promedios del plasma seminal fueron variados entre machos ($P<0.001$). El análisis para determinar el tamaño de la cabeza

espermática por citometría multiparamétrica de un total de 3,297,085 células, mostró un promedio de $4.899 \pm 0.784 \mu\text{m}$ y de $4.823 \pm 0.504 \mu\text{m}$ cuando se empleó un marcador fluorescente y campo claro, respectivamente. El contenido total de ADN para cada condición fue de; $2.543 \pm 0.481 \text{ pg}$, $3.712 \pm 0.434 \text{ pg}$ y $4.675 \pm 0.434 \text{ pg}$ para células espermáticas haploides, diploides y tetraploides, respectivamente. Mientras que para las células sanguíneas fue de $4.440 \pm 0.158 \text{ pg}$. La información generada en el presente estudio contribuye con mayor información biológica y fisiológica para el aprovechamiento y conservación de la especie.

2.2. INTRODUCCIÓN

Los peces son el grupo de vertebrados acuáticos más diversificados en el mundo (Nelson, 2006) y de ellos el orden de los Siluriformes o bagres, es el más representativo (Ferraris, 2007; Nelson, 2006). En la región neotropical del continente Americano, los bagres dulceacuícolas se distribuyen desde el norte de México y hasta Argentina en Sudamérica (Bussing, 2002; Miller *et al.* 2009), estos se caracterizan por los miembros de las familias Ictaluridae, Ariidae, Pimelodidae, Heptapteridae, Loricariidae y Trichomycteridae (Bussing, 2002; Miller *et al.* 2009; Nelson, 2006). Varias de las especies que integran dichas familias, son base de la economía de las comunidades ribereñas (Bussing, 2002; Cháves-Lomelí *et al.* 1989), hecho que ha llevado a reducir los recursos pesqueros por la pesca excesiva y fragmentación de los hábitats acuáticos (Arreguín-Zánches y Arcos-Uitrón, 2011; Culumber *et al.* 2016). El desconocimiento de la biología básica, la sobreexplotación de los recursos pesqueros, el incremento de los niveles de contaminación en los ecosistemas acuáticos, junto con la creciente demanda de proteína de origen animal, han suscitado la búsqueda de alternativas para reducir los efectos derivados de las actividades antropogénicas y de fomentar las medidas de protección al ambiente (Paniagua-Chávez *et al.* 2011).

En años recientes se ha observado que el conocimiento de aspectos básicos de la biología de las especies, como son genético, reproductivo, nutricional y crecimiento, favorecieron mejoras en el manejo y control de las especies que ha permitido la repoblación de sitios sobreexplotados y restaurados por contaminación (Arias-Rodriguez *et al.* 2010), en adición a que se amplía el conocimiento sobre la biología básica de las especies, que ha dado pauta para una mayor comprensión sobre fenómenos atípicos como son la hibridación natural,

ginogénesis y poliploidía natural (Morelli *et al.* 1983; Arai, 2000; 2001; Arias-Rodriguez *et al.* 2004).

Por otro lado, el control reproductivo actualmente hace necesario el buen manejo de los reproductores y de los gametos para su conservación, transporte y empleo para fertilización artificial y manipulación genética (Alavi *et al.* 2012; Cabrita *et al.* 2009; Paniagua-Chávez *et al.* 2011; Yasui *et al.* 2009). Sin embargo, aún existe un gran número de especies de las cuales muy poca información sobre su biología básica está disponible, además de que aspectos de carácter fisiológico como las estructuras internas y externas de las células espermáticas, son un requisito indispensable previo a cualquier procedimiento para su manejo.

En México es muy evidente el amplio desconocimiento sobre la biología básica de las especies ícticas, en adición a la sobreexplotación de los recursos pesqueros, que también han sido afectados por las actividades antropogénicas e industriales (Arreguín-Zánches y Arcos-Uitrón, 2011; Paniagua-Chávez *et al.* 2011). Por ello, el presente estudio fue enfocado hacia el discernimiento de varios aspectos de la biología y fisiología básica del semen del bagre tropical *R. laticauda* basado en el estudio de la motilidad espermática, la morfología, estructura y ultraestructural. Así también, el tamaño de los espermatozoides, contenido de ADN. Además, la osmolaridad, la química y bioquímica del líquido seminal; todo ello con el propósito de incrementar el conocimiento sobre la biología y fisiología reproductiva en el bagre tropical y con el fin de agregar instrumentos útiles para el buen manejo reproductivo de la especie con fines de conservación biológica y experimental.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Recolección y Mantenimiento de los Reproductores

Los machos adultos fueron capturados por pesca artesanal del río Grijalva, Centla, Tabasco, México (18°11'30.93"N, 92°42'43.64"O). El peso promedio y longitud de los especímenes fue de 122.5±60.7 g y 22.2±2.8 cm. Los reproductores fueron aclimatados en un sistema cerrado de recirculación con 10 tanques de 1,600 litros, aireación constante con filtros de agua y luz UV y ciclo de luz/oscuridad (6/6 horas) a 31.2 ±1.0°C. Los peces fueron alimentados dos veces al día con pellets (Growfish Api-Tilapia 2, 35% de proteína, Malta-Cleyton®) y suplementados con larvas y juveniles vivos de *Oreochromis* sp.

2.3.2. Tratamiento Hormonal y Recolecta de Semen

Los machos fueron inyectados con 250 UI/kg de peso con la hormona Gonadotropina Coriónica Bovina (GCB, Loeffler®) y mantenidos en un tanque a $31.2 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ por 12 horas antes de su uso (Arias-Rodriguez *et al.*, 2016. Datos no publicados). Los machos fueron anestesiados empleando Metasulfonato de Tricaina (MS222) 0.25 g/L y el semen fue recolectado individualmente con una jeringa estéril después de aplicar presión suave sobre los flancos del pez, previendo que el área genital estuviera limpia y seca, para evitar la contaminación con agua, sangre, orina o heces fecales que pudieran reducir la calidad del semen (Arias-Rodriguez *et al.* 2004). Las muestras fueron almacenadas a 4°C en una hielera en tubos de 1.5 ml con tiempo no mayor a 20 min después de la recolecta para evitar pérdida en la calidad.

2.3.3. Conteo Espermático Manual y Actividad Espermática

Cincuenta machos adultos fueron empleados para evaluar la concentración y motilidad espermática, para ello 1 μl de semen puro fue mezclado en 999 μl (1:1000) de solución fijadora (bicarbonato de sodio 0.5 g + formaldehído 1 ml + agua destilada 94 ml). El conteo de las células espermáticas fue determinado manualmente y a como sigue: 10 μl de la mezcla fue cargada dentro de la cámara Neubauer, después de 5 min tres conteos fueron realizados con el microscopio óptico a 40X de magnificación (BH-2 Olympus®, Japan). La concentración fue calculada como el número de espermatozoides/ml de semen puro (Arias-Rodriguez *et al.* 2004). La actividad espermática, fue realizada por la mezcla de 1 μl de semen puro con 50 μl de agua corriente 65.666 mOsmol (1:50), rápidamente 10 μl de la mezcla fue colocada sobre un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos.

El tiempo de motilidad fue registrado desde la activación espermática hasta la completa inactivación del movimiento de los espermatozoides. Simultáneamente el tipo de movimiento fue determinado de acuerdo con Acosta *et al.* (1990). Los porcentajes de motilidad fueron observados en escala de 10% hasta 100% (Acosta *et al.* 1990). En todos los casos, las observaciones del número espermático y motilidad, fueron preparadas por triplicado para cada

macho. Todas las observaciones fueron realizadas bajo el microscopio óptico BH-2 (Olympus®, Japan) a magnificación de 400X.

2.3.4. Morfometría Espermática por Microscopía Óptica

Las muestras de semen de 1 µl fueron tomadas de 17 machos y fijadas en 100 µl de glutaraldehído al 2.5%, que fue preparado en buffer de fosfatos a 0.1 M (pH 7.4). Las muestras fueron mantenidas a 4 °C hasta su análisis (Arias-Rodríguez *et al.* 2010).

Las preparaciones espermáticas, fueron elaboradas tomando 10 µl de semen fijado, que luego fue depositado en el extremo de un portaobjetos y dispersado suavemente, secada a temperatura ambiente. Posteriormente fueron teñidas por 10 min con giemsa preparada al 10% en buffer de fosfatos al 0.1 M (pH 7.4) y los residuos fueron eliminados con agua destilada en abundancia y seguidamente secadas al aire. El análisis óptico, fue realizado con el microscopio de contraste de fases Axio Scope.A1 40X + 1.25 X de magnificación (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016). Las imágenes fueron capturadas con la cámara AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016) mediante el programa ZEN/2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016). Las estructuras espermáticas medidas fueron: Ancho de la cabeza, largo de la cabeza, área de la cabeza, tamaño de la pieza media, ancho del flagelo y longitud del flagelo de 30 células espermáticas de cada macho, fueron analizadas y cuantificadas en micrometros con las herramientas del programa ZEN/2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016).

2.3.5. Descripción Morfométrica por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La estructura fina de las células espermáticas, fueron observadas y tomadas siguiendo la metodología recomendada por Arias-Rodríguez *et al.* (2010). Para ello 10 µl de la muestra espermática fueron tomados de 17 machos y fijadas en 990 µl glutaraldehído al 2.5%, que fue preparado en buffer de fosfatos a 0.1 M (pH 7.4). Posteriormente, 10 µl de muestras espermáticas fueron montadas sobre portaobjetos tipo Superfrost® Plus (Thermo Scientific®) y secadas a temperatura ambiente 22±1 °C. Luego, fueron deshidratadas en una serie de etanol (al 25, 50, 70, 80, 90, 95, 100% por 5 min en cada dilución), lavadas con etanol al 100% para el posterior secado a punto crítico en la secadora CPD 030 (Bal-Tec AG, Balzers,

Liechtenstein). Las muestras deshidratadas, fueron cubiertas con la aleación de oro-paladio usando la recubridora SCD-050-Sputter-Coater (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Las observaciones y fotografiado micrométrico, se realizaron en el Microscopio Electrónico de Barrido 6380-LV (JEOL Ltd., Japan). Posterior a la toma de imágenes en formato JPG, la estructura de 30 células espermáticas fueron analizadas y tomadas en micrometros a como sigue: ancho de la cabeza, largo de la cabeza, área de la cabeza, tamaño de la pieza media, ancho del flagelo y longitud del flagelo con las herramientas del programa ZEN/2016 (Carl Zeiss© Microscopy GmbH, 2016).

2.3.6. Descripción de la Ultraestructura Espermática por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El análisis de la morfología y ultraestructura de los espermatozoides del juil tropical, fue realizado mediante la observación por MET de acuerdo a la metodología descrita por Madhavi *et al.* (2015). Las muestras de semen fueron recolectadas como se describió para MOP y MEB. Las muestras de semen fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% neutralizado en 0.1 M de buffer de fosfatos (pH 7.4) en proporción 10:100 (10 µl de semen puro: 90 µl de glutaraldehído) y mantenidas a 4°C. Posteriormente fueron deshidratadas en una serie de acetonas (25, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%) por 10 min en cada etapa. Después las muestras de semen, fueron embebidas en resina EPON en proporción 2:1 (A: B) (solución A: Epon 812 62ml/DDSA 100ml y Solución B: Epon 812 100 ml/nmA 89ml). Las muestras fueron colocadas en moldes y llenadas con resina, luego almacenadas en una estufa con temperatura creciente (36°C, 45°C, 50°C y 60°C) por 60 min en cada etapa hasta completar la polimerización. La microtomía fue realizada mediante el empleo del ultramicrotomo Ultracut-EM UC7 (Leica®). Secciones ultradelgadas de 60 a 80 nm de espesor, fueron obtenidas y colocadas sobre rejillas de cobre, secadas a temperatura ambiente. Las muestras fueron teñidas en acetato de Uranilo que fue diluido al 2% en alcohol etílico al 50% por 10 min y luego en la solución de Reynolds (preparado con: 60 ml de agua destilada + 266g de nitrato de plomo + 3.52g de citrato de sodio) por 10 min a 37°C.

Las observaciones y las microfotografías de la ultraestructura espermática fueron tomadas empleando el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 1011 (JEOL Ltd. Japan). La ultraestructura espermática a como sigue: ancho de la cabeza, largo de la cabeza, área de la

cabeza, ancho de mitocondrias, largo de mitocondrias, ancho área de la pieza media y ancho del flagelo de 30 células espermáticas, fueron analizadas y cuantificadas en micrómetros con las herramientas del programa ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016).

2.3.7. Tamaño Celular Espermático por Citometría Multiparamétrica

Las muestras del semen puro de 10 especímenes, fueron incubadas en la Solución Salina Inmovilizadora de la Motilidad (SSIM; NaCl 0.875 gr, KCl 0.150 gr, CaCl 0.022, MgSO₄ 0.013 gr, Tris 0.242 gr, todo mezclado en 100 ml de agua bidestilada. Lahnsteiner y Patiner, (1998) con el fin de mantener la viabilidad y concentración espermática (López-Hernández. 2013 (Con datos no publicados) a 100,000 células/ml, que es requerido por el citómetro Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™).

Posteriormente las muestras fueron cosechadas por centrifugación a 6000 r.p.m. por 30 segundos, luego fue retirado el sobrenadante y sustituido con 50 µl de la SSIM, a dicha mezcla se le agregó 2.5 µl de Annexin “V” Alexa Fluor® 488 Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™) y se mantuvo en agitación a 15 r.p.m por 20 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Luego se prosiguió a cosechar por centrifugado a 6000 r.p.m por 30 segundos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células con 50 µl de la SSIM, seguidamente se adicionó 1 µl de yoduro de propidio (Tali Invitrogen™), las muestras se mantuvieron en una cámara oscura y en agitación a 15 r.p.m por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, con 25 µl de la muestra se cargó una de las cámaras del porta muestras de análisis celular (Tali Invitrogen™) y se insertó en el puerto del Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™). Durante el análisis óptico de las muestras, fueron seleccionados 20 campos y siguiendo lo especificado en el Tali Image Based Cytometer Firmware 1.0.3 (Invitrogen™). Los conteos de células y el tamaño en micrómetros de la cabeza espermática, se analizaron mediante el programa Tali Image Based Cytometer Firmware 1.0.3 (Invitrogen™). La base de datos de cada análisis o muestra de cada macho se procesaron y promediaron con las herramientas del programa Excel para Windows (© 2010 Microsoft Corporation).

2.3.8. Componentes Químicos, Bioquímicos, Lipídicos y Osmolaridad del Plasma Seminal

El plasma seminal de 10 machos del bagre tropical, fue tomado después de centrifugar dos veces el semen puro a 6000 r.p.m por 10 min y fue almacenado en críoviales a -20°C hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas por el A-25 Random Access Analyzer (Byosystems©, Philippines, 2012) y se determinó el contenido de nitrato NO (ppm), nitrito NO_2 (p.p.m), calcio C^+ (mg/dl), sodio Na^+ (mM/L), potasio K^+ (mM/L), cloro Cl^+ (mM/L), magnesio Mg^+ (mg/dl), pH (potencial de hidrogeno), dureza (p.p.m), alcalinidad (p.p.m), ácido úrico (mg/d), urea (mg/dl), nitrógeno úrico (mg/dl), bilirrubina total (mg/dl), bilirrubina conjugada (mg/dl), albumina sérica (g/dl), alanina (UI/L), aspartato (UI/L), fosfatasa alcalina (UI/L), lactato deshidrogenasa (UI/L), creatinina (mg/dl), proteína total (g/dl), glucosa (g/dl), triglicéridos (mg/dl) y colesterol (mg/dl). La osmolaridad del plasma seminal, fue determinada en mOsmol/kg siguiendo el protocolo del Vapro 5520-Osmometer® (Wescor, Inc., U.S.A).

2.3.9. Contenido Total de Nucleótidos por Citometría Fluorescente de Flujo y Tamaño Total del Genoma

En el análisis de citometría fluorescente de flujo, se procedió con las recomendaciones de Arias-Rodriguez (2007); para ello muestras de semen para calibración y como control fueron obtenidas de tres hembras/dos machos diploides maduros de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. Las muestras de semen y sangre del bagre tropical, se obtuvieron de 10 machos maduros con jeringas estériles de 3 ml tipo 23Gx25mm (DL Médica ®). Las muestras fueron centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 5 minutos, con el propósito de separar el paquete celular del plasma espermático o sanguíneo; posteriormente fueron fijadas durante 10 minutos en 500 μl de glutaraldehido a 4°C (al 2.5%, con 0.1 M de BFS y pH 7.4); se centrifugaron por tres minutos a 6000 r.p.m., se extrajo el sobrenadante, se reemplazó por 1000 μl de glutaraldehido al 2.5% y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Para el análisis citométrico, 50 μl de la suspensión celular fue teñida con 5 μl de yoduro de propidio por 60 seg. Posteriormente, fueron resuspendidas en 5 ml de buffer de fosfatos (BFS) y se analizaron en el BD-FACSCalibur™ Flow Cytometer (Becton-Dickinson© 2007), mediante la BD FACStation™ (Becton-Dickinson© 2007) con el programa la BD CellQuest Pro FACStation para la adquisición y análisis general de los datos (Becton-Dickinson™). El contenido total de nucleótidos (ADN total) se calculó siguiendo la fórmula ajustada, en acuerdo con Hinegardner (1976); Hartley y Horne, (1985); Tiersch *et al.* (1989), (1998),

(1992), (1994), (2003); Hardie *et al.* (2004) donde el contenido (1C=haploide) de ADN nuclear espermático haploide en picogramos (pg)= (Contenido diploide de ADN del control en picogramos de las células sanguíneas de *O. mykiss*/2) x (Número de canal de la muestra espermática de *R. laticauda*)/Número de canal de la muestra espermática control de *O. mykiss*. El valor-2C de 5.5 picogramos fue estimado como el estándar para la trucha arco iris *O. mykiss* (Hartley y Horne, 1985; Tiersch *et al.* 1989), fue empleado como muestra de referencia para el cálculo del contenido del ADN en semen y sangre del bagre tropical. Mientras que para el contenido (2C=diploide) de ADN nuclear eritrocitario diploide (pg)= (Contenido control diploide del ADN en picogramos de las células sanguíneas de *O. mykiss*) x (Número de canal de la muestra sanguínea de *R. laticauda*)/(Número de canal de la muestra espermática control de *O. mykiss*) X (2).

El tamaño del genoma o valor-C en picogramos (pg) (o masa de ADN en picogramos), fue determinada considerando que un 1 pg de ADN es igual 0.978×10^9 pares de bases (pb) (Doležel *et al.* (2007), por lo anterior el tamaño del genoma fue calculado empleando la fórmula propuesta por Doležel *et al.* (2003) donde: El tamaño del genoma de *R. laticauda* en pares de bases (bp)= (0.978×10^9) (contenido de ADN en pg de las muestras espermáticas y sanguíneas de *R. laticauda*).

2.3.10. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de cada parámetro analizado se agruparon en bases de datos individuales con el programa Microsoft® Excel 2010 (© 2010 Microsoft Corporation), se les calculó el promedio y la desviación estándar. Posteriormente, dichos datos se integraron a la plataforma estadística que soporta el programa STATISTICA 8® (StatSoft. Inc. 1984-2007) con el fin de aplicar pruebas de homogeneidad/homocedasticidad y en dependencia de los resultados se empleó el análisis paramétrico de varianzas de una vía (ANVA) o en caso contrario la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en ambos casos con nivel de confianza de $P > 0.05$, al haber diferencias significativas se aplicó la comparación múltiple de Tukey o la de Dunns, respectivamente ($P > 0.05$) mediante el programa STATISTICA 8® (StatSoft. Inc. 1984-2007).

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Generalidades Reproductivas y Fisiología de los Machos y Esperma

En la captura de peces en el río, la proporción de sexos fue de un macho por cada cuatro hembras (1:4). Los especímenes empleados mostraron en promedio peso de 122.5 ± 60.7 gr y longitud de 22.2 ± 2.8 cm. A lo largo del año de estudio, fue posible la recolecta de semen después del tratamiento hormonal controlado por la temperatura y el fotoperíodo, en ello 1.2 ± 0.1 ml de semen en promedio fue recolectado de cada macho, sin relación aparente con el peso o talla del animal. Fue observada la coloración blanquecina típica cuando el semen estaba concentrado y transparente con el semen fluido. El número de espermatozoides varió significativamente ($P=0.001$) entre machos, este mostró el rango mínimo desde 48×10^6 y hasta 177×10^6 espermatozoides por mililitro de semen puro, el promedio observado de espermatozoides fue de $113.5 \times 10^6 \pm 30.698 \times 10^6$ espermatozoides/ml (Ver datos suplementarios 2.7, Anexo I).

Las muestras de semen mostraron motilidad significativamente variable en el tiempo de vitalidad ($P=0.001$) y los porcentajes de células activas ($P=0.001$) (Ver suplemento en el Anexo II). El tiempo de actividad espermática oscilo entre 42 ± 0.01 a 61.6 ± 0.01 segundos y en promedio se registró 50.86 ± 6.270 segundos de motilidad (Ver datos suplementarios, Anexo II).

Por otro lado, en todas las muestras de semen se observó porcentajes de actividad espermática mayores al $90 \pm 0.01\%$ (datos suplementarios anexo II).

2.4.2. Morfometría Espermática por Microscopia Óptica (MOP)

La tinción con giemsa permitió la observación de las microestructuras espermáticas por MOP y su análisis detallado, con lo que se logró notar presencia de tamaños variados en las estructuras y morfología espermática. Fueron notables, las células espermáticas con cabezas esféricas y también ovoides (Figura 1). Los valores promedios de las microestructuras que corresponden a las células espermáticas, se muestran en la Tabla 1.

En las células espermáticas de los 17 especímenes analizados, se observó presencia variable de células espermáticas esféricas y ovoides. Sin embargo, solo fue notable diferencias en el

tamaño de las células espermáticas de los especímenes 5 y 11, que fueron clasificadas en tres grupos como células espermáticas haploides pequeñas, células espermáticas diploides de tamaño mediano y células espermáticas tetraploides grandes (Tabla 1 y Figura 1). Diferencias altamente significativas ($P=0.001$) fueron observadas en las variables y grupos analizados; así el ancho de la cabeza ($2.300\pm 0.163 \mu\text{m}$, $2.956\pm 0.188 \mu\text{m}$, $3.333\pm 0.364 \mu\text{m}$), largo de la cabeza ($2.831\pm 0.197 \mu\text{m}$, $3.058\pm 0.339 \mu\text{m}$, $3.449\pm 0.316 \mu\text{m}$), área de la cabeza ($5.416\pm 0.445 \mu\text{m}^2$, $7.681\pm 0.440 \mu\text{m}^2$, $9.496\pm 0.599 \mu\text{m}^2$), área pieza media ($0.458\pm 0.066 \mu\text{m}^2$, $0.754\pm 0.123 \mu\text{m}^2$, $0.765\pm 0.122 \mu\text{m}^2$), ancho del flagelo ($0.541\pm 0.038 \mu\text{m}$, $0.781\pm 0.047 \mu\text{m}$, $0.797\pm 0.071 \mu\text{m}$) y longitud del flagelo ($31.26\pm 1.373 \mu\text{m}$, $29.14\pm 1.783 \mu\text{m}$, $29.94\pm 2.650 \mu\text{m}$) para los espermatozoides que correspondieron a los grupos haploide, diploide y tetraploide, respectivamente (Tabla 1). Sin embargo, para los espermatozoides 2N y 4N no se observaron diferencias significativas para el área de la pieza media ($P=0.777$), ancho del flagelo ($P=0.420$) y longitud del flagelo ($P=0.288$). La frecuencia de espermatozoides haploides, diploides y tetraploides de 286 células en el macho 5 fue de 88.61%, 7.47% y 3.914%, respectivamente. Mientras que para el macho 11 de 286 células contabilizadas, fue de 91.93%, 2.150% y 5.913% para espermatozoides haploides, diploides y tetraploides, respectivamente.

2.4.3 Análisis Celular Espermático por Microscopía Electrónica de Barrido

Mediante el análisis detallado de imágenes en alta resolución que fueron obtenidas por MEB, se describió la estructura de los espermatozoides del bagre tropical; que se caracterizaron por cabeza espermática con ausencia de acrosoma. El análisis detallado de las células espermáticas maduras, mostraron el ancho de la cabeza de $1.385\pm 0.111 \mu\text{m}$, largo de la cabeza de $1.675\pm 0.193 \mu\text{m}$, área de la cabeza de $2.018\pm 0.112 \mu\text{m}^2$, área de la pieza media de $0.337\pm 0.060 \mu\text{m}^2$, largo del flagelo de $30.40\pm 2.476 \mu\text{m}$ y ancho del flagelo de $0.209\pm 0.031 \mu\text{m}$. Con las observaciones, fue evidente la presencia de dos tipos de espermatozoides, unos con cabeza esférica y otros ovaladas; el conteo de 200 células espermáticas permitió notar que son más frecuentes, los espermatozoides de cabeza con morfología esférica (142=71%) y menos frecuentes los de morfología ovalada (58=29%) (Figura 1F).

Cuando se compararon, los cálculos de las microestructuras de las células espermáticas con morfología esférica y ovalada, respectivamente; se observó diferencias estadísticamente significativas ($P=0.001$) para el ancho de la cabeza ($1.243\pm 0.083 \mu\text{m}$ y $1.320\pm 0.066 \mu\text{m}$),

largo de la cabeza ($1.868 \pm 0.090 \mu\text{m}$, $1.578 \pm 0.082 \mu\text{m}$), área de la cabeza ($2.007 \pm 0.128 \mu\text{m}^2$ y $1.744 \pm 0.088 \mu\text{m}^2$) y área de la pieza media ($0.191 \pm 0.058 \mu\text{m}^2$ y $0.149 \pm 0.023 \mu\text{m}^2$). En el caso de las mediciones realizadas para el ancho del flagelo ($0.184 \pm 0.019 \mu\text{m}$ y $0.174 \pm 0.022 \mu\text{m}$, $P=0.0808$) y longitud del flagelo ($30.617 \mu\text{m} \pm 0.843$ y $30.251 \pm 2.861 \mu\text{m}$, $P=0.504$) no se observó diferencias estadísticamente significativas, entre tales morfotipos.

La tinción con nitrato de plata permitió distinguir la presencia del núcleo espermático con morfología esférica y en la pieza media pequeños puntos ovalados que corresponden a las mitocondrias (Figura 1E).

2.4.4. Análisis Celular Espermático por Microscopia Electrónica de Transmisión

El análisis ultraestructural espermático del juil tropical por MET, ratificó que los espermatozoides de la especie se componen de cabeza esférica u ovoide, esto correspondió con núcleos esféricos u ovoides, en correspondencia al tipo de cabeza espermática (Figura 2 A, B, C, D).

En las imágenes analizadas, no se observó la presencia de fosas nucleares y organelos citoplasmáticos, solo se notó claramente que la cabeza espermática está cubierta por una delgada membrana citoplasmática. La cromátina nuclear se observó homogénea y con inclusión de tres islotes electroiluminados. En la pieza media se observa el cuerpo centriolar equidistantemente y antiparalelamente uno de otro. También se observó en la región lateral de la pieza media, bordeando los centriolos y por encima de la base del axonema de cinco a seis mitocondrias esféricas grandes y pequeñas de forma elongada. Además, fue evidente, la presencia de vacuolas grandes, rodeando los flancos periféricos de la pieza media que está unida por una capa delgada de citoplasma.

El único flagelo presente en la célula espermática, es de tipo tubular sin presencia de aletas laterales, con el axonema típico mostrando la fórmula $9+2$ y la región terminal muy delgada (Figura 2).

2.4.5. Osmolaridad y Componentes Químicos y Bioquímicos del Plasma Seminal

Los valores promedios de los componentes químicos, bioquímicos y lipídicos, así como la osmolaridad del semen de *R. laticauda* se muestran en la Tabla 2. Los resultados de

cada componente mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los especímenes ($P < 0.05$).

2.4.6. Tamaño de las Células Espermáticas y Contenido de ADN por Citometría

El análisis citométrico y el empleo de ioduro de propidio en combinación con la Anexina V Alexa fluor® 488, permitió determinar el tamaño de la cabeza espermática en 3,297,085 células espermáticas (Tabla 3). El promedio del tamaño de la cabeza espermática fue de $4.899 \pm 0.784 \mu\text{m}$ y de $4.823 \pm 0.504 \mu\text{m}$ con tinción fluorescente y campo claro respectivamente, diferencias estadísticas ($P < 0.05$) fueron observadas en las observaciones entre especímenes y tipo de análisis citométrico.

Con el empleo de citometría de flujo, se estableció el contenido total de ADN y el tamaño del genoma, de muestras espermáticas y sanguíneas del juil tropical *R. laticauda*. Tres tipos de ploidía se observaron (Figura 3). El contenido promedio de ADN para las células fue de $2.543 \pm 0.481 \text{ pg}$, $3.712 \pm 0.434 \text{ pg}$ y $4.675 \pm 0.434 \text{ pg}$; para los espermatozoides haploides, diploides y tetraploides, respectivamente. Mientras que el contenido total de nucleótidos para las células sanguíneas (2N) fue de $4.445 \pm 0.079 \text{ pg}$. El tamaño total registrado para el genoma fue de; $1N = 2,487,787,500 \text{ pb}$, $2N = 3,630,825,000 \text{ pb}$, $4N = 4,572,150,000 \text{ pb}$ y de las células sanguíneas fue de $2N = 4,348,025,000 \text{ pb}$ (Figura 3).

Tabla 1. Longitudes promedio de las microestructuras (μm) y nivel de ploidía de las células espermáticas del juil tropical *R. laticauda*.

Especímenes	Ancho de la cabeza (Media \pm D.E)	Largo de la cabeza (Media \pm D.E)	Área de la cabeza (Media \pm D.E)	Área de la pieza media (Media \pm D.E)	Ancho del flagelo (Media \pm D.E)	Longitud del flagelo (Media \pm D.E)	Nivel de ploidía
1	2.352 \pm 0.197 ^c	2.828 \pm 0.147 ^c	5.486 \pm 0.372 ^c	0.458 \pm 0.068 ^b	0.532 \pm 0.036 ^b	31.766 \pm 1.368 ^b	1N
2	2.269 \pm 0.163 ^c	2.762 \pm 0.154 ^c	5.383 \pm 0.401 ^c	0.471 \pm 0.049 ^b	0.539 \pm 0.042 ^b	31.771 \pm 0.957 ^b	1N
3	2.324 \pm 0.170 ^c	2.846 \pm 0.171 ^c	5.605 \pm 0.285 ^c	0.466 \pm 0.058 ^b	0.541 \pm 0.034 ^b	32.183 \pm 1.175 ^b	1N
4	2.359 \pm 0.164 ^c	2.764 \pm 0.159 ^c	5.466 \pm 0.356 ^c	0.471 \pm 0.058 ^b	0.533 \pm 0.035 ^b	31.981 \pm 1.205 ^b	1N
5	2.361 \pm 0.125 ^c	2.663 \pm 0.207 ^c	5.239 \pm 0.452 ^c	0.512 \pm 0.064 ^b	0.556 \pm 0.023 ^b	29.547 \pm 1.276 ^a	1N
	2.960 \pm 0.222 ^b	3.140 \pm 0.348 ^b	7.831 \pm 0.452 ^b	0.753 \pm 0.122 ^a	0.791 \pm 0.038 ^a	29.206 \pm 1.88 ^a	2N
	3.234 \pm 0.433 ^a	3.661 \pm 0.359 ^a	9.637 \pm 0.647 ^a	0.747 \pm 0.130 ^a	0.798 \pm 0.050 ^a	29.691 \pm 2.625 ^a	4N
6	2.399 \pm 0.186 ^c	3.017 \pm 0.154 ^c	5.830 \pm 0.403 ^c	0.495 \pm 0.055 ^b	0.545 \pm 0.056 ^b	31.208 \pm 1.230 ^b	1N
7	2.319 \pm 0.164 ^c	2.910 \pm 0.177 ^c	5.603 \pm 0.460 ^c	0.437 \pm 0.056 ^b	0.530 \pm 0.033 ^b	31.842 \pm 1.531 ^b	1N
8	2.252 \pm 0.122 ^c	2.729 \pm 0.181 ^c	5.218 \pm 0.418 ^c	0.454 \pm 0.070 ^b	0.519 \pm 0.055 ^b	30.617 \pm 0.843 ^b	1N
9	2.251 \pm 0.123 ^c	2.834 \pm 0.174 ^c	5.341 \pm 0.510 ^c	0.451 \pm 0.040 ^b	0.540 \pm 0.031 ^b	30.805 \pm 1.324 ^b	1N
10	2.250 \pm 0.111 ^c	2.740 \pm 0.181 ^c	5.113 \pm 0.339 ^c	0.448 \pm 0.057 ^b	0.534 \pm 0.044 ^b	30.492 \pm 2.414 ^b	1N
11	2.458 \pm 0.251 ^c	2.604 \pm 0.176 ^c	5.228 \pm 0.464 ^c	0.514 \pm 0.078 ^b	0.543 \pm 0.028 ^b	29.347 \pm 0.924 ^a	1N
	2.948 \pm 0.102 ^b	2.908 \pm 0.291 ^b	7.407 \pm 0.268 ^b	0.755 \pm 0.135 ^a	0.763 \pm 0.059 ^a	29.035 \pm 1.756 ^a	2N
	3.398 \pm 0.312 ^a	3.393 \pm 0.260 ^a	9.405 \pm 0.572 ^a	0.776 \pm 0.120 ^a	0.797 \pm 0.084 ^a	30.111 \pm 2.752 ^a	4N
12	2.245 \pm 0.147 ^c	2.744 \pm 0.149 ^c	5.166 \pm 0.410 ^c	0.431 \pm 0.042 ^b	0.521 \pm 0.044 ^b	31.291 \pm 1.288 ^b	1N
13	2.290 \pm 0.152 ^c	2.962 \pm 0.193 ^c	5.619 \pm 0.419 ^c	0.464 \pm 0.085 ^b	0.517 \pm 0.042 ^b	30.240 \pm 1.009 ^b	1N
14	2.260 \pm 0.118 ^c	2.857 \pm 0.240 ^c	5.384 \pm 0.355 ^c	0.456 \pm 0.072 ^b	0.517 \pm 0.039 ^b	31.702 \pm 1.295 ^b	1N
15	2.228 \pm 0.117 ^c	2.729 \pm 0.182 ^c	5.157 \pm 0.446 ^c	0.456 \pm 0.079 ^b	0.503 \pm 0.056 ^b	30.500 \pm 1.271 ^b	1N
16	2.337 \pm 0.104 ^c	2.806 \pm 0.180 ^c	5.601 \pm 0.365 ^c	0.471 \pm 0.079 ^b	0.530 \pm 0.038 ^b	30.923 \pm 1.545 ^b	1N
17	2.297 \pm 0.169 ^c	2.857 \pm 0.183 ^c	5.473 \pm 0.315 ^c	0.482 \pm 0.061 ^b	0.504 \pm 0.045 ^b	30.397 \pm 1.296 ^b	1N

μm = Micrómetros, D.E= Desviación estándar. Caracteres desiguales entre filas indican diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

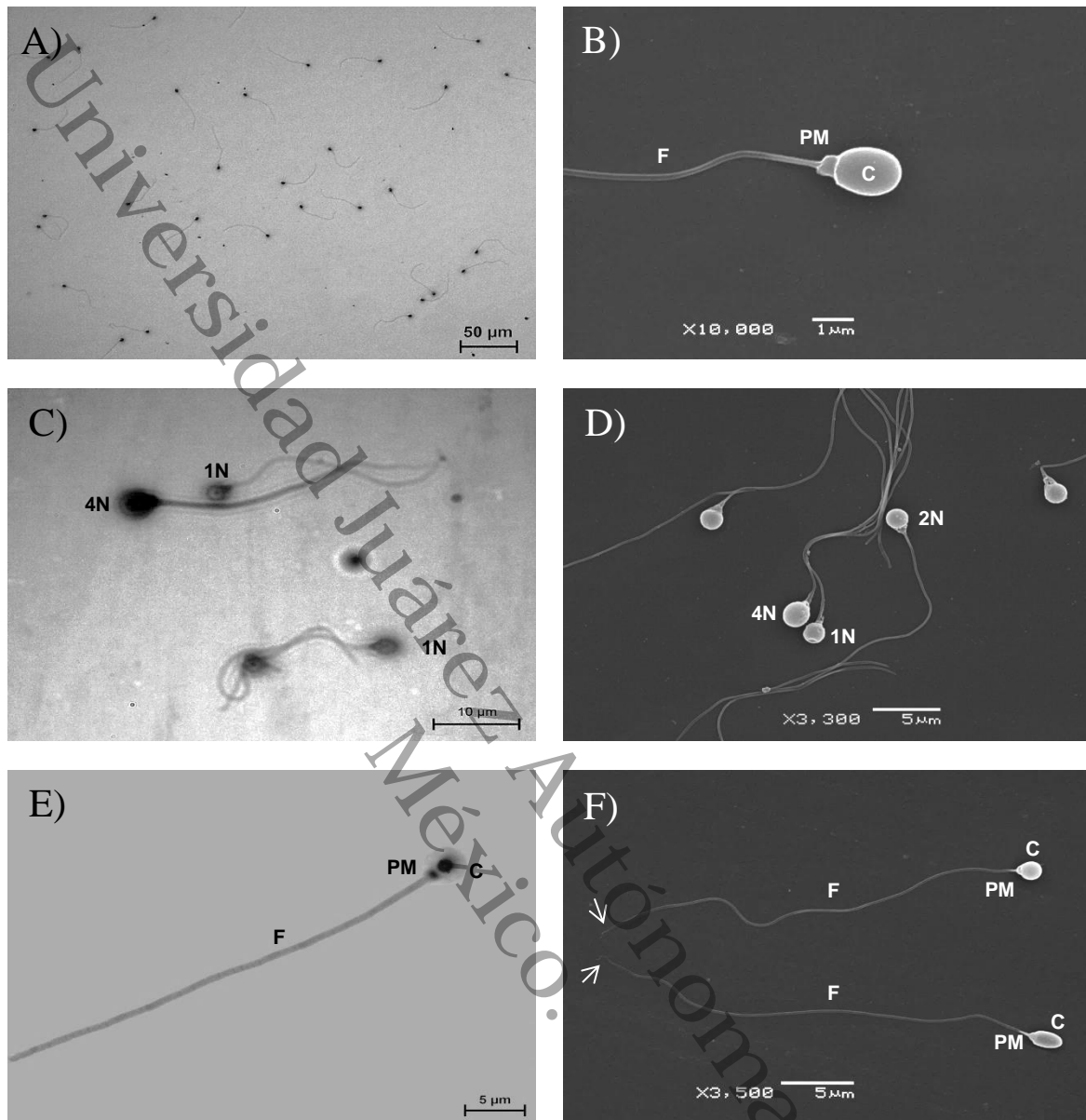


Figura 1. Microestructura básica de las células espermáticas del bagre tropical *R. laticauda* observados por microscopía óptica y teñidas con giemsa (A), nitrato de plata (E) y células observados por Microscopía Electrónica de Barrido (B), poliploidía espermática (C, D) y espermatozoides con cabeza esféricas y ovoides (F). C= cabeza, PM= pieza media, F= flagelo, 1N= haploides, 2N= diploides y 4N= tetraploides.

Tabla 2. Parámetros químicos, bioquímicos y lipídicos del plasma seminal del juil tropical *R. laticauda*.

Parámetros químicos	Media ± S.D	Parámetros bioquímicos	Media ± S.D
Nitrato [NO ₃] (ppm)	40.0±0.10	Ácido úrico (mg/dL)	0.92±0.28
Nitrito [NO ₂] (ppm)	0.50±0.10	Urea (mg/dL)	5.43±2.15
Calcio [Ca] (mg/dL)	10.4±0.41	Nitrogeno úrico (mg/dl)	1.51±0.47
Sodio [Na ⁺] (mM/L)	130±14.3	Bilirrubina total (mg/dl)	0.10±0.01
Potasio [K ⁺] (mM/L)	3.38±0.43	Bilirrubina directa (mg/dl)	0.07±0.01
Cloro [Cl ⁺] (mM/L)	95.0±9.32	Albumina serica (g/dl)	0.33±0.45
Magnesio [Mg ⁺] (mg/dl)	2.64±0.46	Alanina (UI/L)	3.29±1.79
Osmolaridad (mOsmol/kg)	298±5.78	Aspartato (UI/L)	42.8±26.7
pH	8.00±0.10	Fosfatasa alcalina (UI/L)	2.25±1.89
Dureza (ppm)	300±0.10	Lactato deshidrogenasa (UI/L)	319±131
Alcalinidad (ppm)	8.50±0.10	Creatinina (mg/dL)	0.26±0.19
Pérfil lipídico	Media ± S.D	Proteína total (g/dL)	0.33±0.23
Trigliceridos (mg/dL)	19.6±1.52	Glucosa (mg/dL)	2.66±2.08
Colesterol (mg/dL)	36.6±8.14		

D.E= Desviación estándar, p.p.m= partes por millón, mg= miligramos, dL= decilitros, mM= milimolar, mOsmol= miliosmoles, Kg= kilogramo, UI= unidades internacionales.

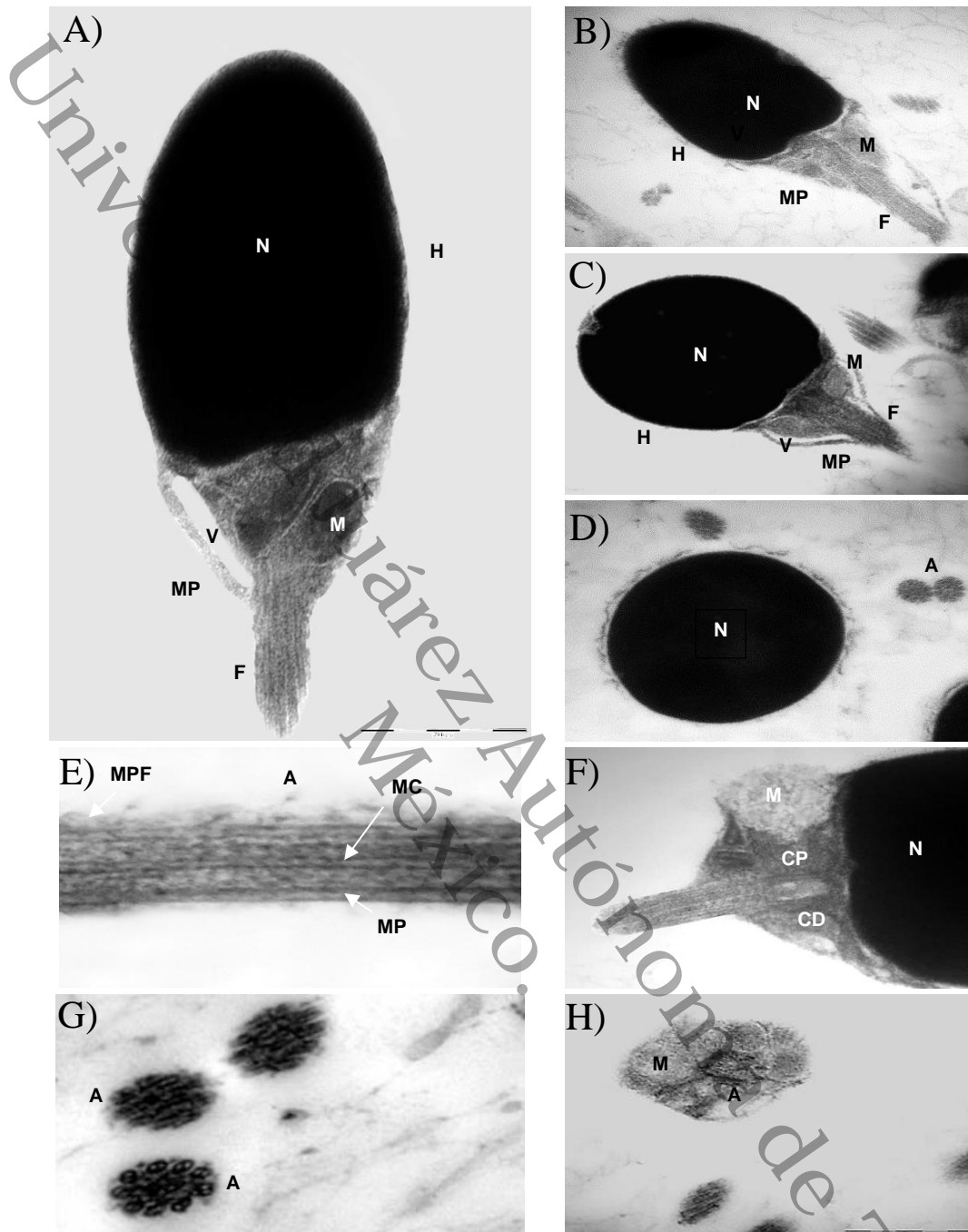


Figura 2. Ultraestructuras espermáticas del bagre tropical *R. laticauda* por MET, células espermáticas ovoides (A, B) y esférica (C), corte transversal con núcleo homogéneo condensado (D), componentes internos del flagelo (E), componentes internos de la pieza media (F), axonema típico 9+2 (G) y anillo mitocondrial (H). C: cabeza, PM: pieza media, F: flagelo, MP: membrana plasmática, M: mitocondrias, CP: centriolo proximal, CD: centriolo distal, A: axón, V: vacuola, MC: microtúbulo central, MP: microtúbulos periféricos y la MPF: membrana plasmática flagelar.

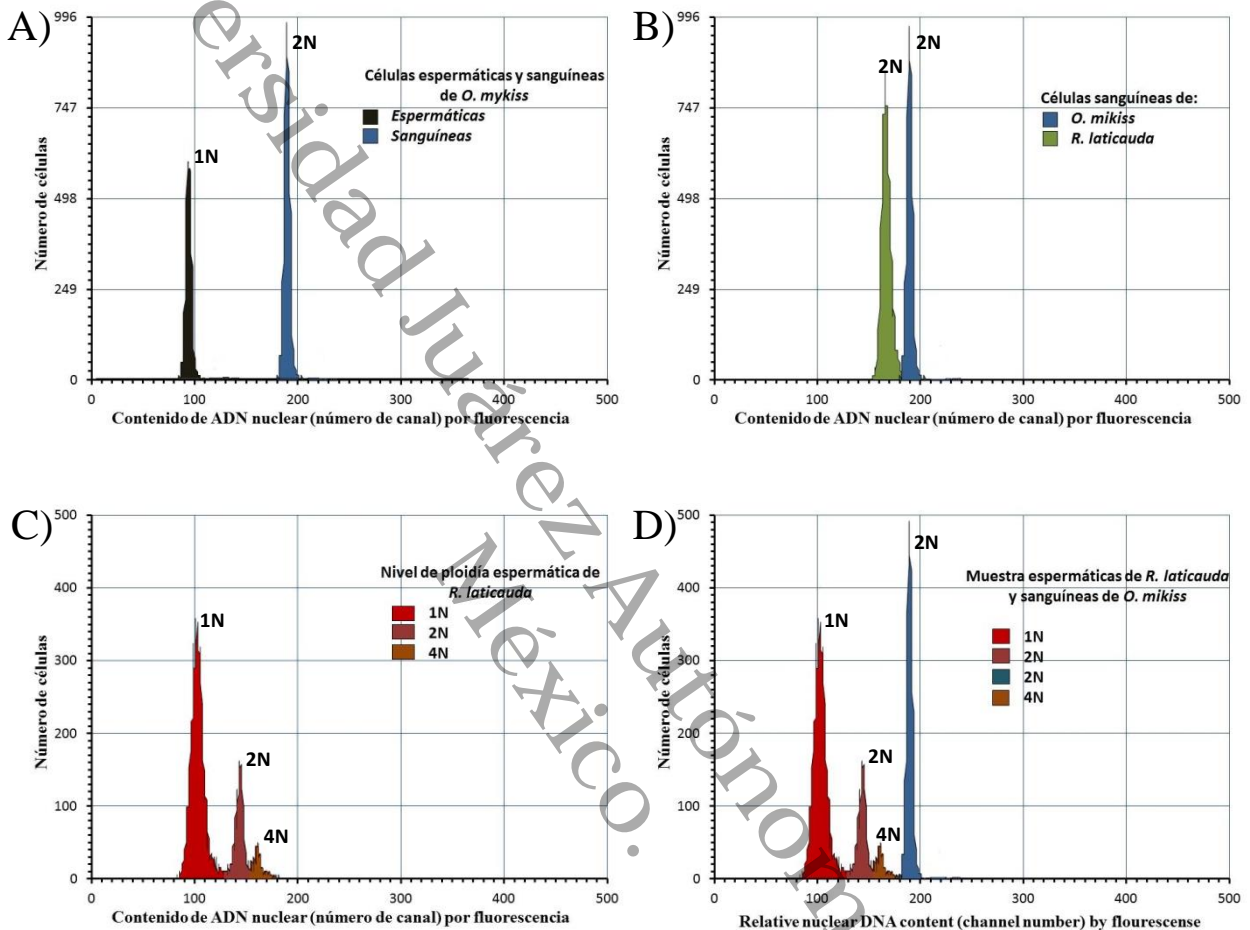


Figura 3. Contenido de ADN nuclear espermático y sanguíneo del bagre tropical *R. laticauda* (pico verde) y sangre de trucha arcoíris (pico en azul). Células sanguíneas y espermáticas de la trucha arcoíris (A), comparación del contenido de ADN de las células sanguíneas de la trucha arcoíris y *R. laticauda* (B), células espermáticas haploides (1N), diploides (2N) y tetraploides (4N) (C), comparación del contenido de ADN de las células sanguíneas de la trucha arcoíris y los tipos de ploidía espermática (D).

2.5. DISCUSIÓN

Por primera ocasión, describe la biología, la fisiología espermática, la estructura extracelular e intracelular, el contenido químico y bioquímico básico del semen del bagre tropical *R. laticauda*. En dicho sentido, fueron determinados en el semen y las células espermáticas de la especie, el tiempo de motilidad o actividad espermática, los porcentajes de motilidad y la variación del número de espermatozoides. También se estudió, la variación de la morfometría extracelular e intracelular espermática por Microscopía Óptica (MOP), por el análisis de las microestructuras mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Adicionalmente, se determinaron los componentes químicos y bioquímicos del plasma seminal, la osmolaridad del semen, el tamaño de las células espermáticas, y el contenido total de ADN por citometría fluorescente. Con todo ello, fueron sentadas las bases de la biología y fisiología reproductiva básica del esperma del bagre tropical *R. laticauda*.

La proporción de sexos observada en *R. laticauda*, durante las campañas de captura de peces, realizadas en el presente estudio fue de un macho por cada cuatro hembras (1:4). El estudio realizado por Chávez-Lomelí *et al.* (1989), en el río San Pedro en Tabasco, México mostró para *R. guatemalensis* la proporción (1.5:3.5) de 1.5 machos por cada 3.5 hembras, siendo esto oportuno con lo reportado en el presente estudio para el juil tropical. Por otro lado, en los machos de *R. guatemalensis*, se estimó el estadio de primera madurez en especímenes con 17 cm y peso aproximado de 75 gr (Chávez-Lomelí *et al.* 1989), biometrías menores a las reportadas para los especímenes macho empleados en este estudio, con peso y longitud promedio de 122.5 ± 60.7 gr y 22.2 ± 2.8 cm, respectivamente, por tales atributos los machos del bagre tropical que se emplearon para el estudio, estuvieron reproductivamente maduros y capacitados fisiológicamente para producir esperma; en acuerdo con las observaciones realizadas en las muestras de semen (promedio de 1.2 ± 0.1 ml) extraídas de los especímenes del bagre tropical, pues el semen mostró coloración blanquecina, típica del semen concentrado y transparente del semen fluido.

El conocimiento del número de células espermáticas con apropiada motilidad, permiten prescribir y garantizar la adecuada proporción de espermatozoides, que son necesarios para realizar la fertilización artificial efectiva de huevos (Rideout *et al.* 2004), en ello las herramientas como son el conteo directo por microscopía óptica, la fotometría, citometría y

centrifugación (espermatocrito) han sido las más empleadas en peces (Cabrita *et al.* 2014; Fauvel *et al.* 2010; Rurangwa *et al.* 2004). En el juil tropical, el empleo del conteo directo por microscopía óptica, permitió establecer el número de células espermáticas en la especie. La concentración promedio de células espermáticas, mostró el valor mínimo de 48×10^6 espermatozoides/ml y el máximo de 170×10^6 espermatozoides/ml, siendo el promedio global de $113.5 \times 10^6 \pm 30.698 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Desmesuradamente, pocos son los estudios sobre la fisiología reproductiva de los bagres tropicales que pertenecen al género *Rhamdia*, en tal contexto la variación del número espermático ha sido observada también en el bague sudamericano *R. quelen*, con conteos significativos que van desde $50 \pm 1.2 \times 10^9$ espermatozoides/ml (Borgues *et al.* 2005), 1.97×10^{10} espermatozoides/ml (Bombardelli *et al.* 2006), $4.508 \pm 1.573 \times 10^{10}$ espermatozoides/ml (Sanches *et al.* 2010), $53.48 \pm 25.23 \times 10^9$ espermatozoides/ml (Soares *et al.* 2010), $1.79 \pm 0.46 \times 10^{10}$ espermatozoides/ml (Sanches *et al.* 2011), $4.27 \pm 3.48 \times 10^9$ espermatozoides/ml (Tessaro *et al.* 2012) y hasta 7.57×10^{10} espermatozoides/ml (Bombardelli *et al.* 2016). Mientras que en *R. hilarii*, 6.35×10^{10} espermatozoides/ml, fueron reportados por Kavamoto y Silveira (1986); las variaciones observadas en *R. quelen*, han sido vinculadas con la temporada reproductiva, como se ha reportado en otros teleósteos.

En otras especies de peces, la variación del número espermático han sido asociadas, también a la temporada reproductiva, como es el caso de *Pseudoplatystoma metaense* (Ramirez-Merlano *et al.* 2011), *Melanogrammus aeglefinus* (Rideout *et al.* 2004), *Salmo trutta macrostigma* (Bozkurt *et al.* 2011), *Salmo trutta caspius* (Hajirezaee *et al.* 2010) y *Perca fluviatilis* (Alavi *et al.* 2010). Otros factores como son la alimentación, la salinidad (Tessaro *et al.* 2012; Martins, *et al.* 2015), la competencia espermática (Gomendio y Roldan, 2008; Browne *et al.* 2015), la temperatura (Romagosa *et al.* 2010) y el empleo de hormonas (Gbemisola and Adebayo, 2014; Yasui *et al.* 2014), se han relacionado directamente con las variaciones del número espermático. Aunque en el bague tropical, la hormona Gonadotropina Coriónica Bovina (GCB) fue empleada para la evaluación del número espermático, esta no fue asociada como un factor que pudiera explicar tal variación. En ello, Ferreira *et al.* (2001), no observaron diferencias significativas en *R. quelen* inducidos hormonalmente a la espermiación y en los no tratados, concluyendo que en la especie no es necesario el uso de un estimulante hormonal para la obtención de muestras espermáticas de buena calidad. Esto también fue observado a lo largo del estudio realizado en el bague tropical ya que fue posible la recolecta de muestras de

semen con buena calidad en especímenes sin tratamiento hormonal. Sin embargo, Yasui *et al* (2014) en *Astyanax altiparanae*, al emplear Ovopel y extracto de pituitaria de carpa, el número espermático mostró ligera reducción. Es claro que las variaciones del número espermático en el bagre tropical, están más asociados a la temporada reproductiva que a otros factores. Sin embargo, se requiere de estudios estacionales y continuos, que den mayores detalles respecto a la fisiología reproductiva de especímenes silvestres en comparación con los mantenidos en cautiverio.

En varias especies de peces dulceacuícolas, los reportes han mostrado que el tiempo de activación o motilidad espermática, fluctúa aproximadamente de 30-40 seg, esto conlleva a la rápida desorganización flagelar después de 30 seg de activación (Billar *et al.* 1995; Holt and Van Look, 2004; Verma *et al.* 2009). En *R. laticauda*, el rango de 42 a 61 seg fue observado, con promedio global de actividad espermática de 50.86 ± 6.270 seg; tiempo similar a lo observado en el bagre sudamericano *R. quelen* con 47.9 ± 1.3 seg (Borgues *et al.* 2005). Sin embargo, en *R. hilarii*, tiempos de motilidad mayores a 108.1 ± 28.26 seg, fue reportado por Kavamoto & Silveira (1986), valor que está fuera del rango observado en *R. laticauda* y *R. quelen*.

Variaciones en los tiempos de actividad espermática, se han ligado a los componentes del medio de activación, cuando se trata de semen fresco y puro; el semen fresco del bagre tropical con osmolaridad de 298 ± 5.78 mOsmol/kg fue activado con agua envejecida que demostró ser un medio líquido de tipo isotónico con osmolaridad de 65.666 mOmol/kg, con ello se logró valores $>90\%$ de células activas.

Se ha documentado ampliamente, que la osmolaridad del medio de activación, es uno de los factores clave que determinan el tiempo de movimiento espermático en diversas especies de peces dulceacuícolas (Alavi & Cosson, 2006), además que aquellas soluciones con alta osmolaridad pueden llevar a las células espermáticas a experimentar daños irreversibles sobre las microestructuras (flagelo y pieza media), reflejándose en la reducción de los porcentajes y tiempo de motilidad (Alavi *et al.* 2009). Para *R. quelen* (Matins *et al.* 2015) y *R. sapo* (Maggesi *et al.* 1984); el movimiento promedio de 30-40 seg y porcentajes de 75-100% de células activas, fue observado cuando las muestras de semen fueron activadas con una solución isotónica, como en el bagre tropical. Sin embargo, cuando muestras espermáticas fueron activadas con una solución hiperosmótica, el tiempo de motilidad aproximado de 200 y

60 seg, con porcentajes de activación del 25-50% de células espermáticas, fue observado para ambas especies.

La composición iónica del plasma seminal, es otro factor importante y clave, que permite a los espermatozoides mantenerse viables por largos períodos de tiempo en los testículos, sin sufrir alteraciones que pudieran modificar la fisiología de la activación (Billard *et al.* 1995; Cosson *et al.* 2004). Los iones como el Na^+ y K^+ , son los responsables principalmente de la inhibición espermática en peces dulceacuícolas (Cosson *et al.* 2004; Borges *et al.* 2005). Para el bagre tropical, las concentraciones de los iones Na^+ fueron de 130 ± 14.3 y de 3.38 ± 0.43 para el K^+ , siendo estos valores menores en comparación con lo reportado para el líquido seminal del bagre sudamericano, *R. quelen* con Na^+ de 153.7 ± 2.4 y K^+ de 10.7 ± 0.5 (Borges *et al.* 2005). Sin embargo, cuando estos valores de Na^+ y K^+ , son comparados con algunas especies de carpas como; *Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Labeo calbasu*, *Hypophthalmichthys molitrix* y *Ctenopharyngodon idella*, las concentraciones de los iones Na^+ , fueron más altos que los de K^+ . Esta variación iónica, modifica la osmolaridad del fluido seminal y como ha sido demostrado en Ciprínidos es el principal supresor de la motilidad (Verma *et al.* 2009). Además de los iones Na^+ y K^+ , el Ca^+ ha sido asociado como factor antagonista del efecto inhibitor de la motilidad del K^+ (Alavi & Cosson, 2006). En el bagre tropical, la concentración de $\text{Ca}^+ = 10.4 \pm 0.41$ mg/dL, fue mayor a lo observado en el semen de *R. quelen* con 4.2 ± 0.20 mg/dL. En los salmónidos, los cambios en la osmolaridad mediados por los iones Ca^+ , son precursores de iniciar la motilidad espermática debido a los cambios del potencial de membrana de las células espermáticas (Alavi & Cosson, 2006). Aunque en las muestras de semen puro del juil tropical, no se observó movimiento u otro tipo de actividad espermática.

Recientemente se ha estudiado, moléculas orgánicas como la glucosa (Adames *et al.* 2015) y el total de proteínas (Campos *et al.* 2010), las cuales han sido también relacionadas con la reducción de los parámetros de la motilidad en *R. quelen*. En dicho aspecto, Dietrich *et al.* (2016) observaron que en semen de carpa, las proteínas presentes principalmente en el citoplasma, las mitocondrias, el citoesqueleto, el núcleo y la membrana plasmática; están asociados en la reducción de los tiempos de motilidad y como mediadores de la generación de energía durante el inicio de la motilidad espermática. Los valores encontrados en *R. laticauda*, de glucosa y el total de proteínas, fueron menores a los resultados obtenidos en el semen de *R. quelen*, pero mayor que en algunas especies de carpas como; *Catla catla*, *Labeo rohita*, *Labeo*

calbasu, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Ctenopharyngodon idella* y *Carassius gibelio* (Taati *et al.* 2010; Verma *et al.* 2009).

Es claro que las variaciones de la calidad espermática, son comunes en las muestras de semen de los peces y no solo dependen de los métodos utilizados durante su manejo y empleo (Yasui *et al.* 2014). Sino que además, de la concentración de componentes orgánicos e inorgánicos del plasma seminal, condición que probablemente es independiente en cada especie, nicho ecológico y hasta entre individuos, tal y como se observó en las muestras de semen analizadas en el bagre tropical.

Por otro lado, la morfología de las células espermáticas y de todas sus estructuras, garantizan el éxito de la fertilización y la transmisión apropiada de la información genética de los machos hacia el huevo (Verma *et al.* 2009). La estructura extracelular e intracelular, es uno de los criterios más importantes para determinar la calidad de una muestra de semen (García-Herreros *et al.* 2006). El análisis espermático por MOP y MEB, permitió por primera ocasión observar y describir detalladamente, las microestructuras externas de los espermatozoides del bagre tropical *R. laticauda*. Mientras que el análisis espermático por MET; los detalles de la ultraestructura y componentes internos de las células espermáticas.

Los resultados de las observaciones por MOP y MEB, dieron luz a indicar que las características morfológicas típicas observadas en las células espermáticas de *R. laticauda*; son muy similares a las mostradas por la mayoría de los peces teleósteos con fertilización externa; tales particularidades son: cabeza sin acrosoma, pieza media única y pequeña, flagelo único y con región terminal en forma de gancho (Jamieson, 2009^a). Se notó, reducción del tamaño de las microestructuras espermáticas al compararse los valores obtenidos por MOP y MEB, dicho fenómeno ha sido asociado a que las células espermáticas para observarse por MEB, son sometidas al tratamiento con alcohol y acetonas, que deshidratan las estructuras espermáticas favoreciendo reducción del tamaño (Marco-Jiménez *et al.* 2006), pero sin efectos en su estructura real. Sin embargo, el análisis por MEB permitió definir a mayor detalle las microestructuras que por MOP no pudieron ser observadas, como fueron la región terminal del flagelo, el inicio y final de la pieza media. Los valores obtenidos para las microestructuras por MEB, fueron similares a lo reportado para el bagre africano *Barbus barbuis*, *Esox lucius* L. (Alavi *et al.* 2008; 2009), *Merluccius australis* (Effer *et al.* 2013), el salmón del Atlántico *Gadus morhua* (Tuset *et al.* 2008^a), la trucha arcoíris *O. mikyss* (Tuset *et al.* 2008^b; 2008^c) y el tambaqui amazónico *Colossoma macropomum* (Maria *et al.* 2010).

El tamaño típico de cabeza espermática y el contenido total de ADN, en células espermáticas y sanguíneas en la especie, se estableció por análisis citométrico, que permitió observar polimorfismo espermático (células pequeñas, medianas y grandes) observado en dos machos de la especie, ha sido también observado en otras especies de peces y mamíferos, las cuales han sido atribuidas principalmente con algún tipo de daño sobre las células espermáticas (Enciso *et al.* 2011). En la carpa por ejemplo, se ha observado, que no todos los espermatozoides son liberados antes del inicio de un nuevo ciclo espermático y espermatozoides en diferentes estadios de madurez pueden encontrarse en machos adultos (Billar *et al.* 1992), las cuales pueden experimentar algún tipo de daño por envejecimiento celular y llevar a procesos como la apoptosis, que pueden dar la apariencia incluso de un tamaño celular mayor, cuando se analizan por MOP (Cruea, 1969). Para el juil tropical, la presencia del polimorfismo espermático, no fue asociada con algún tipo de daño o parte del proceso de apoptosis, ya que mediante el análisis por MEB no se observó la presencia de ninguna de las características típicas que acompañan al proceso de la apoptosis o necrosis. En algunas especies, la hibridación ha dado pauta para el incremento del tamaño de la cabeza espermática debido a una espermatogénesis errónea (Zhou *et al.* 2015; Arias-Rodriguez *et al.* 2010), tal incremento mantiene relación con el tamaño celular y el nivel del contenido de ADN adicional (Juchno *et al.* 2010; Hardie y Hebert, 2004). En el género *Rhamdia*, la poliploidía natural ha sido observada en algunas especies como *R. quelen*, la cual se produce por la retención de las primeras divisiones mitóticas durante los primeros estadios del desarrollo embrionario por factores ambientales como la temperatura y no por hibridación (García *et al.* 2003; Silva *et al.* 2011; Tsuda *et al.* 2010). Las diferencias de las medidas de las microestructuras espermáticas por MOP y MEB de las células pequeñas, medianas y grandes del bagre tropical, mostró la presencia de tres grupos de datos independientes y basado en esas diferencias, fueron clasificados como espermatozoides “haploides, diploides y tetraploides”. Las medidas de las microestructuras espermáticas obtenidas por MOP y MEB, no son suficientes para afirmar que los espermatozoides con tamaños diferentes, son producto de la poliploidía. Por ello, el análisis del contenido total ADN por citometría de flujo, permitió dar sustento a las observaciones obtenidas por MOP y MEB para aquellas células espermáticas con sospecha de poliploidía. Al igual que en las mediciones por MOP y MEB, variaciones pueden presentarse cuando se determina el contenido total de ADN en alguna especie y estas, han sido asociadas con las metodologías empleadas, equipo de análisis y muestra de referencia

(Ciudad *et al.* 2002). Por lo anterior, el empleo del citómetro de flujo y células espermáticas de la trucha arcoíris *O. mykiss* como unidad estándar, con un valor ya conocido de $2C = 5.5$ pg (Tiersch *et al.* 1989) fueron empleadas para determinar los valores del contenido total de ADN en el bagre tropical para mayor precisión. Los valores, determinados en condición diploide o $2C$ (dos copias) en todos los casos fue de $1N = 2.543 \pm 0.08$ pg, $2N = 3.712 \pm 0.122$ pg y $4N = 4.675 \pm 0.217$ pg. Los resultados, mostraron relación proporcional de aproximadamente 0.5 pg entre cada nivel de ploidía celular. Para el loach *Misgurnus anguillicaudatus* tal relación fue también observada en híbridos de la especie, con valor creciente del contenido de ADN en relación al nivel de ploidía ($2N$, $3N$, $4N$, $5N$, Y $6N$) cuando eritrocitos de pollo fueron empleados como unidad estándar (Zhang y Arai, 1996). Los valores del contenido de ADN para las células diploides espermáticas y sanguíneas (4.44 ± 0.03), fueron similares a lo reportado para *R. hilarii*, $1C = 2.25 \pm 0.18$ pg (Fenerich *et al.* 2004) aun empleando métodos diferentes de medición y células de pollo como referencia para el cálculo del contenido de ADN. Dentro del orden Siluriformes, las variaciones del contenido total de ADN entre los géneros es común, y este es representativo de cada especie (Fenerich *et al.* 2004). Además, es claro que en algunas especies, el número cromosómico no siempre mantiene relación con la cantidad total de ADN, ya que en ocasiones especies del mismo orden presentan número cromosómico mayor pero bajo contenido de ADN (Carvalho *et al.* 2002; Fenerich *et al.* 2004). Para *R. laticauda* un número modal diploide de 56 cromosomas, ha sido reportado (España-García, 2012), mientras que para *R. hilarii* el número cromosómico diploide de 58 cromosomas fue observado (Fenerich *et al.* 2004); por ello, el número cromosómico no determina el contenido total de ADN para estas dos especies, las cuales mostraron valores de contenido de ADN espermático y sanguíneo muy similar. Es claro que las observaciones realizadas por MOP y MEB, de células con un tamaño mayor, es producto de poliploidía en la especie y no de artefactos o procesos degenerativos como la apoptosis. Sin embargo, aún es incierto el origen de la poliploidía espermática en el bagre tropical. Posiblemente especies del mismo género como *R. guatemalensis*, *R. quelen* o *R. laticauda*, las cuales comparten el mismo hábitat y períodos de reproducción (Chávez-Lomelí *et al.* 1989; Miller *et al.* 2009) puede estar favoreciendo posible hibridación entre generando descendencia con células espermáticas poliploides como lo observado en el pez *Misgurnus anguillicaudatus* (Arias-Rodriguez *et al.* 2010).

Por otro lado, la presencia de cabezas espermáticas, redondas y ovaladas difirieron en tamaño y frecuencia cuando estas fueron analizadas por MEB. Los espermatozoides ovalados, fueron más grandes, pero menos frecuentes en comparación con los de tipo redondo, 71% y 29%, respectivamente. En el salmón del Atlántico *Gadus morhula*, se observaron células ovaladas y redondas, estas variaron en tamaño y frecuencia, siendo las redondas más abundantes y de menor tamaño (Tuset *et al.* 2008^a). Sin embargo, en *R. quelen*, se observó que las células redondas son menos frecuentes que las ovaladas 39.265±14.50% y 60.565±15.01%, respectivamente (Soares *et al.* 2010). En algunos peces como; *Barbodes gonionotus* (Boonthai *et al.* 2016), *Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix* (Verma *et al.* 2009), *R. quelen* (Quagio-Grassiotto *et al.* 2005) y *Scatophagus argus* (Madhavi *et al.* 2015) las células espermáticas son solo de tipo circular. Mientras que en *Perca fluviatilis* (Lahnsteiner *et al.* 1997), *P. gracilis* (Quagio-Grassiotto *et al.* 2005) y *Cottos gobio* (Lahnsteiner *et al.* 1997) se observan únicamente células espermáticas de tipo ovoide.

Las formas de cabezas espermáticas redondas y ovaladas, han sido atribuidas a procesos de espermiogénesis de tipo simple o compleja, donde las células redondas son las de menor complejidad (Billard, 1986; Psenicka *et al.* 2007). Aunque también, cambios de la morfología espermática se han atribuido a procesos de competencia espermática, como en algunas especies de Salmónidos y Ciprínidos (Tused *et al.* 2008^c y Furbock *et al.* 2009).

El empleo de métodos que permiten una rápida medición de la calidad espermática y estructura, como el citómetro, han sido de las más empleadas por su rápido análisis y seguridad en los resultados (Fauvel *et al.* 2010). En el bagre tropical, el análisis por citometría multiparamétrica y el empleo del marcador yoduro de propidio en combinación con Anexina V Alexa fluor® 488, permitió establecer y corroborar el tamaño real promedio de 3,297,085 células espermáticas con promedio de 4.899±0.784 μm^2 y 4.823±0.504 μm^2 para citometría en campo fluorescente y claro, respectivamente. Este valor fue similar a lo reportado en otras especies de peces, como el salmón del atlántico *Gadus morhua* con promedio de 4.86±0.71 μm^2 (Tuset *et al.* 2008^a). Al igual que los resultados por MOP y MEB, el análisis por citometría multiparamétrica mostró diferencias significativas entre los machos empleados. Las cuales, fueron asociadas de igual manera con los tipos de cabeza observados por MOP, MEB y MET.

Por otro lado, los resultados del análisis de la ultraestructura espermática por MET, mostró características típicas de la familia Heptapteridae y Pimelodidae e incluso con algunas

especies de Cíclidos como fue la ausencia de una estructura acrosomal, carencia de una fosa nuclear, alta cromatina homogénea condensada ocupando el núcleo, complejo centriolar próximo al núcleo, pocas mitocondrias en la pieza media y rodeando al complejo centriolar, un único flagelo con el típico axonema (9+2) y la ausencia de estructuras membranosas en forma de aletas a lo largo del flagelo (Quagio-Grassiotto *et al.* 2005; Jamieson, 2009^a; Verma *et al.* 2009). Para el orden de los Siluriformes al menos unas 26 especie de las 37 familias que comprenden el orden han sido descritas por MET (Jamieson, 2009^a). Dentro de la familia Heptapteridae y Pimelodidae un tipo particular de espermiogénesis ha sido descrito (tipo III) y es característico de las especies que conforman a estas familias (Quagio-Grassiotto *et al.* 2005). Para *R. laticauda*, la espermatogénesis no ha sido descrita a detalle y no existen antecedentes sobre el tema. Sin embargo, con la información generada en el presente estudio y con base en las características espermáticas compartidas con las especies de la familia Heptapteridae y Pimelodidae, fue clasificado como un aquaespermatozoides primitivos de tipo III. Al igual que la mayoría de los peces teleósteos con fertilización externa, la ausencia de un acrosoma y organelos accesorios en la cabeza espermática, fue observada para el bagre tropical, siendo clasificados como un espermatozoide acrosomal. Similar a las observaciones realizadas por MOP y MEB, células con cabezas redondas y ovaladas fueron observadas por MET. Sin embargo, estas no difirieron en cuanto a la presencia de nuevas estructuras internas. En *P. gracilis* células ovoides y en *R. quelea* redondas, han sido descritas para la familia Heptapteridae por MET (Quagio-Grassiotto *et al.* 2005) pero no ambos tipos, como en *R. laticauda*. La posición de los centriolos fue observado adyacente el distal del proximal, entre el núcleo y la región inicial del flagelo para ambos tipos de cabezas. Esta posición es observada también en otras familias de Siluriformes como; Amblycipitidae, Aridae, Auchenniapteridae, Ictaluridae, Malapteruridae, Mochokidae, pimlodidae, Schilbidae y Scoloplacidae (Quagio-Grassiotto y Oliveira, 2008). Aunque en algunas especies como *Phenacogrammus interruptus*, la posición del centriolo proximal yace entre la fosa nuclear (Pecio, 2009), la cual no fue observada en ninguno de los tipos de espermatozoides del bagre tropical. En algunas especies de Ciprínidos, la forma de las mitocondrias son redondas y ovaladas y estas varían en cuanto a número, los cuales pueden ser desde 2 a 10 (Verma *et al.* 2009) aunque en algunas especies una sola mitocondria puede ser observada (Fürböck *et al.* 2009). Para *R. laticauda* un total de 5 a 6 mitocondrias pudieron ser observadas, similar a lo

reportado para *R. quelen* por Quagio-Grassiotto *et al.* (2005) con el mismo patrón en cuanto a la forma de las mitocondrias pequeñas redondas y ovaladas las de mayor tamaño.

La información generada en la presente investigación, permitirá mejorar los programas de reproducción, fertilización *in vitro*, conservación temporal y criopreservación espermática.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2.7. ANEXO I

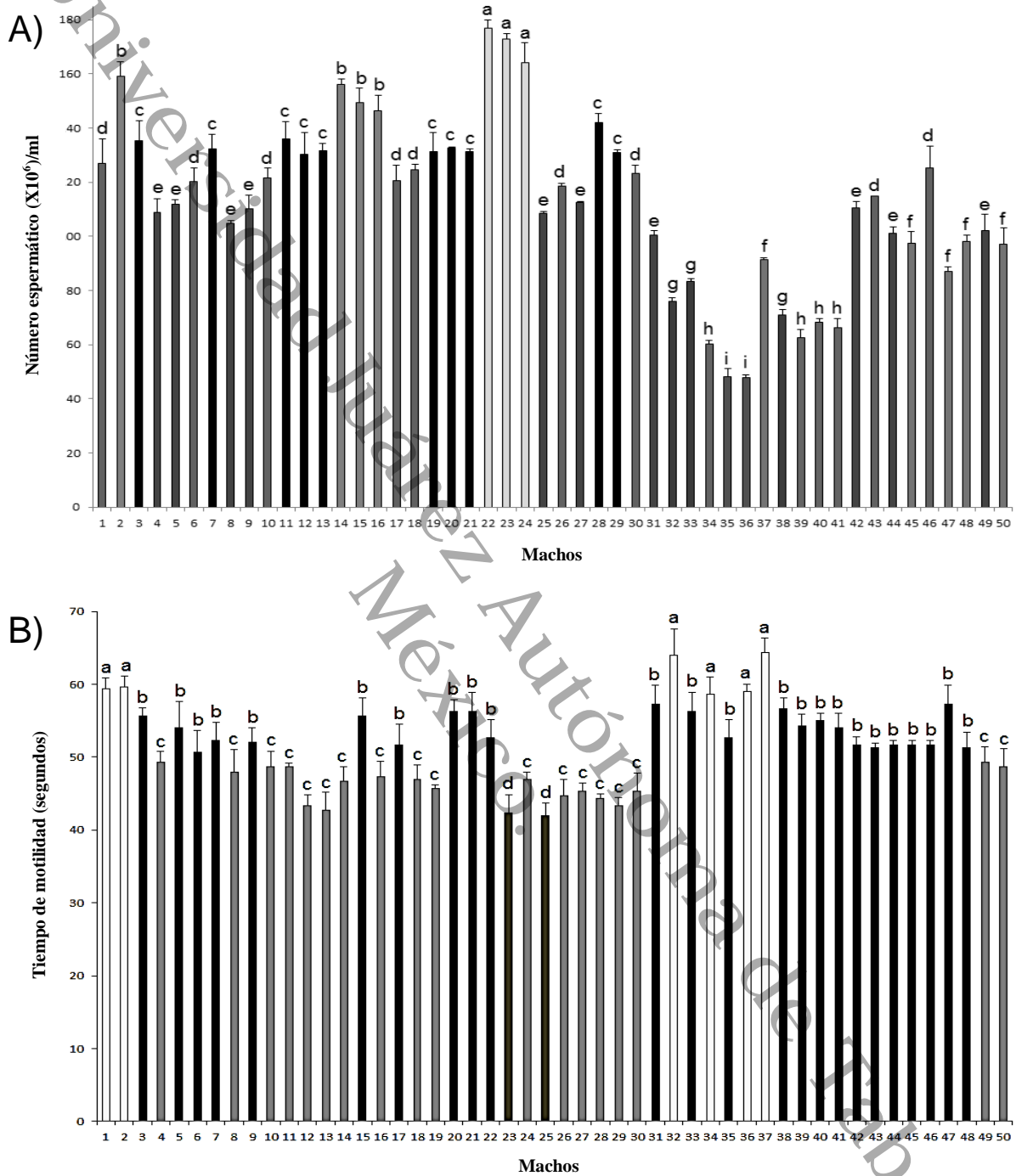


Figura 4. Promedio del número de espermatozoides (A) y motilidad espermática (B) de especímenes de *R. laticauda* (1-50). Letras diferentes entre columnas, indican diferencias significativas entre machos a $P \geq 0.05$, (media \pm S.D) en caso contrario no existen.

2.7.1 ANEXO II

Tabla 3. Comparación del tamaño de la cabeza espermática de 15 especímenes de *R. laticauda* por citometría en campo claro y fluorescente.

♂	Tipo de técnica empleada					
	Citometría por campo claro Media±DE	n	Citometría fluorescente Media±DE	n	Medición manual Media±DE	n
1	4.801±0.029 ^b	81,891	4.993±0.782 ^a	150,808	5.486±0.036 ^a	30
2	4.800±0.036 ^b	45,966	4.929±0.786 ^a	77,5760	5.383±0.042 ^b	30
3	4.791±0.018 ^c	64,554	4.897±0.785 ^a	190,003	5.605±0.034 ^a	30
4	4.782±0.014 ^c	73,323	4.893±0.782 ^a	132,172	5.466±0.035 ^b	30
5	4.795±0.016 ^b	100,73	4.904±0.786 ^a	137,839	5.830±0.056 ^a	30
6	4.863±0.081 ^a	34,607	4.903±0.784 ^a	150,885	5.603±0.033 ^a	30
7	4.816±0.025 ^a	46,264	4.892±0.785 ^a	168,655	5.218±0.055 ^c	30
8	4.793±0.023 ^c	51,571	4.843±0.778 ^c	136,738	5.341±0.031 ^b	30
9	4.785±0.014 ^c	71,531	4.881±0.784 ^b	178,056	5.113±0.044 ^d	30
10	4.804±0.012 ^b	80,004	4.887±0.784 ^a	138,638	5.166±0.044 ^c	30
11	4.815±0.019 ^a	88,938	4.857±0.781 ^a	164,094	5.619±0.042 ^a	30
12	4.855±0.059 ^a	87,905	4.913±0.788 ^a	137,848	5.384±0.039 ^b	30
13	4.893±0.106 ^a	93,708	4.900±0.787 ^a	180,539	5.157±0.056 ^c	30
14	4.880±0.080 ^a	83,237	4.915±0.788 ^a	125,101	5.601±0.038 ^a	30
15	4.875±0.090 ^a	51,692	4.886±0.787 ^a	172,206	5.473±0.045 ^a	30

D.E= Desviación estándar, n= células analizadas. Letras diferentes entre columnas muestran diferencias significativas, en caso contrario las diferencias no existen con $P \geq 0.05$.

CAPITULO III

Efecto de la Luz Ultravioleta Sobre los Espermatozoides de *Rhamdia laticauda*: Basada en Estudios de Fisiología Extracelular e Intracelular

3.1. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la radiación UV-C sobre la fisiología de las células espermáticas del juil tropical *R. laticauda*, como paso primario para la inactivación del ADN espermático y uso posterior para la inducción artificial de ginogénesis en la especie. El tiempo de motilidad, porcentajes de motilidad, tipo de movimiento, análisis estructural por MOP y MEB, porcentajes de células vivas/muertas/apoptóticas y dispersión de del ADN espermático, fue establecido para cada dosis de radiación UV probadas. El tiempo de motilidad, tipo de movimiento y porcentajes de células activas, mostraron relación dosis respuesta conforme al incremento en los niveles de exposición al UV. Los valores más altos de células activas, tipo de movimiento y tiempos de motilidad, fueron observados en los grupos control: 100%, tipo 4 y 48.7 ± 5.40 seg, respectivamente. Mientras que la pérdida total de la viabilidad fue observada hasta la dosis de radiación 1.1 J/cm^2 . Los valores mayores de células espermáticas vivas ($83.11 \pm 1.86\%$) y menores de células muertas ($8.96 \pm 3.57\%$) y en apoptosis ($8.00 \pm 4.14\%$) fueron observados en los grupos control. Mientras que en la dosis 1.1 J/cm^2 , los porcentajes de células muertas ($65.53 \pm 1.71\%$) y apoptóticas ($12.60 \pm 1.81\%$), en conjunto alcanzaron el 78.13% de inviabilidad espermática. El análisis morfológico y de la fina estructura espermática por MOP y MEB, mostro bajo nivel de daño en el grupo control y en las primeras dosis de radiación UV (0.1 J/cm^2 - 0.5 J/cm^2). Mientras que en las dosis de radiación (0.6 J/cm^2 - 1.1 J/cm^2) la frecuencia y tipo de anormalidades fueron mayores, siendo el daño sobre la región media y flagelo los de mayor incidencia. El análisis de dispersión de ADN, no mostró daño alguno sobre las células espermáticas en los grupos control y la dosis 0.1 J/cm^2 . Sin embargo, en la dosis 0.5 J/cm^2 y 1.1 J/cm^2 pudo ser observado mayor daño. El análisis combinado de las diferentes técnicas en la evaluación espermática, permiten dar una amplia visión del efecto de la luz UV sobre los espermatozoides del bagre tropical, los cuales, pueden ayudar a la selección de una dosis idónea para la inactivación del ADN espermático en

la especie, para su uso en la inducción artificial de la ginogénesis, además de que estos ensayos pueden ser de utilidad en programas de monitoreo ambiental para peces nativos en el estado de Tabasco.

3.2. INTRODUCCIÓN

A pesar de los beneficios de las radiaciones ionizantes en el tratamiento de algunas enfermedades como el cáncer; estas han sido relacionadas también con el surgimiento de enfermedades (Madan *et al.* 2015; Yusuf *et al.* 2011) y patologías que afectan la fisiología y salud de los organismos. La radiación ultravioleta (UV), es uno de los agentes físicos que se ha reportado causante de mutaciones en diversos organismos vivos, pues las lesiones provocadas pueden resultar en modificación de las características hereditarias o inactivación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en células somáticas o gaméticas (Herschenfeld & Gilchrest, 1998; Kozmin *et al.* 2003). En peces, diversos estudios han mostrado que la luz UV, es un agente que produce además de la desnaturalización del ADN en espermatozoides (Ciereszko *et al.* 2005; Dietrich *et al.* 2005; Ravanat *et al.* 2001), daño directo sobre las estructuras espermáticas como las mitocondrias, membrana plasmática y flagelo (Li *et al.* 2000; Lu & Wu, 2005; Pruski *et al.* 2009). A pesar de ello, la radiación UV ha sido empleada con fines biotecnológicos en varias especies de peces mediante la inactivación del ADN (inactivo genéticamente) espermático y ovocitario, sin afectar la capacidad fisiológica para la fertilización de huevos para técnicas biotecnológicas como la ginogénesis y androgénesis artificial (Purdom, 1983; Luckenbach *et al.* 2004; Rougeot *et al.* 2005; Arias-Rodriguez *et al.* 2004; Flynn *et al.* 2006).

La inactivación genética del espermatozoide por UV, se ha documentado ampliamente que se produce principalmente por la desnaturalización del ADN, ya que se forman dímeros de timina, citosina y guanina, que crean sitios lábiles en la estructura del ADN que facilitan la fragmentación (Shima and Setlow, 1984; Valcarcel *et al.* 1994). La ginogénesis, ha sido utilizada en peces y otros organismos acuáticos, para producir poblaciones monosexuales, poblaciones isogénicas (descendencia genéticamente igual a la madre) y líneas semiclónicas (mitoginogénesis) (Arias-Rodriguez *et al.* 2004; Arai, 2000; 2001; Purdom, 1983). Así como, para la obtención de caracteres de interés para acuicultura, como resistencia a enfermedades o para la mejora dirigida por selección genética (Purdom, 1983; Hernández-Ibarra, 2004).

El creciente interés mundial por el cultivo de peces, como alternativa para la obtención de proteína de origen animal, principalmente en países en vías de desarrollo como México, ha motivado la creciente atención de los acuicultores del mundo por dominar la reproducción, la proporción de sexos de algunas especies de peces (hembras o machos) mediante biotecnologías que implican el uso de luz UV y que no requieren de la inserción de genes extraños o ajenos (Arias-Rodriguez, 2001). El bagre tropical, es un pez dulceacuícola de tamaño mediano (25 cm), que habita en aguas dulceacuícolas poco profundas, con fondo típicamente arenoso o lodoso en el sureste de México (Miller *et al.* 2009), y al igual que a otras especies de bagres, su fácil cultivo, resistencia a condiciones adversas, además, de su carne blanca y consistente, la convierten como un buen candidato como modelo biológico para estudios encaminados a su aprovechamiento y conservación. Clásicamente, la mayoría de los estudios con UV en peces, se han encaminado en la evaluación de aspectos de carácter fisiológico y muy pocos se han enfocado al estudio de los efectos a nivel intracelular y extraestructural de las células espermáticas cuando se determina la dosis idónea de radiación UV para inactivar a los espermatozoides, sabiendo que estos son de vital importancia para garantizar el éxito de fertilización en las especies y por ende niveles altos de sobrevivencia (Arias-Rodriguez *et al.* 2004). Por ello el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto de once dosis (0.1-1.1 J/cm²) de radiación UV, sobre la capacidad reproductiva de la células espermáticas de *R. laticauda*, basado en estudios fisiológicos y estructurales como fueron tiempo de motilidad, porcentajes de motilidad, tipo de movimiento, análisis de la estructura celular espermática por MOP y MEB. Así mismo, se consideró los porcentajes de células vivas/muertas/apoptóticas por citometría fluorescente y análisis de dispersión de ADN en minigeles. Todo ello en conjunto, con el fin de identificar una dosis óptima de radiación UV, para la correcta inactivación genética espermática, y su empleo posterior en experimentos de manipulación cromosómica encaminados al empleo de ginogénesis haploide y diploide.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Recolecta y Mantenimiento de los Reproductores

Los machos adultos fueron capturado por pesca artesanal en el río Grijalva, Centla, Tabasco, México (18°11'30.93"N, 92°42'43.64"O). El peso promedio y longitud de los

especímenes fue de 122.5 ± 60.7 g y 22.2 ± 2.8 cm. Los reproductores fueron aclimatados en un sistema cerrado de recirculación con 10 tanques de 1,600 litros, aireación constante y con filtros de agua y luz UV) y ciclo de luz/oscuridad (6/6 horas) a $31.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Los peces fueron alimentados dos veces al día con pellets (Growfish Api-Tilapia 2, 35% de proteína, Malta-Cleyton®) y suplementados con larvas y juveniles vivos de *Oreochromis* sp.

3.3.2. Tratamiento Hormonal y Recolecta de Semen

Los machos fueron inyectados con 250 UI/kg de peso con la hormona Gonadotropina Coriónica Bovina (GCB, Loeffler® y mantenidos en un tanque a $31.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$) 12 horas antes de su uso (Arias-Rodriguez, 2016, datos no publicados). Los machos fueron anestesiados empleando Metasulfonato de Tricaina (MS222) 0.25 g/L y el semen fue recolectado individualmente con una jeringa estéril después de aplicar presión suave sobre los flancos del pez, previniendo que el área genital estuviera limpia y seca, para evitar la contaminación con agua, sangre, orina o heces fecales que pudieran reducir la calidad del semen. Las muestras fueron almacenadas a 4°C en una hielera en tubos de 1.5 ml por un tiempo no mayor a 20 min después de la recolecta, para evitar pérdida en la calidad.

3.3.3. Evaluación de la Calidad Espermática y Mezclado en la SSIM

Las muestras de semen puro con motilidad de Grado-4 y porcentajes de células activas $\geq 90\%$, fueron mezcladas en la solución SSIM que se elabora con; NaCl 0.875 gr, KCl 0.150 gr, CaCl 0.022, MgSO₄ 0.013 gr, Tris 0.242 gr/ 100 ml de agua bidestilada (Lahnsteiner y Patiner, 1998). Para mantener una reducida variabilidad del número espermático en la mezcla con la SSIM, un número estándar aproximado de 50,000,000 espermatozoides/ml fue empleado. Para ello, el conteo del número de espermatozoides fue realizado mediante el empleo de un hematócmetro de 0.1 ml (Cámara Neubauer Hausser Scientific de 0,100 mm de profundidad) en acuerdo a lo señalado por Coffin (1986). Las observaciones se realizaron en el microscopio óptico Olympus®, BH-2 Japan con el objetivo 40X (400 aumentos) y filtro de interferencia azul. Una vez determinado el número espermático, la cantidad de semen (μl) fue recolectado tal como se señala en el apartado anterior y mezclado en la SRVE mantenidas a 4°C por un tiempo no mayor a 20 min. En las muestras de semen puro y las mezcladas en la

SSIM, se evaluaron los tiempos de motilidad y porcentajes de motilidad en acuerdo a las escalas señaladas por Acosta *et al.* (1990).

3.3.4. Radiación del Esperma con Luz UV

Una cámara UV con dimensiones de (50cmX50cmX50cm) equipada con una lámpara germicida de 15W (General Electric, G15T8) y adicionada con un agitador orbital (Orbit M60, Labnet) fue empleada para la irradiación de las muestras espermáticas las cuales fueron seleccionadas aleatoriamente. Un total de 11 dosis de radiación UV (0.1 J/cm²-1.1 J/cm²) fueron evaluadas en muestras de semen de 30 machos. Las dosis de radiación UV, se calcularon siguiendo el modelo matemático de Christensen y Tiersch (1994) ($E = (n \times w \times t) / (d^2 \times \pi^2)$). Donde; E= exposición total en julios/cm², n= número total de lámparas, w= rendimiento de la lámpara a 254 nm, t= duración de la exposición en segundos, d²= cuadrado de la distancia de la muestra en relación con la lámpara (10 cm), $\pi^2 = 3.1416$. Para probar cada una de las dosis de radiación, 2 ml de la mezcla (semen + SSIM) se colocaron en cajas Petri de vidrio de 5 cm de diámetro interior. El grosor de la película de la muestra (semen+extender), se calculó en acuerdo a lo propuesto por Arias-Rodriguez, (2001), ($h = v / \pi r^2$), donde; h= altura de la película (cm), v= volumen total de muestra por caja petri de 5 cm (ml), π = Valor de pi = 3.1416, r²= radio de la caja Petri elevado al cuadrado expresada en cm. Las muestras de semen, se mantuvieron en la cámara UV en movimiento continuo para una irradiación homogénea a 20 r.p.m con el Orbit M60, Labnet, durante el tiempo estimado para cada dosis UV.

2.3.5. Análisis Celular Espermático por Microscopia Óptica (MOP)

Muestras de semen de 10 μ l (semen+SRVE+UV) fueron tomadas después de cada dosis de irradiación y fijadas en 100 μ l de glutaraldehído al 2.5%, que fue preparado en buffer fosfatos a 0.1 M (pH 7.4). Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su análisis (Arias-Rodriguez *et al.*, 2010) con el microscopio óptico.

Las preparaciones espermáticas fueron elaboradas tomando 10 μ l de semen fijado, que luego fue depositado en el extremo de un portaobjetos y dispersado suavemente, secada a temperatura ambiente, posteriormente fueron teñidas por 10 min con giemsa preparada al 10%

en buffer de fosfatos al 0.1 M (pH 7.4) y los residuos fueron eliminados con agua destilada, posteriormente secado al aire. El análisis óptico fue realizado en el microscopio de contraste de fases Axio Scope.A1 a 50X de magnificación (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016). Las imágenes fueron capturadas con la cámara AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016) mediante el programa ZEN/2016 (Carl Zeiss© Microscopy GmbH, 2016). El efecto del UV sobre las estructuras espermáticas, fueron analizadas y expresadas en % de frecuencia, con las herramientas del programa ZEN/2016 (Carl Zeiss© Microscopy GmbH, 2016).

3.3.6. Análisis Celular Espermático por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

La estructura fina de las células espermáticas, fueron observadas y tomadas siguiendo la metodología recomendada por Arias-Rodriguez *et al.* (2010). De las muestras espermáticas expuestas a la radiación con UV, 10 µl fueron tomadas y fijadas en 100 µl de glutaraldehido al 2.5%, que fue preparado en buffer fosfatos a 0.1 M (pH 7.4). Las muestras luego fueron mantenidas a 4°C hasta su análisis. Posteriormente 30 µl de muestras espermáticas fue colocado sobre un portaobjeto tipo Superfrost® Plus (Thermo Scientific®) y secado a temperatura ambiente 22±1 °C. Luego, fueron deshidratadas en una serie de etanol (al 25, 50, 70, 80, 90, 95, 100% por 5 min en cada dilución), lavadas con etanol al 100% para el posterior secado a punto crítico en el CPD 030 dryer (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Las muestras deshidratadas, fueron cubiertas con la aleación de oro-paladio usando la recubridora SCD 050 Sputter Coater (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Las observaciones y fotografiado micrométrico, se realizaron en el Microscopio Electrónico de Barrido 6380-LV (JEOL Ltd., Japan). Posterior a la toma de imágenes en formato JPG, la estructura de 30 células espermáticas por cada dosis de irradiación fueron analizadas y tomadas en µm con las herramientas del programa ZEN/2016 (Carl Zeiss© Microscopy GmbH, 2016).

3.3.7. Muerte Espermática Programada por Apoptosis (Muertos/Vivos/Apoptosis)

Muestras de semen (200 µl) que contenían en promedio un número aproximado de 100,000 células espermáticas/ml (cantidad requerida por el citómetro Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™), fueron tomadas después de cada dosis de irradiación UV.

Posteriormente las muestras fueron cosechadas por centrifugación a 6000 r.p.m. por 30 segundos, luego fue retirado el sobrenadante y sustituido con 50µl de la SSIM, a dicha mezcla se le agregó 2.5µl de Annexin V Alexa Fluor® 488 Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™) y se mantuvo en agitación a 15 r.p.m por 20 minutos en ausencia de luz con temperatura ambiente. Luego se prosiguió a cosechar por centrifugado a 6000 r.p.m por 30 segundos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células con 50µl de la SSIM, a continuación se adicionó 1µl de yoduro de propidio (Tali Invitrogen™), las muestras se mantuvieron en una cámara oscura y en agitación a 15 r.p.m por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se cargó con 25µl de la muestra una de las cámaras del porta muestras de análisis celular (Tali Invitrogen™) y se insertó en el puerto del Tali Image Based Cytometer (Invitrogen™). Durante el análisis óptico de las muestras, fueron seleccionados 20 campos y siguiendo lo especificado en el Tali Image Based Cytometer Firmware 1.0.3 (Invitrogen™). Los conteos de células y el tamaño en micrómetros de la cabeza espermática, se analizaron mediante el programa Tali Image Based Cytometer Firmware 1.0.3 (Invitrogen™). La base de datos de cada análisis o muestra de cada macho se procesaron y promediaron con las herramientas del programa Excel para Windows (©2010 Microsoft Corporation).

3.3.8 Análisis de Dispersión de ADN Total en Minigeles de Agarosa

Para valorar el efecto de la luz UV sobre el contenido de ADN de las células espermáticas, el ensayo de dispersión de ADN en minigeles de agarosa fue empleado conforme a lo recomendado por Dietrich *et al.* (2005) con ligeras modificaciones. Muestras de cinco machos de la especie fueron empleados para este ensayo.

Un volumen de 100 µl de muestra espermática fue tomada después de cada dosis de radiación UV probadas y suspendida en 500 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% preparado en buffer de fosfatos (pH 7.0) y mantenido a 45±1°C. Posteriormente, 75 µl de la alícuota (semen+SSIM+ dosis UV/agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%) fue tomada y colocada sobre un portaobjetos previamente recubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 0.5% y mantenida a 4°C por 5 min. Las preparaciones, fueron sometidas a lisis (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris base, Sodio Lauril Sarcocinate al 1%, DMSO al 1% y de Triton X 100 1%) por 60 min a 4°C en ausencia total de luz. Finalizado el tiempo de

lisis, las muestras fueron colocados en una solución alcalina que contenía 300 mM NaOH y 1mM EDTA a pH >13, por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La electroforesis fue realizada en la cámara de electroforesis con dimensiones de 25cm X 20cm (BioRad®), cargada con buffer alcalino (300 mM NaOH y 1mM EDTA) a pH >13. La corrida se realizó a 25V y 300 mA por 30 min y a temperatura ambiente $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ en ausencia de luz.

Concluida la electroforesis, las laminillas fueron deshidratadas en una serie de alcoholes en volúmenes creciente (50, 60, 70, 80, 90 y 100%) por 5 min en cada alcohol, secadas a temperatura ambiente y almacenadas en oscuridad a 4°C hasta su análisis. Las observaciones y digitalización de las imágenes, se realizaron mediante el empleo del microscopio fluorescente Primo Estar (Carl Zeiss®) equipado con una cámara digital Axiocam ERc5s HD (Carl Zeiss®) en conjunto con el programa ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016), para ello, las muestras fueron teñidas con una solución de bromuro de etidio a una concentración de $25\mu\text{g/ml}$. Un total de 100 campos espermáticos por cada dosis de irradiación fue fotografiado, de los cuales se seleccionaron aleatoriamente un total de 100 espermatozoides a los cuales se les midió la longitud de la cola, el área de dispersión de ADN y el tipo de cometa formado, esto con las herramientas del programa ZEN 2016 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2016) y con base en la clasificación de (Enciso-Lorences *et al.* 2009).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Calidad Espermática de las Muestras Control y Aquellas Tratadas con Luz UV

De los 30 especímenes machos, donde se evaluaron once dosis de radiación “UV” en la temporada reproductiva alta 2016 y durante los meses de Septiembre a Octubre. El ajuste del número espermático al promedio de $50.75 \times 10^6 \pm 0.43$ espermatozoides/mililitro previo a la mezcla en la SSIM, permitió la reducción de variabilidad de exposición de las muestras espermáticas al UV, así como, los tiempos de exposición, esto con base en observaciones previas donde sin el ajuste del número espermático, alta variabilidad y tiempos muy prolongados de exposición para alcanzar el cese total de movimiento fue observado (Datos sin publicar).

Los resultados del tiempo de motilidad, de las muestras correspondientes a los tratamientos “A y B” (controles), la motilidad fue alta, mostrando en promedio 48.3 ± 5.32 segundos de motilidad, lo que fue divergente con la variación observada en las muestras tratadas con UV o tratamiento “C” con motilidades altas desde 51.8 ± 4.88 segundos en la dosis de radiación UV 0.6 J/cm^2 y motilidad nula en la dosis más alta 1.1 J/cm^2 tal como se muestra en la Tabla 1 y Figura 1.

Por otro lado, los resultados de los porcentajes de células motiles y tipo de movimiento, se muestran en la Tabla 1 y Figura 1. Variación similar como lo mostrado por el tiempo de motilidad, donde un efecto dosis respuesta principalmente en aquellas muestras correspondientes al tratamiento “C” fue observada para ambas variables. Altos porcentajes de motilidad ($100 \pm 0.00\%$) y tipo de movimiento de grado (4.0 ± 0.00), fueron observado para los tratamientos “A y B” (controles) y en las primeras dosis de radiación ($0.1-0.3 \text{ J/cm}^2$), mientras que el cese total de movimiento fue observado hasta la dosis de radiación 1.1 J/cm^2 . Para todos los casos, después de aplicar la prueba no paramétrica de K-W se identificó diferencias significativas ($P=0.001$) entre los grupos comparados. Mientras que el análisis de comparación múltiple de Dunn con un nivel de confianza de ($P=0.05$), permitió establecer grupos entre variables para cada dosis de radiación (Tabla 1 y Figura 1).

3.4.2 Muerte Espermática Programada por Apoptosis (vivos/muertos/apoptóticos)

Para evaluar la viabilidad espermática en el juil tropical *R. laticauda* después de la exposición a 11 dosis de radiación UV, el análisis por citometría multiparamétrica fluorescente fue empleado. Un total de 4,362,153 de células, fueron analizadas por citometría fluorescente, proveniente de 5 reproductores machos maduros de la especie. Durante el análisis general de los resultados, reducción de los porcentajes de células espermáticas vivas fue observado en dependencia del incremento en los niveles de radiación UV (Figura 2 y Tabla 2). Altos porcentajes de células vivas fueron observado en las muestras control ($83.11 \pm 1.86\%$), mientras en la dosis de irradiación 1.1 J/cm^2 , reducción de hasta un $21.92 \pm 1.88\%$ de células espermáticas vivas, fue observado (Tabla 2). Caso contrario, fue mostrado para los porcentajes de células muertas, ya que los porcentajes más bajos ($8.96 \pm 3.57\%$) fueron en los grupo control y los más altos ($65.53 \pm 1.71\%$) fueron hasta la dosis 1.1 J/cm^2 . El análisis de varianza de K-W, mostro la presencia de diferencias altamente significativas ($P=0.001$) para ambos tipos de células (vivas: muertas), las cuales mantuvieron alta correlación en dependencia de los tiempos de exposición al UV ($R^2=0.973$ y 0.966), respectivamente.

Por otro lado, los resultados de los porcentajes de células apoptóticas, mostraron comportamiento divergente con los porcentajes de células vivas y muertas, ya que a partir del control hasta la dosis de radiación 0.5 J/cm^2 , incremento en los porcentajes de células en apoptosis fue observado. Sin embargo, a partir la dosis de radiación 0.6 J/cm^2 hasta la dosis 1.1 J/cm^2 , ligero descenso fue registrado, pero sin alcanzar valores de nulos (Figura 2 y Tabla 2). El análisis de varianza, mostró la presencia de diferencias altamente significativas ($P=0.001$), y al igual que las células vivas y muertas, estas estuvieron en relación con los tiempos de exposición al UV ($R^2=0.703$).

3.4.3 Evaluación del Efecto del UV por MOP y MEB

Las estructuras mayores y la estructura fina de espermatozoides normales, sin exposición a la luz UV, fueron analizadas por MOP y MEB para su comparación con los espermatozoides expuestos a diferentes niveles de radiación UV.

Los espermatozoides típicos del bagre tropical, se caracterizaron por la presencia de cuatro estructuras principales: Cabeza acrosómica, pieza media pequeña, cola o flagelo y una región final (Figura 5A, 5B y 7A). El análisis detallado y al azar de 30 células espermáticas, permitió describir en promedio que las células espermáticas maduras, muestran ancho de la cabeza de 2.300 ± 0.163 y 1.385 ± 0.111 μm , largo de la cabeza de 2.831 y 1.675 ± 0.193 μm , área de la cabeza de 5.416 ± 0.445 y 2.018 ± 0.112 μm^2 , área de la pieza media de 0.458 ± 0.066 y 0.337 ± 0.060 μm^2 , largo del flagelo de 31.269 ± 1.373 y 30.403 ± 2.476 μm y ancho del flagelo de 0.541 ± 0.038 y 0.209 ± 0.031 μm , para las observaciones realizadas por MOP y MEB, respectivamente.

Por otro lado, las muestras espermáticas que fueron sometidas a diferentes niveles de radiación UV, fueron igualmente analizadas por MOP y MEB. Las frecuencias y tipos de daños se muestran en las figuras 4, 5, 6 y 7. Mediante el análisis por MOP, únicamente fue posible identificar, la presencia de cuatro tipos de daños: Solo cabezas, solo flagelos, flagelos quebrados y flagelos incompletos (Figura 5). Mientras que por MEB, siete nuevas anomalías espermáticas: Vesículas a lo largo del flagelo, vesículas en la pieza media, asimetría de la pieza media, pérdida de la región final del flagelo, daño parcial a la cabeza, flagelos enrollados y daño a la membrana de la cabeza, fueron observadas (Figura 7). El análisis espermático por MOP, únicamente las anomalías flagelos quebrados e incompletos, mostraron incremento con respecto a los niveles de radiación UV. Mientras que por MEB, únicamente se observó valor creciente para las anomalías: Vesícula en la pieza media, membrana de la cabeza dañada, asimetría de la pieza media y pérdida de la región final de la cola. Para las anomalías: vesícula en el flagelo y flagelos enrollados, los porcentajes decrecieron en relación al aumento de los niveles de UV (Figura 6). Los porcentajes de frecuencias para los tipos de daños solo cabezas y solo flagelos, fueron bajas para todos los niveles de radiación UV, cuando fueron analizadas por MOP y MEB.

3.4.4 Analisis de Dispersión de ADN en Minigeles

El ensayo de dispersión de ADN empleado para la evaluación de la integridad del ADN espermático en el bagre tropical, mostró que en las células espermáticas sin tratamiento con UV (control) y las dosis de radiación $0.1-0.4$ J/cm^2 , ningún daño sobre el ADN fue observado, donde las células espermáticas mostraron una forma circular bien definida (Figura

8A, 8B). Sin embargo, a partir de la dosis 0.5 J/cm^2 , efecto del UV sobre el contenido de ADN fue observado, donde las células espermáticas dañadas, mostraban un halo cromatídico rodeando la cabeza de los espermatozoides (Figura 8C). Mientras que en la dosis de radiación más alta (1.1 J/cm^2), núcleo esférico que contiene ADN aún sin daño y una cola en forma de cometa migrando en dirección del ánodo (+), pudo ser evidenciado (Figura 8D). A pesar del ajuste del número espermático, espermatozoides con bajo nivel de daño fueron observados, lo que demuestra que las poblaciones de espermatozoides respondieron de manera desigual ante el UV (Figura 8D).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Tabla 1. Promedios de los tiempos de motilidad en seg, porcentajes (%) de células motiles y tipos de movimiento de 30 machos expuestos a diferentes niveles de radiación UV.

Tratamientos	Duración del movimiento en seg. ($\bar{X} \pm D.E$)	% de células activas ($\bar{X} \pm D.E$)	Tipo de movimiento ($\bar{X} \pm D.E$)
Control "A"	48.7 \pm 5.40 ^a	100 \pm 0.00 ^a	4.0 \pm 0.0 ^a
Control "B"	48.0 \pm 5.31 ^a	100 \pm 0.00 ^a	4.0 \pm 0.0 ^a
0.1 J/cm ²	47.8 \pm 5.11 ^a	100 \pm 0.00 ^a	4.0 \pm 0.0 ^a
0.2 J/cm ²	48.7 \pm 4.30 ^a	100 \pm 0.00 ^a	4.0 \pm 0.0 ^a
0.3 J/cm ²	49.2 \pm 4.94 ^a	100 \pm 0.00 ^a	4.0 \pm 0.0 ^a
0.4 J/cm ²	49.5 \pm 5.13 ^a	99.0 \pm 2.62 ^a	3.7 \pm 0.4 ^a
0.5 J/cm ²	50.6 \pm 6.20 ^a	89.3 \pm 7.45 ^b	3.0 \pm 0.0 ^b
0.6 J/cm ²	51.8 \pm 4.88 ^a	63.3 \pm 19.1 ^b	2.9 \pm 0.2 ^b
0.7 J/cm ²	50.4 \pm 6.53 ^a	30.0 \pm 14.9 ^b	2.7 \pm 0.4 ^b
0.8 J/cm ²	43.3 \pm 12.6 ^a	10.5 \pm 6.79 ^c	2.0 \pm 0.5 ^b
0.9 J/cm ²	22.7 \pm 24.7 ^b	4.30 \pm 3.69 ^c	1.1 \pm 0.8 ^c
1.0 J/cm ²	9.28 \pm 18.7 ^c	1.10 \pm 2.16 ^c	0.4 \pm 0.6 ^c
1.1 J/cm ²	0.00 \pm 0.00 ^d	0.00 \pm 0.00 ^d	0.0 \pm 0.0 ^d

D.E= desviación estándar, Control "A" semen puro, control "B" semen + SSIM, "C" Semen +SSIM + dosis de radiación J/cm². Las literales iguales por parámetro indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos o dosis a $P > 0.05$, en caso contrario las diferencias existen.

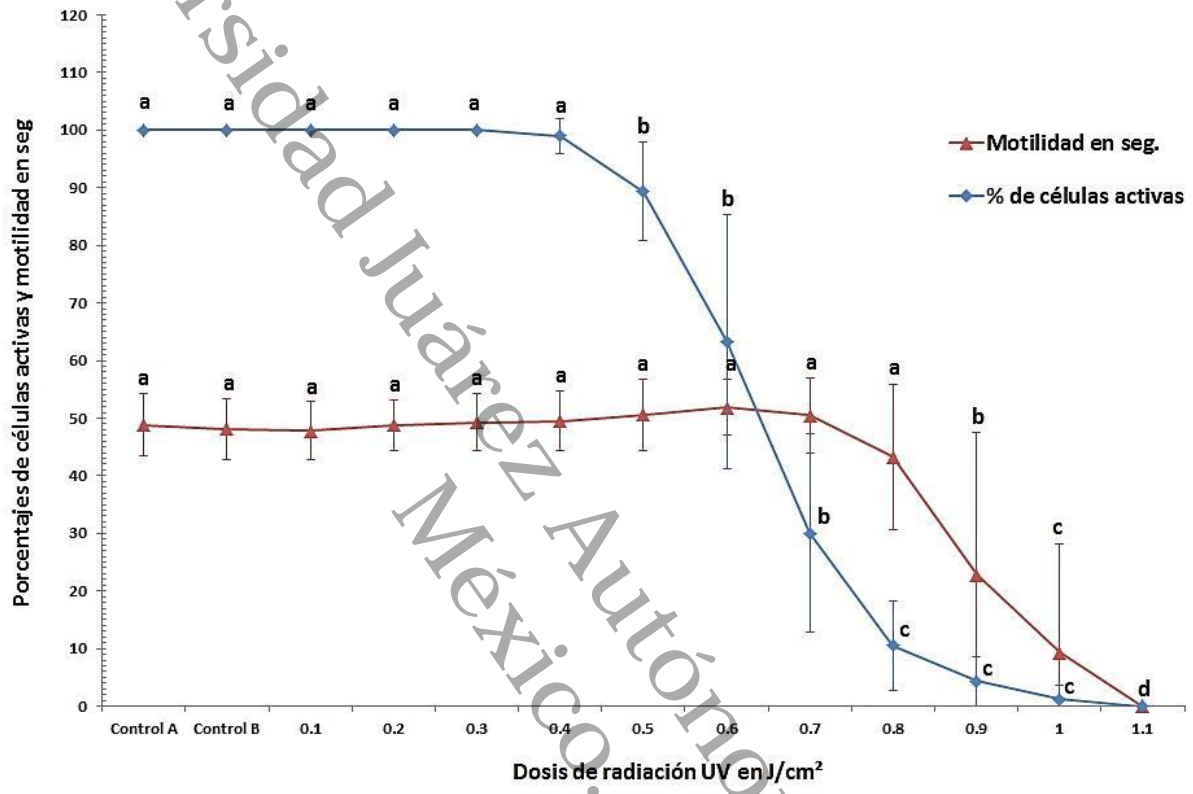


Figura 1. Promedios de los tiempos y porcentajes de motilidad en la estandarización de las dosis de radiación UV en la inactivación genética del juil tropical *R. laticauda*. Las literales iguales por parámetro indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos o dosis a $P > 0.05$, en caso contrario las diferencias existen.

Tabla 2. Promedios de los porcentajes de espermatozoides vivos/muertos/apoptótico e inviábiles, del semen de 5 reproductores del juil tropical *R. laticauda* expuestos a 11 dosis de radiación UV.

Dosis de radiación UV	Vivos ($\bar{X}\pm D.E$)	Muertos ($\bar{X}\pm D.E$)	Apoptótico ($\bar{X}\pm D.E$)	Porcentajes de inviabilidad	Total de espermatozoides
Control	83.11±1.86 ^a	8.96±3.57 ^a	8.00±4.14 ^a	16.96	580,822
0.1 J/cm ²	73.97±1.99 ^a	13.72±2.25 ^a	12.11±2.05 ^a	25.83	625,134
0.2 J/cm ²	71.50±1.26 ^a	14.56±0.62 ^b	13.87±1.40 ^a	28.40	382,132
0.3 J/cm ²	64.06±1.43 ^b	16.68±1.49 ^b	19.50±1.50 ^b	36.18	239,026
0.4 J/cm ²	62.75±1.69 ^b	16.56±1.67 ^b	20.81±1.68 ^b	37.37	237,458
0.5 J/cm ²	57.75±1.65 ^b	21.12±1.74 ^c	21.06±1.94 ^b	42.18	139,618
0.6 J/cm ²	56.58±1.97 ^b	25.05±2.16 ^c	18.52±1.69 ^b	43.57	643,015
0.7 J/cm ²	51.75±1.34 ^b	30.81±1.64 ^d	17.37±1.54 ^b	48.18	319,516
0.8 J/cm ²	46.35±2.17 ^c	35.94±2.79 ^d	17.76±1.85 ^b	53.70	253,080
0.9 J/cm ²	37.68±1.77 ^c	44.93±2.48 ^e	17.37±2.44 ^b	62.30	348,090
1.0 J/cm ²	33.94±2.22 ^c	49.41±2.57 ^e	16.58±2.03 ^a	65.99	488,875
1.1 J/cm ²	21.92±1.88 ^d	65.53±1.71 ^f	12.60±1.81 ^a	78.13	418,668

DE= desviación estándar. Letras desiguales muestran diferencias significativas ($P>0.05$).

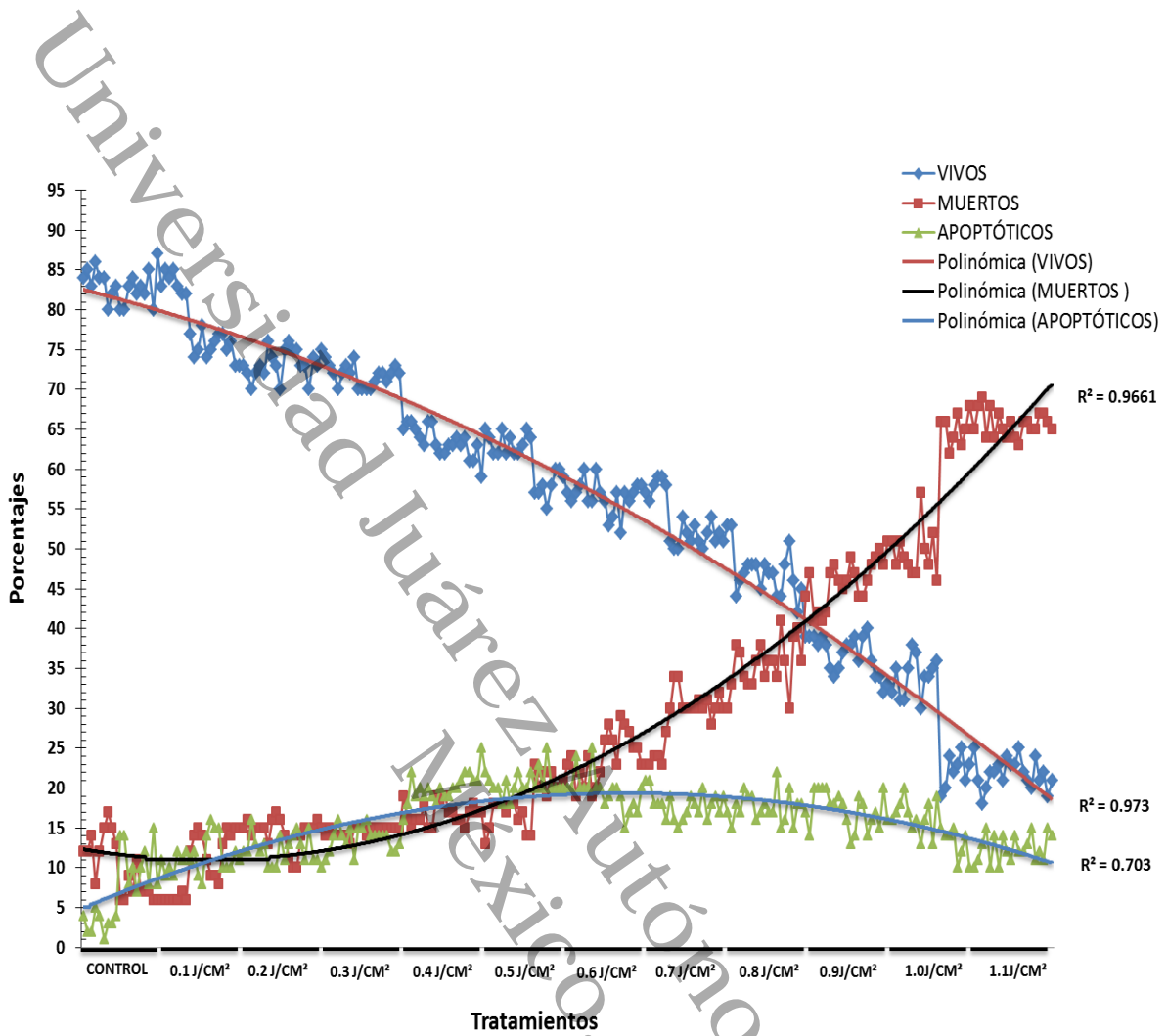


Figura 2. Efecto general de la exposición a 11 dosis de radiación UV sobre la sobrevivencia espermática (vivos/muertos/apoptóticos) de 5 machos del juil tropical *R. laticauda*. Así como la línea de tendencia en relación al efecto de los tratamientos basado en el coeficiente de correlación de R^2 .

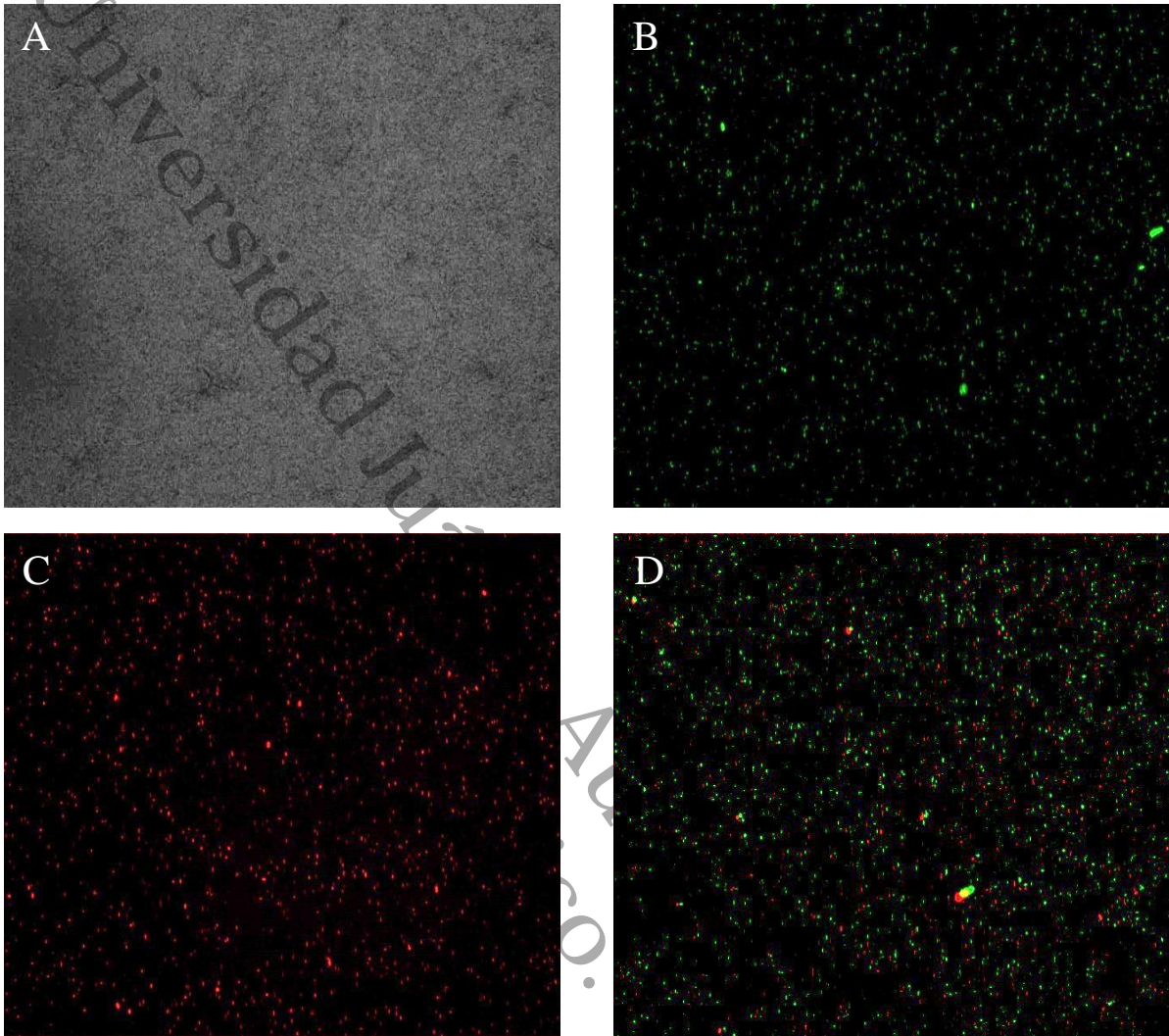


Figura 3. Campo citométrico a 16X de la sobrevivencia espermática del tratamiento control, separando en la misma toma; células espermáticas vivas en campo claro (A), células espermáticas apoptóticas marcadas con Anexina V, emitiendo fluorescencia verde (B), células marcadas con yoduro de propidio emitiendo fluorescencia roja (C) y células muertas y apoptóticas (D).

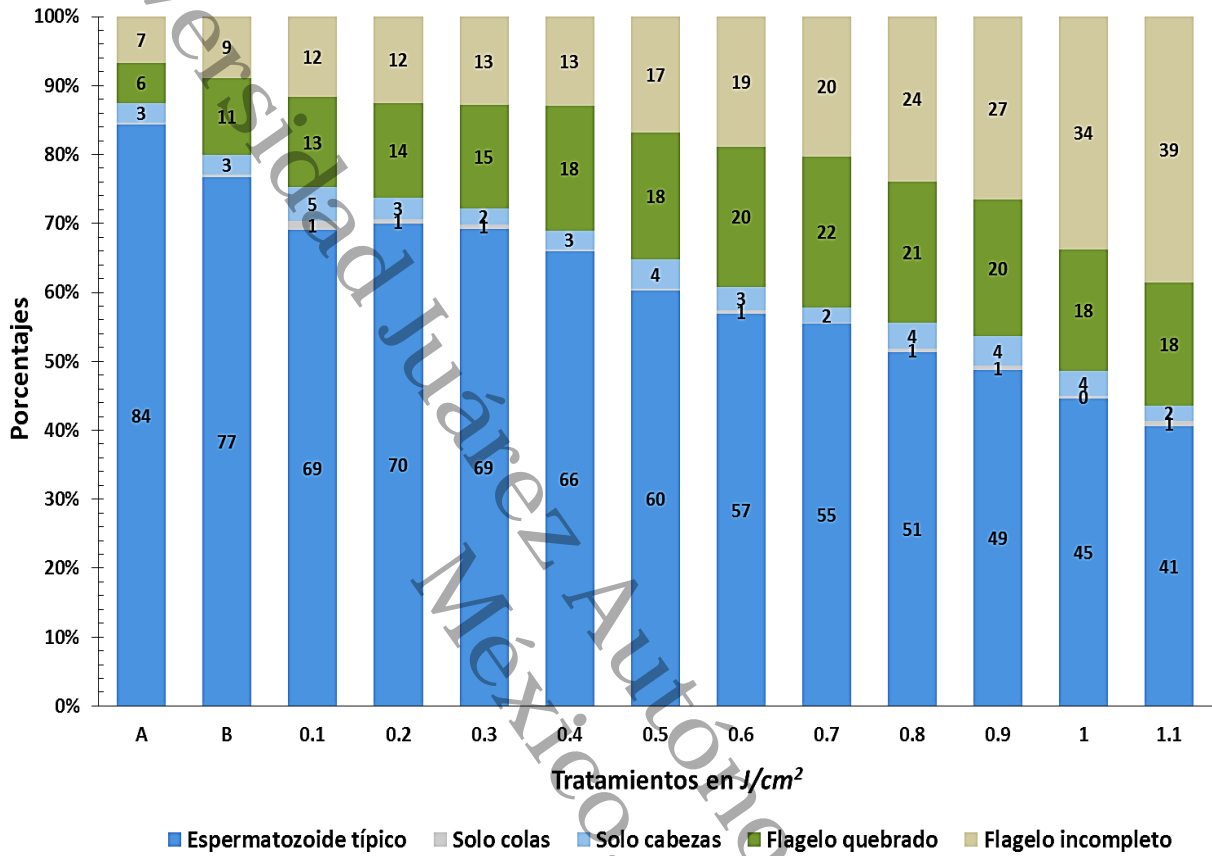


Figura 4. Frecuencia de anomalías estructurales observadas por microscopía óptica en células espermáticas del bagre tropical *R. laticauda* expuestas a 11 dosis de radiación UV.

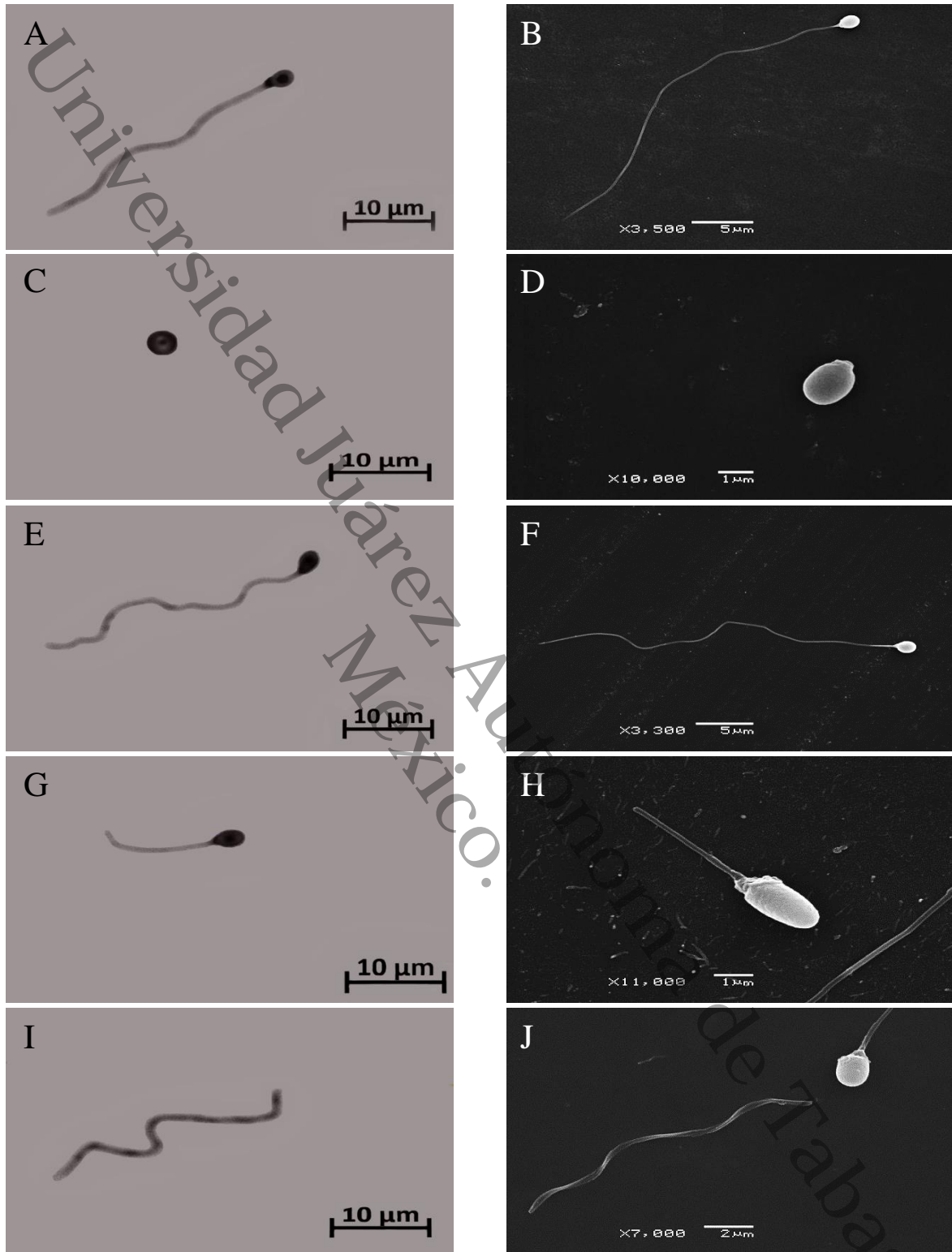


Figura 5. Anormalidades observadas es muestras espermáticas del bagre tropical *R. laticauda* por microscopia óptica y su comparación por microscopia electrónica de barrido expuestas a radiación UV. Espermatozoide normal (A y B), cabeza sola (C y D), espermatozoide con flagelo quebrado (E y F), espermatozoide con flagelo incompleto (G y H), flagelo solo (I y J).

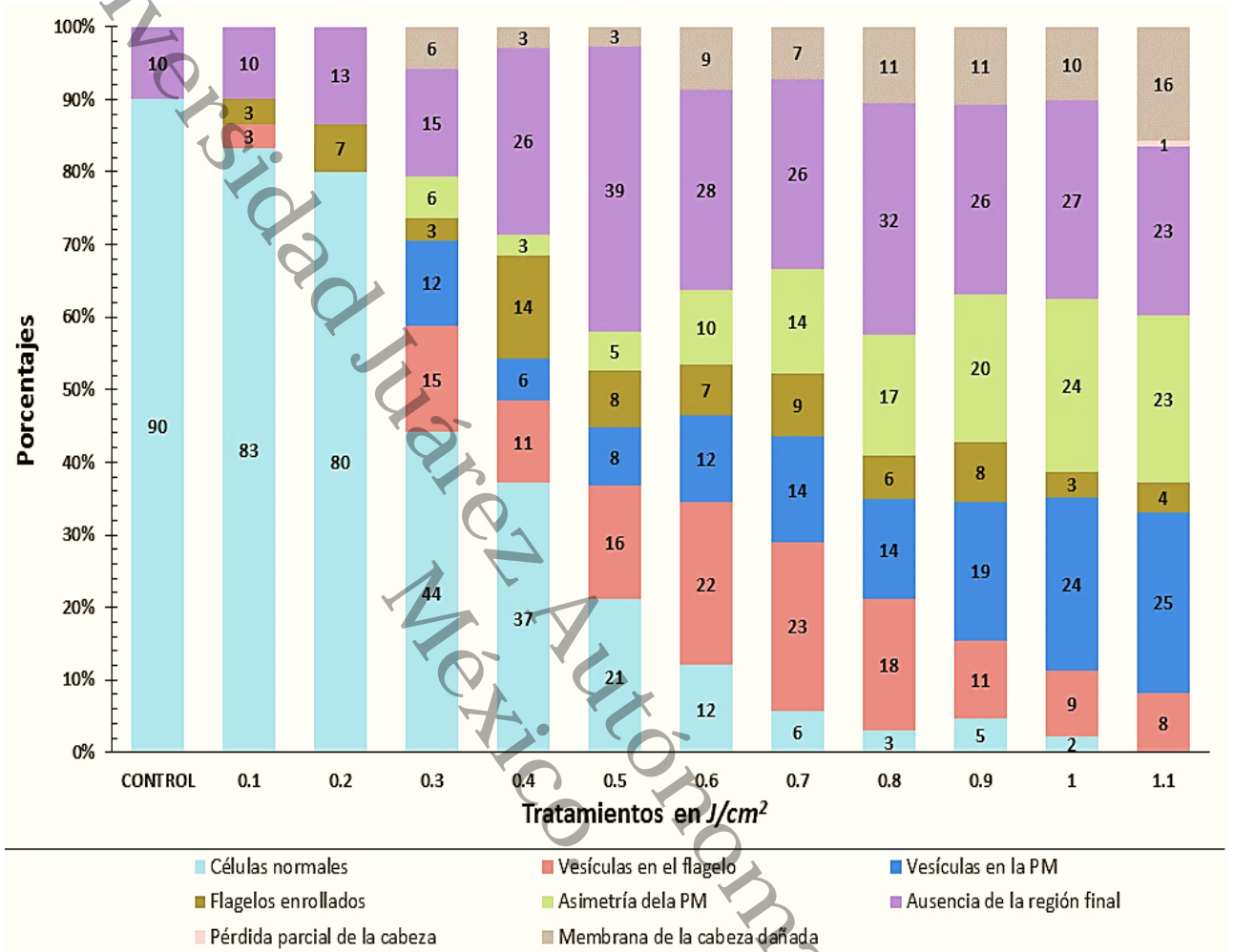


Figura 6. Frecuencia de anomalías observadas por microscopía electrónica de barrido, en células espermáticas del bagre tropical *R. laticauda* expuestas a 11 dosis de radiación UV.

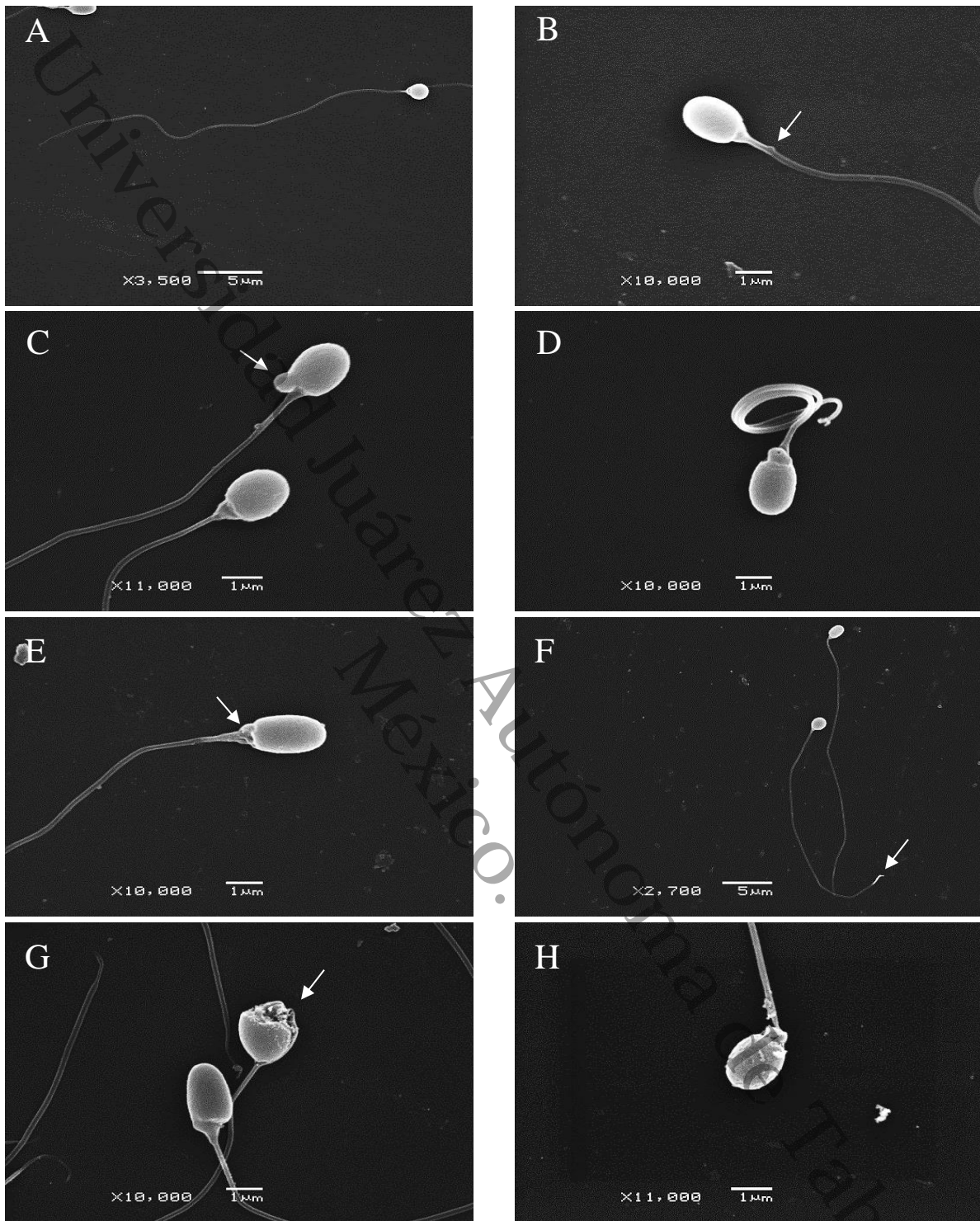


Figura 7. Anormalidades observadas por microscopía electrónica de barrido en muestras espermáticas del juil tropical expuestas a 11 dosis de radiación UV. Espermatozoide normal (A), vesículas a lo largo del flagelo (B), vesícula en la pieza media (C), flagelo enrollado (D), pieza media asimétrica (E), flagelo sin región final (F), pérdida parcial de la cabeza (G) y daño a la membrana plasmática de la cabeza (H). Las flechas señalan el daño directo sobre cada microestructura.

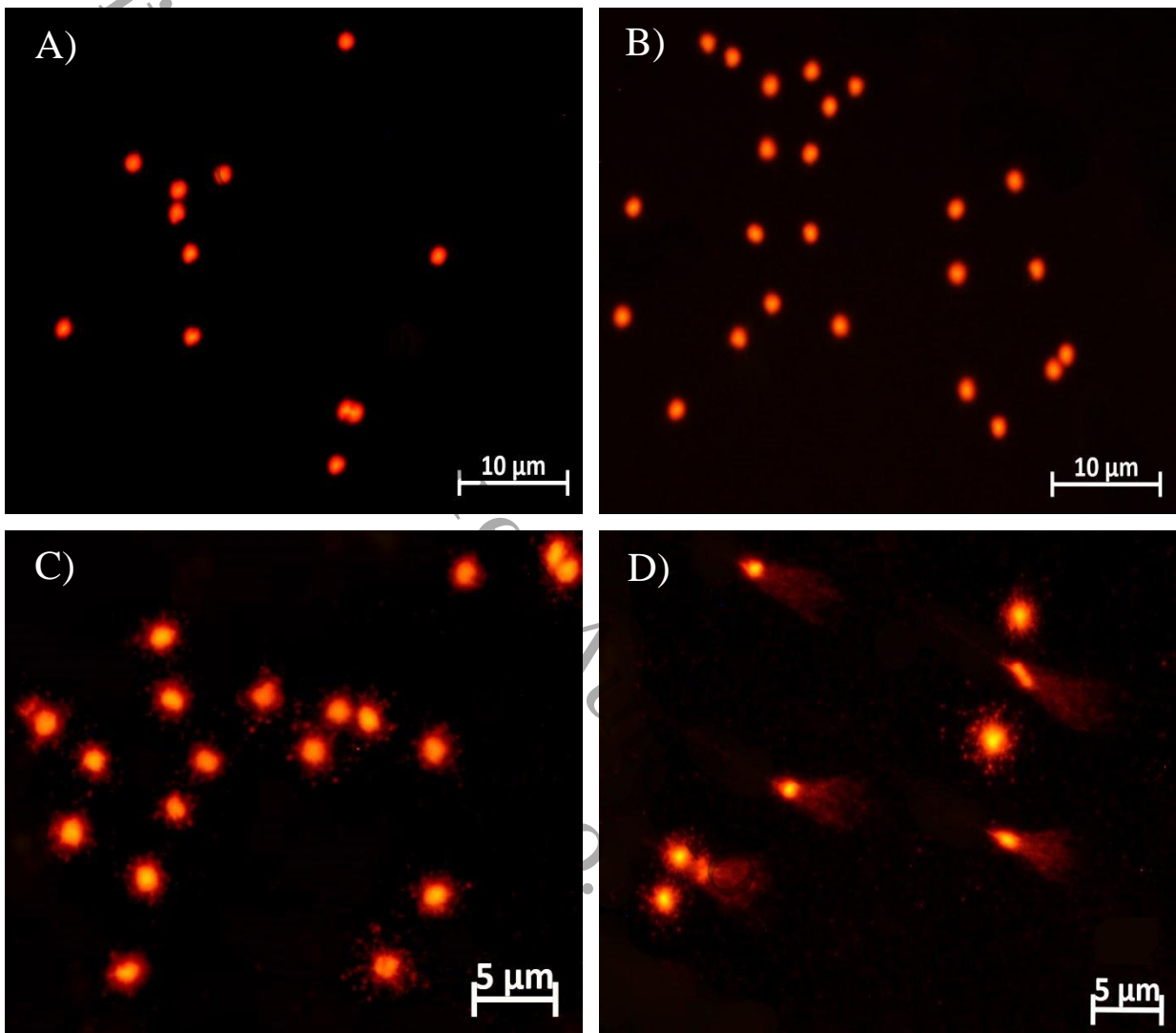


Figura 8. Apariencias del daño sobre los espermatozoides de *R. laticauda* posterior a la exposición a diferentes dosis de radiación UV por el ensayo de dispersión de ADN en minigeles de agarosa. Control (A), 0.1 J/cm^2 (B), 0.5 J/cm^2 (C) y 1.1 J/cm^2 (D).

3.5. DISCUSIÓN

Cuando las células espermáticas del bagre tropical fueron expuestas a diferentes tiempos de radiación UV, alta correlación con la reducción de los tiempos de motilidad, porcentajes y tipos de movimiento fue observado (Figura 1). A dosis bajas, altos valores para los tiempos de motilidad, porcentajes y tipos de movimiento fueron observados para el bagre tropical. Esta correlación ha sido observada en otras especies como: *Dicentrarchus labrax* y *Scophthalmus maximus* (Felip *et al.* 1999; Piferrer *et al.* 2004), donde a dosis bajas de radiación UV, los espermatozoides no mostraron variación en los tiempos y porcentajes de motilidad con respecto a los controles. Los resultados de la reducción de los tiempos de motilidad, porcentajes de motilidad y el tipo de movimiento observados en el bagre tropical, son semejantes a los reportados para varias especies de peces cuando se induce ginogénesis artificial y el UV es empleado para inactivar el ADN espermático (Arai *et al.* 1984; Arias-Rodríguez *et al.* 2004; Christensen *et al.* 1994; Chistopher *et al.* 2009; Felip *et al.* 1999; Kijima 1992; Li *et al.* 2000; Padilla *et al.* 2011; Valcárcel *et al.* 1994). Aunque los porcentajes de motilidad y el tipo de movimiento se reducen, un porcentaje de la población espermática no pierden la capacidad de iniciar las divisiones celulares en el ovocito, llegando en algunos casos a obtener niveles de fecundación similares a los controles en las dosis bajas y medias, aunque las dosis varía dependiendo de la especie en la cual se trabaja (Arai *et al.* 1984; Arias-Rodríguez *et al.* 2004; Don and Avtalion, 1988; Felip *et al.* 1999; Taniguchi *et al.* 1988). Para el bagre tropical, buenos porcentajes de motilidad, tiempo de motilidad y tipo de movimiento, fueron observados hasta la dosis de radiación $0.6-0.7 \text{ J/cm}^2$, siendo estas dosis empleadas con éxito en la inducción artificial de ginogénesis es algunas especies como: *Sphoeroides annulatus* (Arias-Rodríguez *et al.* 2004), *Heteropneustes fossilis* (Christopher *et al.* 2009), *Paralabrax maculatofasciatus* (Huerta, 1999), *Dicentrarchus labrax* (Colombo *et al.* 1995) donde altos porcentajes de sobrevivencia han sido también observados. En trucha arcoíris (*O. mikyss*) ha sido observado que la reducción del 50% de motilidad de la población espermática, permite altos porcentajes de fertilización de huevos y desarrollo de embriones haploides (Dietrich *et al.* 2005). Aunque en el presente estudio la fertilización “*in vitro*” no fue realizada, los resultados obtenidos en relación a los tiempos de motilidad y porcentajes observados en las dosis 0.6 y 0.7 J/cm^2 podrán ser empleados para la producción de altos porcentajes de embriones haploides.

Por otro lado, el cese de movimiento espermático en el bagre tropical se observó hasta la dosis de radiación $1.0 J/cm^2$. Sin embargo, en algunos machos a la misma dosis de radiación, porcentajes $< 5\%$ de células espermáticas activas fueron observadas, mientras que en la dosis $1.1 J/cm^2$, cero porcentajes de movimiento fueron registrados en todos los machos. En este tipo de estudios, algunos factores como la concentración espermática, pueden provocar resistencia a la luz UV por el traslape entre células, lo cual lleva a una mala irradiación y tiempos prolongados de exposición para alcanzar el cese total de movimiento espermático (Christensen y Tiersch, 1994), tal como lo observado en el presente estudio para el bagre tropical (Datos no mostrados). Por ello, el ajuste del número espermático a un número estándar de aproximadamente 500,000 espermatozoides/ml, permitió la reducción de los tiempos de exposición de las muestras espermáticas al UV y radiación más homogénea.

Aunque la motilidad, es solo uno de los parámetros importantes para lograr la fertilización de un huevo (Paniagua-Chavez *et al.* 2006). En peces, es sabido que la reducción del tiempo de motilidad y porcentajes de motilidad cuando se trata de inactivar el ADN espermático con UV, han sido atribuidos principalmente a daños producidos sobre los componentes estructurales espermáticos que le permiten a la células desplazarse, como son: Pieza media, flagelo y región final, los cuales también se han correlacionados con bajos porcentajes de fertilización (Au *et al.* 2002; Li *et al.* 2000; Lu and Wu, 2005; Pruski *et al.* 2009; Ravanat *et al.* 2001; Xu *et al.* 2007). Los resultados del análisis sobre la morfología espermática por MOP y MEB en el bagre tropical, después de la exposición de las células espermáticas a diferentes dosis de UV, mostraron incremento en la incidencia del daño en relación con los tiempos de exposición al UV. Por ambos métodos, el mayor tipo de daño observado fue sobre la región media y estructura flagelar. Espinosa *et al.* (2010) en muestras espermáticas de la ostra *Argopecten purpuratus*, después de la exposición a diferentes crioprotectores, observaron que en dependencia de los tratamientos, los porcentajes de anormalidades más altos fueron sobre la región del flagelo señalando la fragilidad de estas estructuras. En peces, ha sido demostrado, que el UV tiene la capacidad de desnaturalizar las bandas de actina que componen la estructura flagelar (Don and Avtalion, 1993) y a mayor tiempo de exposición, la pérdida completa del flagelo puede presentarse (Li *et al.* 2000), tal como lo observado en el presente estudio para el bagre tropical. Un análisis más detallado por MET, en células espermáticas del erizo marino *Spaerechius granularis* expuestas al UV, mostró que además de la pérdida del flagelo, pérdida del acrosoma y desintegración de la membrana; daño directo sobre las

mitocondrias fue también observado (Lu and Wu, 2005^a). Para el bagre tropical, incremento del daño hacia la membrana celular y pérdida parcial de la pieza media, fue observado cuando las muestras espermáticas fueron analizadas por MEB, las cuales mostraron relación en dependencia de los tiempo de exposición al UV, siendo en las dosis más altas de radiación donde los mayores porcentajes de daño fueron registrados. A pesar de su baja incidencia, las anomalías: Solo flagelos y solo cabezas, fueron observadas en todas las dosis evaluadas, incluso en los grupos controles cuando fueron analizadas por MOP y MEB. Li *et al.* (2000), en la ostra *Patinopekten yessoensis*, observó un fenómeno similar, aunque tales tipos de daños no fueron asociados como un efecto de la exposición al UV, sino como un daño producido por el proceso de fijación de las muestras espermáticas. Posiblemente, el mismo fenómeno explique la baja incidencia de estos daños sobre las células espermáticas para el bagre tropical.

Recientemente, se ha demostrado que la radiación UV, es un detonador para la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en espermatozoides y está, se ha correlacionado con la reducción de la motilidad espermática en varias especies de organismos acuáticos (Ciereszko *et al.* 2005; Dietrich *et al.* 2005; Lu and Wu, 2005^a; 2005^b; Singh *et al.* 2015; Zan-Barb *et al.* 2005). Las ERO, naturalmente se originan de la reducción parcial de la molécula de oxígeno durante el metabolismo aeróbico de las mitocondrias (Singh *et al.* 2015) y su incremento, conlleva a la peroxidación de lípidos de las células espermáticas principalmente sobre la membrana plasmática, las cuales pueden atacar directamente a las mitocondrias de los espermatozoides, resultando en decremento del potencial de membrana y por tanto a la reducción de la motilidad (Aitken *et al.* 2012; Lu and Wu, 2005^a; 2005^b; Sheng and Ong, 2000). El resultado de alta producción de ERO mitocondrial, es el daño hacia esta estructura, membrana plasmática y ADN espermático (Aitken *et al.* 2012), lo cual conllevan a la muerte de la célula por apoptosis debido a que el daño es irreversible (Dietrich *et al.* 2005; Singh *et al.* 2015). El análisis por citometría fluorescente ha permitido medir una gran variedad de atributos de una muestra de semen como son: Viabilidad, integridad acrosomal, función mitocondrial e integridad del ADN en un período de corto tiempo (Cordelli *et al.* 2005; Graham, 2001), las cuales en combinación, pueden dan un mejor estimado del éxito de fertilización cuando se realizan ensayos “*in vitro*” (Cabrita *et al.* 2014; Paniagua-Chávez *et al.* 2006). En peces, el empleo de marcadores como Anexina V, SYBR-14, rodamina 123 y ioduro de propidio, han sido de los más empleados cuando se trata de evaluar la integridad de la membrana espermática por citometría de flujo (Flajshans *et al.* 2004; Ogier de Baulny *et al.*

1997; Schtte *et al.* 1998; Shounan *et al.* 1998). Además, su combinación permite distinguir claramente células espermáticas vivas, muertas, apoptóticas o en proceso de degradación (necrosis) (Ogier de Baulny *et al.* 1997; Schtte *et al.* 1998). El empleo de la Anexina V Alexa Fluor® en combinación con el Ioduro de propidio (Invitrogen™), fueron empleados con éxito durante la evaluación del desempeño fisiológico del espermatozoide del bagre tropical *R. laticauda* sometidas a varias dosis de radiación UV y al igual que en el pez *Solea senegalensis* (Beirao *et al.* 2008) la combinación de ambas tinciones mostraron la presencia de 4 subpoblaciones espermáticas: Sin tinción (vivas), células verdes (apoptóticas), células rojas con una capa verde (necróticas) y células solamente rojas (muertas).

Los resultados obtenidos, después de la evaluación espermática, mismas que fueron analizadas por citometría multiparamétrica fluorescente y de campo claro, permitieron notar variaciones en los efectos evaluados como son espermatozoides vivos, muertos y en apoptosis. En dicho aspecto, las células que no fueron expuestas a ningún tipo de tratamiento (controles) mostraron los mayores porcentajes de células vivas ($83.11 \pm 1.86\%$) y los promedios más bajos de células muertas ($8.96 \pm 3.57\%$) y en apoptosis ($8.00 \pm 4.14\%$), lo que resultó en un bajo porcentaje de células inviables (16.96%) (Tabla 2). La presencia de células en apoptosis en muestras espermáticas sin tratamiento (controles), ha sido también observado en otras especies como *Solea senegalensis*, donde porcentajes de 6-20% de la población de células analizadas, fueron positivas a la tinción con la Anexina V y el ioduro de propidio (Beirao *et al.* 2008), valores similares a lo observado en el bagre tropical. La presencia de células en apoptosis en muestra de semen en el grupo control, pueda deberse quizás a que en el eyaculado, células en estado de envejecimiento o demasiado maduras estén presentes, las cuales posiblemente tienen dañada su membrana o estén experimentando algún proceso de apoptosis natural (Beirao *et al.* 2008; 2009).

Por otro lado, los porcentajes de células vivas, muertas y en apoptosis de las muestras expuestas a diferentes niveles de UV, mostraron disminución significativa de la viabilidad espermática en relación al incremento de los niveles de exposición al UV (Tabla 2). Sin embargo, no se observó deceso total de la viabilidad espermática, incluso en la dosis de radiación más alta evaluada, ya que un ($21.9 \pm 1.88\%$) de células vivas aun pudo ser observado en la dosis $1.1 J/cm^2$. El daño sobre la integridad de la membrana, ha sido correlacionada con pérdida de la motilidad sobre las células espermáticas (Paniagua-Chávez *et al.* 2006). No obstante, las observaciones realizadas por MOP y MEB en células espermáticas expuestas a

diferentes niveles de UV y en adición a los resultado del análisis por citometría multiparamétrica, mostraron que el cese del movimiento espermático, además del daño sobre la membrana, la pérdida o daño sobre las estructuras que le confieren motilidad a los espermatozoides, como son flagelo o mitocondrias, son factores para la perdida de la motilidad. Los porcentajes de células apoptóticas, mostraron alta correlación con los tiempos de exposición al UV ($r^2 = 0.703$), siendo los porcentajes más altos observados hasta la dosis de radiación 0.5 J/cm^2 con $21.06 \pm 1.94\%$. Para posteriormente, experimentar descenso de hasta un $12.60 \pm 1.81\%$ en la dosis 1.1 J/cm^2 . En peces, los estudios empleando marcadores como la anexina V, en combinación con el yoduro de propidio en la evaluación de la integridad de la membrana espermática por citometría fluorescente, han sido muy escasos (Cabrita *et al.* 2005; 2014; Fauvel *et al.* 2010). Mientras que en mamíferos, una vasta cantidad de investigaciones han sido desarrolladas (Aziz *et al.* 2007; Guthrie and Welch, 2005; Martin *et al.* 2004; Peña *et al.* 2003; Ricci *et al.* 2002; Walters *et al.* 2005) las cuales han sido asociadas con baja capacidad reproductiva. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio donde la Anexina V en combinación con el Ioduro de propidio, han sido empleados con éxito en la evaluación de la viabilidad de células espermática expuestas a diferentes niveles de UV para inactivar el ADN espermático, además de que pocos estudios han sido desarrollada empleando ambas tinciones y analizadas por citometría multiparamétrica fluorescente en peces, lo cual no permite un buen debate sobre el empleo de ambos métodos en la evaluación espermática en peces.

La radiación UV es el principal precursor de la formación de fotoproductos en el ADN como son: Dimeros de pirimidina de tipo ciclobutano, 6-4 pirimidina-pirimidona y fotoproductos de citosina (Ravanat *et al.* 2001) los cuales debilitan la estructura de la cadena de ADN debido a la alta formación de sitios lábiles en células espermáticas (Dietrich *et al.* 2005). Recientemente se ha demostrado, que el estrés oxidativo por el UV, incrementa el daño sobre la molécula de ADN por la producción de una gran cantidad de ERO, producto de la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática en células espermáticas (Ciereszko *et al.* 2005; Lu and Wu, 2005; Pruski *et al.* 2009; Singh *et al.* 2015; Zan-Bar *et al.* 2005). El daño sobre el ADN producto del UV, ha sido correlacionado también con baja sobrevivencia, peso, crecimiento (Singh *et al.* 2015), niveles de fertilización y motilidad (Au *et al.* 2002; Lu and Wu, 2005; Rick *et al.* 2014). En peces, el análisis de dispersión de ADN en geles o ensayo cometa alcalino, ha sido el más empleado (Cabrita *et al.* 2005; Beirao *et al.* 2008; Ciereszko *et al.* 2005; Dietrich *et al.*

2005; Labbe *et al.* 2001; Li *et al.* 2008; Lopez-Fernandez *et al.* 2009; Shaliutina *et al.* 2013), ya que esté, permite detectar sitios lábiles, rupturas de una sola cadena y de doble cadena en las células espermáticas (Rojas *et al.* 1999). El ensayo cometa alcalino (pH >13) fue empleado con éxito para valorar la integridad del ADN de las células espermáticas del juil tropical *R. laticauda*. Los resultados obtenidos posterior al análisis de las imágenes de las dispersiones de ADN espermático, mostraron que en las dosis de radiación (0.1-0.4 J/cm²) ningún tipo de daño sobre el núcleo espermático fue observado, similar a lo mostrado por el grupo control. Sin embargo, con el incremento en las dosis de radiación, la presencia de un halo cromatídico bordeando el núcleo espermático fue observado en la dosis 0.5 J/cm². Mientras que, un núcleo esférico y ADN disperso que tenía forma de cola, los cuales en conjunto daban la impresión de un cometa, fue observado hasta la dosis de radiación 1.1 J/cm². Mismo resultado, han sido observado en la trucha arcoíris (*O. mikyss*) donde a un tiempo de radiación de 5 min, se observó un incremento dramático en la fragmentación del ADN espermático (Dietrich *et al.* 2005). Ciereszko *et al.* (2005) en la lamprea marina (*Petromizon marinus*) observaron incremento en la fragmentación del ADN espermático, pero sin cambios en los porcentajes de motilidad. Mientras que Pruski *et al.* (2009) en el erizo marino *Sphaerechinus granularis* observaron que los espermatozoides mostraron cerca del 90% de daño, además de un doble incremento de daño sobre las estructuras que componen el ADN en las células espermáticas después de la exposición al UV. El análisis de dispersión de ADN, en las dosis de radiación más alta (0.7-1.1 J/cm²) puede explicar en parte, el posible descenso de la motilidad espermática, ya que como se ha observado en espermatozoides de humanos, a mayor daño sobre el ADN un incremento de ERO mitocondrial ha sido observado (Aitken *et al.* 2012). Por otro lado, en la dosis más alta probada (1.1 J/cm²) fue posible también observar células con un grado de daño similar como en dosis bajas (**Figura 8D**). Lopez-Fernandez *et al.* (2009) en células espermáticas de *Tinca tinca*, observaron que empleando el ensayo alcalino y neutral para el mismo tipo de tratamiento, diferencias en la dispersión del ADN fue evidenciado, el cual se asoció con el compactamiento espermático y unión de sitios S-S a protaminas. Este es el primer reporte del efecto del UV sobre las células gaméticas en el bagre tropical, donde el ensayo cometa fue empleado con éxito en la evaluación de la integridad espermática, cuando se busca una dosis idónea de radiación para la inactivación del ADN espermático y su uso posterior en procesos de manipulación cromosómica como la ginogénesis haploide y diploide. En el género *Rhamdia*, no existe reporte alguno sobre la inducción de ginogénesis.

Sin embargo, la triploidía ha sido inducida con éxito en algunas especies como *R. quelen* (García *et al.* 2017).

Pocos son los estudios que se han realizado en relación a evaluar el efecto de la radiación UV para la inducción de ginogénesis artificial, así como, la evaluación de la calidad espermática antes del inicio de los experimentos de fecundación, por ello en este trabajo se optó por evaluar este efecto y tratar de estandarizar una dosis para la inducción exitosa de ginogénesis haploide y diploide en el juil tropical *R. laticauda*. Sin embargo, es necesario poner a prueba cada una de las dosis mediante la fertilización de huevos y evaluar el porcentaje de sobrevivencia así como de eclosión por cada dosis.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, G.H., Refstie, T. and Gjerde, B. 1990. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95: 125–132.
- Adames, M.S., Toledo, C.P.R., Neumann, G., Buzzi, A.H., Buratto, C.N., Piana, P.A. and Bombardelli, R.A. 2015. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Reproduction Science*, 161: 119–128.
- Aguilera, H.P., Noriega, C.P. and Guzmán, C.J. 1990. ¿Qué es la acuicultura? Secretaría de pesca, México, DF, 55 pp.
- Aitken, R.J., Jones, K.T. and Robertson, S.A. 2012. Reactive oxygen species and sperm function- in sickness and in health. *Journal of Andrology*, 33: 1096-1106.
- Aksoy, E., Aktan, T.M., Duman, S. and Cuce, G. 2012. Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. *Int. J. Morphol*, 30 (4): 1544-1550.
- Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, 29: 101-110.
- Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30: 1-14.
- Alavi, S. M. H., Rodina, M., Hatef, A., Stejskal, K., Policar, T., Hamáčková, J. and Linhart, O. 2010. Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae). *Czech J. Anim. Sci*, 55 (4): 174–182.
- Alavi, S.M.H., Hatef, A., Pšenička, M., Kašpar, V., Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Cosson, J., Bondarenko, V., Rodina, M., Gela, D. and Linhart, O. 2012. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation. *Rev Fish Biol Fisheries*, 22: 861–886.
- Alavi, S.M.H., Psenicka, M., Rodina, M., Policar, T. and Linhart, O. 2008. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquat. Living Resour*, 21: 75–80.

- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Viveiros, A.T.M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S. and linhart, O. 2009. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theríogenology*, 72: 32–43.
- Álvarez del Villar, J. 1970. Peces Mexicanos (Claves). Secretaria de investigación y comercio. Serie de Investigación Pesquera. Estudio No. 1. México D.F. 166 pp.
- Arai, K. 2000. Chromosome Manipulation in Aquaculture: Recent Progress and Perspective. *Suisanzoshuko*, 48: 295-303.
- Arai, K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197: 205-228.
- Arai, K., Naito, F., Sasaki, H. and Fujino, K. 1984. Gynogenesis with ultraviolet ray irradiated sperm in the pacific abalone. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50: 2019-2023.
- Aral, F., Şahinöz, E. and Dogu, Z. 2007. A Study on the Milt Quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake, Southeastern Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7: 41-44.
- Aramli, M.S., Kalbassi, M.R. and Nazari, R. 2013. Physiological correlation between sperm motility and seminal plasma composition in the persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Journal of Infertility and Reproductive Biology*, 1(2): 12-20.
- Arias-Rodriguez, L. 2001. Inactivación genética de esperma e inducción de Ginogénesis y de triploidia en el botete diana *Sphoeroides annulatus*, (Jenyns, 1842). Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México. 202 pp.
- Arias-Rodriguez, L. 2007. Genetic Differentiation of Japanese Japanese *Misgurnus* loach inferred from Microsatellite Variation, Marker-Centromere Map and Reproduction of Hybrids between Two Populations. PhD Thesis, Graduate School of Fisheries ScCiencias, Hokkaido University, Japan. 156 pp.
- Arias-Rodriguez, L., Rodriguez, I.L.E. and Pignataro, V.G. 2004. Efecto de la radiación UV en la inactivación genética del esperma de botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). *Ciencias Marinas*, 30: 39-402.
- Arias-Rodriguez, L., Yasui, G.J., Kusuda, S., Fujimoto, K. and Arai, K. 2010. Reproductive and genetic capacity of spermatozoa of inter-populational hybrid males in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *J. Appl. Ichthyol*, 26: 653-658.

- Arreguín-Sánchez, F. and Arcos-Huitrón, E. 2011. Fishin in Mexico: state of exploitation and use of ecosystems. *Hidrobiológica*, 21 (3): 431-462.
- Au, D.W.T., Chiang, M.W.L., Tang, J.Y.M., Yuen, B.B.H., Wang, Y.L. and Wu, R.S.S. 2002. Impairment of sea urchin sperm quality by UV-B radiation: predicting fertilization success from sperm motility. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 583–589.
- Aziz, N., Said, T., Paasch, U. and Agarwal, A. 2007. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction*, 22 (5): 1413-1419.
- Beirao, J., Soares, F., Herráez, M.P., Dinis, M.T. and Cabrita, E. 2008. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theríogenology*, 72: 1251–1261.
- Beirao, J., Soares, F., Herráez, M.P., Dinis, M.T. and Cabrita, E. 2009. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theríogenology*, 72: 1251-1261.
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Developpement*, 26 (4): 877-920.
- Billard, R. and Cosson, M.P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zoo*, 261: 122-131.
- Billard, R., Cosson, J. and Linhart, O. 2000. Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baeri* Brandt sperm motility. *Aquacult. Res*, 30: 1-5.
- Billard, R., Cosson, J., Perchee, G. and Linhart, O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.
- Birstein, V.J., Poletaev, A.I. and Goncharov, B.F. 1993. DNA content in eurasian sturgeon species determined by flow cytometry. *Cytometry*, 14: 377-383.
- Bobe, J. and Labbé, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 535-548.
- Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F., Campagnolo, R., Sanches, E.A. and Sypereck, M.A. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia Quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *R. Bras. Zootec*, 35 (4): 1251-1257.
- Bozkurt, Y; Ogretmen, F.; Kokcu, O. & Ercin, U. (2011). Relationship between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma*

- (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science*, 56 (8): 355-364.
- Bombardelli, R.A., Neumann, G., Rebecchi de Toledo, C.P., Saches, E.A., Bastos, D.N. and Oliveira, J.D.S. 2016. Sperm motility, fertilization, and larval development of silver catfish (*Rhamdia quelen*) in copper-contaminated water. *Ciências Agrárias, Londrina*, 37 (3): 1667-1678.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016. Morphological and morphometric evaluation of silver barb, *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1849) sperm supplemented with antibiotics. *J. Appl. Ichthyol*, 32: 480–485.
- Borges, A., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Zanini, R., Amaral, F., Grillo, M.L., Oberst, E.R. and Wassermann, G.F. 2005. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia' *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 31: 45–53.
- Brandan, M., Diaz, R. y Ostrosky, P. 1995. La radiación al servicio de la vida. Mexico. Fondo de Cultura Económica.
- Browne, R.K., Kaurova, S.A., Uteshev, V.K., Shishova, N.V., McGinnity, D., Figiel, C.R., Mansour, N., Agnew, D., Wu, M., Gakhova, E.N., Dzyuba, B. and Cosson, J. 2015. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*, 83: 1–13.
- Bryan, R., Jiang, Z., Friedman, M. and Dadachova, E. 2011. The effects of gamma radiation, UV and visible light on ATP levels in yeast cells depend on cellular melanization. *Fungal Biology*, 115: 945-949.
- Bussing, W.A. 2002. Peces de las aguas continentales de Costa Rica (2ª ed.). San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 468 pp.
- Cabrita, E., Robles, V. and Herráez, P. 2009. Methods in reproductive aquaculture marine and freshwater species. CRC press, USA.
- Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Sarasquete, C., Herráez, M.P. and Robles, V. 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*. 432: 389-401.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C. and Herráez, M.P. 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50: 144–153.

- Campos, V.G., Seixas, F.K., Kaefer, C., Cavalcanti, P.V., Amaral, M.G., Lucia Jr., T., Deschamps, J.C. and Collares, T. 2010. Association Between the Presence of a 38 kDa Factor in the Seminal Plasma and Inhibition of Sperm Motility in Jundiá Fish *Rhamdia quelen*. Ci. Anim. Bras., Goiânia, 11 (2): 402-409.
- Carvalho, M.L., Oliveira, C., Navarrete, M.C., Froehlich, O. and Foresti, F. 2002. Nuclear DNA content determination in Characiformes fish (Teleostei, Ostariophysii) from the Neotropical region. Genetics and Molecular Biology, 25 (1): 49-55.
- Chávez-Lomelí, M.O., Mattheeuws, A.E. y Pérez-Vega, M.H. 1989. Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura. INIREB/FUCID, México. 222 p.
- Charnov, E.L. 2015. Fish reproduction: patterns, puzzles, principles, and possibilities. Environ Biol Fish, 98: 1727–1728.
- Chourrout, D., Chevassus, B. and Herioux, F. 1980. Analysis of a Hertwig effect in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) after fertilization with and gamma;-irradiated sperm. Reproduction. Nutrition. Development. 20: 719-726.
- Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. 1994. Standardization of ultraviolet irradiation of channel catfish sperm. Journal of the World Aquaculture Society, 25: 571-575.
- Christopher, J.G., Murugesan, A.G. and Sukumaran, N. 2009. Genetic Inactivation of Stinging Catfish (*Heteropneustes fossilis*) Sperm, with UV Irradiation. Journal of Applied Aquaculture, 21: 128-137.
- Ciereszko, A., Wolfe, T.D. and Dabrowskia, K. 2005. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. Aquatic Toxicology, 73: 128–138.
- Ciudad, J., Cid, E., Velasco, A., Lara, J.M., Aijón, J. and Orfao, A. 2002. Flow cytometry measurement of DNA contents of G0/G1 diploid cells from three diferent teleost fish species. Cytometry, 48: 20-25.
- Coffin, L. 1986. Laboratorio clinico en medicina veterinaria. La prensa medica mexicana. 334 pp.
- Colombo, L., Barbaro, A., Libertini, A., Benedetti, P., Francescon, A. and Lombardo, I. 1995. Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Journal of Applied Ichthyology, 11 (2): 118-125.

- Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter G., Rescia, M. and Spano, M. 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, 72: 273-279.
- Cosson, J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12: 69–85.
- Costache, M., Radu, D., Nicolae, C.G. and Grosu, H. 2012. Relationships between Morphology, Motility and fertilization Capacity in Paddlefish (*Polyodon spathula*) Spermatozoa. *Advanced Research in Scientific Areas*, 10: 1427-1429.
- Coward, K., Bromage, N.R., Hibbitt, O. and Parrington, J. 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12: 33–58.
- Cruea, D.A. 1969. Some chemical and physical characteristics of fish sperm. *Transactions of the American Fisheries Society*, 98: 785-788.
- Culumber, Z.W., Hopper, G.W., Barts, N., Passow, C.N., Morgan, S., Brown, A., Arias-Rodriguez, L. and Tobler, M. 2016. Habitat use by two extremophile, highly endemic, and critically endangered fish species (*Gambusia eurystoma* and *Poecilia sulphuraria*; Poeciliidae). *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst*, Wiley Online Library, 1-13.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorezyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P. and Traganos, F. 1992. Features of apoptotic cell measure by flow cytometry. *Cytometry*, 13: 795-808.
- Dietrich, G.J., Dietrich, M., Kowalski, R.K., Dobosz, S., Karol, H., Demianowicz, W. and Glogowski, J. 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology*, 97: 277–284.
- Dietrich, G.J., Szyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L. and Ciereszko, A. 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 64: 1809–1822.
- Dietrich, M.A., Dietrich, G.J., Mostek, A. and Ciereszko, A. 2016. Motility of carp spermatozoa is associated with profound changes in the sperm proteome. *Journal of Proteomics*, 138: 124–135.
- Dolezel, J., Greilhuber, J. and Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2 (9): 2233-2244.

- Don, J. and Avtalion, R.R. 1988. Production of F1 and F2 diploid gynogenetic tilapias and analysis of the "Hertwig curve" obtained using ultraviolet irradiated sperm. *Theor. Appl. Genet.* 76: 253-259.
- Don, J. and Avtalion, R.R. 1993. Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and the Hertwig effect: electron microscopic analysis. *J. Fish Biol.* 42 (1): 1-4.
- Dunham, R.A. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology. Genetic Approaches*, CABI Publishing, Cambridge, MA, 385 pp.
- Effer, B., Figueroa, E., Augsburg, A. and Valdebenito, I. 2013. Sperm biology of *Merluccius australis*: Sperm structure, semen characteristics and effects of pH, temperature and osmolality on sperm motility. *Aquaculture*, 408–409: 147–151.
- Enciso-Lorence, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernández, J.L. and Gosálvez, J. 2009. A two-tailed comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 18 (5): 609-616.
- Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S.D., Sarasa, J., Fernández, J.L. and Gosálvez, J. 2011. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology*, 76: 23–32.
- Engeland, M.V., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B. and Reutelingsperger, C.P.M. 1998. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31: 1–9.
- España-García, A. 2011. Cromosomas mitóticos y meióticos del juil *Rhamdia laticauda* (Pisces: Pimelodidae). Tesis de licenciatura, Laboratorio de Acuicultura Tropical, UJAT, Villahermosa, Tabasco, México. 33 pp.
- Espinoza, C., Valdivia, M. and Dupre, E. 2010. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38 (1): 121-128.
- Esteso, M.C., Rodríguez, E., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Pradiee, J., López-Sebastián, A. and Santiago-Moreno, J. 2015. Descriptive analysis of sperm head morphometry in Iberian ibex (*Capra pyrenaica*): Optimum sampling procedure and staining methods using Sperm-Class Analyzer®. *Animal Reproduction Science*, 155: 42–49.
- Fabbrocini, A., Maurizio, D. and D'Adamo, R. 2016. Sperm motility patterns as a tool for evaluating differences in sperm quality across gonad development stages in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816). *Aquaculture*, 452: 115–119.

- Farrell, P.A. 2011. Encyclopedia of fish physiology from genome to environment. Academic Press, USA. 200 pp.
- Fauvel, C., Suquet, M. and Cosson, J. 2010. Evaluation of fish sperm quality. J. Appl. Ichthyol, 26: 636–643.
- Felip, A., Pifferer, F., Carrillo, M. and Zanuy, S. 1999. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Heredity, 83: 387-397.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M. and Piferrer, F. 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. Genetica, 111: 175-195.
- Fenerich, P.C., Foresti, F. and Oliveira, C. 2004. Nuclear DNA content in 20 species of Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi) from the neotropical region. Genetics and Molecular Biology, 27 (3): 350-354.
- Ferraris Jr, C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa, 1418, 1-628.
- Ferreira, A.A., Nuñez, A.P.O., Luz, R.K., Tataje, D.A.R., Esquivel, J.R. and Restrepo, J.B. 2001. Avaliação Qualitativa e Quantitativa do Sêmen do Jundiá, *Rhamdia quelen*. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, 27 (1): 57-60.
- Flajshans, M., Cosson, J., Rodina, M. and Linhart, O. 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. Cell Biology International, 28: 955-959.
- Flynn, S.R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D.J. and Benfey, T.J. 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. Aquaculture, 253: 721–727.
- Fopp-Bayat, D. 2010. Induction of diploid gynogenesis in wels catfish (*Silurus glanis*) using UV-irradiated grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. Journal Experimental Zoology, 313A: 24-27.
- Fopp-Bayat, D. and Woznicki, P. 2009. Spontaneous gynogenesis in Wels catfish *Silurus glanis* L. Caryologia, 62 (1): 75-79.
- Fopp-Bayat, D., Kolman, R. and Woznicki, P. 2007. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated bester sperm. Aquaculture, 264: 54–58.

- Fürböck, S., Lahnsteiner, F. and Patzner, R.A. 2009. A fine structural review on the spermatozoa of Cyprinidae with attention to their phylogenetic implications. *Histol Histopathol*, 24: 1233-1244.
- Garcia, C., Moreira-Filho, O., Bertollo, L.A. and Centofante, L. 2003. B Chromosomes and Natural Triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia*, 68 (4): 403–411.
- Garcia, S., Yasui, G.S., Bernardes-Junior, J.J., Correa da Silva, B., Amaral-Junior, H and Zaniboni-Filho, E. 2017. Induction of triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) by double-temperature shock. *Lat Am. J. Aquat. Res*, 45 (1): 209-212.
- García-Herreros, M., Aparicio, I.M., Barón, F.J., García-Marín, L.J. and Gil, M.C. 2006. Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 29: 553-563.
- Gbemisola, O.B and Adebayo, O.T. 2014. Sperm Quality and reproductive performance of male *Clarias Gariepinus* induced with synthetic hormones (Ovatide and Ovaprim). *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 6 (1): 9-15.
- Ghigliotti, L., Bolla, S.L., Duc, M., Ottesen, O.H. and Babiak I. 2011. Induction of meiotic gynogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) through pressure shock. *Animal Reproduction Science*, 127: 91– 99.
- Goldstein, J., Newbury, D.E., Echlin, P., Joy, D.C., Roming Jr, A.D., Lyman, C.E., Fiory, C. and Lifshin, E. 1992. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Plenum Press, New York. Segunda edición. 785 p.
- Gomelsky, B., Cherfas, N.B., Gissis, A. and Hulata, G. 1998. Induced diploid gynogenesis in white bass. *The Progressive Fish-Culturist*, 60: 288–292.
- Gomelsky, B., Mims, S.D., Onders, R.J., Shelton, W.L., Dabrowski, K. and Garcia-Abiado, M.A. 2000. Induced gynogenesis in black crappie. *North American Journal of Aquaculture*, 62 (1): 33-41.
- Gomendio, M. and Roldan, E.R.S. 2008. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Dev. Biol*, 52: 439-447.
- Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68: 239–247.

- Grozea A., Muscalu, N.C. and Banatean, D.I. 2006. Chromosomes inactivation in common carp spermatozoa in order to obtain all-female population by means of gynogenesis. Proceeding Abstr “Animal Husbandry, Veterinary and Agroecology in transitional processes”, University of Novi Sad, Herceg Novi, 88pp.
- Gusmão-Pompiani, P., Oliveira, C. and Quagio-Grassiotto, I. 2005. Spermatozoa ultrastructure in Sciaenidae and Polynemidae (Teleostei: Perciformes) with some consideration on Percoidei spermatozoa ultrastructure. *Tissue and Cell*, 37: 177–191.
- Guthrie, H.D and Welch, G.R. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, 63: 396-410.
- Guzmán, A.P. and Fuentes, C.D.F. 2006. Pesca, acuicultura e investigación en México. CEDRSSA. 384 pp.
- Hardie, D.C. and Hebert, P.D.N. 2004. Genome-Size evolution in fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61: 1636-1646.
- Hartley, S.E. and Horne, M.T. 1985. Cytogenetic Techniques in Fish Genetics. *J. Fish Biol*, 26: 575-582.
- Hajirezaee, S., Amiri, B. M., Mirvaghefi, A. and Ahmadi, A. S. 2010. Evaluation of semen quality of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in different times of spermiation during the spawning season. *Czech J. Anim. Sci*, 55 (10): 445–455.
- Hassanzadeh-Saber, M. and Hallajian, A. 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquacult Int*, 22: 273–279.
- He, S. and Woods, L.C III. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 48: 254–262.
- Hernández, R.R., Hendrickson, D.A., Lundberg, J.G. and Humphries, J.M. 2005. *Lacantuni aenigmatica* (Teleostei: Siluriformes) a new and phylogenetically puzzling freshwater fish from Mesoamerica. *Zootaxa*, 1000: 1-24.
- Hernández-Ibarra, I. N. K. (2004). Poliploidía y ginogénesis en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*), certificación genética de presuntos híbridos de abulón rojo y azul (*Haliotis fulgens*), y cariótipos de las especies parentales. Tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. 132 pp.

- Herschenfeld, R.E. and Gilchrest, B.A. 1998. The accumulative effects of ultraviolet radiation on the skin: photoageing. *In*: Hawk, J.L.M. (Ed) Photodermatology. Oxford University Press. New York, USA. pp 69-87.
- Hessen, D.O., Frigstad, H., Faerovig, P.J., Wojewodzic, M.W. and Leu, E. 2012. UV radiation and its effects on P-uptake in arctic diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 411: 45–51.
- Hiddemann, W., Schumann, J., Andreeff, M., Barlogie, B., Herman, C.J., Leif, R.C., Mayall, B.H., Murphy, R.F. and Sandberg, A.A. 1984. Covention on Nomenclature for DNA Cytometry. *Cytometry*, 5: 445-446.
- Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M. 1983. Fish physiology. Volume IX, part B. Academic Press. USA. 497 pp.
- Holt, W.V. and Van Look, K.J.W. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127: 527–535.
- Horst, G. and Maree, L. 2009. Sperm Blue®: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechnic and Histochemistry*, 84 (6): 1-10.
- Huerta, B.M.A. 1999. Inactivación genética de esperma de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachnert, 1868) utilizando luz UV. Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México, 89 pp.
- Hussain, M.G., Penman, D.J., McAndrew, B.J. and Johnstone, R. 1993. Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. a comparison of the relative effectiveness of pressure and heat shocks. *Aquaculture*, 111 (4): 263-270.
- Ijiri, K.I. and Egami, N. 1980. Herwitg effect caused by UV-irradiation of sperm of *Oryzias latipies* (Teleost) and its photoreactivation. *Mutation research*, 69: 241-248.
- Jamieson, B.G.M. 1991. Fish Evolution and Systematics: Evidence From Spermatozoa. Cambridge University Press. New York. USA. 319 pp.
- Jamieson, B.G.M. 2009a. Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes). Phylogeny, Reproductive Sistem, Viviparity, Spermatozoa. Voluemen 8A. Science Publishers, Enfiel, NH, USA. 788 pp.
- Jamieson, B.G.M. 2009b. Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes). Sperm competition, Hormones sexual selection, Reproductive modes fertilization,

- Sex determination parental care, conservatiuon cryopreservation, Embríology. Genetics. Volumen 8B. Science Publishers, Enfiel, NH, USA. 541 pp.
- Ji, X.S., Chen, S.L., Yang, J.F., Ma, H.Y. and Jiang, Y.L. 2010. Artificial gynogenesis and assessment of homozygosity in meiotic gynogens of spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Aquacult Int*, 18: 1151–1161.
- Jianxun, C., Xiuhai, R. and Qixing, Y. 1991. Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia*, 56: 424-429.
- Jiménez-Trinidad, A. 2016. La osmolaridad y sus efectos en la vitalidad espermática del bagre tropical *Rhamdia laticauda* (Pisces: Heptapteridae). Tesis de licenciatura, Laboratorio de Acuicultura Tropical, UJAT, Villahermosa, Tabasco, México. 74 pp.
- Juarez, T.M., Flores, E.M. and Luna, M.J. 2007. El sector pesquero en México. CEDRSSA. 45 pp.
- Juchno, D., Lackowska, B., Boron, A. and Kilarsi, W. 2010. DNA content of hepatocyte and erythrocyte nuclei of the spined loach (*Cobitis taenia* L.) and its polyploid forms. *Fish Physiol Biochem*, 36: 523–529.
- Kang, X., Wei, D., Jun, X., Min, T., Chun, Z., Yun, L. and ShaoJun, L. 2015. Development and application of biological technologies in fish genetic breeding. *Fish Biology and Biotechnology*, 58 (2): 187-201.
- Kavamoto, E.T. and Silveira, W.F. 1986. Physical, Chemistry and microscopic seminal characteristic of *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) in field conditions). *B. Inst. Pesca*, 13 (1): 95-100.
- Kienzler, A., Tronchere, X., Devaux, A. and Bony, S. 2013. UV-induced Nucleotide Excision Repair (NER) and Photoreactivation Repair (PER) in two trout fish cell lines used in ecotoxicological assessment studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 125: 51–55.
- Kijima, A. 1992. Effect of UV irradiation on genetic inactivation of sperm using Marketing Tissue Culture Petri-dish in the pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Tohuko Journal of Agricultural Research*, 42: 3-4.
- Komen, H. and Thorgarrd, G.H. 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture*, 269: 150–173.

- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pals, S.T. and Vans Oers, M.H.J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on b cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84 (5): 1415-1420.
- Kozmin, S.G., Pavlov, Y.I., Kunkel, T.A. and Sage, E. 2003. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Pol η and Pol ζ in response to irradiation by simulated sunlight. *Nucleic Acids Research*, 31(15): 4541-4552.
- Krysko, D.V., Berghe, T.V., Herde, K.D. and Vandenabeele, P. 2008. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44: 205-221.
- Kucharczyk, D., Luczynski, M.J., Szczerbowski, A., Katarzyna T., Stawomir, K. and Igor, B. 2004. Meiotic gynogenesis in ide (*Leuciscusidus L.*) induced by high- temperature shock. *Polish Fisheries*, 12 (2): 187-190.
- Kunz, Y.W. 2004. *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Springer. Dordrech, Netherlands. 637 pp.
- Kuradomi, R.Y., De Souza, T.G., Foresti, F., Schulz, R.W., Bogerd, J., Moreira, R.G., Furlan, R.L., Almeida, E.A., Maschio, L.R. and Batlouni, S.R. 2016. Effects of re-stripping on the seminal characteristics of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, 225: 162-173.
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A. and Maisee, G. 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60: 397-404.
- Lahnsteiner, F. 2011. Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim for more than two hours in saline solutions. *Aquaculture*, 314: 221–224.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R.A. 1997. Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio*. *Journal of Fish Biology*, 50: 564–574.
- Lasher, R. and Rugh, R. 1962. The “Hertwig effect” in teleost development. *Biological Bulletin*, 123: 582-588.
- Lebeda, I., Dzyuba, B. and Rodina, M. 2014. Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Aquacult Int*, 22: 485–495.
- Li, P., Wei, Q. and Liu, L. 2008. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *J. Appl. Ichthyol*, 24: 121–125.

- Li, Q., Osada, M., Kashihara, M., Hirohashi, K. and Kijima, A. 2000. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Aquaculture*, 186: 233–242.
- Llanos, C. and Scotto, C. 2014. Comparación entre la obtención de crías por cruce natural versus la utilización de un inseminador artificial en el pez ornamental *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Revista AquaTIC*, 40: 21-31.
- López-Fernández, C., Gage, M.J.G., Arrollo, F., Gosálbez, A., Larrán, A.M., Fernández, J.L. and Gosálvez, J. 2009. Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *Reproduction Research*, 138: 257-266.
- López-Hernández, J. 2013. Efecto de la luz ultravioleta sobre la calidad espermática del juil tropical *Rhamdia laticauda* (Pisces: Heptapteridae). Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México, 56 pp.
- Lu, X.Y. and Wu, R.S.S. 2005^a. Ultraviolet damages sperm mitochondrial function and membrane integrity in the sea urchin *Anthocardaris crassispina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 53–59.
- Lu, X.Y. and Wu, R.S.S. 2005^b. UV induces reactive oxygen species, damages sperm, and impairs fertilisation in the sea urchin *Anthocardaris crassispina*. *Marine Biology*, 148: 51–57.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Beasley, J.M., Sullivan, C.V. and Borski, R.J. 2004. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm. *Aquaculture*, 237: 499–516.
- Luczynski, M., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Glogowski, J., Luczynski, M., Szczerbowski, A. and Babiak, I. 2007. Gynogenesis in northern pike: UV inactivation of spermatozoa and the heat shock inducing meiotic diploidization. *Environmental Biotechnology*, 3 (2): 39-43.
- Luo, D., Sun, J.J., Lu, X., Liu, L.Z., Chen, S.J. and Li, G.F. 2011. Comparative sperm ultrastructure of three species in *Siniperca* (Teleostei: Perciformes: Siniperacidae). *Micron*, 42: 884–891.
- Madan, R., Benson, R., Sharma, D.N., Julka, P.K. and Rath, G.K. 2015. Radiation induced hereditary disease: Pathogenesis, management and review literature. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 27: 187-193.

- Madhavi, M., Kailasam, M. and Mohanlal, D.L. 2015. Ultrastructure of sperm of the Spotted scat (*Scatophagus argus*, Linnaeus, 1766) observed by scanning and transmission electron microscopy. *Animal Reproduction Science*, 153: 69–75.
- Maggese, M.C., Cukier, M. and Cussac, V.E. 1984. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodiade) sperm induced by media of different salinities. *Rev. Brasil. Bio*, 44 (4): 541-546.
- Marco-Jiménez, F., Pérez, L., Viudes de Castro, M.P., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Jover, M. and Asturiano, J.F. 2006. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology*, 65: 1302–1310.
- Maree, L., Plessis S.S., Menkveld, R. and Horst, G. 2010. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Human Reproduction*, 25 (6): 1369–1382.
- Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P., Silva, C.A. and Carneiro, C.F. 2010. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. Appl. Ichthyol*, 26: 779–783.
- Maricchiolo, G., Genovese, L., Laura, R., Micale, V. and Muglia, U. 2004. Fine structure of spermatozoa in the common pandora (*Pagellus erythrinus* Linnaeus, 1758) (Perciformes, Sparidae). *Histol Histopathol*, 19: 1237-1240.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P. and Levy, R. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*, 71: 28-37.
- Martínez, G., Atencio, V. and Pardo, S. 2011. Efectos de la concentración de glucosa sobre la activación de la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Rev.MVZ Córdoba*, 16 (2): 2554-2563.
- Martins, G.B., Piedras, S.R.N., Fernandes-Pouey, J.L.O., Bongalhardo, D.C. and Robaldo, R.B. 2015. Salinity on artificial reproduction of silver catfish (*Rhamdia quelen*) Salinidade. *Ciência Rural*, Santa Maria, 45 (3): 458-463.
- Mattei, C. 1970. Spermiogeneses comparée des poissons. *Comparative Spermatology*. Academic Press, New York 57–69 pp.
- Mattei, X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69: 3038–3055.
- Meulemans, C.C.E. 1986. The basic principles of UV-sterilization of water. *Ozone: Science & Engineering*, 9: 299-313.

- Miller, R.R., Minckley, L.W. and Norris, M.S. 2009. Peces Dulceacuícolas de México. CONABIO, SIMAC, ECOSUR, Consejo de Peces del Desierto. México. 559 pp.
- Mirsky, A.E. and Ris, H. 1950. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *The Journal of General Physiology*, 452-462.
- Mirza, J.A. and Shelton, W.L. 1988. Induction of gynogenesis and sex reversal in silver carp. *Aquaculture*, 68 (1): 1-14.
- Molina-Luzón, M.J., López, J.R., Robles, F., Navajas-Pérez, R., Ruiz-Rejón, C., De la Herrán, R. and Navas, J.S. 2015. Chromosomal manipulation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and gynogenesis. *J Appl Genetics*, 56: 77-84.
- Moreno, M. R. 1976. Peces dulce-acuícolas que se explotan en México, y datos sobre su cultivo. Primera edición. San Gerónimo Lidice. México, DF: Ediciones tercer mundo. 68 pp.
- Morgan, A.J., Murashige, R., Woolridge, C.A., Luckenbach, J.A., Watanabe, W.O., Borski, R.J., Godwin, J. and Daniels, H.V. 2006. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm. *Aquaculture*, 259: 290-299.
- Muchlisin, Z.A. 2005. Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. 2005. *Biodiversitas*, 6 (1): 12-15.
- Muchlisin, Z.A., Hashim, R., Chong, A.S.C. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology*, 62: 25-34.
- Mylonas, C.C. and Zohar, Y. 2001. Use of GnRHa-delivery system for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 463-491.
- Mylonas, C.C., Fostier, A. and Zanuy, S. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 516-534.
- Nahon, S., Castro-Porras, V.A., Pruski, A.M. and Charles, F. 2009. Sensitivity to UV radiation in early life stages of the Mediterranean sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Science of the Total Environment*, 407: 1892-1900.
- Nam, Y.K., Cho, H.J., Im, J.H., Park, I. and Choi, G.C. 2001. Production of all-female diploid and triploid far eastern catfish, *Silurus asotus* (Linnaeus): survival and growth performance. *Aquaculture Research*, 32: 991-997.

- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the World. Fourth Edition. Published by John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 601 pp.
- Nowosad, J., Kucharczyk, D., Liszewski, T., Targoska, K. and Kujawa, R. 2015. Comparison of temperature shock timing to induced artificial mitotic gynogenesis and androgenesis in common tench. *Aquacult Int*, 23: 45–53.
- Ogier de Baulny, B., Le Vernn, Y., Keeboeuf, D. and Maisse, G. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Críobiology*, 34: 141-149.
- Orfão, L.H., Nascimento, A.F., Corrêa, F.M., Cosson, J. and Viveiros, A.T.M. 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture*, 311: 241-247.
- Padilla, I.S., Eizaguirre, C., Scharsack, J., Lenz, T and Milinski, M. 2011. Induction of diploid gynogenesis in an evolutionary model organism, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Developmental Biology*, 11 (55): 1-11.
- Paniagua-Chávez, C.G., Jenkins, J., Segovia, M. and Tiersch, T.R. 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology*, 53: 128–138.
- Paniagua-Chávez, C.G., Ortiz-Gallarza, S.M. and Aguilar-Juárez, M. 2011. National Subsystem for Aquatic Genetic Resources: The use of cryopreservation for conservation of aquatic genetic resources in Mexico. *Hidrobiológica*, 21 (3): 415-429.
- Paramo-Delgadillo, S. 1986. Los Bagres del Estado de Tabasco (parte 1). Expresión. Revista de la Secretaria de Educación Cultura y Recreación. Tabasco. No-10. 30 pp.
- Pavlov, D.A. 2006. A method for the assessment of sperm quality in fish. *Journal of Ichthyology*, 46 (5): 391–398.
- Pecio, A. 2009. Ultrastructural examination of spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure in congo tetra *Phenacogrammus interruptus* Boulenger, 1899 (Ostaríophysi: Characiformes: Alestidae). *Folia Biologica (Kraków)*, 57 (1-2): 13-21.
- Peña, F.J., Johannisson, A. and Wallgren, M. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theríogenology*, 60: 677-689.

- Pérez, I.C. 2006. Apoptosis: una muerte silenciosa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 37 (1): 13-17.
- Peruzzi, S. and Chatain, B. 2000. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax L.* relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture*, 189: 23–37.
- Pifferer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Castro, J. and Martínez, P. 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture*, 238: 403–419.
- Pinkel, D., Lake, S., Gledhill, B.L., Van Dilla, M.A., Stephenson, D. and Watchmaker, G. 1982. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry*, 3: 1-9.
- Pruski, A.M., Nahon, S., Escande, M.L. and Chales, F. 2009. Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean sea-urchin spermatozoa. *Mutation Research*, 673: 67–73.
- Psenicka, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Gela, D., Nebesarova, J. and Linhart, O. 2007. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. *Biol. Cell*, 99: 103–115.
- Psenicka, M., Alavi, S.M.H., Rodina, M., Cicova, Z., Gela, D., Cosson, J., Nebesarova, J. and Linhart, O. 2008. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). *J. Appl. Ichthyol*, 24: 371–377.
- Purdom, C.E. 1968. Radiation-induced gynogenesis and androgénesis in fish. *Heredity*, 24: 431-444.
- Purdom, C.E. 1983. Genetics engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33: 287-300.
- Quagio-Grassiotto, I. and Oliveira, C. 2008. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysis). *Zoologischer Anzeiger*, 247: 55–66.
- Quagio-Grassiotto, I., Ortiz, R.J., Pérez, M.H.S. and Oliveira, C. 2011. Sperm of Doradidae (Teleostei: Siluriformes). *Tissue and Cell*, 43: 8–23.

- Quagio-Grassiotto, I., Spadella, M.A., Carvalho, M. and Olivera, C. 2005. Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, 3 (3): 401-410.
- Ravanat, J.L., Douki, T. and Cadet, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63: 88–102.
- Ramirez-Merlano, J., Medina-Robles, V. and Cruz- Casallas, P. 2011. Variación estacional de las características seminales del bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, pimelodidae). *Rev. MVZ Córdoba*, 16 (1): 2336-2348.
- Rey-Vázquez, G. 2012. Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. 77 pp.
- Ricci, C., Perticarari, S., Fragonas, E., Giolo, E., Canova, S., Pozzobon, C., Guaschino, S. and Presani, G. 2002. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human Reproduction*, 17 (10): 2665-2672.
- Rick, I.P., Mehlis, M., Eber, E. and Bakker, T.C.M. 2014. The influence of ambient ultraviolet light on sperm quality and sexual ornamentation in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Oecologia*, 174: 393-402.
- Rideout, R.M., Trippel, E.A. and Litvak, M.K. 2004. Relationship between sperm density, spermatozoa, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *Journal of Fish Biology*, 65: 319–332.
- Rodríguez, M. and Schaper, J. 2005. Apoptosis: measurement and technical issues. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 38: 15–20.
- Rodríguez-Juiz, A.M., Torrado, M. and Mendez, J. 1996. Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry. *Marine Biology*, 126: 489-497.
- Rojas, E., Lopez, M.C. and Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography*, 722: 225-254.
- Rougeot, C., Ngingo, J.V., Gillet, L., Vanderplasschenc, A. and Mélard, C. 2005. Gynogenesis induction and sex determination in the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, 243: 411–415.

- Rouxel, C., Suquet, M., Cosson, J., Severe, A., Quemener, L. and Fauvel, C. 2008. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. *Aquaculture Research*, 39: 434-440.
- Rurangwaa, E., Kimeb, D.E., Olleviera, F. and Nasha, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1–28.
- Saber, M. H. and Hallajian, A. 2014. Study of sex determination system in ship sturgeon, *Acipenser nudiiventris* using meiotic gynogenesis. *Aquacult Int*, 22: 273–279.
- Saber, M. H., Noveiri, S. B., Pourkazemi, M., Yazdani, M., Ghoroghi, A., Bahmani, M., Pourdehghani, M., Chakmehdouz, F., Yarmohammadi, M. and Nowruzfashkhami. 2014. Induction of meiotic gynogenesis in ship sturgeon *Acipenser nudiiventris* using UV-irradiated heterologous sperm. *J Appl Genetics*, 55: 223–229.
- SAGARPA. 2007. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Bagre para la Inocuidad Alimentaria. CIAD, A.C. Unidad Mazatlán. 150pp.
- SAGARPA. 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. CONAPESCA-SAGARPA. Mazatlán, Sinaloa. Mexico. 311pp.
- Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Marcos, R.M., Neuman, G., Toledo, C.P.R. and Romagosa, E. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research*, 42: 153-156.
- Sanches, E.A., Marcos, R.M., Baggio, D.M., Tessaro, L., Balen, R.E. and Bombardelli, R.A. 2011. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. *R. Bras. Zootec*, 40 (6): 1163-1167.
- Schmitter-Soto, J.J. 1998. Catálogo de los peces continentales de Quintana Roo. El colegio de la frontera sur, San Cristóbal de la Casas. 239 p.
- Schreck, C.B. and Moyle, P.B. 1990. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. 29 pp.
- Schulz, R.W., França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H. and Miura, T. 2010. Spermatogenesis in Fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 390–411.
- Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H. and Ramaekers, F. 1998. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 86: 63-69.

- Serafini, R., Longobardi, V., Spadetta, M., Neri, D., Ariota, B., Gasparrini, B. and Di Palo, R. 2014. Trypan blue/giemsa staining to assess sperm membrane integrity in salernitano stallions and its relationship to pregnancy rates. *Reprod Dom Anim*, 49: 41–47.
- Sgonc, R. and Gruber, J. 1998. Apoptosis Detection: An overview. *Experimental Gerontology*, 33 (6): 525-533.
- Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, L., Linhartova, P. and Linhart. O. 2013. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Animal Reproduction Science*, 139: 127–135.
- Shen, H.M. and Ong, C.N. 2000. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (4): 529-536.
- Shima, A. and Setlow, R.B. 1984. Survival and pyrimidine dimers in cultured fish cells exposed to concurrent sun lamp ultraviolet and photoreactivating radiations. *Photochemistry and Photobiology*, 39: 49-56.
- Shounan, Y., Feng, X. and Connell, P.J.O. 1998. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 217: 61-70.
- Silva, M., Matoso, D.A., Ludwig, L.A.M., Gomes, E., Almeida, M.C., Vicari, M.R. and Artoni, R.F. 2011. Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguacu basin, southern Brazil. *Environ Biol Fish*, 91: 361–366.
- Singh, M.K., Sharma, J.G. and Chakrabarti, R. 2015. Simulation study of natural UV-B radiation on *Catla catla* and its impact on physiology, oxidative stress, Hsp 70 and DNA fragmentation. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 149: 156-163.
- Siraj, S.S., Seki, S., Jee, A.K., Yamada, Y. and Taniguchi, N. 1993. Diploid Gynogenesis in Lampam Jawa *Puntius gonionotus* Using UV Irradiated Sperm of *Puntius schwanenfeldii* followed by temperature shock. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 (6): 957-962.
- Soares, F.A.C., Streit Jr, D.P., Ebert, A.R., Coldebella, I.J. and Oberst, E.R. 2010. Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no inverno e na primavera. *R. bras. Ci. Vet*, 17: 129-133.

- Sousa, P.C., Santos, E.A.A., Souza, A.L.P., Lima, G.L., Barros, F.F.P.C., Oliveira, M.F. and Silva, A.R. 2013. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Pesq. Vet. Bras*, 33 (7): 924-930.
- Sugama, K., Taniguchi, N., Seki, S., Nabeshima, H and Hasegawa, Y. 1990. Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black seabream and heat shock. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 56 (9): 1427-1433.
- Taati, M.M., Mehrad, B., Shabani, A. and Golpour, A. 2010. Correlation between chemical composition of seminal plasma and sperm motility characteristics of Prussian carp (*Carassius gibelio*). *Bioflux*, 3 (3): 233-238.
- Tabares, C.J., Tarazona, A.M. and Olivera-Angel, M. 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18 (2): 149-161.
- Tan-Fermin, J.D., Miura, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. 1999. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias microcephalus* (Gunther). *Aquaculture*, 171: 323-338.
- Taniguchi, N., Seki, S., Fukai, J. and Kijima, A. 1988. Induction of two types of gynogenetics diploids by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 1483-1491.
- Tessaro, L., Toledo, C.P.R., Neuman, G., Krause, R.A., Meurel, F., Natali, M.R.M. and Bombardelli, R.A. 2012. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture*, 326-329: 74-80.
- Thorgaard, G.H. 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: *fish Physiology*, vol. IX, part B. (W. S. Hoar, D.J. Randall and E. M. Donaldson, eds). Academic Press, New York. 477 pp.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J. and Utter, F.M. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*, 29: 305-309.
- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., Wachtel, S.S. and Elias, S. 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry*, 10: 706-710.

- Tsuda, J.R., Moraes, V.P.O., Giuliano-Caetano, L. and Dias, A.L. 2010. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genetics and Molecular Research*, 9 (3): 1929-1935.
- Tuset, V.M., Trippel, E.A. and Monserrat, J. 2008^a. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *Journal of Applied Ichthyology*. 24 (4): 398-405.
- Tuset, V.M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowinska, M., Monserrat, J. and Ciereszko, A. 2008^b. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 69: 1033–1038.
- Tuset, V.M., Dietrich, G.M., Wojtczak, M., Słowinska, M., Monserrat, J. and Ciereszko, A. 2008^c. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *J. Appl. Ichthyol*, 4: 393–397.
- Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J., McGowan, C. and Reith, M. 2006. Gynogenesis and sex determination in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 252: 573–583.
- Valcárcel, A., Guerrero, G. and Maggese, M.C. 1994. Hertwig effect caused by UV-irradiation of sperm of the catfish, *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae), and its photoreactivation. *Aquaculture*, 128: 21-28.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F. and Doroshov, S.I. 1996. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in White sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture*, 147: 177-189.
- Vargas, M.A., Geihs, M.A., Maciel, F.E., Cruz, B.P., Maia-Nery, L.E. and Allodi, S. 2011. The effects of UV radiation on the visual system of the crab *Neohelice granulata*: A protective role of melatonin, Part C. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 154: 427–434.
- Vázquez, G.R., Da Cuña, R.H., Meijide, F.J. and Guerrero, G.A. 2012. Spermatogenesis and changes in testicular structure during the reproductive cycle in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Acta Zoologica*, 93: 338–350.
- Verma, D.K., Routray, P., Dash, C., Dasgupta, S. and Jena, J. K. 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9: 67-76.
- Vermes, I., Haanen, C. and Reutelingsperger, C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243: 167–190.

- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184: 39-51.
- Volckaert, F. A., Van den Haute, C., Galbusera, P. H. and Ollevier, F. 1997. Gynogenesis in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Optimizing the induction of body gynogenesis with combined pressure and temperature shocks. *Aquaculture Research*, 28: 329-334.
- Walters, E.M., Men, H., Agca, Y., Mullen, S.F., Critser, E.S. and Critser, J.K. 2005. Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: Acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility. *Críobiology*, 50: 193-205.
- Wootton, R. J. and Smith, C. 2015. *Reproductive Biology of Teleost Fishes*. Wiley Blackwell. USA. 472 pp.
- Xenarthra A.C. 2008. Programa maestro bagre de San Luis Potosí. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. 380 pp.
- Xin, N., Liu, T., Zhao, H., Wang, Z., Liu, J., Zhang, Q. and Qi, J. 2014. The impact of exogenous DNA on the structure of sperm of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Animal Reproduction Science*, 149: 305–310.
- Xu, H.J., You F., Yan L.B. and Zhang J.P. 2007. Effects of ultra-violet irradiation on sperm motility and diploid gynogenesis induction in large yellow croaker (*Pseudosciaenacrocea*) undergoing cold shock. *Aquacult. Int*, 15:371-382.
- Xu, X.R., Zhu, J.Q., Ye, T., Wang, C.L., Zhu, Y.F., Dahms, H.U., Jin, F. and Yang, W.X. 2013. Improvement of single-cell gel electrophoresis (SCGE) alkaline comet assay. *Aquatic Biology*, 18: 293-295.
- Yacamán, M.J. y Reyes-Gasga, J. 1998. Microscopía electrónica una vision del microcosmos. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, Fondo de Cultura Economica. México, D. F. 143 pp.
- Yasui, G.S., Arias-Rodriguez, L., Fujimoto, T. & Arai, K. (2009). A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. *Animal Reproduction Science*, 116 (3): 335-345.

- Yasui, G.S., Senhorini, J.A., Shimoda, E., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L.S.O., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L. and Silva, L.A. 2014. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, 90 (3): 464-470.
- Yusuf, S.W., Sami, S. and Daher, I.N. 2011. Radiation-Induced Heart Disease: A Clinical Update. *Cardiology Research and Practice*, 10: 1-9.
- Zamai, L., Falcieri, E., Zauli, G., Cataldi, A. and Vitale, M. 1993. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry*, 14: 891-897.
- Zan-Bar, T., Bartoov, B., Segal, R., Yehuda, R., Lavi, R., Lubart, R. and Avtalion, R.R. 2005. Influence of visible light and ultraviolet irradiation on motility and fertility on mammalian and fish sperm. *Photomedicine and Laser Surgery*, 23: 549-555.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. and Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *BioTechniques*, 23: 525-531.
- Zhang, H., Liu, S., Zhang, C., Tao, M., Peng, L. Y., You, C., Xiao, J., Zhou, Y., Zhou, G., Lou, K. and Liu, Y. 2011. Induced gynogenesis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) using irradiated sperm of allotetraploid hybrids. *Mar Biotechnol*, 13: 1017–1026.
- Zhang, L., Wang S., Chen, W., Hu, B., Ullah, S., Zhang, Q., Le, Y., Chen, B., Yang, P., Bian, X., Liu, Y., Chen, Q., Lin, J., Gao, C. and Hu, J. 2014. Fine Structure of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatozoa. *Pak Vet J*, 34 (4): 518-521.
- Zhang, Q. and Arai, K. 1996. Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fisheries science*, 62 (6): 870-877.
- Zhou, R., Xiao, J., Qin, Q., Zhu, B., Zhao, R., Zhang, C., Tao, M., Luo, K., Wang, J., Pen, L. and Liu, S. 2015. YY super sperm lead to all male triploids and tetraploids. *Genetics*, 16 (68): 1-9.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C. and Vilella, S. 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47: 227–235.