



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



---

---

**SUPRESIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN  
TESTÍCULOS DE LA MOJARRA PINTA *Parachromis  
managuense***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

P R E S E N T A

**BIOL. AARÓN ALEJANDRO TORRES MARTÍNEZ**

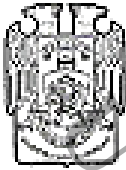
DIRECTORES

**M.C. ARLETTE AMALIA HERNÁNDEZ FRANYUTTI**

**DR. ULISES HERNÁNDEZ VIDAL**

VILLAHERMOSA, TABASCO

JUNIO 2017



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**



JUNIO 26 DE 2017

**C. AARÓN ALEJANDRO TORRES MARTÍNEZ  
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: **"SUPRESIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN TESTÍCULOS DE LA MOJARRA PINTA *Parachromis managuense*"**, asesorado por la M. en C. Arlette Amalia Hernández Franyutti y Dr. Ulises Hernández Vidal sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez, Dra. Julla María Leshner Gordillo, M. en C. Arlette Amalia Hernández Franyutti, Dr. Ulises Hernández Vidal y M. en C. María de Jesús Contreras García.

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**

UJAT  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DIRECCIÓN**

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

## 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: **"SUPRESIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN TESTÍCULOS DE LA MOJARRA PINTA *Parachromis managuense*"**, 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 este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 27 de Junio de 2017.

AUTORIZO



AARÓN ALEJANDRO TORRES MARTÍNEZ

Nothing has such power to broaden the mind as the ability to investigate systematically and truly all that comes under thy observation in life.

Marco Aurelius

Bad times have a scientific value. These are occasions a good learner would not miss.

Ralph Waldo Emerson

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesora y amiga de siempre, la M.C. Arlette Hernández Franyutti por todo el apoyo durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez por su gran apoyo durante el análisis e interpretación de los datos, así como en la preparación del artículo científico.

A mi comité revisor, Dra. Julia María Leshner Gordillo, Dr. Ulises Hernández Vidal y M.C. María de Jesús Contreras García por sus sugerencias y observaciones para enriquecer esta investigación.

Al M.C. Salomón Páramo Delgadillo y al Dr. Lenin Arias Rodríguez por el préstamo de algunos materiales para la ejecución de mis experimentos y por la donación de ejemplares de peces.

A mi amigo el Dr. Carlos Augusto Strüssmann por quien siento gran admiración y respeto, por su asesoría técnico-académica durante mi estancia de investigación en su laboratorio de la Universidad de Ciencias y Tecnologías Marinas de Tokio.

Al Dr. Sullip Kumar Majhi de la Oficina Nacional de Recursos Genéticos de Peces de Nueva Deli, India, por su asesoría técnica en el trasplante de espermatogonias en peces.

A todos los amigos que hicieron de mi estadía en el país Nipón una experiencia inolvidable: mis muy queridas amigas Stefany Lizeth, Munti Sarida y Alison Ng, así como a Seik Rahmann, Melikey Ayan, Sevgi Bozdemir, Nur Un Nesa Rani, Alan, Anrin Kondo, Minori Goto, Yusa Nakamura y Kessaku Tanabe.

A mí muy querido amigo de Yokohama, Shunsuke Sasaki, a quien agradezco profundamente las experiencias inolvidables que compartió conmigo, así como su interés por enseñarme las costumbres de su pueblo.

A mis amigos de posgrado de la DACBIOL: Juan Carlos López, Santiago Bautista, Roberto Méndez, Jesús Regil, Patricia Orduña, Juan Manuel Vidal, Vladimir Aguilar, Leonardo Rosado, Feliciano Gallegos; y a todos mis amigos del Laboratorio de Biología de la Reproducción quienes hicieron mi travesía por allí una experiencia mucho más amena: Roberto Muñoz, Moisés González, Luis Luna, Javier Méndez.

Al Laboratorio de Acuicultura Tropical y al Laboratorio de Bioquímica por el uso de sus instalaciones para la realización de mis experimentos y actividades de investigación.

Al proyecto FOMIX de la UJAT por los múltiples apoyos para mi asistencia a congresos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención y por la beca Mixta para la realización de mi estancia en el extranjero.

## ÍNDICE

RESUMEN GENERAL.....	vii
<b>CAPITULO I</b>	
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Trasplante de células germinales en vertebrados.....	4
Trasplante de células germinales en peces .....	10
Trasplante de Células Germinales Primordiales en embriones en estadio de blástula .....	10
Trasplante de células germinales en larvas recién eclosionadas.....	11
Trasplante de espermatogonias y ovogonias en peces adultos.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	20
OBJETIVOS.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
METODOLOGÍA.....	22
Adquisición y manejo de ejemplares .....	22
Diseño experimental.....	22
Análisis histológico y estereológico de los testículos de <i>P. managuense</i> .....	23
Aislamiento de las espermatogonias de <i>P. splendida</i> .....	24
Análisis estadístico.....	25

LITERATURA CITADA.....	26
<b>CAPITULO II</b>	
The effect of busulfan and high temperature on the spermatogenesis of the jaguar cichlid <i>Parachromis managuense</i> .....	39
ABSTRACT.....	39
INTRODUCTION.....	40
MATERIALS AND METHODS .....	42
Ethic statement .....	42
Experimental design .....	42
Sampling.....	43
Histological and stereological analysis .....	43
Statistical analysis .....	44
RESULTS.....	44
DISCUSSION.....	47
AKNOWLEDGEMENTS.....	51
REFERENCES.....	51
TABLE AND FIGURES.....	56
<b>CAPITULO III</b>	
Caracterización morfológica de las espermatogonias de <i>P. splendida</i> .....	60
Aislamiento de las espermatogonias de <i>P. splendida</i> con gradiente de Percoll.....	60
4. LITERATURA CITADA.....	62

## RESUMEN GENERAL

El trasplante de células germinales es una biotecnología reproductiva con gran potencial para la propagación de la línea germinal de animales comercialmente importantes y para la conservación de especies amenazadas. De las varias técnicas de trasplante de células germinales que se han desarrollado en peces, el trasplante de espermatogonias en organismos sexualmente competentes constituye la única metodología que permite la obtención de animales subrogados en un periodo corto de tiempo y a un costo relativamente bajo. Esta técnica tiene como prerequisite la disponibilidad de un huésped parcial o totalmente estéril capaz de recibir las espermatogonias del donante y mantener una gametogénesis subrogada. En esta investigación se realizaron avances en el trasplante de espermatogonias de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida* en los testículos de la mojarra pinta *Parachromis managuense*, las cuales son especies de cíclidos filogenéticamente relacionadas y que poseen características reproductivas similares. Dichos avances comprenden i) la supresión de la espermatogénesis en *P. managuense* para la creación de huéspedes parcialmente estériles, ii) la caracterización morfológica de las espermatogonias del donante *P. splendida*, y iii) el aislamiento de dichas células mediante digestión enzimática y gradiente de Percoll. La presente tesis se encuentra organizada en tres capítulos. El CAPITULO I constituye una revisión exhaustiva de la literatura sobre el trasplante de células germinales en mamíferos y peces, y se describen detalladamente los materiales y métodos utilizados en este estudio. En el CAPITULO II se reportan los resultados de un experimento diseñado para evaluar el efecto aislado y combinado de los factores temperatura (30 y 35°C), aplicación del agente antimitótico busulfan (0 y 40 mg/kg) y tiempo de dosificación (7, 14, 21, 28 y 35 días) sobre la espermatogénesis de *P. managuense*, con el propósito de establecer un protocolo rápido y sencillo para la preparación de organismos parcialmente estériles que sirvan como huéspedes para el trasplante de las espermatogonias de *P. splendida*. Se evaluó el efecto de estos tres factores sobre los cambios en el volumen relativo de los diferentes tipos de células germinales (espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides), células somáticas (células de Sertoli y de Leydig) y otras estructuras (lumen y espacio intersticial) que constituyen el testículo; y estos datos se analizaron mediante un ANOVA multifactorial (MANOVA). Se encontró que la temperatura, el busulfan (40 mg/kg de pez) y el tiempo de



dosificación (individualmente o en conjunto) tienen efectos altamente significativos en el volumen relativo de las células y tejidos evaluados; los cuales reducen el volumen de las células germinales y a su vez incrementan el volumen del lumen y el espacio intersticial. Un hallazgo interesante de este estudio fue que la alta temperatura (35°C) es capaz de suprimir completamente la espermatogénesis en *P. managuense* en un lapso de 28 días. Esto significa que los huéspedes para el trasplante de espermatogonias pueden ser preparados fácilmente, sin la necesidad de aplicar químicos potencialmente peligrosos. Dado que estos resultados pretenden ser publicados en una revista científica indexada, este capítulo ha sido escrito en inglés y en formato de artículo científico. Por último, en el CAPITULO III se describen los resultados de la identificación morfológica de las espermatogonias A indiferenciadas (Aund) de *P. splendida*, la subpoblación más indiferenciada de espermatogonias en el testículo de los peces, y su aislamiento mediante digestión enzimática doble y gradiente de Percoll. Se desarrolló una metodología exitosa para el aislamiento de estas células con conteos de 500,000 células por mililitro, las cuales con base en las pruebas de viabilidad con azul de tripano presentaron una alta viabilidad (97.29%).

Este estudio representa un avance importante para el trasplante de espermatogonias en especímenes adultos de *P. managuense*, con el propósito a futuro de producir subrogados de especies nativas de cíclidos que se encuentran amenazadas y para el cultivo de especies con potencial económico pero que son difíciles de reproducir en cautiverio. Futuros estudios estarán enfocados a desarrollar un protocolo para el marcaje de las espermatogonias de *P. splendida* y determinar la capacidad de estas células de colonizar las gónadas y reestablecer la espermatogénesis en *P. managuense*.

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

El trasplante de células germinales se ha convertido en una de las áreas de investigación más importantes en la biotecnología, debido a sus múltiples aplicaciones en zootecnia y la biología de la conservación (Salomon et al., 2010). Esta técnica consiste en la transferencia de células germinales donadoras dentro de las gónadas embrionarias o adultas de un animal huésped, con el propósito de producir espermatozoides u ovocitos derivados del donante (subrogados), usando la maquinaria celular y hormonal del huésped (Brinster y Avarbock, 1994; Lee et al., 2013). En el trasplante de espermatogonias estas células son aisladas e inyectadas en las gónadas de organismos sexualmente competentes con deficiencia de células germinales. Esta técnica fue desarrollada en el ratón por el grupo de investigación de Ralph Brinster de la Universidad de Pensilvania (Brinster y Zimmerman, 1994; Brinster y Avarbock, 1994) y a partir de entonces se ha sido aplicado en un número creciente de especies de mamíferos de importancia zootécnica, más allá del monopolio del ratón (González y Dobrinsky, 2015). Solo hasta recientemente esta técnica ha sido aplicada en algunas especies de peces teleósteos (Lacerda et al., 2010; Mahji et al., 2009a; Mahji et al., 2014), en conjunto con otras técnicas de trasplantes que usan células germinales primordiales (CGPs) y ovogonias (Lee et al., 2013; Yoshikazi et al., 2011). El trasplante de espermatogonias representa una valiosa herramienta para el estudio de la espermatogénesis *in vitro*, la producción de animales transgénicos y la crio-preservación de las cualidades genéticas de líneas animales comercialmente importantes, así como de especies en peligro de extinción (Honaramooz y Yang, 2011; Lacerda et al., 2010). En cuanto a la transgénesis, la modificación genética de la línea germinal *in vitro* usando vectores virales seguida del trasplante de espermatogonias representa una alternativa mucho más viable y menos costosa que el uso concomitante de técnicas de trasplante nuclear y manipulación de embriones (González y Dobrinsky, 2015; Nagano et al., 2001). A través del trasplante de espermatogonias se han obtenido animales transgénicos en la rata, ratón, cabra, vaca, oveja, cerdo y perro, en donde el trasgen ha sido identificado en los espermatozoides obtenidos después del trasplante xenogénico (ver González y Dobrinsky, 2015 para una revisión).

Además de sus contribuciones a los campos como la medicina reproductiva humana y la transgénesis (Singh et al., 2011; Weidner et al., 2014), el trasplante de espermatogonias puede generar información básica sobre la biología de las espermatogonias, la regulación de la espermatogénesis y las interacciones somatogerminales en el testículo (Brinster et al., 2002; McLean et al., 2001; Shinohara et al., 2002). Estas células proveen también un modelo ideal para estudiar los mecanismos de auto-renovación y diferenciación de las células troncales en general (Zheng et al., 2014).

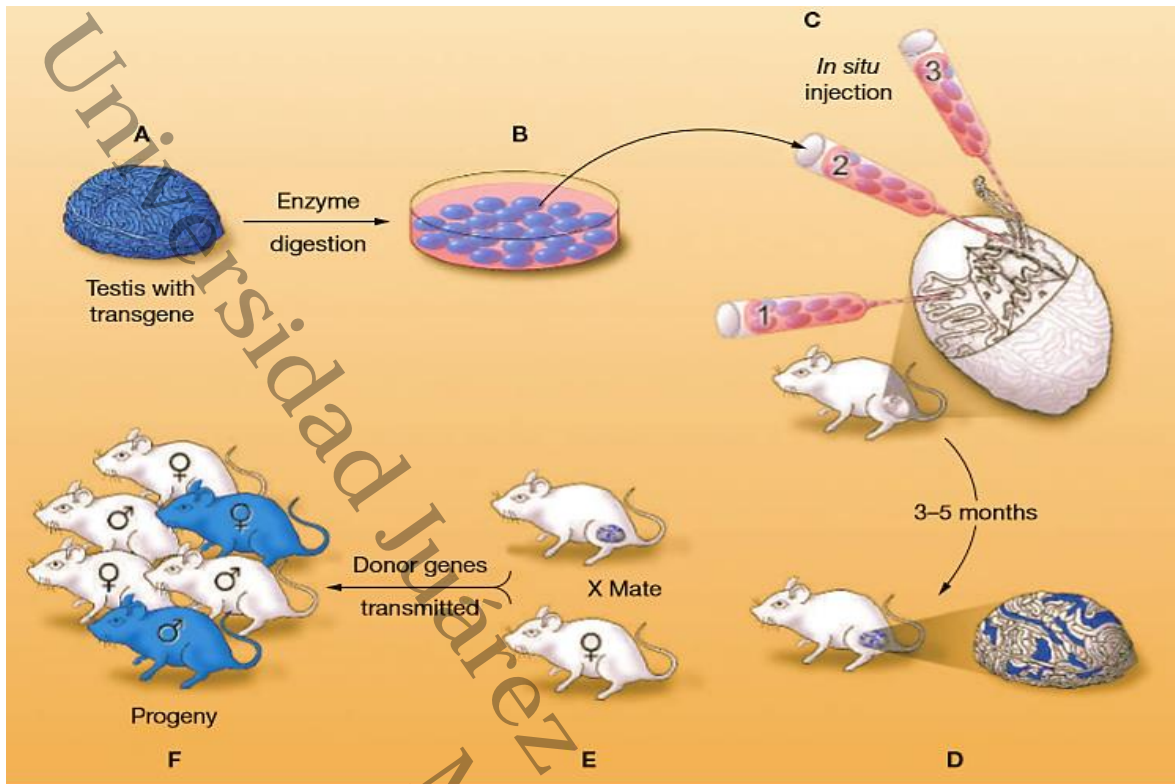
A pesar de que el trasplante de células germinales (espermatogonias) ha sido aplicado exitosamente en una lista creciente de mamíferos (Hanaramooz et al., 2003; Dobrinsky, 2006, Dobrinsky 2015), solo en la última década se ha dado un progreso importante en el trasplante de células germinales en varias especies de peces teleósteos (Lacerda et al., 2010; Lacerda et al., 2012, Majhi et al., 2009, Majhi et al., 2014). En este último grupo se han establecido tres diferentes metodologías para el trasplante de células germinales, entre las cuales se encuentran el trasplante células germinales primordiales (PGCs) en embriones en estadio de blástula, el trasplante de espermatogonias en larvas recién eclosionadas (Yoshikazi et al., 2011) y el trasplante de espermatogonias en organismos adultos sexualmente competentes (Lacerda et al. 2010, Mahji et al 2009a, 2014). Estos ensayos han aportado información valiosa sobre la biología de las células germinales, los cuales pueden ser aplicados a la biotecnología reproductiva de peces. Por ejemplo, a partir del trasplante de espermatogonias en larvas recién eclosionadas de teleósteos se demostró que las ovogonias y espermatogonias provenientes de peces donantes adultos mantienen su plasticidad sexual en respuesta al ambiente somático de la gónada hospedera (Lee et al., 2013; Okutsu et al., 2006). Con esto se demostró, al menos en peces, que el fenotipo sexual de las células germinales está determinado por el micro-ambiente somático de la gónada y no mediante mecanismos de especificación celular autónoma en la línea germinal (Okutsu et al., 2008; Yoshizaki et al., 2010; Yoshizaki et al., 2011). Esta característica biológica de las espermatogonias les otorga un gran potencial para la propagación de la línea germinal de muchas especies de importancia comercial, debido a que estas células pueden ser aisladas, multiplicadas *in vitro* y trasplantadas a huéspedes macho o hembras para producir espermatozoides u ovocitos, respectivamente. A pesar de que en el trasplante de PGCs y espermatogonias en blástulas y larvas recién eclosionadas de peces, la tasa de transmisión

del haplotipo del donante es muy alto (100%), estas presentan dos limitantes importantes: i) la necesidad de equipo sofisticado y costoso, y ii) periodos de tiempo muy largos (el tiempo que le toma una la larva alcanzar la madurez sexual y producir los gametos)(Lacerda et al., 2012). Como una alternativa, Lacerda et al. (2006) desarrollaron una técnica más rápida y relativamente menos costosa para el trasplante de espermatogonias en peces adultos, adaptando protocolos convencionalmente usados para el trasplante de espermatogonias en roedores (Brinster y Zimmermann, 1994; Ogawa et al., 1999). La factibilidad de esta metodología ha sido demostrada por un número creciente de especies de peces en los que esta técnica ha sido aplicada exitosamente (Lacerda et al., 2010; Majhi et al., 2009, Majhi et al., 2014) y varios grupos de investigación en Brasil, República Checa, Portugal, India y Japón se encuentran desarrollando esta línea de investigación en otras especies de teleósteos.

## ANTECEDENTES

### Trasplante de células germinales en vertebrados

El trasplante de espermatogonias es una biotecnología que consiste en la inserción de células germinales exógenas dentro del testículo de un animal huésped, con el propósito de producir espermatozoides u ovocitos subrogados de la especie donante, usando la maquinaria celular y hormonal del huésped para soportar una gametogénesis exógena (Brinster y Avarbock, 1994; Lee et al., 2013). Esta metodología fue desarrollada originalmente en el ratón por el grupo de investigación de Ralph Brinster en la Universidad de Pensilvania, quienes lograron restablecer la espermatogénesis en los túbulos seminíferos de ratones estériles después de trasplantar una suspensión de espermatogonias troncales o SSCs (Spermatogonial Stem Cells, por sus siglas en inglés), provenientes de un testículo donante (Brinster y Avarbock, 1994; Brinster y Zimmermann, 1994) (Figura 1). El trasplante de SSCs constituye el único abordaje experimental para el estudio de la espermatogénesis en mamíferos, debido a la posibilidad de generar espermatozoides subrogados completamente funcionales. Además, el método es mucho más prometedor que la espermatogénesis *in vitro*, con cuya técnica apenas se logró recientemente la espermatogénesis completa en explantes de testículos de ratón (Sato et al., 2011; Sato et al., 2015) y para la cual no se ha establecido un sistema experimental efectivo que cubra completamente el proceso de espermatogénesis *in vitro* (Reuter et al., 2012). El trasplante de espermatogonias representa también una valiosa herramienta para la producción de animales transgénicos y la crio-preservación de las cualidades genéticas de líneas animales comercialmente importantes, así como de especies en peligro de extinción (Honaramooz y Yang, 2011; Lacerda et al., 2010). En cuanto a la transgénesis, la modificación genética de la línea germinal *in vitro* usando vectores virales seguida del trasplante de espermatogonias representa una alternativa mucho más viable y menos costosa que el uso de técnicas de trasplante nuclear y manipulación de embriones (González y Dobrinsky, 2015; Nagano et al., 2001). Por ejemplo, a través del trasplante de espermatogonias se han obtenido animales transgénicos en la rata, ratón, cabra, vaca, oveja, cerdo y perro, en donde el transgen ha sido identificado en los espermatozoides obtenidos después del trasplante xenogénico (González y Dobrinsky, 2015).



**Figura 1.** Método para el trasplante de espermatogonias desarrollado por Ralph Brinster (Brinster y Zimmermann, 1994) en el ratón. Una suspensión de células aisladas de un ratón transgénico con un gen reportero (transgen)(A y B) es micro inyectada en los túbulos seminíferos (C) de un ratón huésped genéticamente estéril. Las espermatogonias trasplantadas eventualmente pueden establecerse e iniciar la espermatogénesis en el testículo del huésped (D). Mediante la cruce con ratones de tipo silvestre (E) se puede obtener descendencia con el haplotipo del donante (F). Imagen tomada de Brinster (2002).

Además de sus contribuciones a los campos como la medicina reproductiva humana (Singh et al., 2011; Weidner et al., 2014) y la zootecnia (Zheng et al., 2014), el trasplante de espermatogonias puede generar información básica sobre la biología de las SSCs, la regulación de la espermatogénesis y las interacciones somatogerminalas en el testículo (Brinster, 2002; McLean et al., 2001; Shinohara et al., 2002) de las cuales se sabe muy poco. Estas células proveen también un modelo ideal para estudiar los mecanismos de auto-renovación y diferenciación de las células troncales en general (Zheng et al., 2014).

Aunque el término “trasplante de espermatogonias” sugiere que cualquier espermatogonia puede ser exitosamente trasplantada, en realidad solo una subpoblación de estas células germinales posee propiedades de células troncales (las SSCs), lo cual les permite integrarse, proliferar y diferenciarse en el epitelio germinal de un espécimen huésped (Brinster, 2002;

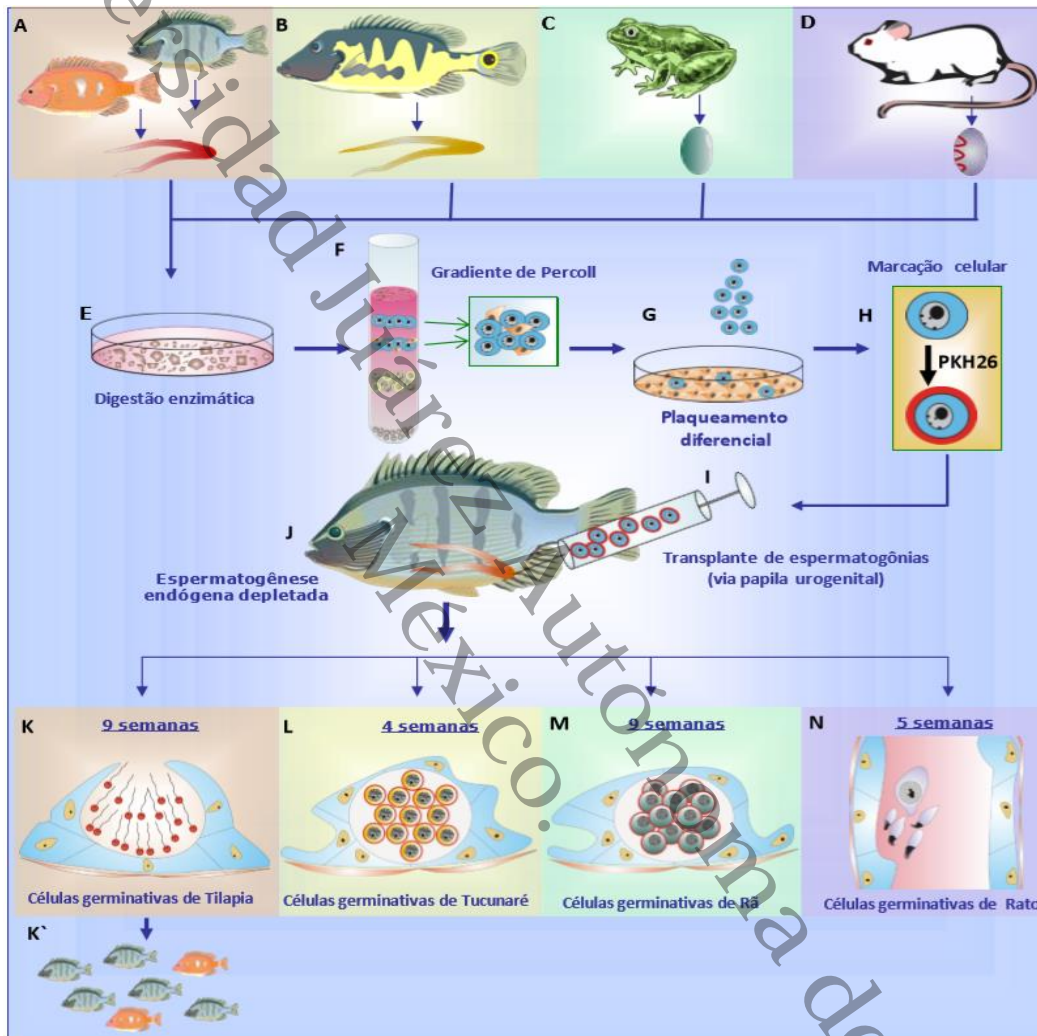
Dobrinsky, 2006; Oatley y Brinster, 2012). Las SSCs comprenden una subpoblación de células germinales indiferenciadas en el testículo de todos los vertebrados, las cuales mantienen el balance entre los procesos de auto-renovación y diferenciación necesarios para mantener un proceso espermatogénico continuo durante la vida fértil de un organismo (Zheng et al., 2014). El trasplante exitoso de SSCs entre individuos de la misma especie motivó a otros investigadores a extender esta metodología a individuos de diferentes especies, así que se realizaron trasplantes de SSCs de rata y de hámster en testículos de ratones esterilizados químicamente (Clouthier et al., 1996). En estos experimentos se usaron como huéspedes ratones mutantes inmunodeficientes como los *nude mice*, los cuales carecen de linfocitos T, o los ratones SCID (Severe combined immune deficiency) sin linfocitos B y T, cepas que disminuían las probabilidades de un rechazo inmunológico. Adicionalmente se desarrolló un protocolo a base de acetato de leuprolido (un agonista de la hormona liberadora de las gonadotropinas, GnRH) para tratar los ratones y ratas huéspedes antes del trasplante, con el propósito de incrementar el éxito de colonización de las células germinales del donante (McLean, 2001; Ogawa, 2001; Ogawa et al., 1999). A partir de estos estudios, el trasplante de SSCs se aplicó con fines experimentales en numerosas especies de mamíferos de laboratorio (rata, hámster, conejo, perro, gato, macaco), animales domésticos con valor zootécnico (caprinos, ovinos, porcinos), animales en peligro de extinción e incluso humanos (González y Dobrinsky, 2015; Zheng et al., 2014). En todas las especies en las que se aplicó el trasplante de espermatogonias los resultados fueron discrepantes. A partir de estos estudios se dedujo que el éxito de la técnica depende del grado de proximidad filogenética de las especies involucradas, debido a una aparente restricción de la maquinaria somática del huésped para soportar el desarrollo de las células germinales exógenas (Ogawa et al., 1999). Esta incompatibilidad parece ser producto de una divergencia evolutiva en el complejo arreglo de interacciones que ocurren entre las células de Sertoli y las células germinales durante el proceso de espermatogénesis (Smith y Brown, 2012), interacciones que en su mayoría se desconocen. En las espermátidas y espermatozoides derivados de espermatogonias de hámster trasplantadas en testículos de ratón, dichas restricciones evolutivas se han manifestado como defectos estructurales graves en la cola y cabeza de estas células (Ogawa et al., 1999), o mediante la ocurrencia de arresto meiótico durante la espermatogénesis subrogada (Dobrinsky et al.,

1999). También se reportó la existencia de asincronía entre el ciclo espermatogénico de las células germinales de hámster trasplantadas en testículos de ratón, con lo cual se demostró que en ciertas especies el ciclo celular es controlado por las células germinales y no por las células de Sertoli (Franca et al., 1998). En el ratón, dichas alteraciones en el desarrollo de las células germinales fueron atribuidas a su divergencia con los hámsteres, la cual va desde los 16 hasta los 66 millones de años (Kumar y Hedges, 1998). En el caso de los experimentos realizados en humanos, las SSCs provenientes de hombres azoospermicos trasplantadas en el testículo de ratones inmunodeficientes (SCID), no sobrevivieron después de 150 días en el testículo del huésped, posiblemente debido a la incompatibilidad somatogerminal (Reis et al., 2000; McLean, 2001). Esta incompatibilidad se presenta principalmente en especies altamente evolucionadas, mientras que en vertebrados inferiores como los peces se ha observado una mayor receptividad hacia células germinales de otros vertebrados como anfibios y mamíferos (Lacerda et al., 2008). En los mamíferos, una estrategia que se ha sugerido para superar las restricciones filogenéticas es el co-trasplante de las SSCs junto con células de Sertoli del donador, las cuales pueden crear un ambiente inmunoprivilegiado en el testículo del donante sin que exista ninguna clase de rechazo hacia las células germinales (Kaur et al., 2015; Mital et al., 2010). No obstante, la utilidad de este método no ha sido probada en vertebrados no mamíferos.

Tal como puede observarse, la hipótesis de una restricción evolutiva entre especies filogenéticamente distantes se deriva únicamente del trasplante de SSCs realizado en unas cuantas especies de mamíferos, mientras que no se ha investigado si dicha condicionante se presenta también en vertebrados como los anfibios, reptiles y aves, en donde las estrategias reproductoras tienden a ser mucho más plásticas. En estos dos últimos grupos de vertebrados hasta la fecha no existe ningún estudio sobre el trasplante de espermatogonias, aunque en el caso de las aves se ha investigado extensivamente el trasplante de células germinales primordiales para la construcción de quimeras de *Gallus domesticus* (Naito et al., 1994). Únicamente existe un estudio de corta duración sobre el trasplante de espermatogonias entre especies filogenéticamente distantes: el trasplante de espermatogonias de la rana *Lithobates catesbeianus*, utilizando como huésped a la tilapia del Nilo, en donde se obtuvieron espermatoцитos secundarios de rana (Lacerda et al., 2008) (Figura 2). Sin embargo, debido a la corta duración de dicho estudio, no se pudo concluir si



el testículo de la tilapia del Nilo es incapaz de madurar gametos de *L. catesbeianus* más allá del estadio de espermatozoides secundario o si la carencia de espermátidas y espermatozoides se debió al corto tiempo del experimento, lo cual no permitió que se completara el ciclo espermatogénico (Lacerda et al., 2008).



**Figura 2.** El trasplante de espermatogonias se ha realizado también entre especies filogenéticamente distantes, aunque los resultados aún no son concluyentes. El diagrama muestra el trasplante alógeno entre dos líneas diferentes de tilapias *Oreochromis niloticus* (A) y el trasplante xenogénico de células germinales de tucunare *Cichla monoculus* (B), rana toro *Lithobatescates beianus* (C) y rata Wistar *Ratus norvegicus* (D) en testículos de tilapia, en donde se obtuvieron diferentes grados de espermatogénesis del donante. Tomado de Lacerda et al., (2008).

En todos los estudios mencionados anteriormente las espermatogonias del donante se obtuvieron a través de disociación enzimática mediante un procedimiento desarrollado por Bellvé et al. (1977), en donde el testículo del donador es disgregado enzimáticamente

mediante digestión enzimática doble, usando tripsina y colagenasa. En estudios recientes se ha incorporado también la enzima hialuronidasa, la cual disgrega los agregados de proteoglicanos y facilita el aislamiento de las células germinales, reduciendo el daño celular por exposición prolongada a la tripsina (Honaramooz et al., 2003). Una vez que estas células han sido aisladas, estas deben de ser marcadas para su identificación inequívoca y para demostrar el éxito del trasplante. Para ello se han empleado especies transgénicas que expresan genes reporteros en la línea germinal como la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein por sus siglas en inglés), ROSA26 o el gen LACZ proveniente de *Escherichia coli*. Sin embargo, debido a que para la mayoría de las especies no existen dichos modelos transgénicos con genes reporteros, en muchas especies como el macaco (Schlatt et al., 2002; Hermann et al. 2007), el cerdo (Honaramooz et al., 2003) y en varias especies de teleosteos (Lacerda et al., 2010; Mahji et al. 2009b, Mahji et al. 2014 ) las células germinales han sido marcadas usando el colorante fluorescente de membrana PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker) o CFDA-SE (Carboxy Fluorescein Diacetate Succinyl Diester), la lectina DBA y el BrDU (Bromodeoxiuridina) antes del trasplante, para visualizar el desarrollo de las células germinales dentro del huésped.

La preparación del huésped es fundamental para el éxito del trasplante de espermatogonias en cualquier especie (Ogawa et al., 2000). Cuando no se cuenta con organismos naturalmente estériles, la apropiada preparación del huésped es crítica para facilitar el acceso de las células germinales al compartimiento basal del testículo y reducir la competencia con las células germinales endógenas. Para ello se han empleado diferentes estrategias; como la elección de organismos en la pre-pubertad cuando no existe actividad espermatogénica (Honaramooz et al., 2003), el uso de cepas mutantes con esterilidad inherente como los ratones que carecen de la vitamina A o del Kit ligando (Russell et al., 1996; Sato et al., 2015; Ogawa et al., 2000), organismos esterilizados con irradiación (Shuttlesworth et al., 2000), esterilización química a través de compuestos como el busulfan 1,4-butanediol dimethanesulfonate de grado analítico (Fluka) o terapéutico (Myleran) (Brinster y Zimmermann, 1994; Siqueira-Silva et al., 2015), alta temperatura (McLean et al., 2002) o isquemia fría (Young et al., 1998). La elección de cualquiera de estos métodos depende de la especie en cuestión: por ejemplo, en los peces el método preferido para esterilizar al huésped es una combinación de alta temperatura y el uso del

agente citotóxico busulfan, aunque un estudio demostró que la sola aplicación de alta temperatura es suficiente para esterilizar al huésped (Siqueira-Silva et al., 2015).

### **Trasplante de células germinales en peces**

A partir del éxito obtenido en varias especies de mamíferos, durante la última década se ha investigado el potencial biotecnológico de las células germinales de varias especies de peces (Lacerda et al., 2010; Majhi et al., 2014; Majhi et al., 2009a). Actualmente se han establecido tres principales metodologías para el trasplante de células germinales en los peces: i) el trasplante de Células Germinales Primordiales (PGCs) en embriones en estadio de blástula, ii) el trasplante de PGCs, espermatogonias y ovogonias en larvas recién eclosionadas (Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010), y iii) el trasplante de espermatogonias y ovogonias en peces adultos (Lacerda et al., 2006; Lacerda et al., 2010; Majhi et al., 2009a; Mahji et al., 2014). Cada una de estas estrategias biotecnológicas presentan ventajas y desventajas, y estas se describen a continuación (Figura 3).

#### **Trasplante de Células Germinales Primordiales en embriones en estadio de blástula**

La producción de quimeras de línea germinal mediante el trasplante de PGCs fue reportada por primera vez en el pez cebra por Lin et al. (1992) a través del trasplante de blastómeras. Este método consiste en el aislamiento y trasplante intra o inter-específico de PGCs en embriones de peces en estadio de blástula, incluso entre embriones de especies filogenéticamente distantes (Saito et al., 2011; Saito et al., 2014). Las PGCs son los eslabones más tempranos e indiferenciados de la línea germinal y son especificadas durante las etapas más tempranas del desarrollo embrionario a través de diferentes mecanismos moleculares (Herpin et al., 2007). Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en espermatozoides u ovocitos dependiendo del ambiente somático de la gónada. Las PGCs deben ser marcadas y aisladas de cierto número de embriones donadores mediante técnicas de micro-manipulación y disociación enzimática (Saito et al., 2010). Eventualmente estas células son trasplantadas en embriones hospederos en estadio de blástula, previamente esterilizados con la inyección de un oligonucleótido morfolino anti-sentido que inhibe el desarrollo de la línea germinal del huésped, es decir, inhibe la especificación de las células germinales primordiales endógenas (Saito et al., 2010). De esta forma, cuando el huésped

alcanza la madurez sexual estos pueden producir un 100% de descendencia con el haplotipo del donante (Saito et al., 2008). Para la identificación de las PGCs trasplantadas se han utilizado varios métodos, entre ellos la inserción del transgen que codifica para la GFP o el gen estructural lacZ, los cuales se ligan a secuencias de DNA específicas de la línea germinal como el gen *vasa*, el cual se encuentra evolutivamente conservado (Gustafson y Wessel, 2010). El trasplante xenogénico de PGCs también ha sido aplicado entre las especies *Danio albolineatus* y *D. rerio*, y el pez dorado *Carasius auratus* y *D. rerio*, con la producción exitosa de espermatozoides y ovocitos subrogados (Saito et al., 2008; Saito et al., 2010). El trasplante de PGCs ofrece grandes ventajas, como su utilidad para producir organismos genéticamente superiores y la propagación de líneas de peces comercialmente valiosas haciendo uso una sola PGC donadora, la cual puede generar millones de gametos en la gónada del huésped (Lacerda et al., 2012). A pesar de que en el trasplante de PGCs en blástulas de peces la tasa de transmisión del haplotipo del donante es muy alta (100%), estas presentan dos limitantes importantes: i) la necesidad de equipo sofisticado y costoso, y ii) periodos de tiempo muy largos (el tiempo que le toma a un embrión alcanzar la madurez sexual y producir los gametos) (Lacerda et al., 2012). Otra limitante es el bajo número de PGCs presentes en embrión y la baja supervivencia de estas células después del tratamiento enzimático para su aislamiento.

### **Trasplante de células germinales en larvas recién eclosionadas**

El trasplante de PGC, espermatogonias u ovogonias en larvas de peces es una técnica que consiste en el aislamiento de estas células germinales a partir de un donante, y su eventual trasplante en la cavidad peritoneal de larvas de peces recién eclosionadas (Kobayahi et al., 2007; Okutsu et al., 2008; Yoshizaky et al., 2011). Esta técnica fue desarrollada en la trucha arcoíris *Onchorhynchus mykiss* por el grupo de investigación de Goro Yoshizaky, de la Universidad de Ciencias y Tecnologías Marinas de Tokio, y a partir de entonces ha sido aplicada en un número creciente de especies de peces (Farlora et al., 2014; Psenicka et al., 2015; Takeuchi et al., 2009; Yazawa et al., 2010). El éxito del trasplante de células germinales en larvas recién eclosionadas se debe a varias propiedades que se encuentran evolutivamente conservadas, como el lento desarrollo del sistema inmune, la capacidad de

migración de las ovogonias y espermatogonias en respuesta a agentes quimiotácticos y su plasticidad sexual (Raz, 2004; Yoshizaki et al., 2012).

A pesar de que el método se desarrolló originalmente usando PGCs, desde el descubrimiento de la plasticidad sexual de las espermatogonias (Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010) la mayoría de los estudios se han enfocado en el trasplante de estas últimas, debido a que estas células pueden cosecharse en grandes cantidades en cualquier momento a lo largo de la vida de los peces, independientemente del estado de madurez del organismo (Schultz et al., 2010). Al igual que las PGCs las espermatogonias tienen también la plasticidad sexual para diferenciarse en espermatozoides u ovocitos, dependiendo del sexo del huésped, conservando así el arreglo completo de genes del donante (Morita et al., 2012; Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010). A diferencia de las SSCs de los mamíferos, las cuales han sido caracterizadas estructural y funcionalmente, las características biológicas de las espermatogonias troncales de los peces permanecen enigmáticas. Sin embargo, con base en estudios recientes sobre la ultraestructura del citoplasma y la organización de la heterocromatina se considera que las espermatogonias Aund (espermatozonias A indiferenciadas) son equivalentes a las espermatogonias troncales de los mamíferos (Lacerda et al., 2012; Lacerda et al., 2014). Este vacío en la biología de las espermatogonias Aund se debe a la ausencia de marcadores universales que permitan la identificación inequívoca de estas células, a pesar de los intentos que se han realizado en diferentes especies de teleósteos (Lacerda et al., 2013; Yano et al., 2009). A pesar de la ausencia de estudios moleculares en las espermatogonias Aund, los trasplantes xenogénicos de espermatogonias realizados en varias especies de teleósteos sugieren que estas células se comportan de manera similar a las SSCs de los mamíferos, dado que tienen alta capacidad proliferativa (posiblemente ilimitada) y pueden diferenciarse en espermatozoides y ovocitos (Morita et al., 2012; Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010) en función del ambiente somático de la gónada. La ausencia de marcadores moleculares para las espermatogonias Aund plantea limitantes para su aislamiento y purificación, debido a que no existe un método de separación de estas células de otros subtipos de espermatogonias presentes en el testículo de los peces (Lacerda et al., 2010; Lacerda et al., 2014; Mahji et al., 2009; Majhi et al., 2014). En la mayoría de los estudios de trasplante de espermatogonias realizados en peces la porción del testículo aislada

mediante digestión enzimática y eventualmente trasplantada en el huésped representa en realidad una mezcla heterogénea de espermatogonias (Aund, Adiff, B, etcétera), de las cuales solo las Aund tienen el potencial de reestablecer la espermatogénesis en el huésped. En el caso de los mamíferos el aislamiento de las SSCs de otros subtipos de espermatogonias y su cuantificación mediante citometría de flujo permitió el incremento del éxito del trasplante de espermatogonias, un logro que hubiera sido imposible sin la disponibilidad de marcadores moleculares de superficie (Shinohara et al., 1999; Shinohara et al., 2000; Kanatsu-Shinohara et al., 2004). Solo recientemente esta metodología fue aplicada para el aislamiento y enriquecimiento de espermatogonias Aund provenientes de trucha arcoíris *O. mykiss* (Hayashi et al., 2014).

Después de que las PGCs o espermatogonias son aisladas del donante, estas son trasplantadas en la cavidad peritoneal de larvas de peces recién eclosionadas, las cuales en este estadio de desarrollo son incapaces de montar una respuesta inmune celular (Figura 3). Una vez trasplantadas, estas células adquieren la capacidad de migrar, responder a agentes quimiotácticos (en una recapitulación del establecimiento de la línea germinal durante la embriogénesis gonadal) y diferenciarse en espermatozoides u ovocitos en la gónada huésped (Lee et al., 2013; Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010). El primer trasplante de PGCs en larvas de peces fue realizado por Takeuchi et al. (2003), quienes usaron como donantes truchas GFP-vasa transgénicas que expresaban la GFP en la línea germinal y truchas silvestres como huéspedes. Las PGCs trasplantadas fueron capaces de migrar mediante pseudopodios y colonizar las crestas genitales de las larvas huéspedes, en donde se diferenciaron en ovocitos y espermatozoides viables, produciéndose subrogados mediante inseminación artificial (Okutsu et al., 2008; Takeuchi et al., 2003). Con el propósito de determinar la viabilidad del trasplante de PGCs entre diferentes especies, Takeuchi et al. (2004) usaron PGCs de truchas vasa-GFP transgénicas y las trasplantaron en la cavidad peritoneal de larvas de salmón masu *Oncorhynchus masou*. Una vez que las larvas de *O. masou* alcanzaron la madurez sexual produjeron espermatozoides de *O. mykiss* que expresaron la GFP. Eventualmente se desarrolló un protocolo para la crio-preservación de PGCs de trucha arcoíris, y a partir de ensayos de trasplante con células descongeladas se consiguió obtener espermatozoides y ovocitos viables con descendencia completamente fértil (Kobayashi et al., 2007). La principal desventaja con esta técnica son los largos

periodos de tiempo que las larvas necesitan alcanzar la madurez sexual y producir los gametos subrogados. Otra desventaja es la dificultad para obtener cantidades suficientes de estas células, dado que los embriones poseen un número extremadamente bajo de PGCs y no todas sobreviven al aislamiento mediante digestión enzimática (Yoshizaki et al., 2012).

Una biotecnología similar al trasplante de PGCs fue desarrollada con las espermatogonias y ovogonias, en donde estas células fueron aisladas de truchas *vasa*-GFP transgénicas e inyectadas en la cavidad peritoneal de machos y hembras de larvas de truchas silvestres recién eclosionadas (Okutsu et al., 2006; Yoshizaki 2010; Yoshizaki et al., 2011; Yoshizaki et al., 2012). Cuando los huéspedes alcanzaron la madurez sexual, las espermatogonias proliferaron y se diferenciaron en espermatozoides en los machos, mientras que en las hembras estas se desarrollaron como ovocitos completamente funcionales que expresaron el transgen de la GFP (Yoshizaki et al., 2010, Yoshizaki et al., 2012. Con base en el éxito obtenido en estas especies, el trasplante de espermatogonias se realizó también en las especies marinas japonesas *Nibea mitsukurii* y *Scomber japonicus* usando el marcador fluorescente de membrana PKH26, con resultados similares (Takeuchi et al., 2009; Yazawa et al., 2010). Recientemente, un grupo de investigación Checo realizó también un trasplante de espermatogonias del pez cirujano Siberiano *Acipenser baerii* en la cavidad peritoneal de larvas de *Acipenser ruthenus*, las cuales colonizaron las gónadas con una eficiencia de trasplante del 60% (Psenicka et al., 2015). En todas las especies de peces en que se ha practicado el trasplante xenogénico de espermatogonias, las gónadas del huésped produjeron siempre un porcentaje de gametos con el haplotipo del huésped y otro porcentaje con el haplotipo del donante. Con el propósito de incrementar la eficiencia de trasplante a un 100%, Okutsu et al. (2007) trasplantaron espermatogonias de trucha arcoíris *vasa*-GFP transgénicas en larvas de salmón masu triploides, los cuales eran estériles debido a la ocurrencia de errores en la meiosis (Manning y Burton, 2003). Dos años después del trasplante, el 34% de los triploides de salmón mostraron caracteres sexuales secundarios y produjeron semen con 100% de espermatozoides de trucha (Okutsu et al., 2008). A partir de estas investigaciones se determinó también la existencia de plasticidad sexual de las células germinales (ovogonias y espermatogonias) provenientes de gónadas adultas, las cuales al ser trasplantadas en ovarios o testículos eran capaces de revertir su fenotipo sexual y adaptarse al sexo de la gónada hospedera para formar ovocitos o espermatozoides

(Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010). Antes de este hallazgo, varios experimentos en mamíferos y peces habían revelado la capacidad de estas células de revertir su fenotipo sexual en respuesta a esteroides exógenos o bajo condiciones *in vitro* (Devlin y Nahagama, 2002), incluso su capacidad para reprogramarse en células pluripotentes y diferenciarse en células somáticas (Oatley y Brinster, 2012; Thoma et al., 2011), pero este descubrimiento en peces confirmó la plasticidad de las espermatogonias *in vivo* (Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010) y su potencial para la biotecnología reproductiva de peces. Al igual que en el trasplante de PGCs, esta metodología tiene la desventaja de requerir largos periodos de tiempo y equipo sofisticado y costoso (Lacerda et al., 2012).

### **Trasplante de células germinales en peces adultos**

Como una alternativa al trasplante de células germinales en embriones y larvas recién eclosionadas de peces, Lacerda et al. (2006) desarrollaron una técnica más rápida y barata para el trasplante de espermatogonias en peces adultos, adaptando protocolos convencionalmente usados para el trasplante de SSCs en roedores (Brinster y Zimmermann, 1994; Brinster y Avarbock, 1994; Ogawa et al., 1999; Schlatt, 2002; Zheng et al., 2014) (Figura 3). La factibilidad de esta metodología ha sido demostrada por el número creciente de especies de peces en los que esta técnica ha sido aplicada exitosamente (Mahji et al., 2009a, Mahji et al., 2014) y varios grupos de investigación en Brasil, República Checa, Portugal, India y Japón se encuentran desarrollando esta línea de investigación en otras especies de teleósteos. La principal ventaja del trasplante de espermatogonias y ovogonias en peces adultos es que cuando se usan animales sexualmente competentes se reducen los costos de crianza y el tiempo requerido para la producción de subrogados (Mahji et al., 2014). Los únicos modelos bien establecidos para el trasplante de espermatogonias en peces adultos son la tilapia del Nilo *O. niloticus* (Lacerda et al., 2006; Lacerda et al., 2008; Lacerda et al., 2010; Lacerda et al., 2013) y el pejerrey de la Patagonia *O. hatcheri* (Mahji et al., 2009a; Mahji et al., 2009b; Mahji et al., 2014). El trasplante de espermatogonias en peces adultos fue desarrollado por el grupo de Luiz Renato de Franca, en la Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil (Lacerda et al., 2006), y se basó en los experimentos realizados por el grupo de Ralph Brinster en roedores. Estos investigadores lograron realizar un trasplante rápido y sencillo, en el cual se trasplantó una suspensión de



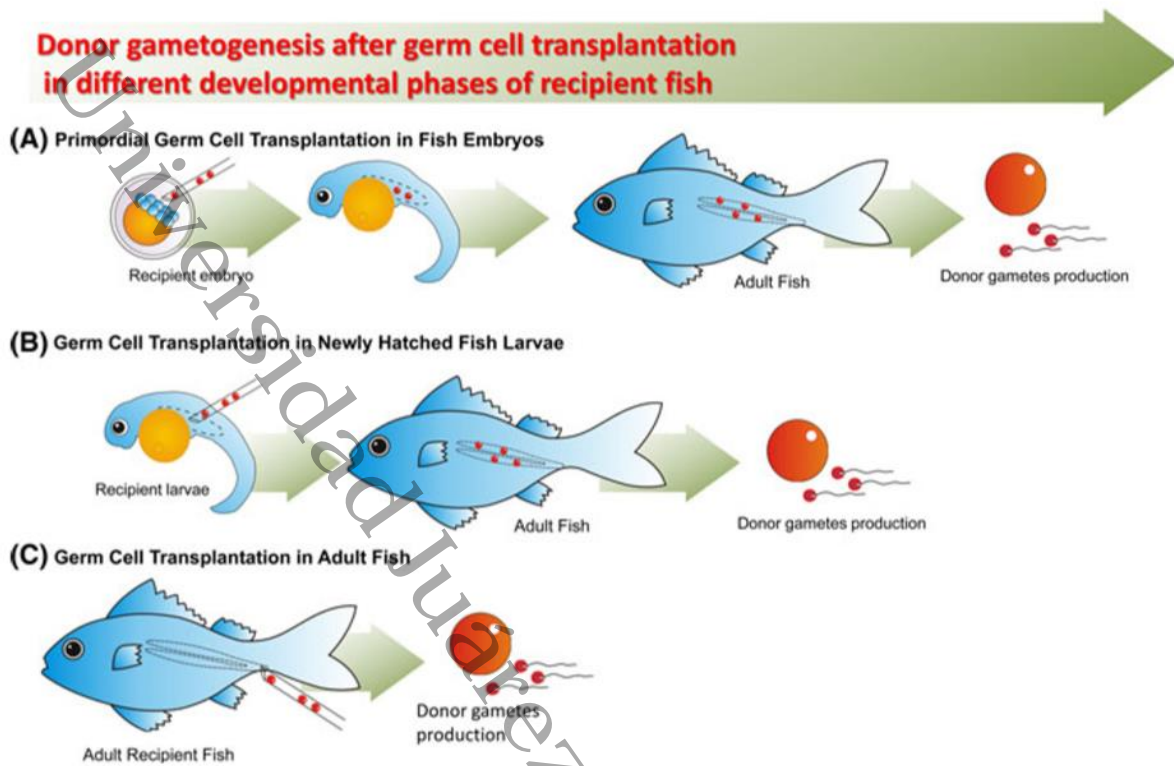
espermatogonias (conteniendo una subpoblación de espermatogonias Aund) en testículos maduros de la tilapia del Nilo *O. niloticus* (Lacerda et al., 2006). Como se comentó anteriormente, la preparación del huésped es fundamental para el éxito del trasplante de espermatogonias en cualquier especie. En la tilapia, dada la carencia de una línea mutante estéril o de organismos triploides, los huéspedes fueron esterilizados termoquímicamente, manteniendo los peces a alta temperatura y aplicándoles inyecciones repetidas de busulfan (1,4-butanediol dimetanesulfonato), un agente antimitótico alquilante del DNA que se utiliza para destruir las células espermatogénicas del huésped con el propósito de reducir la competencia entre nichos germinales y facilitar la integración de las espermatogonias del donante (Lacerda et al., 2006; Lacerda et al., 2010; Lacerda et al., 2012). En los teleósteos este método constituye la forma más eficiente para suprimir la espermatogénesis endógena debido a que el mantenimiento de los peces a altas temperaturas incrementa también el grado de apoptosis de las células germinales (Ito et al., 2008; Strüssmann et al., 1998). Dada la carencia de marcadores moleculares para identificar las espermatogonias de *O. niloticus* y *O. bonariensis*, estas fueron marcadas con los colorantes fluorescentes de membrana PKH26-GL, antes de ser inyectadas en la gónada hospedera, con el propósito de identificarlas inequívocamente en los lóbulos seminíferos del huésped después del trasplante (Lacerda et al., 2010; Mahji et al., 2014). Solo hasta recientemente se han identificado marcadores moleculares de superficie en las espermatogonias Aund de *O. niloticus*, como las proteínas GFRA1 y NANOS (Lacerda et al., 2013), lo cual permitirá la purificación de estas células mediante citometría de flujo e incrementar la eficiencia de transmisión del haplotipo del donante. En la tilapia del Nilo los análisis histológicos del parénquima testicular no mostraron evidencia de rechazo inmunológico en los huéspedes hacia las espermatogonias trasplantadas, debido a la condición inmunológicamente privilegiada del epitelio germinal (Hedger, 2007). Las observaciones en especímenes sacrificados durante la octava y novena semana después del trasplante revelaron la presencia de espermatozoides con el haplotipo del donante (Lacerda et al., 2006; Lacerda et al., 2010).

El trasplante de espermatogonias fue aplicado también en machos adultos de las especies estrechamente relacionadas de pejerrey *O. bonariensis* y pejerrey de la Patagonia *O. hatchery*, mediante la inyección de espermatogonias directa en las gónadas a través de una

incisión quirúrgica abdominal (Majhi et al., 2009a) y eventualmente mediante la papila urogenital de machos y hembras (Mahji et al., 2014). Estos últimos dos estudios tienen la ventaja de haber reducido al mínimo la complejidad metodológica para aislar y trasplantar las espermatogonias y obtener subrogados, lo cual resulta particularmente útil en zonas aisladas en donde la preservación de la línea germinal de una especie en peligro de extinción podría requerirse de inmediato (Mahji et al., 2014). En el primer estudio las espermatogonias fueron marcadas con el colorante fluorescente verde CFDA-SE (Majhi et al., 2009a) y en el segundo las ovogonias y espermatogonias se marcaron mediante el colorante fluorescente rojo de membrana PKH26 (Mahji et al., 2014). Después de algunas semanas del trasplante los ejemplares de pejerrey de la Patagonia *O. hatchery* produjeron espermatozoides de *O. bonariensis* positivos para los marcadores CFDA-SE y PKH26, respectivamente (Mahji et al., 2009a; Mahji et al., 2014). Este último estudio representa el único antecedente sobre el aislamiento y trasplante de ovogonias en peces adultos, en el cual las ovogonias y espermatogonias de *O. bonariensis* se aislaron y marcaron mediante el mismo procedimiento (Mahji et al., 2014). A partir de este logro se pueden concluir dos cosas: a) que las ovogonias de los teleósteos pueden ser aisladas utilizando los mismos protocolos para el aislamiento de espermatogonias, y que estas células mantienen su plasticidad sexual al ser trasplantadas en machos o hembras sometidas a altas temperaturas (Mahji et al., 2014). Al igual que en la tilapia del Nilo, los ejemplares de *O. hatchery* se esterilizaron con inyecciones de busulfan y manteniendo los peces a altas temperaturas para inducir la apoptosis de las células espermátogénicas (Majhi et al., 2009a, Majhi et al., 2009b, Mahji et al., 2014). El trasplante alogénico de espermatogonias también fue evaluado experimentalmente en hembras y machos adultos del pez cebra *Danio rerio*, utilizando el transgen GFP como marcador de las espermatogonias del donante, con el propósito de evaluar la actividad biológica y la plasticidad sexual de estas células germinales (Nóbrega et al., 2010). Tres semanas después de ejecutado el trasplante se observó la formación de quistes y pequeños ovocitos GFP-positivos, de forma similar a lo que ocurre en el trasplante de ovogonias y espermatogonias en larvas recién eclosionadas de salmón (Yoshizaki et al., 2010a; Yoshizaki et al., 2010b). Este estudio confirmó la plasticidad sexual de las espermatogonias, las cuales pueden diferenciarse en ovocitos, aun

después de haberse diferenciado en espermatogonias y haber sido trasplantadas en un ovario adulto (Nóbrega et al., 2010).

Puesto que la criopreservación a largo plazo del germoplasma de peces es de gran importancia para la conservación de especies amenazadas o líneas genéticas importantes, en los últimos años se ha alcanzado cierto progreso en la criopreservación de espermatogonias de tilapia del Nilo (Lacerda et al., 2010), trucha arcoíris (Lee et al., 2013), salmón masu *O. masou* (congeladas solo durante 24 horas) y el esturión *Acipenser ruthenus* (Golpour et al., 2016). A pesar de que se han realizado avances en la crio-preservación de huevos y embriones (Rahman et al., 2008; Rahman et al., 2011, Rahman et al., 2013; Saragusty y Arav, 2011), la preservación de las espermatogonias u ovogonias representa una alternativa mucho más viable para la producción de espermatozoides y huevos viables a largo plazo (Kobayashi et al., 2007), debido a que estas pueden ser criopreservadas con la misma simplicidad que una célula somática. Lee et al. (2013) desarrolló un método para la criopreservación de testículos completos de trucha arcoíris, cuyas espermatogonias se mantuvieron viables después de 939 días en congelamiento. Cuando estas espermatogonias fueron descongeladas y trasplantadas intraperitonealmente en machos y hembras triploides de trucha estériles, produjeron espermatozoides y ovocitos subrogados GFP-positivos, (Lee et al., 2013). Algo similar ocurrió con las espermatogonias de salmón masu *O. masou*, las cuales tras ser congeladas a -80°C durante 24 horas y eventualmente trasplantadas en huéspedes triploides de trucha arcoíris, no mostraron diferencias significativas en la cantidad de esperma, la viabilidad o el número de gametos en comparación con el grupo control (Yoshizaki et al., 2011). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el ratón, en donde se obtuvo descendencia viable a partir de SSCs congeladas (Avarbock et al., 1996; Kanatsu-Shinohara et al., 2003). El procedimiento más sencillo para la criopreservación de espermatogonias de peces fue desarrollado por Lee et al. (2015), el cual congeló especímenes completos de trucha con el transgen GFP-vasa durante 1113 días, cuyas espermatogonias fueron aisladas y trasplantadas en salmones triploides para obtener espermatozoides y ovocitos subrogados de trucha (Lee et al., 2015). La principal ventaja del congelamiento de organismos completos radica en que se puede aplicar en casos de emergencia; por ejemplo, cuando un ejemplar de una especie en peligro de extinción de una especie que solo sobrevive en cautividad muere inesperadamente.



**Figura 3.** Diagrama que ilustra las tres diferentes técnicas de trasplante de células germinales en teleósteos usando diferentes estadios de desarrollo: A) Trasplante de células germinales primordiales en embriones (PGCs) en estadio de blástula, B) Trasplante de células germinales (PGCs, ovogonias y espermatogonias) en larvas recién eclosionadas y C) Trasplante de células germinales (ovogonias y espermatogonias) en peces adultos. Imagen tomada de Lacerda et al. (2012).

El trasplante de espermatogonias en peces adultos constituye una línea de investigación con gran potencial para la investigación básica y aplicada, con repercusiones para la conservación de especies amenazadas y la propagación de la línea germinal de especies o líneas genéticas económicamente importantes, con un bajo costo y periodos de tiempo más cortos (Lacerda et al., 2012; Lacerda et al., 2013). Con base en lo anterior, este estudio pretende contribuir con ciertos avances metodológicos para la aplicación a futuro del trasplante de espermatogonias de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida* en testículos adultos de la mojarra pinta *Parachromis managuense*, además de ofrecer la posibilidad de que esta última especie sea utilizada como huésped para las células germinales de numerosas especies de cíclidos nativos de la región, cuyas poblaciones han estado en decline durante los últimos años.

## JUSTIFICACIÓN

Aunque el trasplante de espermatogonias ha sido relativamente bien establecido en mamíferos, solo recientemente se ha investigado su potencial en algunas especies de teleósteos, con fines de acuicultura y/o conservación. El trasplante de espermatogonias en peces sexualmente competentes se ha aplicado en un número muy reducido de especies. Este ensayo experimental permite indagar las propiedades de las células germinales y el control de la gametogénesis, además de que ofrece la posibilidad de manipular las células germinales *in vitro* y criopreservadas mediante protocolos estandarizados para cualquier tipo de célula somática. La plasticidad sexual de estas células en la gónada hospedera ofrece también la posibilidad de criopreservar fragmentos completos de testículos y obtener ambos tipos de gametos mediante el trasplante de espermatogonias. La mojarra tenguayaca *P. splendida* es un cíclido nativo de gran importancia comercial en el sur de México, Belice y Guatemala que ha sido sobre-explotado durante varias décadas. La captura desmedida de esta especie junto con el deterioro de los cuerpos de agua ha provocado una disminución de las poblaciones naturales durante los últimos 15 años (Arredondo-Figueroa et al., 2013). El trasplante xenogénico de espermatogonias ofrece la alternativa de reproducir a *P. splendida* en cautiverio, dada la falta de conocimiento sobre la biología básica de esta especie y al alarmante decline de sus poblaciones silvestres (Jiménez-Martínez et al., 2009). Por otra parte, la mojarra pinta *P. managuense* representa una excelente opción como huésped para las espermatogonias de *P. splendida* porque es una especie exótica relativamente abundante en la zona, es fácil de mantener en condiciones experimentales, tolera muy bien el estrés durante su manipulación, es resistente a patógenos y presenta estrategias reproductivas similares a las de la *P. splendida*. A largo plazo, la aplicación del trasplante de espermatogonias puede tener repercusiones importantes en la manipulación reproductiva y conservación del germoplasma de *P. splendida* y otras especies de cíclidos nativos, haciendo posible el cultivo *in vitro* y la criopreservación de las espermatogonias de esta especie, como una alternativa a la criopreservación de ovocitos y embriones, para los cuales existen numerosas limitantes técnicas. Ante la disminución de las poblaciones de *P. splendida* en el sur de México, el trasplante de espermatogonias puede ayudar a restablecer las poblaciones silvestres mediante la producción de gametos subrogados.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la viabilidad del trasplante de espermatogonias de la mojarra tenguayaca *P. splendida* en testículos de especímenes adultos de la mojarra pinta *P. managuense*.

### **Objetivos particulares**

- 1) Suprimir la espermatogénesis endógena de los machos adultos de la mojarra pinta *P. managuense* usando una combinación del agente citotóxico busulfan y alta temperatura.
- 2) Caracterizar morfológicamente las espermatogonias Aund de *P. splendida* a ser trasplantadas.
- 3) Establecer un protocolo para el aislamiento de las espermatogonias de *P. splendida* mediante digestión enzimática doble y gradiente de Percoll.

## **METODOLOGÍA**

### **Adquisición y manejo de ejemplares**

Los ejemplares de mojarra pintas *P. managuense* (n=60) utilizados como huéspedes (137.37 + 79.04 g) fueron adquiridos en la Granja La Lupita (Ejido Alvarado, Centro, Tabasco). Antes del inicio del experimento los ejemplares se aclimataron a 25°C durante cuatro semanas. Todos los organismos fueron machos adultos sexualmente maduros, los cuales se mantuvieron en estanques de 2000 L y fueron alimentados *ad libitum* 3 veces al día con alimento comercial para peces marinos, con recambios parciales de agua 2 o 3 veces por semana. Los donantes de espermatogonias, los especímenes de *P. splendida* (n=2, 263.75 ± 7.47 g) se mantuvieron en condiciones similares, hasta que fueron sacrificados para la extracción de sus testículos. Estos ejemplares fueron capturados en la laguna urbana Las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco. Todos los organismos usados en este estudio fueron manipulados y sacrificados conforme a los lineamientos para el uso de animales en la investigación de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT).

### **Diseño experimental**

Se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado (2x2x5) con tres factores: temperatura, aplicación o no de busulfan y tiempo de exposición. El factor temperatura constó de dos niveles (30 y 35°C), al igual que el busulfan (0 y 40 mg/kg de pez), mientras que el factor tiempo consistió de cinco niveles (7, 14, 21, 28 y 35 días). Los sesenta especímenes de *P. managuense* fueron divididos equitativamente en cuatro tanques de 2000 L, dos de los cuales se mantuvieron a 30°C y los otros dos restantes a 35°C. En un tanque de cada temperatura los especímenes fueron inyectados intraperitonealmente con 40 mg/kg de busulfan los días 7, 14, 21 y 28 (una inyección semanal de busulfan), mientras que los especímenes de los tanques restantes no recibieron ningún tratamiento adicional. Previo a las inyecciones de busulfan los peces se anestesiaron con 0.04 mL/L de aceite de clavo y se registró el peso y la longitud. Para la preparación del busulfan este se diluyó primero en dimetil sulfóxido (DMSO) y eventualmente se preparó la solución de trabajo con solución Ringer (pH 7.8), de acuerdo con Majhi et al., 2009b, tras lo cual la solución se mantuvo

bajo agitación constante a temperatura ambiente para evitar la formación de cristales y la precipitación del compuesto.

Para incrementar la temperatura de los estanques se instalaron resistencias de 1000 W (1 por estanque) y un sistema de recirculación para homogeneizar la temperatura, la cual se incrementó gradualmente de 1°C por día hasta alcanzar los 35°C, después de lo cual esta se mantuvo estable durante las cinco semanas que duro el experimento. Los estanques se recubrieron lateralmente con poliestireno para evitar la pérdida de calor y se sellaron por encima con una cubierta plástica para disminuir la evaporación. Un sistema de recirculación para los estanques permitió el paso continuo del agua a través de un filtro de carbón activado para inmovilizar el busulfan que pudiera ser excretado por los peces a través de la orina. Esta medida de seguridad se tomó para evitar cualquier posible efecto ecotoxicológico, a pesar de que datos recientes sugieren que no existe riesgo de impacto ambiental, pues fuera del organismo los compuestos derivados del busulfan se comportan de forma inocua (EMEA, 2005).

#### **Análisis histológico y estereológico de los testículos de *P. managuense***

Para evaluar el efecto de la temperatura, el busulfan y el tiempo de dosificación sobre la espermatogénesis del huésped *P. managuense* se recurrió a un análisis histológico de los testículos de todos los ejemplares muestreados (n=66). De la misma forma los testículos de 6 ejemplares de *P. splendida* (26.75 ± 1.63 cm) también se procesaron con histología para la identificación morfológica de las espermatogonias Aund que serían aisladas mediante gradiente de Percoll (ver más adelante). Para el análisis histológico de los testículos de *P. managuense* se muestrearon de dos a tres organismos por cada tratamiento durante la primera semana, los cuales se consideraron como controles. Siete días después de cada inyección de busulfan (días 14, 21, 28 y 35) se muestrearon de dos a tres organismos para evaluar el efecto de los diferentes factores sobre la espermatogénesis del huésped. El número de organismos fluctuó debido a que algunos organismos murieron durante el experimento. Todos los ejemplares muestreados se sacrificaron con una sobredosis de aceite de clavo, tras lo cual se registró su peso y longitud. Se extrajeron los testículos y se fijaron con solución fijadora de Bouin (formaldehído, ácido pícrico y ácido acético), durante 24 horas. Eventualmente se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol



(10, 30, 50, 70, 96 y 99%; 30 min en cada concentración), se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina Paraplast® (Leica Biosystems, The Netherlands). Se obtuvieron cortes histológicos transversales y longitudinales de 7 µm de espesor con un micrótomos rotatorio (Thermo Scientific™, Microm HM325), los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina (Humason, 1979). Las preparaciones histológicas se analizaron con un microscopio óptico (Carl Zeiss, modelo AxioStar Plus®) y las fotomicrografías se obtuvieron con una cámara (Zeiss AxioCam MRc5®) usando el programa ZEN Lite™.

Para el análisis estereológico se empleó la técnica de conteo por puntos (Weibel et al., 1966), la cual consiste en determinar el número de puntos incidiendo sobre una estructura biológica en particular para determinar su volumen relativo de un tejido. Para ello se usó una rejilla digital (Zeiss ZEN Lite Software) con 925 intersecciones la cual se colocó sobre campos elegidos azarosamente. Se analizaron tres campos por cada organismo (parte anterior, media y posterior) a un aumento total de 400X y se contaron un total de 2775 puntos por cada espécimen. Los datos obtenidos se expresaron como porcentajes de volumen relativo. El número mínimo de puntos a contarse para obtener un 95% de confianza para las densidades volumétricas se calculó usando la fórmula  $PT = (0.453) * (1 - V/VV.E2)$  (Sundberg, 1992).

#### **Aislamiento de las espermatogonias de *P. splendida***

Se sacrificaron 5 ejemplares de *P. splendida* (263.75±87.47 grs) con una sobredosis de aceite de clavo, los testículos se extrajeron cuidadosamente bajo condiciones de esterilidad, se seccionaron en fragmentos de aproximadamente 2mm<sup>3</sup> y se lavaron con solución salina balanceada de Hank (HBSS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en una caja de Petri hasta por cinco veces, con la finalidad de retirar el exceso de semen y/o sangre presentes en el tejido. Estos fragmentos testiculares se sometieron a digestión enzimática con colagenasa tipo IA en Medio Eagle Modificado de Dulbecco/Ham F12 (1:1) (DEMEM, Gibco, Grand Island, NY) a una concentración de 2 mg/mL, y se incubaron por una hora a temperatura ambiente y bajo agitación leve. La suspensión celular resultante se centrifugó por cinco minutos a 100g. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en una solución de 0.5% de tripsina/suero bovino fetal/HBSS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por dos horas bajo agitación constante. Después de haber transcurrido este tiempo la acción de la

tripsina se interrumpió con la adición de 10% (v/v) de Suero Bovino Fetal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los fragmentos testiculares que no se disgregaron durante el proceso de digestión con colagenasa IA y tripsina se disociaron mecánicamente con una pipeta. La suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon con poros de 42  $\mu\text{m}$  de diámetro (Millipore, Ireland), para descartar los grumos de tejido no disociados. El filtrado obtenido de esta forma se centrifugó por 10 min a 100g a temperatura ambiente. Después de retirar cuidadosamente el sobrenadante, las células se resuspendieron en medio de cultivo DEMEM/F12. Esta suspensión de células se sometió a un gradiente continuo de Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con el propósito de aislar las espermatogonias para el trasplante. La osmolaridad de Percoll se ajustó adicionándose una parte de HBSS para cada nueve de Percoll, la cual constituyó la solución stock, a partir de la cual se prepararon cuatro diferentes concentraciones de Percoll para la elaboración del gradiente: Percoll 10%, 25%, 30% y 40% (2 mL por estrato). Estas soluciones a diferentes concentraciones se colocaron cuidadosa y secuencialmente (de 40 hasta 10) en un tubo cónico (Falcon, 15 mL). Finalmente, la suspensión de células se colocó cuidadosamente en el tope de la columna de Percoll y se centrifugó por 30 min a 800g a 25°C. Esto permitió que las células se concentraran en las diferentes interfaces del gradiente de densidad, formando bandas visibles, a partir de las cuales se seleccionaron las bandas con mayor cantidad de espermatogonias (bandas superiores), las cuales se identificaron con base en criterios morfológicos. Estas bandas celulares fueron aisladas en tubos cónicos (Falcon 2.5 mL) y mezcladas con el colorante azul de tripano 0.4% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) para determinar el número de espermatogonias por mL y el porcentaje de células viables con un hemocitómetro.

### **Análisis estadístico**

Los valores promedio obtenidos mediante la técnica de conteo por puntos utilizada para determinar el volumen relativo de los diferentes tejidos testiculares se sometieron a un análisis de varianza multiparamétrico (MANOVA) seguido de la prueba de múltiples rangos de Tukey HSD, utilizando el software estadístico StatGraphics Centurion XVITM (Standpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, EUA). Los resultados fueron considerados significativos cuando  $p < 0.05$  y altamente significativos cuando  $p < 0.001$ . Los

gráficos de interacciones se construyeron utilizando el programa SigmaPlot 12.0™ (Systat Software Inc., San José, California, EUA).

## LITERATURA CITADA

AILAD. 2010. Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza. 14 pp.

[http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo\\_animales.pdf](http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo_animales.pdf)

Alvarenga, É. R., & França, L. R. (2009). Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) 1. *Biology of Reproduction*, 80(3), 537-544.

Arredondo-Figueroa, J. L., Núñez-García, L. G., Pérez-Vega, M. H., Ponce-Palafox, J. T., & de los Ángeles Barriga-Sosa, I. (2013). Culture of founders and breeding of the Bay Snook *Petenia splendida* (Pisces: Cichlidae) in a recirculation aquaculture system. *European International Journal of Science and Technology*, 2, 123-32.

Avarbock, M. R., Brinster, C. J., & Brinster, R. L. (1996). Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Medicine*, 2(6), 693.

Bellvé, A. R., Cavichia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., & Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. *Journal of Cell Biology*, 74, 68-85.

Brinster, R. L. (2002). Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, 296(5576), 2174-2176.

Brinster, R. L., & Avarbock, M. R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11303-11307.

Brinster, R. L., & Zimmermann, J. W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11298-11302.

Clouthier, D. E., Avarbock, M. R., Maika, S. D., Hammer, R. E., & Brinster, R. L. (1996). Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 381(6581), 418.

Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3), 191-364.

Dobrinski, I. (2006). Transplantation of germ cells and testis tissue to study mammalian spermatogenesis. *Anim Reprod*, 3(2), 135-145.

Dobrinski, I., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (1999). Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biology of Reproduction*, 61(5), 1331-1339.

Farlora, R., Hattori-Ihara, S., Takeuchi, Y., Hayashi, M., Octavera, A., Alimuddin, & Yoshizaky, G. (2014). Intraperitoneal germ cell transplantation in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Biotechnology* 16, 309-320.

França, L. R., Ogawa, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L., & Russell, L. D. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction*, 59(6), 1371-1377.

Golpour, A., Siddique, M. A. M., Rodina, M., & Pšenička, M. (2016). Short-term storage of sterlet *Acipenser ruthenus* testicular cells at  $-80^{\circ}$  C. *Cryobiology*, 72(2), 154-156.

González, R., & Dobrinski, I. (2015). Beyond the mouse monopoly: studying the male germ line in domestic animal models. *ILAR Journal*, 56(1), 83-98.

Gustafson, E. A., & Wessel, G. M. (2010). Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays*, 32(7), 626-637.

Hayashi, M., Sato, M., Nagasaka, Y., Sadaie, S., Kobayashi, S., & Yoshizaki, G. (2014). Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. *Biology of Reproduction*, 91(1), 23.

Hermann, B. P., Sukhwani, M., Lin, C. C., Sheng, Y., Tomko, J., Rodriguez, M., ... & Schatten, G. P. (2007). Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells*, 25(9), 2330-2338.

Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., & Scharl, M. (2007). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Developmental Biology*, 7(1), 3.

Hedger MP. 2007. Immunologically privileged environments: In: Halberstadt, C. R., Emerich, D.F. (Eds). *Cellular transplantation from laboratory to clinic*. Elsevier, Amsterdam, pp 567–590.

Honaramooz, A. & Yang Y. (2011). Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals. *Veterinary Medicine International*, 1-9.

Honaramooz, A., Behboodi, E., Blash, S., Megee, S. O., & Dobrinski, I. (2003). Germ cell transplantation in goats. *Molecular Reproduction and Development*, 64(4), 422-428.

Honaramooz, A., Megee, S. O., & Dobrinski, I. (2002). Germ cell transplantation in pigs. *Biology of Reproduction*, 66(1), 21-28.

Ito, L. S., Takahashi, C., Yamashita, M., & Strüssmann, C. A. (2008a). Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6), 762-774.

Ito, L. S., Cornejo, A. M., Yamashita, M., & Strüssmann, C. A. (2008b). Thermal threshold and histological process of heat-induced sterility in adult pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): a comparative analysis of laboratory and wild specimens. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6), 775-784.

Izadyar, F., Creemers, L. B., van Dissel-Emiliani, F. M., van Pelt, A. M., & de Rooij, D. G. (2000). Spermatogonial stem cell transplantation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169(1), 21-26.

Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2004). CD9 Is a Surface Marker on Mouse and Rat Male Germline Stem Cells? *Biology of Reproduction*, 70(1), 70-75.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2003). Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Human Reproduction*, 18(12), 2660-2667.

Kaur, G., Thompson, L. A., & Dufour, J. M. (2015). Therapeutic potential of immune privileged Sertoli cells. *Animal Reproduction*, 12(1), 105-117.

Kim, Y., Selvaraj, V., Dobrinski, I., Lee, H., McEntee, M. C., & Travis, A. J. (2006). Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats. *Journal of Andrology*, 27(2), 248-256.

Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2007). Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 74(2), 207-213.

Kumar, S., & Hedges, S. B. (1998). A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, 392(6679), 917-920.

Jiménez-Martínez, L. D., Alvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W. M., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodríguez, L., & Almeida-Madriral, J. A. (2009). Evaluation of larval growth and survival in Mexican mojarra, *Cichlasoma urophthalmus*, and bay snook, *Petenia splendida*, under different initial stocking densities. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(6), 753-761.

Lacerda, S. M. D. S. N., Costa, G. M. J., & de França, L. R. (2014). Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *General and Comparative Endocrinology*, 207, 56-65.

Lacerda, S. M. S. N., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P. H. A., Segatelli, T. M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., ... & França, L. R. (2013a). Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(1), 3-11.

Lacerda, S. M. S. N., Costa, G. M. J., da Silva, M. D. A., Campos-Junior, P. H. A., Segatelli, T. M., Peixoto, M. T. D., ... & de França, L. R. (2013b). Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 95-106.

Lacerda, S. M. S. N., Aponte, P. M., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P. H. A., Segatelli, T. M., Silva, M. A., & França, L. R. (2012). An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Animal Reproduction*, 9(4), 798-808.

Lacerda, S. M., Batlouni, S. R., Costa, G. M., Segatelli, T. M., Quirino, B. R., Queiroz, B. M., ... & França, L. R. (2010). A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Plos One*, 5(5), 1-9.

Lacerda, S. M. S. N., Batlouni, S. R., Assis, L. H., Resende, F. M., Campos-Silva, S. M., Campos-Silva, R., ... & Franca, L. R. (2008). Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybium*, 32(2), 115-118.

Lacerda, S. M. S. N., Batlouni, S. R., Silva, S. B. G., Homem, C. S. P., & França, L. R. (2006). Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Animal Reproduction*, 3(2), 146-159.

Lee, S., Seki, S., Katayama, N., & Yoshizaki, G. (2015). Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Scientific Reports*, 5, 1-12.

Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., & Yoshizaki, G. (2013). Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1640-1645.

Lin, S., Long, W., Chen, J., & HoPKINS, N. A. N. C. Y. (1992). Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10), 4519-4523.

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Rahman, S. M., & Strüssmann, C. A. (2014). Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. *PLoS one*, 9(4), 1-11.

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Yokota, M., Watanabe, S., & Strüssmann, C. A. (2009a). Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. *PLOS One*, 4(7), 1-8.

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Rahman, S. M., Suzuki, T., & Strüssmann, C. A. (2009b). Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). *Theriogenology*, 71(7), 1162-1172.

Manning, A. J., & Burton, M. P. M. (2003). Cytological abnormalities in the ovaries of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). *Fish Physiology and Biochemistry*, 29(4), 269-273.

McLean, D. J., Russell, L. D., & Griswold, M. D. (2002). Biological Activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation 1. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1374-1379.

McLean, D. J., Johnston, D. S., Russell, L. D., & Griswold, M. D. (2001). Germ cell transplantation and the study of testicular function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(1), 16-21.

Miranda, L. A., Chalde, T., Elisio, M., & Strüssmann, C. A. (2013). Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 45-54.

Mital, P., Kaur, G., & Dufour, J. M. (2010). Immunoprotective sertoli cells: making allogeneic and xenogeneic transplantation feasible. *Reproduction*, 139(3), 495-504.

Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., ... & Takeuchi, Y. (2012). Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of



spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biology of Reproduction*, 86(6), 176-176.

Nagano, M., Brinster, C. J., Orwig, K. E., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2001). Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13090-13095.

Naito, M., Tajima, A., Yasuda, Y., & Kuwana, T. (1994). Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 39(2), 153-161.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., Van De Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., & Schulz, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *Plos One*, 5(9), 1-16.

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological Reviews*, 92(2), 577-595.

Ogawa, T. (2001). Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications. *Journal of Molecular Medicine*, 79(7), 368-374.

Ogawa, T., Dobrinski, I., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2000). Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Medicine*, 6(1), 29-34.

Ogawa, T., Dobrinski, I., & Brinster, R. L. (1999). Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue and Cell*, 31(5), 461-472.

Ogawa, T., Dobrinski, I., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (1999). Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biology of Reproduction*, 60(2), 515-521.

Ogawa, T., Dobrinski, I., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (1998). Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. *Tissue and Cell*, 30(5), 583-588.

Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard Jr, T. D., & Kaiser, M. J. (2008). Spermatogonial transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents. *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 209.

Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2725-2729.

Okutsu, T., Ayaka, Y. A. N. O., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., & Yoshizaki, G. (2006). Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *Journal of Reproduction and Development*, 52(6), 685-693.

Progatzy, F., Dallman, M. J., & Celso, C. L. (2013). From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus*, 3(3), 1-14.

Pšenička, M., Saito, T., Linhartová, Z., & Gazo, I. (2015). Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology*, 83(6), 1085-1092.

Rahman, S. M., Strüssmann, C. A., Suzuki, T., & Watanabe, M. (2013). Electroporation enhances permeation of cryoprotectant (dimethyl sulfoxide) into Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. *Theriogenology*, 79(5), 853-858.

Rahman, S. M., Strüssmann, C. A., Majhi, S. K., Suzuki, T., & Watanabe, M. (2011). Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. *Theriogenology*, 75(2), 248-255.

Rahman, S. M., Majhi, S. K., Suzuki, T., Matsukawa, S., Strüssmann, C. A., & Takai, R. (2008). Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. *Cryobiology*, 57(2), 170-174.

Raz, E. (2004). Guidance of primordial germ cell migration. *Current Opinions in Cell Biology*, 16(2), 169-173.

Reis, M. M., Tsai, M. C., Schlegel, P. N., Feliciano, M., Raffaelli, R., Rosenwaks, Z., & Palermo, G. D. (2000). Xenogeneic transplantation of human spermatogonia. *Zygote*, 8(02), 97-105.

Reuter, K., Schlatt, S., Ehmcke, J., & Wistuba, J. (2012). Fact or fiction: *in vitro* spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 2(4), 245-252.

Robles, V., Riesco, M. F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D. G., Cabrita, E., & Herráez, P. (2016). Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: biotechnological applications. *Aquaculture*. *In press*.

Russel, L. D., Franca, L. R., & Brinster, R. L. (1996). Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *Journal of Andrology*, 17(6), 603-614.

Saito, T., Pšenička, M., Goto, R., Adachi, S., Inoue, K., Arai, K., & Yamaha, E. (2014). The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. *PLOS One*, 9(2), e86861.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Nomura, K., Tanaka, H., Adachi, S., ... & Yamaha, E. (2011). The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. *PLOS One*, 6(9), e24460.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., & Yamaha, E. (2010). Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *International Journal of Developmental Biology*, 54(10), 1481-1486.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., & Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation 1. *Biology of Reproduction*, 78(1), 159-166.

Saragusty, J., & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141(1), 1-19.

Salomon, A. K., Gaichas, S. K., Shears, N. T., Smith, J. E., Madin, E. M., & Gaines, S. D. (2010). Key features and context-dependence of fishery-induced trophic cascades. *Conservation Biology*, 24(2), 382-394.

- Sato, T., Katagiri, K., Kojima, K., Komeya, M., Yao, M., & Ogawa, T. (2015). *In vitro* spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues. *PLOS One*, 10(6), 1-13.
- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., ... & Ogawa, T. (2011). *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 471(7339), 504-507.
- Schlatt, S. (2002). Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1), 107-111.
- Schlatt, S., Foppiani, L., Rolf, C., Weinbauer, G. F., & Nieschlag, E. (2002). Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Human Reproduction*, 17(1), 55-62.
- Schulz, R. W., De França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411.
- Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2002). Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1491-1497.
- Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2000). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8346-8351.
- Shinohara, T., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (1999).  $\beta 1$ - and  $\alpha 6$ -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5504-5509.
- Shuttlesworth, G. A., De Rooij, D. G., Huhtaniemi, I., Reissmann, T., Russell, L. D., Shetty, G., ... & Meistrich, M. L. (2000). Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration 1. *Endocrinology*, 141(1), 37-49.
- Siqueira-Silva, D. H., dos Santos Silva, A. P., Ninhaus-Silveira, A., & Veríssimo-Silveira, R. (2015). The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra

*Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. *Theriogenology*, 84(6), 1033-1042.

Singh, S. R., Burnicka-Turek, O., Chauhan, C., & Hou, S. X. (2011). Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(3), 468-483.

Smith, B. E., & Braun, R. E. (2012). Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science*, 338(6108), 798-802.

Strüssmann, C. A., Conover, D., Somoza, G., & Miranda, L. (2010). Implications of climate change for the reproductive capacity and survival of New World silversides (family Atherinopsidae). *Journal of Fish Biology*, 77, 1818-1834.

Strüssmann, C. A., Saito, T., & Takashima, F. (1998). Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(2), 637-644.

Sundberg, M. (1992). An Introduction to stereological analysis: morphometric techniques for beginning biologists. Pp: 51-72. Paper presented at the Proceedings of the 6<sup>o</sup> Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). Canada, University of Newfoundland.

Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., & Kuwana, T. (1993). Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology*, 40(3), 509-519.

Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., & Yoshizaki, G. (2009). Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biology of Reproduction*, 81(6), 1055-1063.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., & Takeuchi, T. (2004). Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 430(7000), 629-630.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., & Takeuchi, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1142-1149.

Thoma, E. C., Wagner, T. U., Weber, I. P., Herpin, A., Fischer, A., & Scharl, M. (2010). Ectopic expression of single transcription factors directs differentiation of a medaka spermatogonial cell line. *Stem Cells and Development*, 20(8), 1425-1438.

Weibel, E. R., Kistler, G. S., & Scherle, W. F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *The Journal of Cell Biology*, 30, 23.

Weidner, W. H., Schuppe, H. C., Pilatz, A., Altinkilic, B., & Diemer, T. (2014). Sperm cells for artificial reproduction and germ cell transplantation. *European Urology Supplements*, 13(4), 83-88.

Yano, A., Suzuki, K., & Yoshizaki, G. (2008). Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biology of Reproduction*, 78(1), 151-158.

Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N., & Yoshizaki, G. (2010). Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells 1. *Biology of Reproduction*, 82(5), 896-904.

Yoshizaki, G., Okutsu, T., Morita, T., Terasawa, M., Yazawa, R., & Takeuchi, Y. (2012). Biological characteristics of fish germ cells and their application to developmental biotechnology. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s4), 187-192.

Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., & Takeuchi, Y. (2011). Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 6(1), 55-61.

Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., & Okutsu, T. (2010a). Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*, 137(8), 1227-1230.

Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M., & Takeuchi, Y. (2010b). Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Animal Reproduction*, 7(3), 187-96.

Zheng, Y., Zhang, Y., Qu, R., He, Y., Tian, X., & Zeng, W. (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 147(3), R65-R74.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## CAPITULO II

### **The effect of busulfan and high temperature on the spermatogenesis of the jaguar cichlid *Parachromis managuense* (Teleostei: Cichlidae)**

AARÓN TORRES-MARTÍNEZ, WILFRIDO MIGUEL CONTRERAS-SANCHEZ, ARLETTE AMALIA HERNÁNDEZ-FRANYUTTI, ULISES HERNÁNDEZ-VIDAL, JULIA MARIA LESHEN-GORDILLO.

Laboratorio de Acuicultura Tropical. División Académica de Ciencias Biológicas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas Km. 0.5 S/N, Entronque a Bosques de Saloya. CP. Villahermosa, Tabasco, Mexico.

CARLOS AUGUSTO STRÜSSMANN

Graduate School of Marine Science and Technology. Tokyo University of Marine Science and Technology. Konan 4-5-7, Minato, Tokyo 108-8477, Japan.

#### **ABSTRACT**

Spermatogonial transplantation has emerged as a powerful technique for seed production and the propagation of economically important and endangered species. The success of this technique depends on the availability of a recipient lacking of germ cells where transplanted spermatogonia can differentiate into surrogate sperm. With this goal, we standardized a protocol to suppress the spermatogenesis in the jaguar cichlid (*Parachromis managuense*) for its future use in spermatogonial transplantation. Based in previous studies we used repeated injections of 40 mg/kg body weight of busulfan and reared fish at two different temperatures (30 and 35°C) by a period of 35 days. We investigated how factors temperature, busulfan, and time of exposition affect the volume density of different testicular components, and how these factors interact to induce spermatogenesis suppression in *P. managuense*. We found that almost all factors and their interaction decreased the volume density of spermatogonia, spermatocytes, spermatid, and sperm, and at the same time they increased the volume density of Leydig cells, Sertoli cells, lumen, and



interstitial space. However, since spermatogonia were present in all treatments, we concluded that full sterilization was not achieved, notwithstanding we used high doses of busulfan during a short time. Our study demonstrates that high temperature (35°C) alone can remove all spermatogenic stages and increase the luminal area to allow spermatogonial transplantation in *P. managuense* after 28 days of experimentation. This means that *P. managuense* recipients for spermatogonial transplantation can be easily produced by rearing fish at 35°C, avoiding the application of dangerous drugs and with minimal manipulation.

**Key words:** Busulfan, high temperature, spermatogenesis, spermatogonial transplantation, *Parachromis managuense*

## INTRODUCTION

Spermatogonial transplantation is a powerful technique consisting in the isolation of spermatogonia from an adult donor testis, and their eventual transplantation into an infertile recipient testis, where they can settle and produce donor-derived viable sperm (Brinster and Zimmerman, 1994). This biotechnological approach has a great potential for the surrogate production of commercially important and endangered species as well as in the conservation of genetic resources. Spermatogonial transplantation has been conducted in a growing number of experimental and domestic mammals (González & Dobrinsky, 2015; Zheng et al., 2014), but only recently it has been applied in a handful of teleost species, for instance, from Nile tilapia to Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Lacerda et al., 2006; Lacerda et al., 2010), from zebrafish to zebrafish (Nóbrega et al., 2010), from the pejerrey *Odontesthes bonariensis* to the Patagonian pejerrey *Odontesthes hatcheri* (Majhi et al., 2014; Majhi et al., 2009a), and recently from the Jundia catfish *Rhamdia quelen* into the Nile tilapia (Silva et al., 2016).

Since spermatogonia cannot be directly inserted into a host testis with active spermatogenesis, it is imperative to deplete spermatogenesis and create new niches for transplanted spermatogonia, because these cells require an environment free of competence where they can proliferate and restore spermatogenesis (Brinster et al., 2003). The pivotal role of recipient preparation to improve the colonization efficiency of transplanted

spermatogonia was early recognized in the mouse and rat (Brinster et al., 2003; Ogawa et al., 1999). As in mammals, spermatogonial transplantation in adult fish depends of an appropriate recipient preparation. Although there are many ways of inducing sterility in fish (see Golpour et al. 2016 for a review), the use of high temperatures together with repeated doses of the anti-mitotic drug busulfan to suppress spermatogenesis has become the most reliable method. This is because the thermochemical cytoablation is not time consuming, is easy to achieve, and can be used in cases requiring immediate attention (Lacerda et al. 2006, Mahji et al., 2009a). The application of high temperature, together with busulfan has successfully removed germ cells in several species such as the Nile tilapia *O. niloticus* (Lacerda et al., 2010; Lacerda et al 2008; Lacerda et al., 2006), the Patagonian pejerrey *Odonthestes hatchery* (Mahji et al., 2009b), the zebra fish *Danio rerio* (Nóbrega et al., 2010), the Senegalese sole *Solea senegalensis* (Pacchiarini et al., 2014) and the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Siqueira-Silva et al., 2015). A number of studies conducted in *O. bonariensis* (larvae, juvenile and sub-adults) have shown that high temperatures can induce degeneration of spermatogenic cells via apoptosis due to the high sensitivity of these cells to temperature changes (Ito et al., 2008a; Strüssmann et al., 1998). In the Nile tilapia high temperatures are able to shorten the duration of spermatogenesis and accelerating germ cell mitosis, allowing busulfan to destroy more spermatogenic cells (Lacerda et al., 2010; Alvarenga and Franca, 2009; Villela et al., 2003). Nevertheless, since gonadal thermo-sensitivity and biological responses to busulfan are species-specific, these parameters must be evaluated for each species in order to determine the appropriated temperature regimes and busulfan doses to deplete spermatogenesis and create suitable recipient for spermatogonial transplantation.

Southern Mexico is an area of great importance for freshwater aquaculture, as it harbors one of the biggest hotspots of freshwater fishes in Mexico (Contreras-MacBeath et al., 2014). Many of these species are rapidly diminishing as a result of overfishing, pollution, and habitat destruction (Pérez-Sánchez and Páramo-Delgadillo, 2008), therefore, reproductive biotechnologies as spermatogonial transplantation could play a central role in recovery efforts. Although our research group have actively conducted fish repopulation efforts during the last decade, we are currently exploring new approaches that could be more appropriated in special circumstances, such as when the remaining individuals are not

sexually competent, reproduction in captivity is hard to achieve, or species are extinct in the wild. In this context, the aim of this study was to evaluate the suitability of different temperature regimens and busulfan doses to deplete spermatogenesis in the jaguar cichlid (*P. managuense*), a non-native freshwater species inhabiting southern Mexico. The relative abundance, stress tolerance, and reproductive similarities of this species with other cichlids of the region, makes it a suitable host for future experiments on ST.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics statement**

All procedures and protocols followed approved guidelines for the ethical handling of animals of the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (AILAD, 2010).

### **Experimental design**

*P. managuense* specimens were obtained from a local fish farm. Fish were transported to the Tropical Aquaculture Laboratory, located at the Biological Sciences Division (UJAT) and stocked for acclimation at room temperature during four weeks. A completely randomized factorial design with three factors was used (2x2x5) with two different temperatures (30 and 35 °C), two busulfan administration regimes (no busulfan and with busulfan) and five dose-evaluation times (7, 14, 21, 28 and 35 days) (Table 1). Sixty sexually mature *P. managuense* males ( $137.37 \pm 79.04$  grs, mean body weight  $\pm$  SD) were equally divided into four 2,000 L-tanks, two of them were kept at 30 °C and two at 35°C. In one tank from each temperature all fish were intraperitoneally injected four times (Majhi et al., 2014) with 40 mg/kg (body weight) of busulfan (days 7, 14, 21 and 28); while the fish in the other tanks remained undisturbed. Prior to busulfan injections, fish were anesthetized with clove oil and body weight and lengths were recorded. The tanks from each temperature regime were covered with polystyrene to prevent heat loss and connected to a recirculation system containing a 1,000 w heater with a thermostat. Each tank under busulfan administration was equipped with an activated carbon filter to retain the busulfan excreted by fish. Each specimen was considered an experimental unit since independency.

Busulfan solution was prepared by dissolving 1,4-butanediol dimethanesulfonate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) powder in dimethyl sulfoxide (DMSO), and eventually diluted further with Ringer solution to reach working concentrations, according to Majhi et al., 2009.

### **Sampling**

Two to three fish from each tank were sampled every 7 days. Fish were sacrificed with and overdose of clove oil.

### **Histological and stereological analysis of testes**

Testes were quickly extracted through a ventral incision and fixed in Bouin fixative solution by 12 hours. Afterwards, entire testes were dehydrated in growing concentrations of ethanol and cleared in xylene. Testes were sectioned in three parts (anterior, medium, and posterior), and testicular pieces, embedded in paraffin Paraplast® (Leica Biosystems, Illinois, USA), and sectioned at 7 µm thick. Histological sections were stained with haematoxylin-eosin, according to Humason (1997). Digital photomicrographs were taken with an AxioCam MRc5® camera coupled to a Zeiss Axiostar® plus microscope (Zeiss, Jena, Germany).

A stereological analysis was performed using the counting point method (Weibel et al., 1966) to determine the effect of temperature, busulfan, and accumulation time on the relative volume (% volume density) of several testicular components (spermatids, spermatogonia, spermatocyte, sperm, Sertoli, and Leydig cells) and the lumen and interstitial space. The volume densities of testicular components were determined using a digital 925- intersection grid placed on fields to determine the number of points overlaying each of the tissues considered. Three fields per organism were randomly selected (one field per testicular region: anterior, mid, and posterior) and examined at 400X magnification in a computer monitor, using the morphometry software ZEN Lite™ (Zeiss, Jena, Germany). Since each 925-intersection grid was considered a field, and three fields per fish were examined, a total of 2,775 points were counted per fish. The minimum number of points to be counted to obtain 95% confidence for density volumes was determined using the formula  $PT = (0.453)((1-V)/(V \cdot E^2))$  (Sundberg, 1992).

## Statistical analysis

After confirmation of data normality and homogeneity of variances, mean values of testicular volume densities obtained by the counting points method were subjected to a Multiple Analysis of Variance (MANOVA) followed by Tukey's HSD tests, using the statistic software StatGraphics Centurion XVI™ (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA). Statistical differences were considered when  $p < 0.05$ . The graphics presented in this study were constructed using the software SigmaPlot 12.0™ (Systat Software Inc., San José, California, USA).

## RESULTS

In general, the effects of the three factors studied as well as their interactions, significantly decreased the percent volume density of all spermatogenic cellular forms (spermatogonia, spermatocyte, spermatids, and sperm) (Figure 1). The space generated by this loss was occupied by lumen, interstitial space, and a significant increase in the amount of Sertoli and Leydig cells. The MANOVA performed to each of the testicular cells and interstitial space indicated highly statistical significant effects of temperature, busulfan and time ( $p < 0.001$  in all cases), presented as follows:

*Spermatogonia.* A significant effect of the three factors studied was observed on the volume density of spermatogonia (MANOVA). The effect of busulfan on spermatogonia consisted on significantly reducing volume density (MANOVA;  $F(1,112) = 89.82$ ,  $p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged 4.63% ( $\pm 0.25$ ) while untreated fish averaged 7.68 ( $\pm 0.25$ ). The effect of temperature was observed as a decrease on volume density for the fish subjected to 35 °C, compared to those in 30 °C ( $5.29 \pm 0.25$  and  $7.02 \pm 0.25\%$ , respectively) (MANOVA;  $F(1,112) = 28.82$ ,  $p < 0.001$ ). The effect of dosing time was reflected with a decline of spermatogonial volume density. The mean initial volume averaged 8.17% ( $\pm 0.41$ ), declining at day 14, remaining for three weeks between 6.21% and 6.60%, to drop again at day 35 to 4.37% ( $\pm 0.41$ ). There were significant interactions between temperature and time, and busulfan and time ( $p < 0.001$  in both cases), but there was no interaction between busulfan and temperature ( $p > 0.05$ ) (Figure 2A).

*Spermatoocytes.* Busulfan, temperature and dosing time all had significant effects on the volume density of spermatoocytes (MANOVA). Busulfan reduced the volume density of spermatoocytes (MANOVA  $F(1,112) = 100.48, p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged 7.69% ( $\pm 1.03$ ) while untreated fish averaged 17.0% ( $\pm 1.03$ ). Temperature effect was observed as a diminution of volume density for the fish kept at 35°C, compared to those at 30°C (6.69 $\pm$ 1.03 and 18.0 $\pm$ 1.03%, respectively) (MANOVA;  $F(1,112) = 137.79, p < 0.01$ ). Dosing time effect was observed as a significant decline of the volume density. The mean initial volume averaged 30.08% ( $\pm 1.69$ ), dropped at day 14 to 15.45% ( $\pm 1.69$ ) and decreased further at day 21 to 6.27% ( $\pm 1.55$ ). Then, volume density remained unaltered at day 28 and 35 (3.38%  $\pm$  1.55 and 6.54%  $\pm$  1.69, respectively). The interaction effect was significant for busulfan and time, and busulfan and temperature ( $p < 0.001$  in both cases), but there was no interaction between temperature and time ( $p > 0.05$ ) (Figure 2B).

*Spermatids.* A significant effect of the three factor tested was observed in the volume density of spermatids (MANOVA). The effect of busulfan on spermatids consisted on significantly reducing volume density (MANOVA;  $F(1,112) = 254.97, p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged 5.55% ( $\pm 0.83$ ) while the untreated ones averaged 15.59% ( $\pm 0.83$ ). The effect of temperature was observed as a significant decrease on volume density for the fish subjected to 35°C, compared to those in 30°C (6.81  $\pm$  0.83 and 14.32  $\pm$  0.83%, respectively) (MANOVA;  $F(1,112) = 137.79, p < 0.001$ ). The effect of dosing time was reflected as a decline in spermatid volume density. The initial volume (22.58  $\pm$  1.37%) declined to 13.87% ( $\pm 1.37$ ) at day 14 and further up to 4.93% ( $\pm 1.25$ ) at day 21, after which it remained unaffected. There were statistically significant interactions among all factors ( $p < 0.001$  in all cases) (Figure 2C).

*Sperm.* There was a significant effect of busulfan and time, but not temperature (MANOVA). The effect of busulfan on sperm consisted on significantly reducing volume density (MANOVA;  $F(1,112) = 55.68, p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged 5.2% ( $\pm 0.48$ ) while untreated fish averaged 12.05% ( $\pm 0.48$ ). The effect of temperature was non-significant (MANOVA;  $F(1,112) = 2.29, p > 0.05$ ). Dosing time effect was reflected in the decline of sperm volume density (MANOVA;  $F(4, 112) = 76.98, p < 0.001$ ). The volume density did not show statistical differences between days 7 and 14 (8.58  $\pm$  0.78

and  $7.87 \pm 0.78\%$ , respectively), but peaked at day 21 to  $19.29\% (\pm 0.78)$ , to drop again at day 28 to  $5.11\% (\pm 0.71)$  and remaining unchanged at day 35 ( $2.37 \pm 0.78\%$ ). There were significant interactions among all factors ( $p < 0.001$  in all cases) (Figure 2D).

*Lumen.* Busulfan, temperature and dosing time all had significant effects on the luminal volume density (MANOVA). Busulfan significantly increased the volume density of lumen (MANOVA;  $F(1,112) = 95.62, p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged  $21.54\% (\pm 0.49)$  while untreated fish averaged  $15.47\% (\pm 0.49)$ . Temperature increased the volume density of fish kept at  $35^\circ\text{C}$ , compared to those at  $30^\circ\text{C}$  ( $23.31 \pm 0.49$  and  $13.71 \pm 0.49\%$ , respectively) (MANOVA;  $F(1,112) = 240.75, p < 0.001$ ). The effect of dosing time was reflected as a decrease in luminal volume density. The initial volume averaged  $7.12\% (\pm 0.8)$  increasing at day 14 to  $14.41\% (\pm 0.8)$  and remaining steady until day 21 ( $17.41 \pm 0.73\%$ ), then peaked again at day 28 to  $27.13\% (\pm 0.73)$  and remained in  $26.45\% (\pm 0.8)$  at day 35. There were significant interactions among all factors ( $p < 0.001$  in all cases) (Figure 3A).

*Sertoli cells.* A significant effect of the three factors studied was observed on the volume density of Sertoli cells (MANOVA). The effect of busulfan on Sertoli cells consisted on significantly increasing the volume density (MANOVA;  $F(1,112) = 193.63, p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged  $19.97\% (\pm 0.51)$  while untreated fish averaged  $12.8\% (0.51)$ . Temperature effect caused an increase on the volume density of fish kept at  $35^\circ\text{C}$ , compared to those at  $30^\circ\text{C}$  ( $17.15 \pm 0.51$  and  $15.55 \pm 0.51$ , respectively) (MANOVA;  $F(1,112) = 17.18, p < 0.001$ ). The effect of dosing time was reflected as an increase in the volume density of Sertoli cells  $F(4, 112) = 28.45, p < 0.001$ . The initial volume averaged  $10.04\% (\pm 0.83)$ , increasing at day 14 to  $15.66\% (\pm 0.83)$ , remaining for one week in  $17.86\% (\pm 0.76)$  and increasing again at day 28 to  $19.80\% (\pm 0.76)$ , after which it remained unchanged again ( $18.37 \pm 0.83\%$ ). There were significant interactions between busulfan and time, and busulfan and temperature ( $p < 0.001$  in both cases), but there was not interaction for temperature and time ( $p > 0.05$ ) (Figure 3B).

*Leydig cells.* A significant effect of two of the three factors was observed in the volume density of Leydig cells (MANOVA). Busulfan significantly increased volume density ( $F(1,112) = 71.05, p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged  $14.35\% (\pm 0.46)$  while the

untreated ones averaged 9.08% ( $\pm 0.46$ ). Temperature effect was non-significant ( $F(4, 112) = 10.63, p > 0.05$ ). The effect of dosing time was reflected as an increase in the volume density of Leydig cells ( $F(4, 112) = 10.63, p < 0.001$ ). The mean initial volume averaged 7.87% ( $\pm 0.76$ ), increased at day 14 to 13.41% ( $\pm 0.76$ ), and remained unchanged for three weeks ( $12.0 \pm 0.7, 11.08 \pm 0.7$  and  $14.20 \pm 0.76\%$ , respectively). There were significant interactions among all factors ( $p < 0.001$  in all cases) (Figure 3C).

*Interstitial space.* Busulfan, temperature and dosing time all had significant effects on the luminal volume density (MANOVA). Busulfan effect on interstitial space consisted on significantly increasing volume density (MANOVA;  $F(1,112) = 259.30, p < 0.001$ ). Fish that received busulfan averaged 20.0% ( $\pm 0.62$ ) while untreated fish averaged 9.89% ( $\pm 0.62$ ). Temperature caused an increment on the volume density for the fish subjected to 35°C, compared with those at 30°C ( $19.43 \pm 0.62$  and  $10.46 \pm 0.62\%$ , respectively) ( $F(1,112) = 217.09, p < 0.001$ ). The effect of dosing time was reflected as an increase on interstitial volume density ( $F(4, 112) = 67.93, p < 0.001$ ). The initial volume averaged 5.54% ( $\pm 1.03$ ), increasing at day 14 to 12.66% ( $\pm 0.94$ ) and maintained there at day 21 ( $13.33 \pm 0.94\%$ ), peaking again at day 28 to 21.95% ( $\pm 0.94$ ) and remaining unchanged at day 35 ( $21.25 \pm 1.03\%$ ). There were significant interactions among all factors ( $p < 0.001$  in all cases) (Figure 3D).

## DISCUSSION

This study provides a fast and easy methodology for the preparation of specimens of *P. managuense* as recipients for spermatogonial transplantation, using busulfan and high temperature to suppress spermatogenesis. Although no previous study has analyzed how temperature, busulfan and time of exposition interact to kill spermatogenic cells, our results essentially agree with that reported in other teleost species, where busulfan and elevated temperatures have led to severe spermatogenesis suppression over time (Siqueira-Silva et al., 2016; Majhi et al., 2014; Lacerda et al., 2010; Nóbrega et al., 2010; Majhi et al., 2009; Lacerda et al., 2006). Almost all factors evaluated in this study had highly significant effects on the volume density of spermatogenic cells and other testicular components of *P. managuense* ( $P < 0.001$ ). Our graphics of interaction showed that temperature had a time-dependent effect on the cytotoxic activity of busulfan. When fish received busulfan and



were subjected to 35°C, spermatocyte and spermatid dropped at day 14, while it took to busulfan-treated fish kept at 30°C and untreated fish kept at 35°C at least 21 days to reach comparable levels of germ cell depletion. At 35°C and with busulfan, spermatogonia only decreased to comparable levels at day 35. The severe suppression of spermatocytes, spermatids and sperm was probably caused by the synergic effect of high temperature and busulfan, since high temperatures have shown to induce apoptosis in germ cells (Nóbrega et al., 2010; Ito et al., 2008a; Strüssmann et al., 1998; Alvarenga y Franca, 2009) and busulfan kills these cells by alkylating DNA during their path to sperm. In fact, spermatocytes and spermatids have shown to be the most sensitive germinal cells to high temperature in other species. In contrast, a different response was observed in the sperm dynamic of *P. managuense*. At 35°C with no busulfan, the volume density of these cells peaked at day 21 and dropped only after 28 days, suggesting that high temperature could have promoted the differentiation of spermatocytes and spermatids into sperm (contributing even more to the disappearance of these cells). Elevated temperatures have shown to accelerate spermatogenesis in other species such as the Nile tilapia (Alvarenga y Franca, 2009; Lacerda et al., 2006) and several species of carp (Majhi and Rasal, 2014). We hypothesize that once these cells became differentiated into sperm, they eventually degenerated at day 28 probably by apoptosis, because sustained high temperature has shown to induce this type of cell death in testes of other teleost species (Ito et al., 2008). The removal of germ cells by busulfan and high temperature was reflected as an increase of the luminal volume density, but also of the interstitial space. Moreover, in absence of germ cells, Sertoli cells retracted their cytoplasmic projections further increasing the luminal area.

Although the number of spermatogonia steadily decreased in presence of busulfan and/or high temperature, there were always scattered spermatogonia associated with germinal epithelium, some of them with signs of degeneration as described in *O. hatcheri* (Mahji et al., 2009b). Survival of spermatogonia to thermochemical treatments has been reported in *A. altiparanae* (Siqueira Silva et al., 2015), *D. rerio* (Nóbrega et al., 2010), and *O. hatcheri* (Majhi et al., 2009b), where cytoablative therapies failed to induce full sterility. Based on the nuclear and cytoplasmic morphology of remaining spermatogonia in *P. managuense*, we suggest these cells were spermatogonia Aund, the most undifferentiated spermatogonia in fish testis (Lacerda et al., 2012; Schultz et al., 2010). The occurrence of these cells across

our treatments shows that high dosages and frequent injections of busulfan are unable of inducing full sterility in this species, probably because these stem cells are highly resistant to busulfan and high temperature. However, full sterility is not necessarily required for fish spermatogonial transplantation. In mammals, for instance, recipient preparation methods that remove most but not all endogenous spermatogenesis are more desirable (Brinster et al., 2003) than those that induce full sterility, because studies suggest that cytoablative therapies can cause long-term detrimental effects on somatic and germ cells and can affect the recipient environment (Brinster et al., 2011). Moreover, partial sterilization is not an obstacle for spermatogonial transplantation in fish, as demonstrated by the successful transplantation of donor spermatogonia in several teleost species (Silva et al., 2016; Majhi et al., 2014; Lacerda et al., 2010; Nóbrega et al., 2010; Majhi et al., 2009). The only inconvenient is that surviving spermatogonia can restore endogenous spermatogenesis and compete with transplanted spermatogonia, leading to a diminution in the production of surrogate sperm over time (Shinohara et al., 2002).

Rearing specimens of *P. managuense* at 35°C alone caused the complete removal of spermatocytes, spermatids and sperm, and a gradual decline of spermatogonia, after 21 days of exposition. Similar results were reported in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Siqueira-Silva et al., 2015), suggesting that the spermatogenesis of other fish species could be highly sensitive to temperature changes. In contrast with these results, in *O. hatcheri* and *O. niloticus* thermal therapy alone failed to induce spermatogenesis suppression and the most severe germ cells loss was observed when busulfan injections were accompanied of high temperatures (Nóbrega et al., 2010; Majhi et al., 2009b; Lacerda et al., 2006). Although similar grades of germ cell ablation were observed earlier (day 14) in busulfan-treated fish, the use of high temperature alone represents a better alternative since a practical viewpoint, because it could be used for the massive preparation of *P. managuense* recipients for spermatogonial transplantation, with low manipulation and without the need of using toxic compounds as busulfan, which has shown to be toxic for many cell phenotypes from a variety of animal tissues (Bishop and Wassom, 1986). In addition, our finding could has environmental implications too, as the increased temperatures caused by global warming could disrupt fish reproductive systems, gametogenesis and the endocrine regulation of reproduction in wild populations (Miranda

et al., 2013; Strüssmann et al., 2010). For instance, gonads with partial and total sterilization were found in wild specimens of pejerrey *O. bonariensis* collected in Argentina (Cornejo, 2003; Cornejo 2002), and when the naturally occurring temperatures of this region were simulated in the laboratory, similar alterations were found in this species (Ito et al., 2008b).

In *O. niloticus* and *O. hatcheri* Leydig cells and Sertoli cells were not affected during the process of germ cell suppression (Majhi et al., 2009b; Lacerda et al., 2006). This is a desirable characteristic for spermatogonial transplantation, because settlement, proliferation, and differentiation of spermatogonia depend of the integrity of the somatic machinery to support germ cell development (Brinster et al., 2003; Ogawa et al., 1999). However, in this study, we observed a significant increase in the volume density of Leydig cells when busulfan was present. There are two possible explanations for this finding. The first one is that variation in Leydig cell volume density could be an expression of the social status of *P. managuense* rather than a physiological response to the factors tested. For instance, in the Nile tilapia Pfennig et al. (2012) showed that dominant males have more Leydig cells than the subordinated ones. In our study, some *P. managuense* males showed higher volumes of Leydig cells than others, regardless of the temperature, busulfan dosage or time of sampling. It is possible that every time we sampled a dominant male, the next male in the hierarchy turned into a dominant one, resulting in high counting of Leydig cells. The second hypothesis is related to the testicular balance between germ and somatic cells. In several mammalian species, it has been demonstrated that germ cell ablation can create a physiological unbalance that increase the amount of Leydig cells as well as their biosynthetic capabilities (Rich et al., 1979). The absence of spermatogenic cells seemingly induce to Sertoli cells to secrete a paracrine factor that stimulates Leydig cell proliferation (Wu and Morunu, 1994, Rich et al., 1979). We suggest that the severe germ cell suppression of *P. managuense*'s testes could have caused the Leydig cell hypertrophy. Nevertheless, future studies must be conducted to determine the relationship between germ cell absence and Leydig cell physiology.

In addition to establish an easy and rapid protocol to remove testicular germ cells in *P. managuense* for future studies on spermatogonial transplantation, this study throws some

clues about how high temperatures can affect testicular homeostasis. There are several applications for this finding; the first one is that germ cell ablation using hot water could be a useful tool to study the testicular physiology in absence of germinal cells, and to study how unbalances in somatic machinery influence the recovery of spermatogenesis and germ development after spermatogonial transplantation. Because temperatures peak in southern Mexico during dry season, it would be valuable to study how annual temperature changes affect testicular function in fish, aiming to visualize the possible effects of global warming in native teleost species. As relatively high temperatures have shown significantly accelerate the process of spermatogenesis in many species (Alvarenga y Franca, 2009; Majhi and Rasal, 2014), rearing fish in warm water could shorten the periods of harvesting sperm.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Dr. Sullip Kumar Majhi from the National Bureau of Fish Genetic Resources, India, for its technical advice during a research stay at Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan. Funding for this study was provided by the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco through the project PFI-UJAT-2014-IB-32.

#### **REFERENCES**

AILAD. 2010. Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza. 14 pp.  
[http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo\\_animales.pdf](http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo_animales.pdf)

Alvarenga, É. R., & Franca, L. R. (2009). Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biology of Reproduction*, 80(3), 537-544.

Bishop, J. B., & Wassom, J. S. (1986). Toxicological review of busulfan (Myleran). *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 168, 15-45.

Brinster, C. J., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., Karagenc, L., Brinster, R. L., & Orwig, K.E. (2003). Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biology of Reproduction*, 69, 412-420.

Brinster, R. L., & Zimmermann, J. W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11298-11302.

Contreras-MacBeath, T., Brito-Rodríguez, M., Sorani, V., Goldspink, C., & McGregor-Reid, G. (2014). Richness and endemism of the freshwater fishes of Mexico. *Journal of Threatened Taxa* 6, 5421-5433.

Cornejo, A. M. (2003). Esterilidad en el pejerrey *Odontesthes bonariensis* en ambientes naturales. *Biol Acuát*, 20, 19-26.

Cornejo, A. M. (2002). Anormalidades en gónadas de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinopsidae) en lagunas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Biociências*, 43-56.

Golpour, A., Siddique, M. A. M., Siqueira-Silva, D. H., & Pšenička, M. (2016). Induced sterility in fish and its potential and challenges for aquaculture and germ cell transplantation technology: a review. *Biologia*, 71, 853-864.

González, R., & Dobrinski, I. (2015). Beyond the mouse monopoly: studying the male germ line in domestic animal models. *ILAR Journal*, 56, 83-98.

Ito, L. S., Takahashi, C., Yamashita, M., & Strüssmann, C. A. (2008a). Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes). *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6), 762-774.

Ito, L. S., Cornejo, A. M., Yamashita, M., & Strüssmann, C. A. (2008b). Thermal threshold and histological process of heat-induced sterility in adult pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): a comparative analysis of laboratory and wild specimens. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6), 775-784.

Lacerda, S. M. S. N., Aponte, P. M., Costa, G. M. J., Campos-Junior, P. H. A., Segatelli, T. M., Silva, M. A., & França, L. R. (2012). An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Anim Reprod*, 9(4), 798-808.

Lacerda, S. M., Batlouni, S. R., Costa, G. M., Segatelli, T. M., Quirino, B. R., Queiroz, B. M., ... & França, L. R. (2010). A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. PLoS One, 5(5), e10740.

Lacerda, S. M., Batlouni, S. R., Assis, L.H., Resende, F. M., Campos-Silva, S. M., Campos-Silva, R., et al. (2008). Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Cybium, 32, 115-118.

Lacerda, S.M., Batlouni, S., Silva, S., Homem, C., & França, L. R. (2006). Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. Animal Reproduction, 3, 146-159.

Majhi, S. K., & Rasal, A. R. (2014). Comparative elevation in water temperature induces somatic growth and rapid proliferation of gonadal germ cells in three species of carp. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14, 739-748.

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Rahman, S. M., & Strüssmann, C. A. (2014). Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. PLoS one. 2014, 9:e95294.

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Yokota, M., Watanabe, S., & Strüssmann, C. A. (2009a). Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. PLoS One, 4(7), e6132.

Majhi, S. K., Hattori, R. S., Rahman, S. M., Suzuki, T., & Strüssmann, C. A. (2009b). Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). Theriogenology, 71(7), 1162-1172.

Miranda, L. A., Chalde, T., Elisio, M., & Strüssmann, C. A. (2013). Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. General and Comparative Endocrinology, 192, 45-54.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., Van De Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., & Schulz, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. PLoS One, 5:e12808.

Ogawa, T., Dobrinski, I., & Brinster, R. L. (1999). Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue and Cell*, 31, 461-472.

Pacchiarini, T., Olague, E., Sarasquete, C., & Cabrita, E. (2014). Busulfan administration produces sublethal effects on somatic tissues and inhibits gametogenesis in Senegalese sole juveniles. *Histology and Histopathology*, 29, 619-628.

Pérez-Sánchez, E., & Páramo-Delgado, S. (2008). The culture of cichlids of southeastern Mexico. *Aquaculture Research*, 39(7), 777-783.

Pfennig, F., Kurth, T., Meißner, S., Standke, A., Hoppe, M., Zieschang, F., et al. (2012). The social status of the male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) influences testis structure and gene expression. *Reproduction*, 143, 71-84.

Rich, K. A., Kerr, J. B., & de Kretser, D. M. (1979). Evidence for Leydig cell dysfunction in rats with seminiferous tubule damage. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 13, 123-135.

Schulz, R. W., De França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411.

Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2002). Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1491-1497.

Silva, M., Costa, G., Lacerda, S. M., Brandão-Dias, P., Kalapothakis, E., Júnior, A.S., et al. (2016). Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *General and Comparative Endocrinology*, 230, 48-56.

Siqueira-Silva, D. H., dos Santos Silva, A. P., Ninhaus-Silveira, A., & Veríssimo-Silveira, R. (2015). The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. *Theriogenology*, 84(6), 1033-1042.

Strüssmann, C. A., Conover, D., Somoza, G., & Miranda, L. (2010). Implications of climate change for the reproductive capacity and survival of New World silversides (family Atherinopsidae). *Journal of Fish Biology*, 77, 1818-1834.

Strüssmann, C. A., Saito, T., & Takashima, F. (1998). Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119, 637-644.

Sundberg, M. (1992). An Introduction to stereological analysis: morphometric techniques for beginning biologists. Pp: 51-72. Paper presented at the Proceedings of the 6<sup>o</sup> Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). Canada, University of Newfoundland.

Vilela, D. A. R., Silva, S. G. B., Peixoto, M. T. D., Godinho, H. P., & França, L. R. (2003). Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 187-190.

Weibel, E. R., Kistler, G. S., & Scherle, W. F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *The Journal of Cell Biology*, 30, 23-38.

Wu, N., & Murolo, E. P. (1996). Temperature and germ cell regulation of Leydig cell proliferation stimulated by Sertoli cell-secreted mitogenic factor: a possible role in cryptorchidism. *Andrologia*, 28, 247-257.

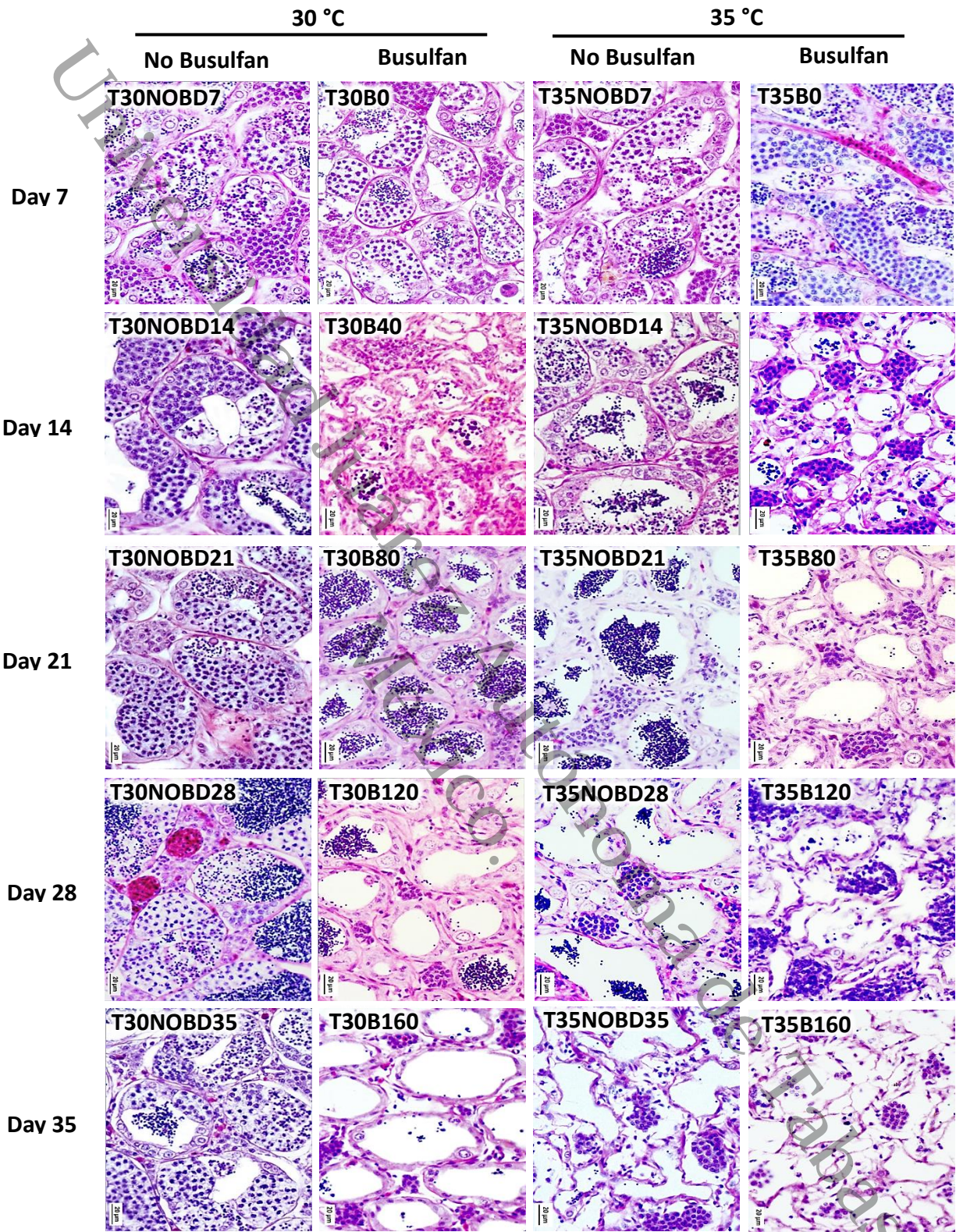
Zheng, Y., Zhang, Y., Qu, R., He, Y., Tian, X., & Zeng, W. (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 147(3), R65-R74.



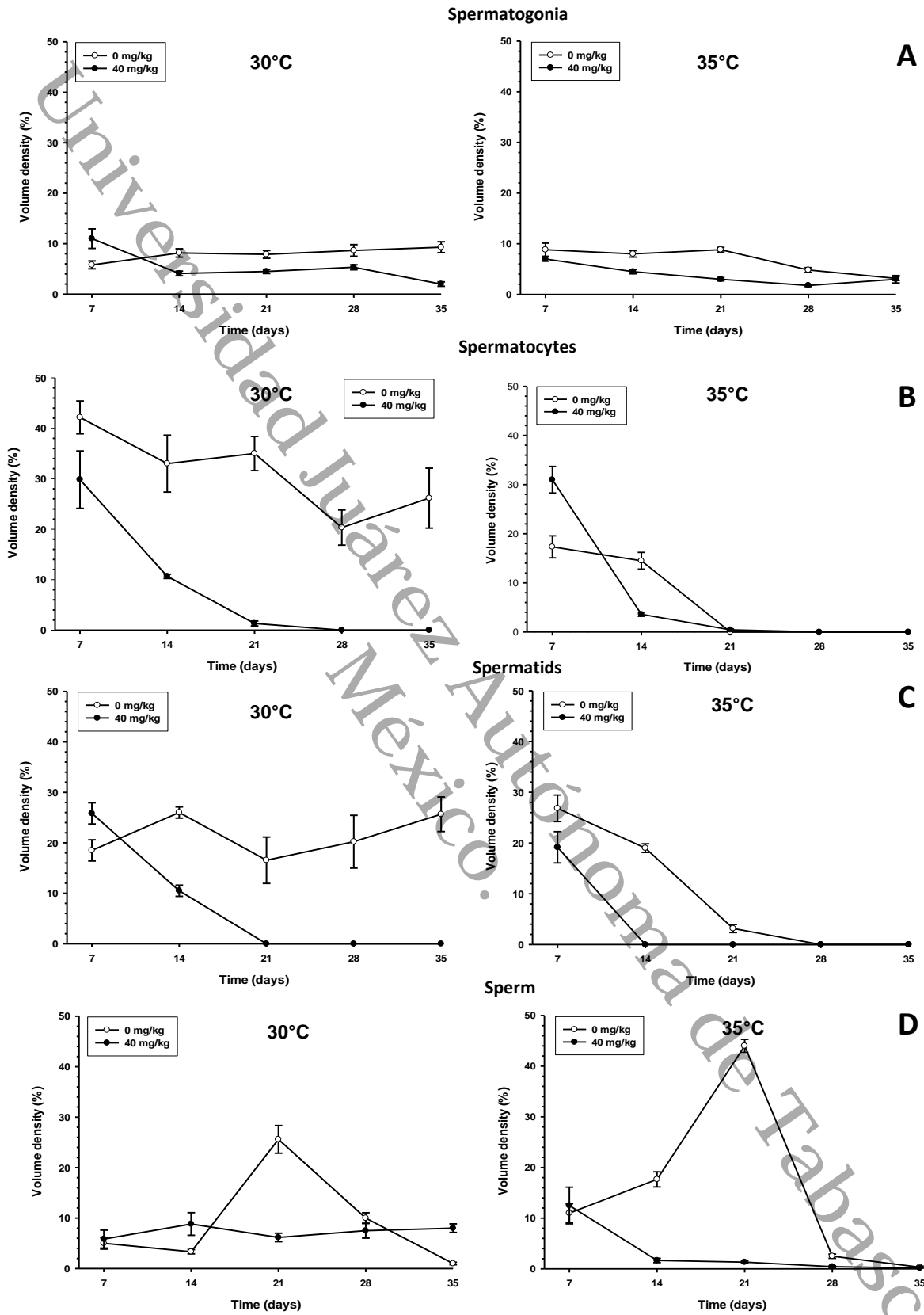
## ANEXOS (TABLA Y FIGURAS)

**TABLE 1.** Schematic representation of the experimental design (-) Fish that had not received busulfan and (\*) fish that received busulfan (40 mg/kg) the prior week. The remaining fish in these treatments accumulated a dose every week.

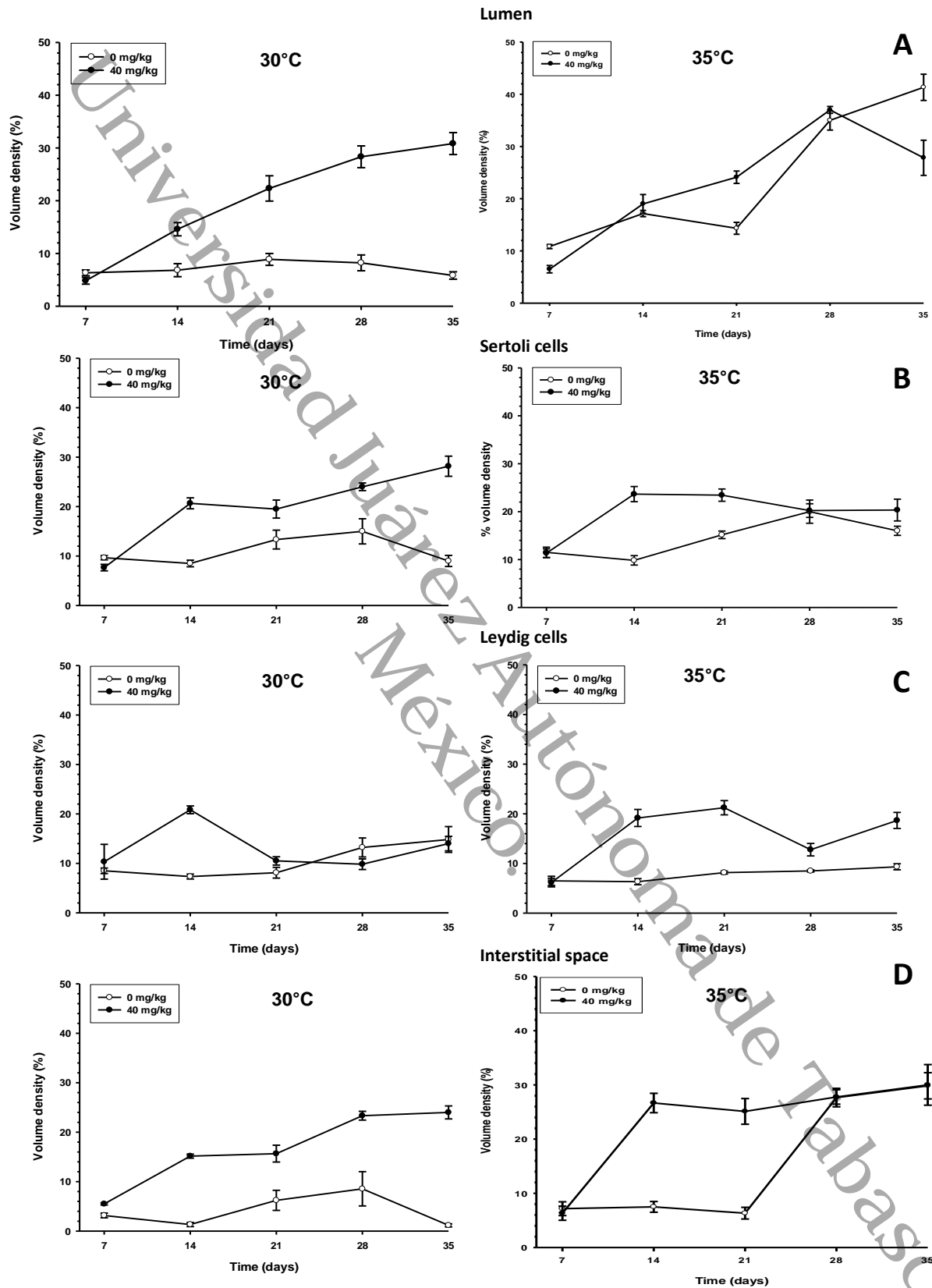
Temperature (°C)	Busulfan	Time and Dosing (days)	Treatment code
30	NO (CONTROL)	7 -	T30NOBD7
		14 -	T30NOBD14
		21 -	T30NOBD21
		28 -	T30NOBD28
		35 -	T30NOBD35
	YES	7 -	T30B0
		14 *	T30B40
		21 *	T30B80
		28 *	T30B120
		35 *	T30B160
35	NO	7 -	T35NOBD7
		14 -	T35NOBD14
		21 -	T35NOBD21
		28 -	T35NOBD28
		35 -	T35NOBD35
	YES	7 -	T35B0
		14 *	T35B40
		21 *	T35B80
		28 *	T35B120
		35 *	T35B160



**Figure 1.** Seminiferous lobules of sexually mature *P. managuense* specimens from different treatments (see figure 1 for the nomenclature of treatments). Fish were reared during 35 days and sampled at days 7, 14, 21, 28, and 35 after the start of the experiment. From day 28, spermatogenesis was severely depleted in all treatments, except when fish did not received busulfan injections and were kept at 30°C; in this specimens spermatogenesis and testicular structure remained unchanged.



**Figure 2.** Interaction graphs for the mean volume density of spermatogonia (A), spermatocytes (B), spermatids (C), and sperm (D) in fish exposed to two busulfan doses (0 and 40 mg/kg/bw) and reared under two different thermal regimes (30 and 35°C) during a period of 35 days.

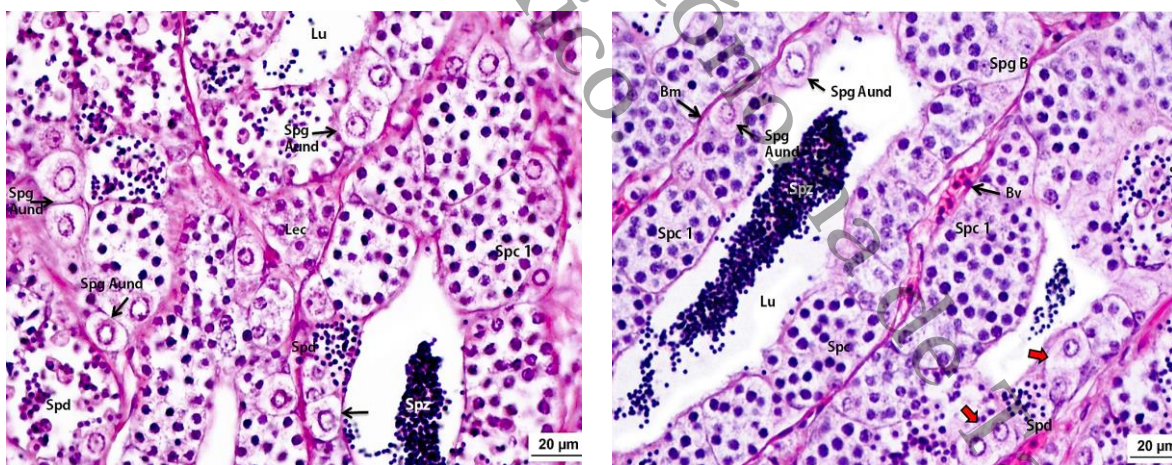


**Figure 3.** Interaction graphs for the mean volume density of lumen (A), Sertoli cells (B), Leydig cells (C), and interstitium (D) in fish exposed to two busulfan doses (0 and 40 mg/kg/bw) and reared under two different thermal regimes (30 and 35°C) during a period of 35 days.

### CAPÍTULO III

#### Caracterización morfológica de las espermatogonias de *P. splendida*.

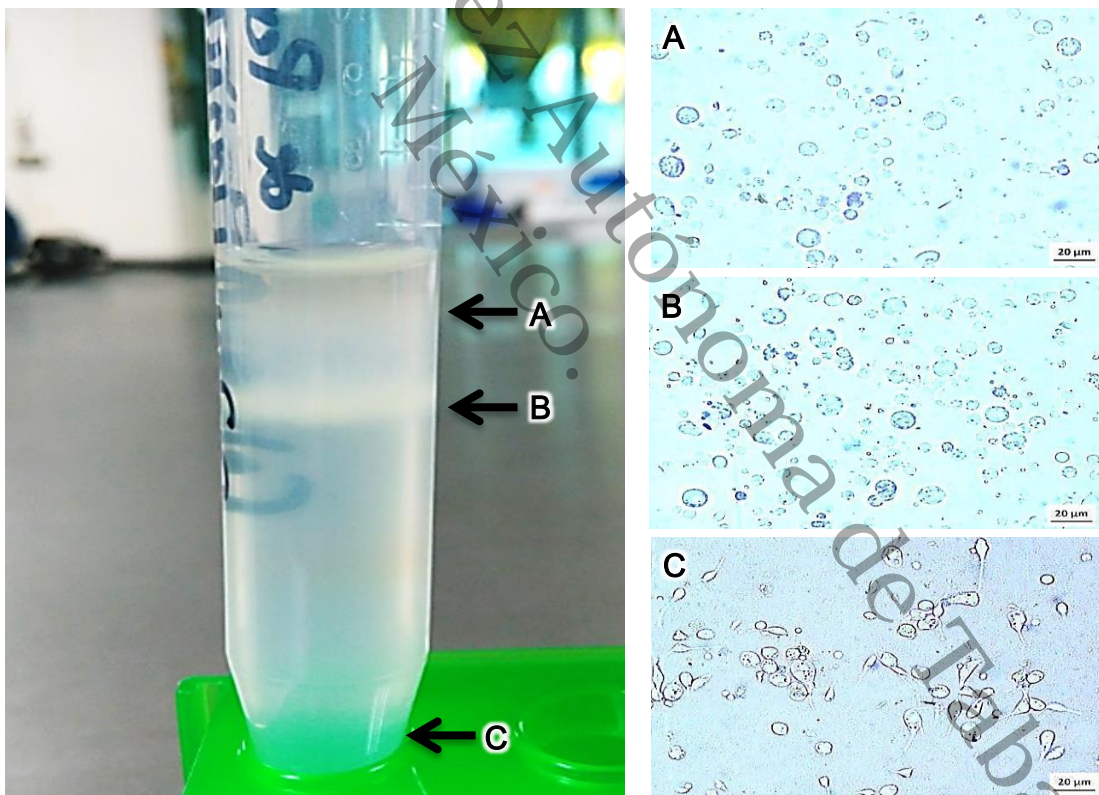
Dada la ausencia de marcadores moleculares para identificar las espermatogonias Aund de *P. splendida*, dichas células fueron identificadas mediante criterios morfológicos usados para identificar estas células en otras especies de teleósteos, principalmente en el pez cebra *Danio rerio* (Schulz et al., 2010; Nóbrega et al., 2010). Las espermatogonias Aund de *P. splendida* representan la sub población de espermatogonias con mayor tamaño ( $16.05 \pm 2.32 \mu\text{m}$ ), las cuales tienen una morfología que va de esférica a ovoide y núcleo redondo con abundante eucromatina y un solo nucléolo (Fig. 1A,B). Estas células se dividen activamente por mitosis y crean nidos celulares en el epitelio germinal. Se les encuentra estrechamente asociadas con la membrana basal de los lóbulos seminíferos y con la vasculatura intersticial del testículo (Fig. 1B), similar a lo reportado en mamíferos (Chiarini-García et al., 2011; Yoshida et al., 2007). Dada la condición no restringida del testículo de *P. splendida*, las espermatogonias Aund se encuentran distribuidas a lo largo de los lóbulos seminíferos, como la mayoría de los teleósteos que presentan esta condición (Uribe et al., 2014).



**Figura 1.** Espermatogonias A indiferenciadas (Spg Aund) en el testículo de *P. splendida*, las cuales se aislaron mediante gradiente de Percoll. **A.** Las Spg Aund son células ovoideas con citoplasma hialino y núcleo eucromático. También se observan espermatocitos primarios (Spc 1), espermatidas (Spd), espermatozoides (Spz), lumen (Lu) y células de Leydig (Lec). H-E. 400X. **B.** Sección longitudinal de testículo de *P. splendida*. Espermatogonias Aund (Spg Aund) en interfase. La presencia de Spg Aund en proceso de citocinesis indica que dichas células se dividen continuamente mediante mitosis (flechas rojas) para generar precursores para la espermatogénesis. Las espermatogonias Aund se encuentran asociadas a la membrana basal (Bm) de los lóbulos seminíferos y a los vasos sanguíneos (Bv) en el compartimento intersticial. Se observan también algunas espermatogonias B (Spg B), espermatocitos primarios y secundarios (Spc), espermatidas (Spd). En el lumen de los lóbulos seminíferos (Lu) se observan numerosos espermatozoides (Spz). H-E. 400X.

## Aislamiento de las espermatogonias de *P. splendida* con gradiente de Percoll

La doble digestión enzimática de los testículos seguida de la separación de la suspensión de células testiculares en un gradiente de Percoll mostró ser un método eficaz para el aislamiento de las espermatogonias de *P. splendida* (Fig. 2) Las espermatogonias Aund se observaron como células redondeadas de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ , tal como se observó en las secciones histológicas de *P. splendida*. A pesar de que en las bandas superiores aparecieron también otros tipos de células espermatogénicas, el componente principal fueron las espermatogonias Aund (Fig. 2A,B). La dilución de una muestra de suspensión celular en azul de tripano al 0.4% (1:1) seguida de su cuantificación con un hemocitómetro arrojó un conteo de 500,000 células por mililitro y una viabilidad de 97.29%. A partir de estos resultados se concluye que este método permite el aislamiento de una gran cantidad de espermatogonias con un porcentaje muy alto de viabilidad.



**Figura 2.** Suspensión de las células germinales de *P. splendida* en gradiente de Percoll. En el tubo se observa la presencia de tres diferentes bandas, las cuales se aislaron para determinar su número y porcentaje de viabilidad. Las bandas superiores (A, B) contienen una gran cantidad de espermatogonias y algunos espermatocitos, entre ellas Aund, mientras que la banda inferior (C) se encuentra constituida principalmente por espermatozoides.

## LITERATURA CITADA

Chiarini-Garcia, H., Hornick, J. R., Griswold, M. D., & Russell, L. D. (2001). Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biology of Reproduction*, 65(4), 1179-1185.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., Van De Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., & Schulz, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *Plos One*, 5(9), 1-16.

Schulz, R. W., De França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411.

Uribe, M. C., Grier, H. J., & Mejía-Roa, V. (2014). Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*, 4(3), e983400.

Yoshida, S., Sukeno, M., & Nabeshima, Y. I. (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*, 317(5845), 1722-1726.