UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Fisiología y Microestructura de los Espermatozoides del Pochitoque Tropical *Kinosternon leucostomum*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

JESÚS EMMANUEL JIMÉNEZ JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

LENIN ARIAS RODRIGUEZ

VILLAHERMOSA, TABASCO, MÉXICO **MAYO, 2022**

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Fisiología y Microestructura de los Espermatozoides del Pochitoque Tropical Kinosternon leucostomum

Por Jesus Emmanuel Jimenez

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

CANTIDAD DE PALABRAS 19007
HORA DE ENTREGA 26-JUN-2025 01:32P. M.
NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO 116937181

Fisiología y Microestructura de los Espermatozoides del Pochitoque Tropical Kinosternon leucostomum

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.revistas.una.ac.cr Internet	85 palabras — 1%
2	es.scribd.com Internet	76 palabras — < 1%
3	archivos.ujat.mx Internet	32 palabras — < 1%
4	conacento.com.mx Internet	21 palabras — < 1%
5	Kováčik, Jozef, and Bořivoj Klejdus. "Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition", Food Chemistry, 2014. Crossref	19 palabras — < 1%
6	es.wikipedia.org Internet	19 palabras — < 1%
7	1library.co Internet	18 palabras — < 1%
8	transparencia.ujat.mx Internet	18 palabras — < 1%
	repositorio.upch.edu.pe	

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

9	Internet	17 palabras — < 1%
10	www.coursehero.com Internet	17 palabras — < 1%
11	core.ac.uk Internet	16 palabras — < 1%
12	libstore.ugent.be Internet	16 palabras — < 1%
13	www.elacuario.net Internet	15 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS	ACTIVADO	EXCLUIR FUENTES	DESACTIVADO
EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA	ACTIVADO	EXCLUIR COINCIDENCIAS	< 15 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

MAYO 12 DE 2022

C. JESÚS EMMANUEL JIMÉNEZ JIMÉNEZ
PAS. DE LA LIC. EN BIOLOGIA
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 denominado: **"FISIOLOGÍA Y MICROESTRUCTURA DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL POCHITOQUE TROPICAL *Kinosternon leucostomun*"**, asesorado por el Dr. Lenin Arias Rodríguez, sobre el cual sustentará su Examen Profesional, cuyo jurado está integrado por la Dra. Julia María Lesher Gordillo, Dra. Claudia Elena Zenteno Ruiz, Dr. Lenin Arias Rodríguez, Dr. Ulises Hernández Vidal y Dr. Leonardo Cruz Rosado.

A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

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

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

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 Licenciatura denominado: **"FISIOLOGÍA Y MICROESTRUCTURA DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL POCHITOQUE TROPICAL *Kinosternon leucostomun*"**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

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

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

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 12 de Mayo de Dos Mil Veintidós.

AUTORIZO

JESÚS EMMANUEL JIMÉNEZ JIMÉNEZ

DEDICATORIA

A mis padres, **Natanael** *y* **Candelaria**, *quienes son mis ideales. Ellos me brindan apoyo incondicional, sabiduría y sobre todo, amor.* **Mamá**, *gracias por estar cada madrugada en el portal de nuestra casa, esperando a que mi silueta desapareciera en la neblina.* **Papá**, *gracias por tus lecciones, las cuales han forjado carácter en mi persona y que sin duda, me han ayudado a seguir adelante.*

A mis hermanos, **Verónica**, **Luis** *y* **Natalia**, *que de una u otra forma, me ayudaron para que continuara estudiando.*
A mi **Lola**, *mi tierna viejita, quien me ayudó en innumerables ocasiones durante esta licenciatura, aprecio los gestos de amor y apoyo que haces por mí, por nosotros.*

Agáta, *you appeared at a difficult time in my life, your presence meant the infletion point I needed. Although we are separated by an ocean, "one day in the near future, we will be together and complete". Thank you Pomeranč ik*

El esfuerzo empleado en la realización de esta tesis, es mínimo si se compara con los sacrificios interminables que mi familia realiza día a día, por ello tomo las palabras de un Maestro y les digo…

Gracias totales

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

AGRADECIMIENTOS

A mi directo de Tesis, el **Dr. Lenin Arias Rodriguez**, quien abrió las puertas del Laboratorio a su cargo para que elaborara el presente estudio. Hiciste que descubriera habilidades que no sabía que tenía, gracias por brindarme tus conocimientos, tu paciencia y tu tiempo. Más que mi asesor, lo considero mi amigo.

Al estudiante de doctorado, **Javier Hernández Guzmán** y a la estudiante de maestría **Adriana Osorio Pérez**, quienes me dieron su amistad y ayuda. Gracias por sus consejos.

Al **Dr. Robert Černý** y a la estudiante de doctorado **Agáta Horácková**, por el apoyo para la realización de esta Tesis, ambos de la **Universidad de Charles en Praga, República Checa**.

Al **Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco (CCYTET)**, por el apoyo recibido mediante la convocatoria: **Apoyo a la actividad académica de los recursos humanos para la ciencia y la tecnología 2022**.

"Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes"

-Isaac Newton

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Próxima estación mucho más allá del Sol,
convoy espacial, ¿Qué tan lejos nos llevará?
-Gustavo Cerati

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE

CONTENIDOS	Pág
I.- INTRODUCCIÓN……	1
II.- ANTECEDENTES…….	2
2.1.-Tortugas Nativas de Tabasco…….	2
2.1.1.- Generalidades de los Kinostérnidos Nativos de Tabasco…….....	3
2.1.2.- El Pochitoque Tropical *K. leucostomum*…….	3
2.1.3.- El Pochitoque Jaguactero *K. acutum*…….....	6
2.1.4.- El Pochitoque escorpión *K. scorpioides*…….....	6
2.1.5.- El Taimán o Joloca *C. angustatus*……..	7
2.1.6.- El Guao Tres Lomos *S. triporcatus*…….....	8
2.2.- Reproducción Sexual en Vertebrados……...	9
2.3.- La Gametogénesis y Microestructura Espermática en Vertebrados…….	11
2.4.- La Calidad Espermática……	18
2.5.- Parámetros para Evaluar la Calidad Espermática…….	18
2.5.1.- Motilidad Espermática…….....	19
2.5.2.- Viabilidad Espermática……..…….	19
2.5.3.- Concentración espermática……..……...…	20
2.5.4.- Morfología Espermática…….	20
2.5.5.- Sistemas Computacionales…….	20
2.5.6.- Evaluación de la Calidad Espermática y Microestructuras en Tortugas.……	21
III.- JUSTIFICACIÓN…….	22
IV.- OBJETIVOS…...……	25
4.1.- Objetivo General……...	25
4.2.- Objetivos Específicos……	25
V.- MATERIALES Y MÉTODOS……...	26
5.1.- Recolecta, Mantenimiento de los Especímenes y Procedimiento Ético……	26
5.2.- Estimulación de la Espermiación y Recolecta de Semen……..……..	26
5.3.- Análisis Microscópico de la Calidad Espermática…….	26
5.4.- Fijado y Conteo de Células Espermáticas en *K. leucostomum*……	27
5.5.- Observación y Evaluación Morfométrica de las Microestructuras de los espermatozoides de *K. leucostomum* por Microscopia Óptica y Tinción con Giemsa…..	29
5.6.- Observación de Microestructuras Espermática de *K. leucostomum* por Microscopia de Inmunofluorescencia…….	29
5.7.- Microestructura Espermática por Microscopia Electrónica de Barrido (M.E.B)…..	30
5.8.- Determinación del Contenido de ADN Nuclear y Tamaño del Genoma……	31
5.9.- Análisis Estadístico de los Datos……..…..…….	32

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

VI.-RESULTADOS..... 33
6.1.- Fisiología de la Activación Espermática..... 33
6.2.- Biometrías de las Microestructuras y Tamaño del Genoma Espermático 34

VII.- DISCUSIÓN 57

VIII.- CONCLUSIONES..... 62

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 63

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

I.- INTRODUCCIÓN

Actualmente en Tabasco, se cuenta con 106 especies de reptiles registradas, incluidas en 73 géneros y 26 familias (Barragán-Vázquez *et al*. 2019). En el particular caso de las tortugas de agua dulce, se ha reportado la distribución de nueve especies; la tortuga blanca *Dermatemys mawii*, la hicotea *Trachemys venusta*, el guao *Staurotypus triporcatus*, el chiquiguo *Chelydra rossignoni*, el taimán *Claudius angustatus*, la mojína *Rhinoclemmys areolata*. Así también, tres especies de la subfamilia kinosterninae como son los pochitoques tropicales *K. scorpioides*, *K. leucostomum* y *K. acutum* (Hernández-Guzmán & Arias-Rodriguez, 2019). Desde tiempos prehispánicos y hasta la actualidad, las tortugas en Tabasco han sido un elemento muy importante en el ámbito cultural, gastronómico y religioso (Beauregard-Solís *et al*. 2010). Sin embargo, la perdida de diversidad, un problema ambiental severo, derivado de las actividades antropogénicas (Ceballos *et al*. 2017); está afectando a las poblaciones de tortugas en la entidad, aunado a la fragmentación de hábitats, la contaminación de los cuerpos de agua y la captura en temporadas de anidamiento han afectado a las poblaciones silvestres (Beauregard-Solís *et al*. 2010), tales acciones conducirán al citado grupo taxonómico a la extinción local, pues las nueve especies nativas del estado están catalogadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059 de la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2010). Así mismo, la carencia de estudios de biología y ecología básica en las tortugas dulceacuícolas nativas del estado, están vulnerando las oportunidades para desarrollar proyectos que permitan la conservación de estas especies, mediante el empleo de herramientas de reproducción asistida. Por ello, para apoyar programas de conservación en las tortugas dulceacuícolas de México, es necesario realizar estudios específicos de reproducción, ya que en el pasado solo se han abordado temas acerca de la distribución geográfica, evaluaciones taxonómicas y estudios culturales (Hernández-Guzmán *et al*. 2014). Por lo anterior, la caracterización fisiológica basada en la actividad espermática, tipo de movimiento, tiempo de motilidad, numero de células espermáticas y el discernimiento microestructural de los espermatozoides de la tortuga dulceacuícola *K. leucostomum*, ampliará el conocimiento reproductivo y celular como base para apoyar la reproducción asistida y la fertilización *"In vitro"* en la especie. Así también, para el establecimiento de las bases metodológicas para su empleo en bancos de germoplasma, que puedan garantizar la conservación temporal y criopreservación espermática.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

II.- ANTECEDENTES

2.1.-Tortugas Nativas de Tabasco

Localizado en la región sureste del territorio mexicano, Tabasco se encuentra en la franja intertropical, por consiguiente, el suelo ostenta características propias a dicho ambiente (Palma-López, 2019). El clima cálido húmedo, debido a dicha influencia tropical, provoca abundantes lluvias durante 10 meses (Aceves-Navarro & Rivera-Hernández, 2019). Aunado a esto, el territorio tabasqueño tiene la red hidrológica más compleja del país; la presencia de los dos ríos más caudalosos de México, Usumacinta y Grijalva, originan las precipitaciones características del estado (López-Castañeda & Zavala-Cruz, 2019). Tales factores, actúan en forma de sinergias y permiten que en el estado, se dé variedad de humedales. De esta manera, los ambientes acuáticos y semiacuáticos, junto con la vegetación asociada a ellos, albergan especies distintivas de fauna, entre ellas las tortugas dulceacuícolas tropicales. De acuerdo a Ippi y Flores, (2001), Tabasco se encuentra ubicado en el área de endemismo de tortugas neotropicales, perteneciente a la región del Golfo de México. Así pues, en el territorio tabasqueño, se distribuyen nueve especies de tortugas dulceacuícolas, clasificadas en cinco familias (**Tabla 1)** (Barragán-Vázquez *et al*. 2019).

Tabla 1. Listado de nueve especies de tortugas dulceacuícolas nativas del estado de Tabasco.

Nombre	Familia
Kinosternon leucostomum	Kinosternidae
Kinosternon acutum	Kinosternidae
Kinosternon scorpioides	Kinosternidae
Claudius angustatus	Kinosternidae
Staurotypus triporcatus	Kinosternidae
Chelydra rossignoni	Chelydridae
Trachemys Scripta	Emydidae
Rhinoclemmys areolata	Geoemydidae
Dermatemys mawii	Dermatemydidae

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

2.1.1.- Generalidades de los Kinostérnidos Nativos de Tabasco

2.1.2.- El Pochitoque Tropical *K. leucostomum*

El pochitoque tropical o tortuga tropical (**Fig. 1)**, es de talla mediana dentro del género *Kinosternon* (**Tabla 2)**. El caparazón mide hasta 175 mm y 165 mm de longitud en machos y hembras respectivamente (Berry & Iverson, 2001[a]). El caparazón es unicarenado, a excepción de los individuos adultos, cuyo caparazón es liso (Berry & Iverson, 2001[a]; Rueda-Almonacid *et al*. 2007) y el color de este varía, ya sea marrón a negro (Berry & Iverson, 2001[a]). El plastron tiene dos lóbulos en forma de "bisagras", es decir, cinéticos, típicos del género, ubicados en la parte anterior y posterior del mismo; la coloración varia de amarillo a marrón con cisuras en negro (Berry & Iverson, 2001[a]). Este pochitoque es omnívoro, se alimenta de semillas y frutas; aunque, sus tendencias se inclinan hacia alimentos de origen animal (insectos y renacuajos) (Rueda-Almonacid *et al*. 2007; Vogt & Guzman-Guzman, 1988). En relación con la reproducción, Zenteno-Ruiz *et al*. (2001), mencionan que en Tabasco, esta especie inicia su ciclo reproductivo en septiembre y termina en diciembre. Actualmente, se sabe que los embriones exhiben diapausa (Ewert, 1991) y el sexo, es determinado por la temperatura (Vogt & Flores-Villela, 1992). Cabe señalar que la actividad de este pochitoque es influenciada por la temperatura, ya que realiza un periodo de estivación (inactividad durante la época de seca); cava la tierra o la hojarasca y permanece allí; aunque esto varía entre poblaciones (Morales-Verdeja & Vogt, 1997). Estudios citogenéticos recientes en el estado tabasqueño, indican que este pochitoque tiene número modal diploide 2n=56 cromosomas y modal haploide de 1n=28 cromosomas (Hernández-Guzmán *et al*. 2014, 2015).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *K. leucostomum.*

Reino: Animalia

Filo: Cordata

Subfilo: Vertebrata

Clase: Reptilia

Orden: Testudines

Suborden: Cryptodira

Super familia: Kinosternoidea

Familia: Kinosternidae

Género: *Kinosternon*

Nombre científico: *K. leucostomum* Duméril y Bibron, 1851

Nombre vernácular: Pochitoque tropical, White-lipped Mud Turtle

(Turtle Taxonomy Working Group, 2021)

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Fig. 1. Especímenes adultos macho (**A**) y hembra (**B**) del pochitoque tropical *K. leucostomum*. ***Imágenes originales por el autor: JEJJ.***

2.1.3.- El Pochitoque Jaguactero *K. acutum*

El pochitoque jaguactero, como es conocido en Tabasco, es el más pequeño de los pochitoques de la región, tiene caparazón que llega a medir de 105 a 120 mm de longitud, en los machos y hembras respectivamente (Iverson & Vogt, 2011). El caparazón es unicarenado, aunque suele haber adultos con presencia de un par de quillas laterales, la coloración varía de marrón claro a oscuro (Iverson & Vogt, 2011). El plastrón presenta los típicos lóbulos en forma de "bisagras"; en color es amarillento a café claro (Iverson & Vogt, 2011). La alimentación de la especie citada, consiste principalmente de insectos y caracoles (Iverson & Vogt, 2011). Respecto al dimorfismo sexual, los machos presentan la cola más larga y gruesa, a pesar de ello, las hembras son más grandes (Iverson & Vogt, 2011). En el estado de Veracruz, este pochitoque inicia el ciclo reproductivo en septiembre y termina en marzo; desovan dos a cuatro veces por año; con dos a tres huevos por puesta (Iverson & Vogt, 2011). Los embriones exhiben diapausa (Ewert, 1991); y hasta la fecha, se sabe que el sexo es determinado por la temperatura (Legler & Vogt, 2013). Similar a otras especies de tortugas, este kinostérnido estiva entre la hojarasca desde abril hasta agosto (Iverson & Vogt, 2011).

2.1.4.- El Pochitoque escorpión *K. scorpioides*

El pochitoque escorpión, es una tortuga dulceacuícola de talla mediana dentro del género (Berry & Iverson, 2001[b], 2011). Los especímenes tienen el caparazón oval y presenta tres quillas longitudinales (Berry & Iverson, 2011; Rueda-Almonacid *et al*. 2007). En algunas poblaciones, el caparazón de los machos mide 200 mm aproximadamente; mientras que, en las hembras, hay registros de hasta 180 mm de longitud (Berry & Iverson, 2001[b]); la coloración del caparazón es variable, ya sea olivo, marrón o negro (Berry & Iverson, 2001[b], 2011). El plastron, presenta lóbulos en forma de "bisagra", siendo el lóbulo anterior más móvil que el posterior; la coloración puede ser amarillenta a marrón (Berry & Iverson, 2011). Es carnívoro, se alimenta de insectos, caracoles, renacuajos y carne de mamíferos; seguramente por carroña (Berry & Iverson, 2011; Rueda-Almonacid *et al*. 2007). En relación al dimorfismo sexual, los machos adultos tienen cola más larga y prensil; adornadas con protuberancias en forma de espinas (Berry & Iverson, 2011). Durante la temporada reproductiva, los machos muerden las patas traseras de las hembras o la cola a modo de cortejo (Berry & Iverson, 2011).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Por otro lado Iverson, (2010) indica que la subespecie *K. scorpioides cruentatum,* inicia el ciclo reproductivo en agosto y termina en junio; realizan dos a cuatro puestas por año; con dos a tres huevos. De acuerdo a Ewert, (1991, 2004) e Iverson, (2010) los embriones exhiben diapausa. Conforme a Teska, (1976), este pochitoque, excava la tierra y la hojarasca para permanecer en un estado "semidurmiente"; puede permanecer enterrado hasta 95 hrs o bien, busca cuerpos de agua cercanos y permanece sumergido hasta 25 hrs. Killebrew, (1975) establece que, las subespecies; *K. scorpioides cruentatum* y *K. scorpioides scorpioides* tienen número modal diploide de 2n=54 cromosomas.

2.1.5.- El Taimán o Joloca *C. angustatus*

La tortuga tropical dulceacuícola conocida como taimán o joloca, es la más pequeña de la subfamilia Staurotipinae (Legler & Vogt, 2013). El caparazón mide en promedio 150 mm y 165 mm de longitud en hembras y machos respetivamente. El caparazón es tricarenado (Iverson & Berry, 1980); aunque estas quillas desaparecen cuando son adultos (Zenteno-Ruiz *et al*. 2001). El color varía en un gradiente marrón de claro-oscuro (Iverson & Berry, 1980). La característica más evidente de dicha especie, se observa en el puente y el plastron, pues son muy reducidos sí se compara con otros kinostérnidos (Legler & Vogt, 2013). El plastrón exhibe color amarillento; y carece de las bisagras que poseen los pochitoques (Iverson & Berry, 1980). La cabeza del taimán es grande, sí se compara con el resto del cuerpo (Legler & Vogt, 2013); presenta tonalidades amarillentas en las regiones laterales del cuello y puede estar moteada con puntos negros (Zenteno-Ruiz *et al*. 2001).

El taimán es carnívoro, sus mandíbulas prominentemente curvas, en forma de gancho les permite alimentarse de pequeños crustáceos o coleópteros (Zenteno-Ruiz *et al*. 2001). En relación al dimorfismo sexual, los machos poseen un parche de escamas tuberculadas en la parte inferior de los muslos traseros (Zenteno-Ruiz *et al.* 2001). Los machos, tienen la cola más larga, gruesa y prensil, adornada de dos hileras de protuberancias en forma de espinas en la región dorsal (Iverson & Berry, 1980). Llega a la madurez sexual a los 89-98 mm de longitud de caparazón, hembras y machos respectivamente. La temporada de anidación ocurre a partir de noviembre a febrero (Flores-Villela & Zug, 1995), mientras la incubación se estima entre 95 a 265 días bajo condiciones controladas (Vogt & Flores-Villela, 1992). De acuerdo con los autores Flores-Villela & Zug, (1995); Vogt & Flores-Villela, (1986), los embriones exhiben diapausa; mientras que el sexo es

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

determinado genéticamente (Vogt & Flores-Villela, 1986, 1992). Zenteno-Ruiz *et al*. (2001) señalan que, en Tabasco, estivan desde marzo y emergen hasta que las lluvias inunden los pantanos. Por otro lado, citogenéticamente, el taimán, tiene número modal diploide 2n=54 cromosomas. (Killebrew, 1975).

2.1.6.- El Guao Tres Lomos *S. triporcatus*

La tortuga dulceacuícola llamada localmente guao tres lomos, pertenece a la subfamilia Staurotipinae y es el kinostérnido más grande; la talla y peso máximo son de al menos 400 mm de longitud y 10 kg de peso (Legler & Vogt, 2013). De forma oval, el caparazón está evidentemente tricarenado y presenta coloración que va de gris a marrón oscuro (Legler & Vogt, 2013). El plastron, al igual que el taimán, es cruciforme (Legler & Vogt, 2013); el lóbulo plastral anterior presenta una "bisagra" débilmente cinética; y la coloración es amarillenta (Iverson, 1983). La cabeza que es de color negro, está moteada con machas blancas (Zenteno-Ruiz *et al*. 2001). Está altamente especializado en él consumo de moluscos, no obstante, esto puede cambiar si estos están ausentes, ya que puede alimentarse de semillas y frutas (Vogt & Guzman-Guzman, 1988). En relación al dimorfismo sexual, los machos, presentan la cola más larga con respecto a las hembras (Iverson, 1983). Sin embargo, las hembras tienden a ser más grandes (Legler & Vogt, 2013).

Los machos exhiben parches bien definidos de escamas tuberculadas en la parte inferior de los muslos, estas le permiten abrazar a las hembras durante la copula (Legler & Vogt, 2013). Alcanzan la madurez sexual cuando los machos alcanzan 220 mm y las hembras 180 mm de longitud (Legler & Vogt, 2013). En Tabasco, el periodo de anidación inicia en agosto y termina en marzo (Zenteno-Ruiz *et al*. 2001). Cabe señalar que, los embriones de esta especie presentan diapausa (Ewert, 1991); mientras que el sexo, es determinado genéticamente, es decir, la temperatura no influye en ellos (Vogt & Flores-Villela, 1986, 1992; Zenteno-Ruiz *et al*. 2001). Durante la temporada de sequía en México, esta especie entra en periodo de estivación (Legler & Vogt, 2013). Estudios citogenéticos, indican que el número modal diploide de *S. triporcatus* es de 2n=54 cromosomas (Hernández-Guzmán *et al.* 2014; Killebrew, 1975).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

2.2.- Reproducción Sexual en Vertebrados

Una característica fisiológica afín, a todos los organismos vivos, es la capacidad de reproducirse; este proceso asegura la continuidad de las especies mediante la formación de nuevos individuos (Blüm, 1986; Curtis *et al.* 2016). En los vertebrados, el patrón de reproducción común es el sexual. Uno de los aspectos importantes de la reproducción sexual, es la recombinación y reducción del material genético, es decir, el genoma parental que se encuentra en cada individuo, se recombina para producir células sexuales especializadas, mismas contienen la mitad del complemento cromosómico con respecto las células somáticas (Lombardi, 1998). Por lo tanto, la reproducción sexual implica la unión del gameto masculino y femenino (Blüm, 1986).

En vertebrados, se describen dos tipos de apareamiento durante la reproducción sexual, la poligamia y la monogamia. La primera, se caracteriza por el apareamiento de un individuo con más de una pareja sexual durante la misma temporada reproductiva. Dentro de este contexto, se refiere a poliginia, cuando un macho se aparea con más de una hembra y poliandria cuando una hembra se aparea con más de un macho (Blüm, 1986).

En contraste, la monogamia se caracteriza por un vínculo entre pareja. Esto sucede cuando un individuo se aparea con una pareja sexual toda la vida. Una variación de la monogamia, la encontramos cuando un individuo tiene una pareja sexual diferente, por temporada reproductiva (Blüm, 1986).

El resultado de apareamiento es la fecundación, proceso por el cual espermatozoide y óvulo fusionan sus núcleos. En los animales, la fecundación se puede llevar a cabo externamente o internamente (Audesirk *et al*. 2013). La fecundación externa, comprende la fusión tanto del espermatozoide y el óvulo fuera del cuerpo parental. En este tipo de fecundación, la liberación de ambos gametos debe ser estrictamente sincrónica (Audesirk *et al*. 2013). Por el contrario, la fecundación interna, involucra la colocación de los espermatozoides dentro del aparato urogenital de la hembra, mediante la introducción de un órgano capaz de transportar y liberar los espermatozoides dentro de la hembra o, mediante la oposición de cloacas (Audesirk *et al*. 2013; Blüm, 1986).

En dicho sentido, en vertebrados se distinguen tres adaptaciones reproductivas, oviparidad, ovoviviparidad y viviparidad**.** La primera se caracteriza por el desove y desarrollo embrionario del huevo fuera del cuerpo materno (Angelini & Ghiara, 1984). La oviparidad se puede clasificar dependiendo de la forma en que se lleve a cabo la fecundación, en ovuliparidad, que ocurre cuando

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

la fecundación es externa, esto implica que los huevos sin fertilizar, sean expulsados del cuerpo materno y depositados en un medio acuoso, donde los machos liberan espermatozoides para la fecundación posterior de los huevos, tal como ocurre comúnmente en peces y anfibios (Angelini & Ghiara, 1984; Blüm, 1986) o bien, a oviparidad cuando la fecundación es estrictamente interna y posteriormente, los huevos serán expulsados al ambiente externo, donde el huevo se desarrollará. Para asegurar el desarrollo del embrión, se incluye la formación del cascarón, el cual protegerá físicamente la integridad del huevo, como ocurre en reptiles y aves (Blüm, 1986).

Por otro lado, se tiene a la ovoviviparidad, que ocurre cuando la fecundación es interna, pero, los embriones dentro del huevo se desarrollan y eclosionan dentro del sistema urogenital de la hembra. El desarrollo del embrión se realiza sin conexión placentaria; por lo tanto, se excluye los casos en que los embriones reciben nutrientes de la madre, dicha adaptación, ocurre en algunas especies de tiburones (Angelini & Ghiara, 1984; Blüm, 1986).

En el caso de la viviparidad, esta se refiere al desarrollo completo o casi completo de los embriones dentro del cuerpo materno e involucra el cuidado del embrión hasta su nacimiento. La transferencia de gases respiratorios y nutrición del embrión son asociados a la placenta. La viviparidad implica la fertilización interna, tal como ocurre en los mamíferos (Angelini & Ghiara, 1984; Blüm, 1986).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

2.3.- La Gametogénesis y Microestructura Espermática en Vertebrados

La gametogénesis, se refiere a la formación de los gametos haploides. Este proceso toma lugar en las gónadas, estructuras comúnmente pareadas, las cuales tienen dos funciones: la formación de gametos y la producción de hormonas que regulan la reproducción. En machos, las gónadas son los testículos y en hembras son los ovarios (Blüm, 1986; Lombardi, 1998).

El evento celular de gametogénesis, se divide principalmente en la fase gonial y la fase gametogénica (Lombardi, 1998). La fase gonial, empieza cuando las células germinales primordiales (CGP), migran hacia la cresta de la gónada embrionaria, allí proliferan mediante divisiones mitóticas continuas y en consecuencia, dan lugar a células llamadas gonias o gonocitos; en machos nos referimos a espermatogonias y en hembras a ovogonias (Blüm, 1986; Gilbert, 2005; Lombardi, 1998). Por otro lado, en la fase gametogénica, espermatogonias y ovogonias, son sometidas a divisiones mitóticas y meióticas. Por lo anterior, se refiere a ovogénesis al proceso de formación y maduración de óvulos y espermatogénesis al proceso de formación y maduración de espermatozoides (Lombardi, 1998).

La espermatogénesis, es un evento celular conservado entre vertebrados, pues los eventos de diferenciación de espermatogonias a espermatozoides son similares (Pudney, 1995). Sin embargo, existen dos tipos de espermatogénesis; cística y acística (Blüm, 1986; Lombardi, 1998; Pudney, 1995). La espermatogénesis cística, ocurre en vertebrados anamniotas (**Fig. 2**). El espermatocísto se forma cuando las espermatogonias primarias o tipo $\mathbf{A_0}$ son rodeadas por células de Sertoli, que funcionan como pared del císto (Pudney, 1995). Al finalizar la espermatogénesis, los espermatozoides son liberados a lumen del túbulo seminífero a partir de la ruptura del espermatocísto o bien, el espermatocísto persiste como espermatóforo o espermatozeugmata (Lombardi, 1998; Pudney, 1995). En contraste, en la espermatogénesis acística **(Fig. 3)** que ocurre en vertebrados amniotas, las células de Sertoli están en contacto cercano con las espermatogonias primarias (Pudney, 1995), dichas espermatogonias, están situadas encima de la lámina basal del túbulo seminífero (Lombardi, 1998). Durante el proceso de espermatogénesis, estas células se mueven de manera distal con respecto a la lámina basal del túbulo, a través de los espacios intercelulares formados por las células de Sertoli. Al finalizar la espermatogénesis, los espermatozoides son liberados en el lumen del túbulo seminífero (Blüm, 1986; Lombardi, 1998; Pudney, 1995).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

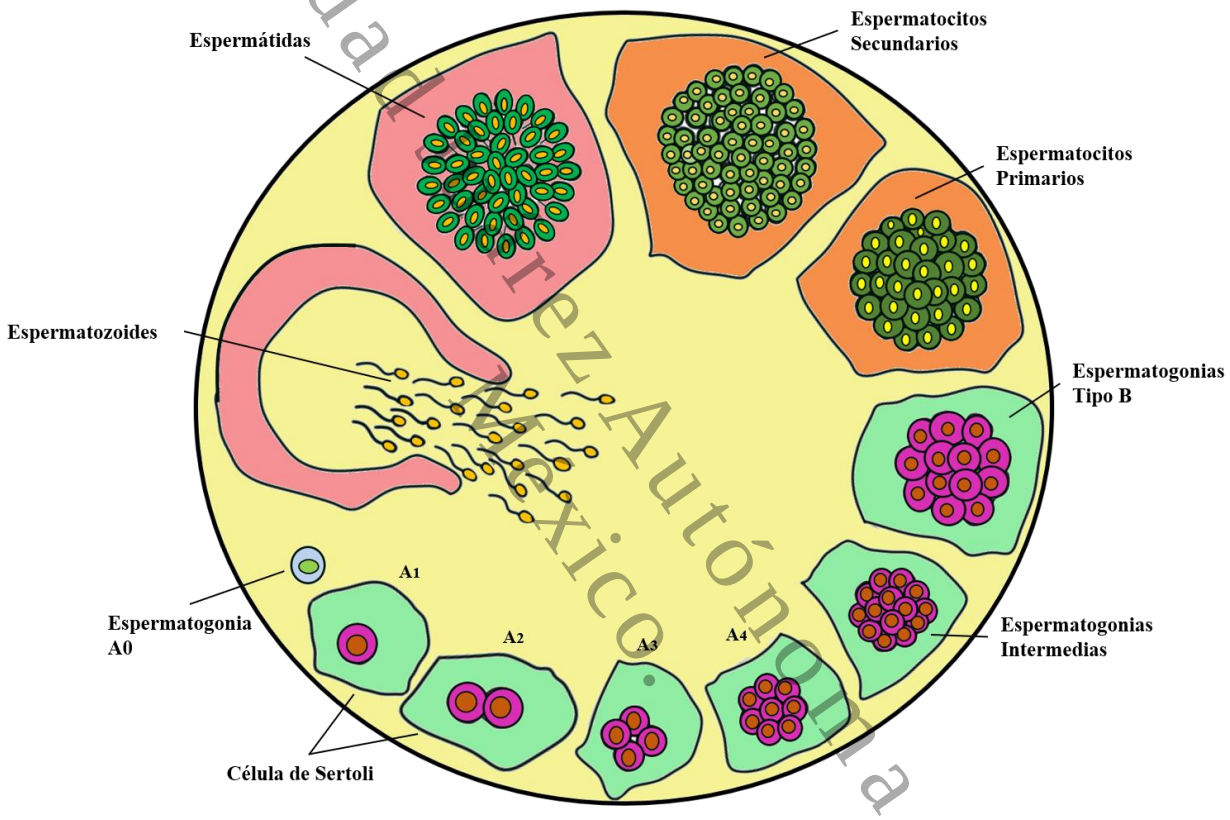

Fig. 2. Esquema mostrando la espermatogénesis cística. Inicialmente, las espermatogonias primarias o tipo A_0, son rodeadas por las células de Sertoli, formando el císto. Estas células proliferan y se diferencian en espermatogonias de tipo A_1-A_4, espermatogonias intermedias y espermatogonias tipo B mediante mitosis (císto azul). Las espermatogonias tipo B se someten a meiosis I y II, produciendo espermatocitos primarios y secundarios encada división meiótica respectivamente (císto naranja). Este linaje de células experimentará cambios morfohistológicos, se diferenciarán en espermátidas y por último en espermatozoides, que serán liberados al lumen del túbulo seminífero por la ruptura de la pared del císto (císto rosa). ***Esquema original por el autor: JEJJ.***

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

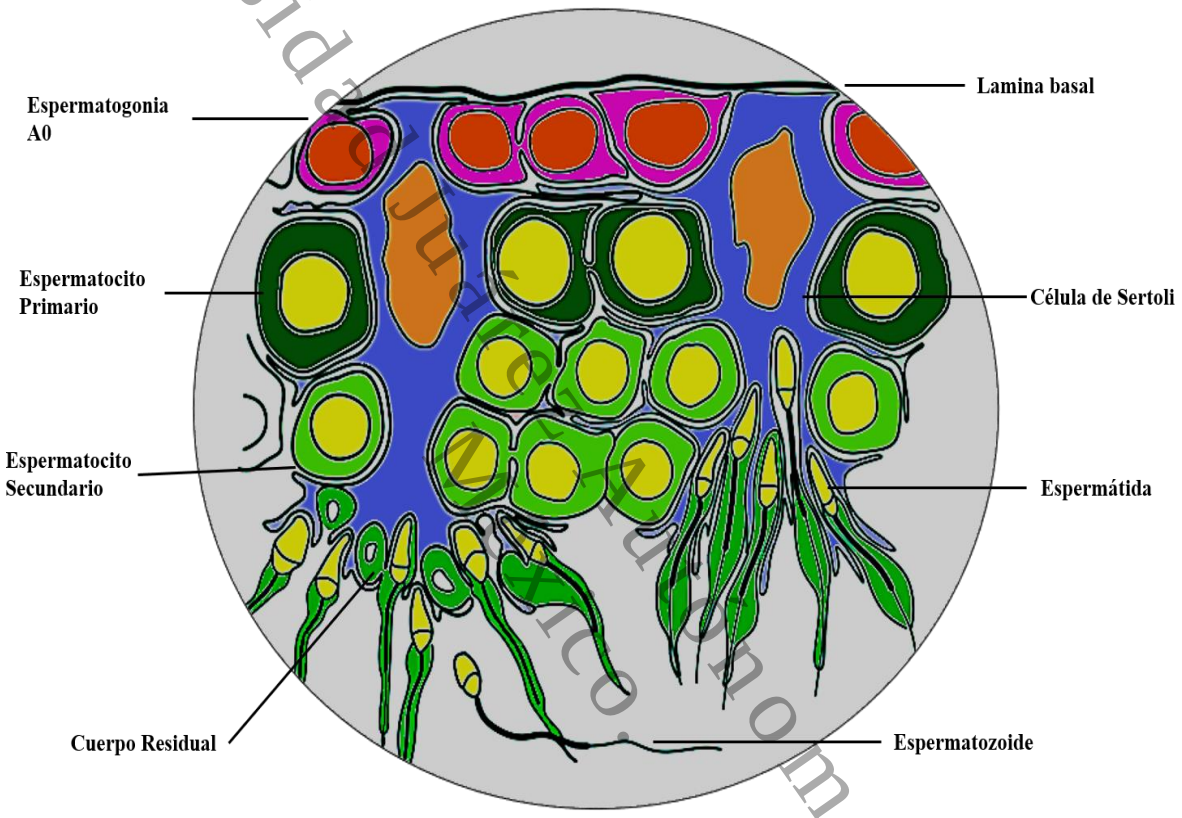

Fig. 3. Esquema mostrando la espermatogénesis acística. En este tipo de espermatogénesis, las células de Sertoli, están en contacto cercano con las espermatogonias de tipo A_0. Dichas espermatogonias, están localizadas de la lámina basal del túbulo seminífero, mientras que, los espermatocitos primarios y espermatocitos secundarios, están localizados en los niveles más altos del túbulo seminífero. Por otro lado, las espermátidas, se encuentran cercanas al lumen, donde desecharán restos de citoplasma, conocidos como cuerpo residual. Por último, los espermatozoides son liberados en el lumen del túbulo seminífero. ***Esquema original por el autor: JEJJ.***

En los vertebrados, el proceso espermatogénico implica tres fases a nivel celular: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis (**Fig. 4**) (Gribbins, 2011; Lombardi, 1998).

Durante la Espermatocitogénesis o fase proliferativa, las espermatogonias se dividen mitóticamente y cuyo resultado es la formación de espermatocitos primarios. Durante esta fase, las espermatogonias denominadas tipo $A_{0,}$ son sometidas a múltiples divisiones mitóticas continuas para autorrenovarse o bien, para producir múltiples poblaciones de espermatogonias, ya sea de tipo A_1, A_2, A_3 y A_4. (Gilbert, 2005; Lombardi, 1998).

Las espermatogonias tipo $A_{4,}$ tienen tres opciones: pueden autorrenovarse; experimentar apoptosis o bien; formar las primeras células comprometidas en convertirse en espermatozoides, las espermatogonias intermedias, que se dividirán de forma mitótica para formar la espermatogonia tipo B. Este último linaje de células, dará lugar a partir de la mitosis a los espermatocitos primarios o de primer orden. Dichas células, pueden autorrenovarse o bien, pueden entrar a la meiosis, que es la siguiente fase de la espermatogénesis (Gilbert, 2005; Lombardi, 1998).

La meiosis, es la secuencia de divisiones celulares (meiosis I y meiosis II), que involucra a los espermatocitos primarios y cuyo resultado es la recombinación, reducción y segregación del material genético (Gribbins, 2011). La profase I, está dividida estadios caracterizados por el movimiento y grado de condensación de los cromosomas: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Después de la meiosis I, los espermatocitos primarios se diferencian en espermatocitos secundarios, los cuales son sometidos a meiosis II, de dicha división, surgen las células haploides denominadas espermátidas. (Lombardi, 1998).

En la espermiogénesis, que es la última fase de la espermatogénesis, se realiza la maduración de las espermátidas en espermatozoides. Durante esta fase, las espermátidas son sometidas a transformaciones citológicas (Gribbins, 2011; Lombardi, 1998). Esta fase implica, por lo tanto; el desarrollo del acrosoma; la elongación del núcleo; condensación del ADN y el desarrollo del flagelo (Lombardi, 1998; Shin-Ichi, 1987). Al terminar los cambios morfohistológicos, las espermátidas son separadas y liberadas de las células de Sertoli hacia el lumen de los túbulos seminíferos, tal proceso es conocido como espermiación, el cual es acompañado de la eliminación excesiva de citoplasma, conocido como cuerpo residual. Las espermátidas liberadas en el lumen de los túbulos seminíferos, son referidas como espermatozoides (Lombardi, 1998).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

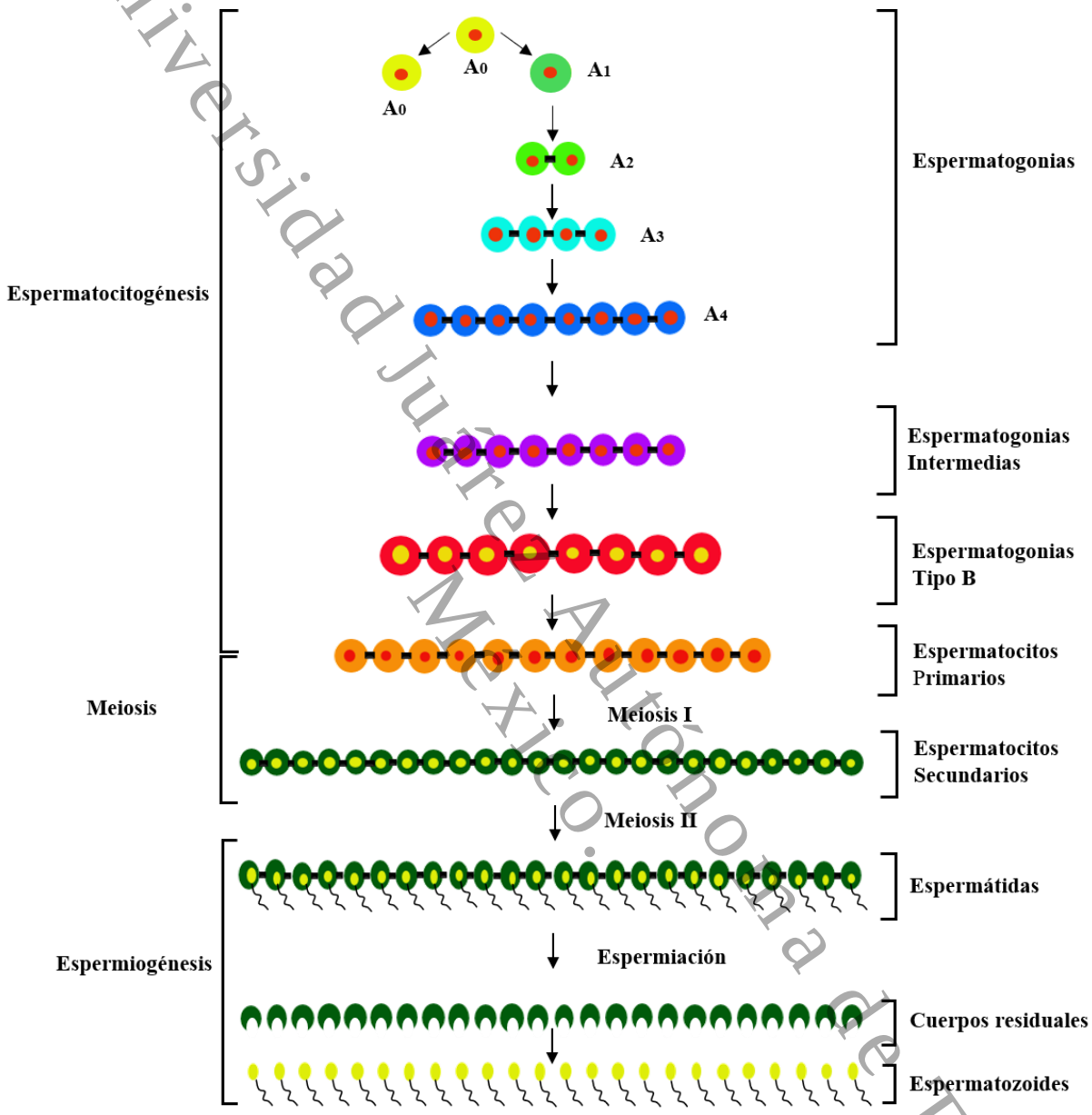

Figura 4. Representación esquemática del proceso espermatogénico en los vertebrados. En la espermacitogénesis, las espermatogonias tipo A_0, proliferan mediante mitosis hasta diferenciarse en espermatocitos primarios. Después, durante la meiosis, estos son sometidos a dos divisiones meióticas, produciendo espermátidas, las cuales son sometidas a cambios morfohistológicos durante la espermiogénesis. Por último, durante la espermiación, se elimina el exceso citoplasmático y los espermatozoides son liberados al lumen del túbulo seminífero. ***Esquema original por el autor:JEJJ.***

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Los espermatozoides, poseen microestructuras típicas altamente conservadas en la mayoría de los vertebrados. Sin embargo, hay dos tipos de espermatozoides según la composición de la cabeza; de tipo acrosomal y de tipo no acrosomal (**Fig. 5**) (Lombardi, 1998).

Los espermatozoides comprenden dos componentes estructurales: La cabeza, que es la microestructura conformada por un núcleo, que contiene la información genética hereditaria en forma de cromatina altamente condensada. También cuenta con una región acrosomal o acrosoma, el cual se forma a partir de gránulos membranosos producidos por el Aparato de Golgi (Lombardi, 1998; Temple-Smith *et al.* 2018).

Por último, el flagelo, que se origina a partir del cuerpo basal formado por uno de los dos centriolos que contiene la espermátida durante la espermiogénesis (Lombardi, 1998). El flagelo consiste en la mayoría de los vertebrados en axonema, que es una estructura formada por un arreglo de nueve microtúbulos periféricos y dos centrales, tal arreglo es conocido como complejo 9 + 2. El axonema, se extiende desde el cuello hasta la región terminal (Temple-Smith *et al*. 2018). El flagelo, puede ser dividido en cuatro regiones: el cuello que es la región que vincula a la cabeza con el resto de la cola; la pieza media, la cual tiene la capacidad de producir energía en forma de ATP necesaria para la motilidad espermática a partir de las mitocondrias que allí se encuentran; la pieza principal, que se caracteriza por ser la región más larga del flagelo y por último, la región terminal (Lombardi, 1998).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

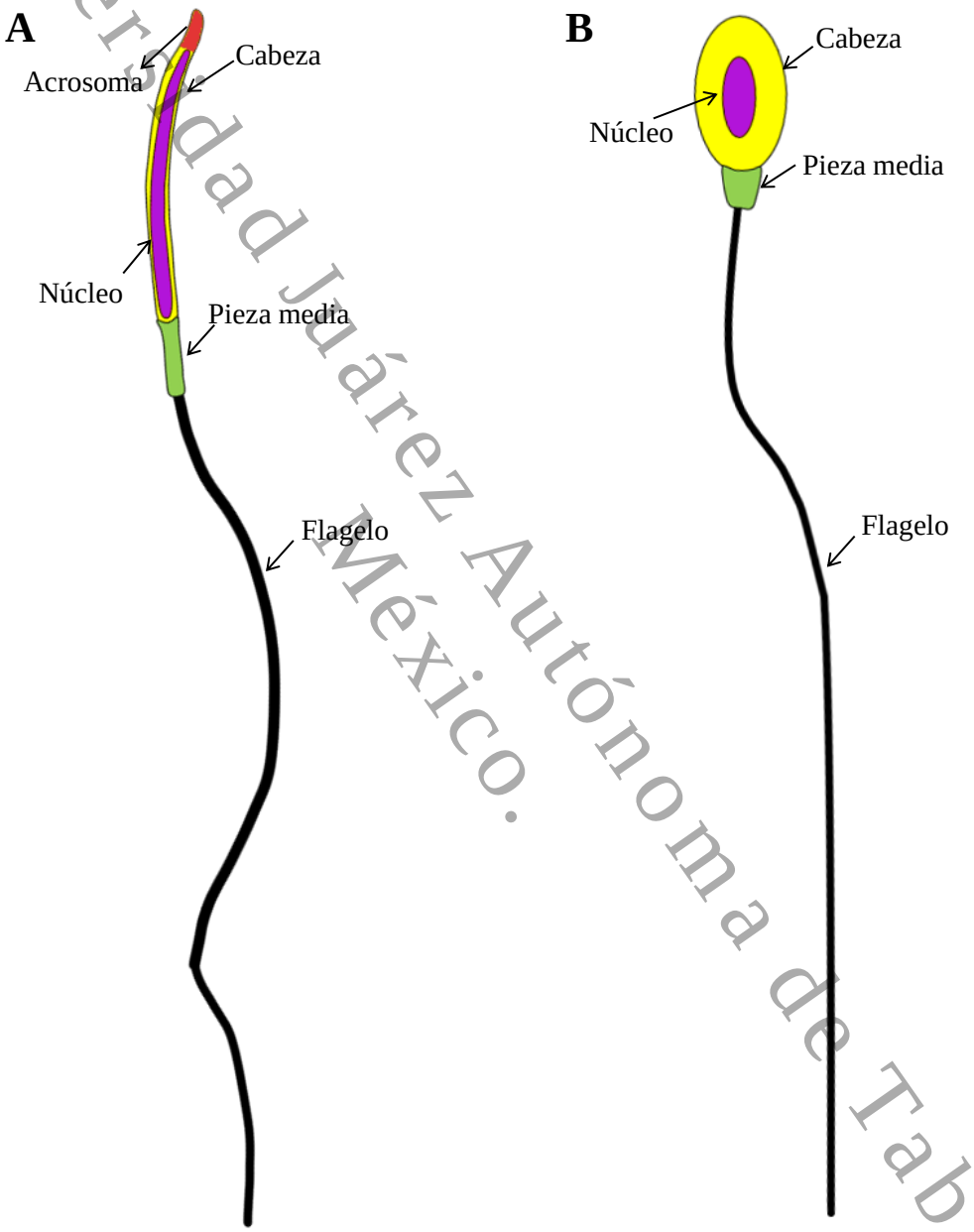

Fig. 5. Esquema mostrando las microestructuras típicas afines entre espermatozoides. Se representa el espermatozoide de tortugo de tipo acrosomal (**A**) y de pez, que es de tipo no acrosomal (**B**). ***Esquema original por el autor: JEJJ.***

2.4.- Calidad Espermática

En la mayoría de las especies, las hembras aseguran el éxito reproductivo mediante la cópula con diferentes machos, las células espermáticas en consecuencia, enfrentan lo que se conoce como competencia espermática (Simmons & Fitzpatrick, 2012); que se define como la competición entre eyaculados de diferentes machos para la fertilización de un conjunto de óvulos (Pizzari & Parker, 2009). Para asegurar la paternidad, los machos incrementan el número de espermatozoides competentes con respecto a sus rivales. No obstante, el número de espermatozoides en cada eyaculación no es suficiente para asegurar el éxito reproductivo (Snook, 2005). Por lo tanto, durante la evolución espermática, se han desarrollado características puntuales que permiten a los espermatozoides competir, sobresalir o capitalizarse sobre espermatozoides rivales (Fitzpatrick & Lüpold, 2014). El conjunto de estas características, conforman lo que se conoce como calidad espermática; esta se refiere a la eficiencia de los espermatozoides para fertilizar al gameto femenino. Dicha calidad espermática, está sujeta a características morfológicas y fisiológicas propias de los espermatozoides; tales como el tamaño, longevidad, viabilidad y la movilidad, esta última incluye velocidad de nado, grado de movimiento al nadar y el porcentaje de células motiles (Snook, 2005). En dicho contexto, los machos que produzcan la mayor cantidad y mejor calidad de espermatozoides competentes, tendrá ventaja sobre aquellos en que la cantidad y calidad espermática sea baja (Fitzpatrick & Lüpold, 2014; Holt & Look, 2004).

2.5.- Parámetros para Evaluar la Calidad Espermática

En la evaluación de la calidad espermática, cualquier parámetro relacionado con la capacidad de fertilización del esperma podría ser potencialmente usado como una medida de la calidad espermática (Rurangwa *et al*. 2004). The World Health Organization (2010), tiene parámetros estandarizados para la evaluación de la calidad espermática, relacionados con la fertilidad, tales parámetros son: motilidad espermática, vitalidad espermática, concentración espermática y morfología espermática. En acuicultura, se han aplicado métodos para evaluar la calidad espermática en peces mediante tales parámetros, incluyendo los porcentajes de fertilización (Arias-Rodriguez, 2001; López-Hernández *et al*. 2018; Osorio-Pérez, 2017).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

2.5.1.- Motilidad Espermática

La motilidad espermática, es el parámetro relacionado directamente con la fertilidad. Este parámetro mide la movilidad, velocidad y el porcentaje de células motiles (Snook, 2005). En acuicultura, la motilidad se ha evaluado mediante el tiempo de actividad espermática, el grado de movimiento y porcentaje de células motiles (López-Hernández *et al*. 2018). El tiempo de motilidad espermática, se expresa en términos de tiempo, particularmente en segundos y se puede medir con el uso de cronómetros digitales (Osorio-Pérez, 2017). Este parámetro en el caso de los peces se evalúa desde la activación de los espermatozoides con agua hasta el cese total de movimiento flagelar (López-Hernández *et al.* 2018). El grado o tipo de movimiento progresivo evalúa el vigor con el cual la célula espermática toma su trayectoria motil (López-Hernández *et al.* 2018). Para estimar el grado de movimiento, se utilizan escalas establecidas que pueden ser simples y se distinguen tres grados: motilidad progresiva, motilidad no progresiva e inmovilidad (World Health Organization, 2010); o se pueden utilizar aquellas más detalladas donde el grado 4 representa el máximo movimiento progresivo de los espermatozoides y el grado 0 representa la inmovilidad (Menkveld & Kruger, 1996). Por último, el porcentaje de células motiles se obtiene determinando de manera subjetiva el número de células activas bajo el microscopio, utilizando la escala que va de 0% a 100% con intervalos de 10% donde 90% y 100%; representan el porcentaje de células motiles óptimas para asegurar la fecundación del ovulo (Arias-Rodriguez, 2001; Osorio-Pérez, 2017).

2.5.2.- Viabilidad Espermática

La viabilidad espermática, es el parámetro que se estima evaluando la integridad de la membrana espermática (World Health Organization, 2010). La tinción con eosina-nigrosina, es una técnica común para la evaluación de la integridad de la membrana en células espermáticas. La nigrosina incrementa el contraste entre el fondo y las cabezas espermáticas, haciendo más fácil la visualización. Por otra parte, la eosina tiñe las células muertas de rojo oscuro, mientras que las células vivas aparecen blancas (Agarwal *et al.* 2016; Moskovtsev & Librach, 2013). Para la estimación, se evalúan 200 células espermáticas en cada replica y se calcula el porcentaje de células vivas (Moskovtsev & Librach, 2013).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

2.5.3.- Concentración Espermática

Este parámetro, estima el número de espermatozoides por unidad de volumen de semen diluido; dicho parámetro está relacionado tanto con el tiempo de fecundación y porcentaje de fecundación (World Health Organization, 2010). En acuicultura, el conteo de células espermáticas se ha realizado con el hematocitómetro o cámara Neubauer (Arias-Rodriguez, 2001). De igual manera, en tortugas, este parámetro de calidad espermática se estima mediante el uso del hematocitómetro (Kawazu *et al*. 2014[b]; Tanasanti *et al*. 2009; Zimmerman & Mitchell, 2017). Se recomiendan, aquellas cámaras con capacidad de 100 µl de volumen (World Health Organization, 2010). Otros métodos de conteo espermático, es mediante el uso de citómetros automáticos pues son de fácil operación y con altos estándares de precisión (Osorio-Pérez, 2017), así también mediante espectrofotometría (López-Hernández *et al.* 2018).

2.5.4.- Morfología Espermática

La descripción morfológica de las microestructuras espermáticas, es un parámetro muy importante para la evaluación de la calidad espermática, pues permite identificar anormalidades morfológicas tales como espermatozoides con doble flagelo, espermatozoides sin flagelo y por su puesto anormalidades en la cabeza (López-Hernández *et al*. 2018). Se han empleado diferentes técnicas de tinción, para la evaluación morfológica. Estas consisten en realizar frotis de semen teñidos ya sea con Hematoxilina-eosina, Giemsa, naranja "G" entre otros (López-Hernández *et al.* 2018). Protocolos empleados en Microscopia Electrónica de Barrido (M.E.B), han mostrado resultados de mayor resolución para visualización detallada de microestructuras espermáticas en pejelagarto (*Atractosteus tropicus)* (Osorio-Pérez, 2017) y el bagre tropical *Rhamdia laticauda* (López-Hernández, 2017).

2.5.5.- Sistemas Computacionales

Los sistemas computacionales representan herramientas de alta precisión para la evaluación de la calidad espermática. Programas como C.A.S.A (Computer-Assisted Sperm Analisis), pueden evaluar parámetros como: motilidad, morfometría y la integridad de la membran de manera automática (Alquézar-Baeta *et al*. 2019). Los principales componentes de C.A.S.A son: una cámara

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

de video, una tarjeta capturadora de fotogramas de video y una computadora. El programa se encarga de identificar, seguir todos los espermatozoides y realizar los cálculos a partir de la imagen enviada por el microscopio óptico (Mortimer, 2000).

Herramientas computacionales como A.S.M.A (Automated Sperm Morphology Analysis), se ha utilizado para analizar la morfología espermática en peces de manera automática (Fauvel *et al*. 2010). De esta forma, las herramientas computacionales disminuyen el error humano en cuanto a la estimación de la calidad espermática mediante el uso de protocolos tradicionales.

2.5.6.- Evaluación de la Calidad Espermática y Microestructuras en Tortugas

Son escasas las investigaciones realizadas de la evaluación de la calidad espermática en las tortugas. Aquellas investigaciones realizadas se encuentran enfocadas hacia especies marinas como la tortuga carey *(Eretmochelys imbricata)* (Kawazu *et al*. 2014[b], Tanasanti *et al*. 2009) y golfina (*Lepidochelys olivacea*) (Sahatrakul *et al.* 2008, Tanasanti *et al*. 2009) y en la tortuga leopardo *(Stigmochelys pardalis)* que es de hábitos terrestres (Zimmerman & Mitchell, 2017). Los parámetros de calidad estimados comunes a estas investigaciones son: motilidad, concentración espermática, viabilidad espermática, morfología y volumen del eyaculado.

Por otra parte, la Microscopia Electrónica de Transmisión (M.E.T), se ha empleado para la visualización de microestructuras espermáticas. Con M.E.T, se han observado y descrito las células espermáticas durante la espermiogénesis en la especie tropical *K. scorpioides* (Viana *et al*. 2015), de la tortuga china de concha blanda *Pelodiscus sinensis* (Bian *et al*. 2013), Así como la caracterización microestructural de los espermatozoides, en las tortugas *Mauremys caspica* (Al-Dokhi *et al*. (2007), *Chrysemis picta* (Hess *et al.* 1991) y *Pseudemys scripta elegans (Trachemys scripta elegans*) (Kaplan *et al*. 1966). De la misma manera, la Microscopia Electrónica de Barrido (M.E.B) y la Microscopia Óptica (M.OP), se han utilizado para la visualización de espermatozoides en la tortuga de concha blanda (*P. sinensis)* (Bian *et al*. 2013) y en la tortuga negra de pantano (*Siebenrockiella crassicollis*) (Kimsakulvech & Suttiyotin, 2020). En un contexto local, M.E.B, se ha utilizado recientemente para la visualización y descripción morfológica de los espermatozoides en el pejelagarto tropical *A. tropicus* (Osorio-Pérez, 2017). Así como el empleo de M.E.T y M.E.B para la visualización y descripción morfológica de los espermatozoides el bagre tropical *R. laticauda* (López-Hernández, 2017).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

III.- JUSTIFICACIÓN

En Tabasco, las tortugas son una fuente importante para la obtención de alimento y recursos económicos (Barragán-Vázquez *et al*. 2019). Debido a ello, las nueve tortugas nativas de Tabasco, forman parte de la lista de los animales que más se comercializan de forma ilegal en nuestro estado (Pozo-Montuy *et al*. 2019). Bajo tal contexto, las actividades antropogénicas están provocando la pérdida de especies, cuyas funciones ecológicas, influyen en la conservación de los ecosistemas. A pesar de dicha situación, existe poco interés en realizar estudios en biología y genética básica de las especies nativas, esto quizá se deba a la falta de especialistas en la región (Arias-Rodriguez *et al*. 2019). Sin embargo, en nuestro estado, recientemente se han realizado investigaciones dirigidas en el discernimiento de la diversidad genética en especies como *D. mawii* y *T. venusta.*

La revisión bibliográfica (**Tabla 3**) nos indica que; los estudios realizados en los kinostérnidos están enfocados en campos como la sistemática, taxonomía; reproducción y determinación sexual; comportamiento y fisiología; mencionando de igual manera, aquellas revisiones de carácter cultural o aquellas en que se describen la historia natural del grupo. En el estado, se distribuyen cinco especies de kinostérnidos. No obstante, existen pocos estudios realizados acerca de la biología básica de este grupo de tortugas dulceacuícolas, pues solo se han caracterizado citogenéticamente dos especies, *K. leucostomum* y *S. triporcatus* (Hernández-Guzmán *et al*. 2014, 2015).

Por lo anterior, realizar estudios que incrementen el conocimiento acerca de la biología *K. leucostomum*, como la descripción fisiológica y microestructural de los espermatozoides, es realmente necesario; ya que sin duda será una herramienta de gran ayuda en la conservación de la especie, ampliando las posibilidades de fertilización "*In vitro*". Aunado a ello, el estudio tiene potencial de ser la antesala, para establecer una metodología aplicable para el grupo taxonómico en cuestión en nuestro estado, así como la comparación de resultados entre especies de tortugas en estudios similares.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Tabla 3. Estudios en ecología, citogenética, taxonomía, y biología reproductiva realizados en los kinostérnidos.

Fuente	Estudios realizados
Killebrew (1975)	Descripción citológica de los cromosomas mitóticos en 11 kinostérnidos. Se establece el número modal diploide 2n=56 cromosomas para los géneros *Kinosternon* y *Sternotherus*, mientras que, para la familia Stautotipinae se establece un numero modal diploide 2n=54 cromosomas.
Teska (1976)	Descripción detallada acerca del movimiento terrestre y comportamiento durante la temporada de inundación y seca en *K. scorpioides.* Costa Rica.
Hutchison & Bramble (1981)	Estudio fenético acerca de las homologías plastrales entre los fósiles y especímenes vivos de las familias Kinosternidae y Dermatemydidae, sugiriendo la cercanía filogenética de ambas familias.
Vogt & Flores-Villela (1986)	Revisión detallada acerca de la determinación sexual por temperatura en tortugas, se describen aspectos como la temperatura umbral y la influencia de la temperatura sobre los embriones para detener el desarrollo en las especies tropicales *K. leucostomum, C. angustatus y S. triporcatus.*
Vogt & Guzman-Guzman (1988)	Análisis cuantitativo acerca de las preferencias alimenticias mediante fluido y contenido estomacal en dos poblaciones de tortugas tropicales, *K. leucostomum* y *S. triporcatus*.
Iverson (1989)	Estudio de campo que describe la distribución del *K. flavescens arizonense* en Sonora y Arizona, también incluye descripción del hábitat, reproducción y comportamiento.
Iverson (1991)	A partir de características morfológicas de caparazón, cráneo, plastrón se realizan cladogramas del género *Kinosternon.*
Vogt & Flores-Villela (1992)	Se estudian los patrones de determinación de sexo, DSG o DST mediante experimentos de campo y de laboratorio, en las especies tropicales *D. mawii, S. triporcatus, C. angustatus y K. leucostomum, C. serpentina y T. scripta.*
Ewert (1991)	Revisión detallada y selecta acerca de suspensión embrionaria en reptiles (entre ellos, kinostérnidos) y aves, tales como el "cold torpor" y la diapausa y estivación embrionaria.
Flores-Villela & Zug (1995)	Estudio acerca de la biología reproductiva de *C. angustatus*, en el, se describen la madurez sexual, los meses en que ocurre la ovogénesis y espermatogénesis, la temporada de anidación, tamaño y numero de huevos.
Morales-Verdeja & Vogt (1997)	Se registran los movimientos terrestres de tortugas *K. leucostomum* marcadas con radiotransmisores, se obtiene información de la distancia en que las tortugas realizan actividades tales como la búsqueda de sitios de anidación y estivación.
Peterson & Stone (2000)	Mediante la evaluación de parámetros fisiológicos como pérdida de masa, evaporación de agua, muestras de sangre y tasa metabólica se concluye que *K. sonoriense* es capaz de sobrevivir 80 días sin agua y comida, por lo tanto, es capaz de estivar en condiciones naturales.
Carvalho *et al.* (2010)	Se describe la morfología de los testículos, epidídimo, conductos deferentes y pene del kinostérnido *K. scorpioides.* Los resultados morfológicos revelan que los órganos estudiados de esta especie son similares a los de otras tortugas. Se sugiere que la morfología de tales órganos, es una característica conservada entre tortugas.
Iverson (2013)	Mediante la secuenciación de marcadores mitocondriales y tres marcadores nucleares, se realiza una nueva organización filogenética para la familia Kinosternidae. Se mantienes las dos subfamilias Kinosterninae y Staurotipinae. No obstante, se reconoce un nuevo género dentro de kinosterninae, *Cryptochelys*; en cuyo género se encuentra *K. leucostomum*, renombrado *C. leucostoma*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Continua Tabla 3

Fuente	Estudios realizados
Viana *et al.* (2014)	Se realizan biometrías corporales y testiculares en *K. scorpioides.* Los especímenes estudiados, fueron capturados durante la temporada de sequía y de lluvia. Los resultados indican que el grupo colectado durante la temporada de luvias presentó mayor peso corporal. El tamaño de los testículos presenta ligera variación entre ambos grupos. No obstante, el Índice Gonadosomático, indica que no hay diferencias entre los grupos estudiados.
Viana *et al.* (2014)	Se lleva a cabo la descripción morfológica de los vasos deferentes en *K. scorpioides* en la temporada de sequía y de lluvia. Los resultados indicaron que los vasos deferentes presentan menor valor en cuanto al diámetro durante la temporada seca. Por otro lado, se reporta que los vasos deferentes, en la temporada de lluvias.
Sousa *et al.* (2014)	En este estudio, se detalló la morfología nuclear de células de tipo espermatogonias y hasta espermátidas en *K. scorpioides*. Así mismo, se estudió el ciclo de espermatogénesis, el cual se caracterizó por 10 etapas. La duración de dicho ciclo fue de 53 días.
Viana *et al.* (2015)	Mediante el uso de M.E.T, se estudia la espermiogénesis de *K. scorpioides.* Se indican cinco estadios en los que se describen los cambios morfológicos a los que son sometidas las células espermáticas primarias durante la espermatogénesis.
Fernandes *et al.* (2020)	Se realiza la caracterización morfológica, de los órganos que conforman el sistema reproductivo, así como la actividad espermática de la tortuga *K. leucostomum*, durante la temporada de sequía y lluvia. Se concluye que la especie mencionada, exhibe estacionalidad reproductiva.

IV.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo General

4.1.1.- Describir la fisiología de la activación y las microestructuras de los espermatozoides del pochitoque tropical *K. leucostomum.*

4.2.- Objetivos Específicos

4.2.1.- Describir la fisiología de la activación de los espermatozoides en machos adultos de *K. leucostomum* basado en el tiempo de vitalidad, porcentajes de motilidad y tipo de movimiento.

4.2.2.- Establecer el número promedio de células espermáticas por ml en los machos adultos del pochitoque tropical *K. leucostomum.*

4.2.3.- Detallar las microestructuras intracelulares y extracelulares de los espermatozoides del pochitoque tropical *K. leucostomum.*

4.2.4.- Discernir particularidades novedosas e importantes a partir del procedimiento empleado en el estudio.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Recolecta, Mantenimiento de los Especímenes y Procedimiento Ético

Se recolectaron 20 especímenes adultos machos del pochitoque tropical *K. leucostomum*, en los humedales que se ubican dentro del territorio tabasqueño; en acuerdo con el permiso de recolecta SEMARNAT: SGPA/DGVS/04315/11. Los tortugos, fueron trasladados vivos en contenedores térmicos y adecuados hacia las instalaciones del Laboratorio en Genética y Ecofisiología de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACBiol-UJAT). Los especímenes, se mantienen vivos en buenas condiciones de ambientación, calidad de agua y alimentación diaria apropiada, a base de pellets con 32% de proteínas. El presente protocolo, fue evaluado y aprobado por la Comisión Institucional de Ética en Investigación-UJAT, con folio **0989**.

5.2.- Estimulación de la Espermiación y Recolecta de Semen

Los especímenes adultos, fueron inducidos a la espermiación mediante inyección intramuscular con la hormona de Acetato de Gonadorelina base (AGnRH), administrando 5.0 (5.0 µg) unidades (jeringa para insulina) por cada 100 g del espécimen (Arias-Rodriguez Com. Per. 2020). Luego, los especímenes inducidos a la espermiación, fueron colocados en un contenedor térmico con fotoperiodo controlado a seis horas luz/seis horas oscuridad a 30±0.1°C. A las 18 h de estimulación, las muestras de semen fueron obtenidas mediante suave masaje en la región cloacal; la toma de muestras de semen fueron realizadas con una micropipeta con capacidad de 10-100 de µl (Arias-Rodriguez, 2001).

5.3.- Análisis Microscópico de la Calidad Espermática

Se evaluó la calidad espermática, basado en los siguientes parámetros fisiológicos: El grado y tipo de movimientos de los espermatozoides de los tortugos, fueron evaluados de acuerdo a la escala gradual propuesta por Menkveld & Kruger, (1996) (**Tabla 4**). Para ello, se tomaron 5 µl de semen fresco y se colocó sobre un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y posteriormente,

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

se observó bajo el microscopio óptico Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®) con el objetivo 40X. + 1.25X del optovar; y con el apoyo de la cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®).

Adicionalmente, se registró la motilidad de los espermatozoides en minutos, para ello se utilizó un cronometro digital, esto fue desde el momento preciso de la toma de las muestras de semen y hasta que se detuvieron (Osorio-Pérez, 2017).

Así mismo, se determinó el porcentaje (%) de células activas o motiles, de acuerdo al criterio de Arias-Rodriguez, (2001), usando la escala progresiva de 0-100% con intervalos de 10 en 10 (p. e. 10%, 20%, 30%, 60% y hasta100 %).

Tabla 4. Escala gradual para evaluar los tipos de movimiento de los espermatozoides, modificada por López-Hernández *et al*. (2018) con base en Menkveld & Kruger, (1996).

Graduación del movimiento	Descripción del movimiento
Grado 4	Máximo movimiento progresivo de los espermatozoides (óptimo para la fertilización).
Grado 3	Reducción del movimiento progresivo o con el incremento de los movimientos laterales, que promedian aproximadamente de dos a tres anchos el cuerpo del espermatozoide (aun apropiado para la fertilización).
Grado 2	Poco o ningún movimiento progresivo y movimientos laterales circulares de una o dos veces el ancho del cuerpo del espermatozoide (no apropiado para la fertilización).
Grado 1	Muy poco movimiento de la cabeza de los espermatozoides, junto con el decremento del movimiento del flagelo (sin capacidad de fertilización)
Grado 0	Sin motilidad, ni movimiento progresivo (movimiento frontal) de los espermatozoides (sin capacidad absoluta para la fertilización).

5.4.- Fijado y Conteo de Células Espermáticas en *K. leucostomum*

Para determinar la concentración espermática por mililitro de semen de cada espécimen, se empleó la dilución 10:90 (10 µl de semen puro: 90 µl de fijador). El fijador se preparó diluyendo paraformaldehído (PFA) al 4% con solución buffer de fosfatos (SBF) con pH 7.0 (KH_2POH + Na_2HPO + Agua destilada). Dicho fijador se mantuvo bajo refrigeración a 4°C. Cada muestra de semen se fijó y almacenó en tubos de 1.5 ml. De cada muestra fijada, se cargó por triplicado el hematocitómetro y posteriormente se analizó bajo el microscopio óptico Axio Scope. A1 (Carl Zeiss®) con el objetivo 40X. + 1.25X del optovar; y con el apoyo de la cámara digital AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®), se tomaron microfotografías de alta resolución; mismas que fueron empleadas para el conteo de espermatozoides. Para el conteo de las células se tomó en cuenta las trayectorias sugeridas por Arias-Rodriguez, (2001) (**Fig. 6**).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

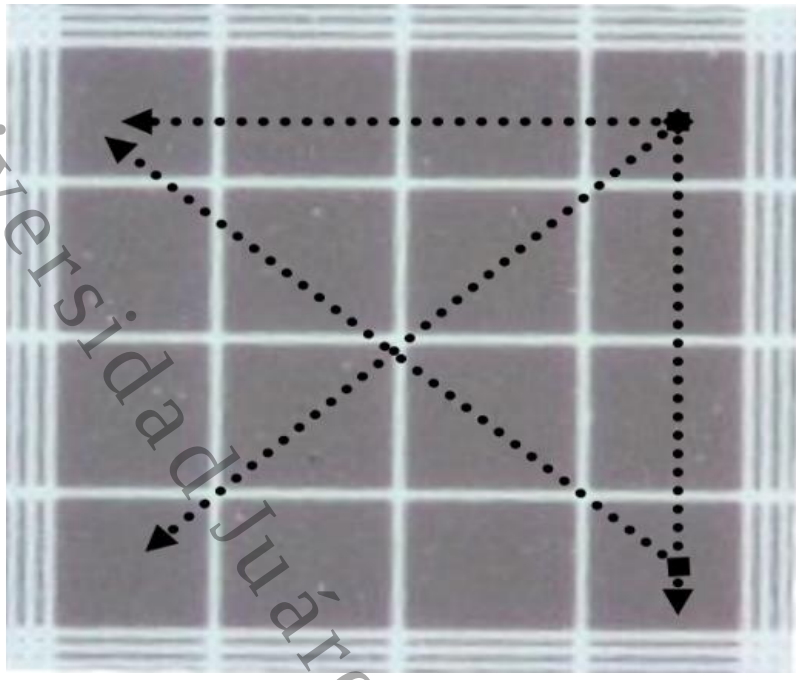

Fig. 6. Microfotografía de la cámara de Neubauer con 16 cuadrantes y 4 trayectorias de conteo. ***Imagen original por el autor: JEJJ.***

El número de espermatozoides por mililitro de semen, se calculó haciendo una adaptación a la fórmula empleada por Arias-Rodriguez, (2001):

Número de espermatozoides por mililitro = [($\bar{x}$) (4) (100) (900)] (10)

Donde:

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

4= Número de cuadros contados en cada trayectoria de conteo.

100 µl = Volumen total de muestra.

10:90 = Dilución de conteo empleado.

10= Factor de conversión a ml.

Ejemplo:

Número de espermatozoides por mililitro= **[**(0.13) (4) (100) (900)**]** (10)

Número de espermatozoides por mililitro= **[**(0.52) (90,000)**]** (10)

Número de espermatozoides por mililitro= **[**46,800**]** (10)

Número de espermatozoides por mililitro= 468,000

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

5.5.- Observación y Evaluación Morfométrica de las Microestructuras de los Espermatozoides de *K. leucostomum* por Microscopia Óptica y Tinción con Giemsa

Para documentar las microestructuras espermáticas, tales como el acrosoma, la cabeza, el núcleo, la pieza media y el flagelo. Se siguieron las recomendaciones metodológicas utilizadas en peces por López-Hernández *et al*. (2018) y Osorio-Pérez, (2017); conforme a lo siguiente: Se tomaron 10 µl de semen fijado y colocaron en uno de los extremos de un portaobjetos limpio y se dispersaron con suavidad a manera de frotis y a continuación, se dejaron secar a temperatura ambiente (25±1.0°C) por 10 min. Posteriormente, cada frotis se tiñó durante 10 minutos con solución de giemsa (Merk Azur-Eosina-azul de metileno) al 10 % preparado en SBF con pH 7.0. Posteriormente, el exceso de giemsa se lavó gentilmente con agua destilada; las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente en posición de decanto. Luego, las laminillas se analizaron bajo el microscopio óptico Axio Scope.A1 (Carl Zeiss®) con el objetivo 40X + 1.25X del optovar; los mejores campos espermáticos se digitalizaron mediante la cámara AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®). La evaluación morfométrica se realizó con el empleo de las herramientas del programa Zen Blue Edition (Carl Zeiss®).

5.6.- Observación de Microestructuras Espermática de *K. leucostomum* por Microscopia de Inmunofluorescencia

Para observar las microestructuras espermáticas mediante inmunofluorescencia se tomó 10 µl de semen fijado de muestras individuales de 10 especímenes, estas se colocaron y mezclaron en un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron a 6000 r.p.m durante 5 minutos. Después, la solución fijadora fue removida y sustituida por 300 µl glutaraldehído al 5% en solución salina buffer de fosfatos (SBF), subsecuentemente se tomó 20 µl de la muestra fijada y se añadió 40 µl de SBF al 0.01 M, preparada con NaCl al 0.138 M y KCl al 0.0027 M (Phosphate buffered saline (PBS) sigma P38135) con pH 7.4. La solución final, fue centrifugada a 2100 r.p.m durante 10 minutos. El sobrenadante, fue removido y las células espermáticas fueron resuspendidas en 20 µl de SBF. Después, una gota de 10 µl se colocó en un portaobjetos SuperfrostTM Plus (Adhesive Microscope Slides®). La gota se dejó secar por 10 minutos a 40° C y entonces el área de interés fue bloqueada contra líquidos con el lápiz Super Pan Pen. El portaobjetos, fue lavado con Triton x-100 al 0.025% en SBF por 5 minutos 3 veces. La muestra fue bloqueada con albumina de suero fetal bovino (ASB) por una hora.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco México

La tinción del anticuerpo primario, se realizó durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-β-actina de ratón (Anti-β-actin antibody mouse sigma A1978®). Los anticuerpos, se disolvieron en 1:500 en ASB al 1% y 24 horas después, las muestras fueron lavadas con SBF tres veces por 5 minutos.

Las muestras, fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG 488 de cabra anti-ratón Alexa FluorR (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG). Los anticuerpos, se disolvieron 1:500 en SBF por 2.5 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con SBF por 5 minutos 3 veces. Las muestras fueron contra teñidas para fluorescencia de contrastes con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Por último, se colocó un cubreobjetos sobre cada preparación citológica. Las muestras fueron observadas bajo el Microscopio Olympus BX51 con lampara de fluorescencia U-RFL-T, las microfotografías fueron tomadas con la cámara Olympus DP74 con 600x y aceite de inmersión.

5.7.- Microestructura Espermática por Microscopia Electrónica de Barrido (M.E.B)

Para observar las microestructuras de las células espermáticas mediante microscopia electrónica de barrido (M.E.B), se tomaron 10 µl del semen fijado en PFA (4%) de 10 especímenes y estas se mezclaron. Después dichas muestras se centrifugaron, para luego remover el sobrenadante y agregar 150 µl de glutaraldehído al 5% en SBF. Posteriormente, se conservó a 4°C hasta su empleo para el análisis M.E.B. Seguidamente, la muestra fue centrifugada durante 10 min a 2100 r.p.m, el sobrenadante fue removido y las células espermáticas, fueron resuspendidas en 30 µl de SBF. Se colocó 15 µl de la solución final, sobre un cubreobjeto de alta precisión revestido con poli-L-lisina (poly-L-lysine-coated high-precision coverslip). La gota fue esparcida con la punta de la pipeta. Luego, las células espermáticas se adhirieron al cubreobjetos en una cámara húmeda evitando que las células se deshidrataran por completo. Subsecuentemente, el cubreobjetos con las células espermáticas, fue deshidratado con una serie de alcoholes (desde 30%, 50%, 70%, 90%, 96% y hasta 100%), siendo expuestos 10 min a cada concentración de alcohol. Los espermatozoides, fueron deshidratados a punto crítico en la cámara CDP 030 Dryer (Bal-Tec AG Balzers, Liechtenstein). El cubreobjetos, con las muestras espermáticas, fue unido al porta muestra o pin, usando cinta de cobre. Por último, la muestra fue recubierta con oro en la recubridora SCD 050 Sputter Coater (Bal-Tec AG Balzers, Liechtenstein). Los campos y las imágenes de M.E.B

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

fueron capturadas usando los componentes electrónicos e informáticos del Microscopio Electrónico de Barrido LV (JEOL Ltd. Japan).

5.8.- Determinación del Contenido de ADN Nuclear y Tamaño del Genoma

El contenido total de ADN nuclear de las células espermáticas fue calculado siguiendo la formula ajustada de Bartos *et al.* (2005) y a como sigue: El **contenido haploide de ADN nuclear (1C) en picogramos (pg) de las células espermáticas del pochitoque tropical =** (contenido estándar diploide de ADN de las células sanguíneas de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*/2) X (promedio en µm del tamaño de los núcleos de las células espermáticas de *K. leucostomum*) / promedio estándar en µm del tamaño de los núcleos eritrocitarios de *O. mykiss*/2. El valor diploide (2C) de 5.5 pg de las células sanguíneas de *O. mykiss*, se consideró como el estándar para este estudio basado en las recomendaciones de Hartley y Horne (1985).

Ejemplo:

1C= (5.5 pg/2) X (9.15 µm) / (21.7 µm /2)
1C= (2.8 pg) X (9.15 µm) / (10.9 µm)
1C= 25.6 pgµm / 10.9 µm
1C= 2.35 pg

El tamaño del genoma, el cual representa una copia de la información genética nuclear, se determinó considerando que 1.0 pg de ADN es igual a 0.978×10^9 pares de base (Doležel *et al.* 2003). De acuerdo con lo anterior, el tamaño del genoma de las células espermáticas se calculó utilizando la fórmula propuesta por Doležel *et al.* (2003) y a como sigue: **Tamaño del genoma haploide de las células espermáticas de *K. leucostomum* (pb)=** (0.978×10^9) x (el contenido de ADN nuclear espermático en pg de *K. leucostomum*).

Ejemplo:

Tamaño del genoma haploide (pb)= $(0.978 \times 10^9) \times (2.35$ pg)
Tamaño del genoma haploide (pb)= (978,000,000) X (2.35 pg)
Tamaño del genoma haploide (pb)= 2,298,300,000 pb o 2.298×10^9 pb

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

5.9.- Análisis Estadístico de los Datos

Los datos generados de la evaluación de la calidad seminal y la morfometría de las células espermáticas, fueron capturadas en una hoja de cálculo de Excel para Windows. A tales resultados se les calculó: porcentajes (%), promedio ($\bar{x}$) y desviación estándar (SD). Posteriormente, los datos se organizaron para ser analizados por las pruebas de normalidad y homocedasticidad. Luego, los datos en porcentajes fueron analizados por las pruebas de Kruskal-Wallis (K-W) (Zar, 1984). Al haber diferencias significativas, se utilizó la prueba de comparación múltiple de Dunn's a $P=<0.05$ de confianza. Todos los análisis, se realizaron con el programa Sigma Plot 12.3 para Windows (Systat Software, Inc. 2011-2012, SigmaPlot©).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

VI.-RESULTADOS

6.1. Fisiología de la Activación Espermática

En la obtención de las muestras de semen para el desarrollo del estudio, fueron tratados 20 especímenes adultos del pochitoque tropical *K. leucostomum,* con acetato de gonadorelina, de ellos 15 respondieron positivamente, lo que correspondió con el 75% de la población estudiada. Los especímenes empleados, mostraron peso de 323.5±11.1 gr y la talla de 131.5±83.4 mm. La talla mínima, fue de 113.8 mm, mientras la talla máxima fue de 151.5 mm. A partir de las muestras de semen puro, fue posible evaluar por triplicado, el tiempo de motilidad de las células espermáticas en minutos, el grado de movimiento espermático y el porcentaje de células activas**,** tales resultados están descritos en la **Tabla 5**.

El tiempo de motilidad de las células espermáticas, tuvo valor mínimo de 54.0±0.38 min y el valor máximo de 161.3±4.00 min. El promedio de la motilidad espermática, de los especímenes analizados, fue 94.1±32.7 min. A partir del análisis de varianza (ANVA) fue posible observar diferencias significativas (*P=<0.001*) y con la comparación múltiple de Dunn's, fue posible distinguir tres grupos ascendentes del tiempo de vitalidad espermática (**"a, b, c"**) (**Tabla 5** y **Fig. 7**).

El grado de movimiento observado en las células espermáticas de los especímenes, fue de tipo ó grado 4 y con el análisis de varianza, no fue posible encontrar diferencias significativas (*P=1.000)* entre los especímenes; el promedio del tipo de movimiento fue de 4.00±0.00 (**Tabla 5**).

Por otro lado, con el porcentaje de células motiles, no fue posible observar variación entre los especímenes estudiados, con el análisis Kruskal-Wallis, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas (*P=1.000),* con promedio general del porcentaje de células motiles de 100.0±0.00 (**Tabla 5).**

Así mismo, el promedio de espermatozoides por mililitro de semen por espécimen, se encuentran resumidos en la **Tabla 6.** El conteo de células espermáticas, no mostró variación entre machos, con el análisis de Kruskal-Wallis, (*P=0.104*), con valor mínimo de 540.0±124.7 X 10^3 y valor máximo de 756.0±124.7 X 10^3 (**Tabla 6** y **Fig. 8**). El promedio total de células espermáticas, por mililitro de semen en el pochitoque tropical fue de 669.7±98.9 X 10^3.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

6.2.- Biometrías de las Microestructuras y Tamaño del Genoma Espermático

La descripción de las microestructuras intracelulares y extracelulares de los espermatozoides del pochitoque tropical *K. leucostomum*, se basaron en el análisis mediante microscopia óptica (MOP), inmunofluorescencia (IF) y microscopia electrónica de barrido (M.E.B).

Con lo anterior fue posible, determinar que los espermatozoides del pochitoque tropical, consisten de tres microestructuras principales; la cabeza, que incluye el acrosoma en la región frontal y el núcleo; subsiguientemente la pieza media que incluye a las mitocondrias y por último, el flagelo (**Fig. 9)**.

Las imágenes tomadas con el MOP, (**Fig. 10)**, muestran que las células espermáticas del pochitoque tropical, tiene cabeza elongada, y curva. Por otra parte, el ápice de la cabeza, se encuentra cubierto por el acrosoma, que es una microestructura compacta y electrodensa. La tinción con el anticuerpo primario anti-β-actina de ratón y el anticuerpo secundario IgG 488 de cabra anti-ratón, evidencia que las tramas de la cabeza y el acrosoma está recubiertos por la proteína actina (**Fig. 11**). Las microfotografías ultraestructurales por M.E.B (**Fig. 12)**, muestran a detalle que la cabeza de dichos espermatozoides es de tipo cilíndrica y alargada.

El núcleo es una microestructura intracelular, se ubica en la cabeza y se extiende a lo largo de la misma. Se caracteriza por ser cilíndrico, elongado y ligeramente curvo. La región frontal del núcleo es reducida, mientras que, la parte posterior o base del núcleo, es más amplia. Con la tinción de giemsa con MOP (**Fig. 10**), se observó que el núcleo consiste en cromatina altamente compacta y electrodensa, lo que también se puede apreciar atreves la tinción con el marcador fluorescente DAPI, el cual revela la región que contiene nucleótidos de ADN y ARN en el núcleo (**Fig. 11**).

La región media o pieza media, es una microestructura extracelular marcadamente visible, que se extiende desde la base de la cabeza del espermatozoide hasta la base de flagelo (**Fig. 10, 11 y 12**). En lo que respecta al flagelo, este inicia después de la pieza media, a tal región del flagelo se denominó base del flagelo. La tinción realizada con anticuerpos, muestran que la actina es una de las proteínas que constituyen a la envoltura del flagelo espermático (**Fig. 11**). El análisis ultraestructural con M.E.B (**Fig. 12**), permitió observar que el flagelo tiene aspecto tubular, con la región inicial gruesa y conforme se extiende hasta la región terminal, reduce su diámetro hasta terminar en forma de resorte, que es sumamente delgado.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

La tinción con giemsa, permitió la caracterización morfométrica precisa de los espermatozoides de *K. leucostomum* por MOP. Por lo anterior, se analizaron por triplicado, las muestras de semen de 15 especímenes adultos del pochitoque tropical, en ellas fue posible registrar amplia variación en las microestructuras señaladas en la **Tabla 7**. Así pues, el área del acrosoma, registró el valor promedio mínimo de 0.73±0.02 μm^2 y el valor promedio máximo de 0.87±0.04 μm^2, con la prueba de Kruskal-Wallis, se encontró diferencias significativas (*P=<0.001*), y con la prueba de Dunn's, se encontró dos grupos ("**a** y **b**"), dichos valores correspondieron al nivel de ploidía 1n (haploide) y 1n+*xn* (aneuploide) (**Fig. 13** y **14**).

Así mismo, el área de la cabeza espermática, registró valor promedio mínimo de 17.4±0.61 μm^2 y el valor promedio máximo de 21.1±1.09 μm^2, con el análisis de Kruskal-Wallis, se reveló significativas (*P = <0.001*) y con la comparación múltiple de Dunn's (*P = <0.001)*, se derivaron dos grupos ("**a y b**"), que correspondieron con los niveles de ploidía señalados (**Fig. 15**).

Por otra parte, la biometría del núcleo espermático, mostró valor promedio mínimo de 8.65±0.60 μm^2 y máximo de 12.3±0.78 μm^2, cuando se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, se observaron diferencias significativas (*P=<0.001*), que derivaron en dos grupos de datos ("**a** y **b**"), posterior al empleo de la prueba de Dunn's, con valor de *P=<0.001,* dichos grupos, fueron congruentes con 2 niveles de ploidía (**Fig. 16)**.

La pieza media, registró valor promedio mínimo de 2.64±0.31 μm^2 y máximo de 4.22±0.46 μm^2. Mediante el análisis de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas (*P=0.001*), dichas diferencias, derivaron en dos grupos ("**a** y **b**") después de la prueba de Dunn's con el valor de *P=0.001*. Dichos grupos, correspondieron al nivel de ploidía (**Fig. 17**).

El flagelo, tuvo longitud mínima promedio de 53.0±4.51 μm y máxima de 61.9±2.79 μm, con empleo del análisis de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas (*P=<0.001*) y con la prueba *a posteriori* de Dunn's (*P=<0.001*), se derivaron dos grupos. Sin embargo, tales grupos no estuvieron relacionados con niveles de ploidía (**Fig. 18)**.

El ancho de la base del flagelo, registró valor mínimo promedio de 0.71±0.03 μm y valor máximo de 0.96±0.09 μm, mediante el análisis de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas (*P=<0.001*) y con la prueba de Dunn's, con valor de *P=<0.001*, se derivaron dos grupos. Dichos grupos, están relacionados con el nivel de ploidía (**Fig. 19)**, mientras que, en la región terminal del flagelo, se observó valor mínimo promedio de 0.51±0.05 μm y el valor máximo promedio de 0.68±0.09 μm, con el análisis de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas (*P=<0.001*) y con la prueba de Dunn's (*P=<0.001*), se lograron separar dos grupos. (**Fig. 20**).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Por otro lado, los espermatozoides del pochitoque tropical, mostraron variabilidad en longitud total, el valor promedio mínimo observado fue de 70.04±4.24 μm y el valor máximo fue de 80.3±2.71 μm. Mediante el análisis de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas (*P=<0.001*) y con la prueba de Dunn's (*P=<0.001*), se derivaron dos grupos, dichos grupos no estuvieron relacionados con el nivel de ploidía (**Fig. 21)**.

Por último, el 57% de la población de células espermáticas estudias, fueron haploides (**1n**) y el 43% fueron células espermáticas aneuploides (**1n+*xn***). El espécimen 4, tuvo el 100% de espermatozoides haploides, mientras que el pochitoque 8, tuvo el 100% de espermatozoides aneuploides (**Tabla 7**).

El análisis de las células espermáticas, permitió calcular el contenido de ADN nuclear espermático en picogramos (pg) y el tamaño del genoma en pb de los espermatozoides de *K. leucostomum*.

El contenido de ADN nuclear promedio espermático, de las células haploides (1C=haploide) fue de 2.35±0.07 pg, mientras que para las células aneuploides (1C=aneuploide) fue de 2.96±0.13 pg mientras que, el promedio del tamaño del genoma de células espermáticas haploides fue de 2.294 X 10^9 pb, mientras que para células aneuploides fue de 2.889 X 10^9 pb (**Fig. 22).**

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Tabla 5. Parámetros promedio, de la calidad espermática típica del semen en el pochitoque tropical *K. leucostomum*, que considera la motilidad en minutos, el tipo de movimiento y el porcentaje de células motiles.

Espécimen	Movimiento en minutos $\bar{x}$±D.E	Tipo de movimiento $\bar{x}$±D.E	Porcentajes de células motiles $\bar{x}$±D.E
1	54.0±0.38[a]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
2	59.1±10.5[a]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
3	63.2±5.90[a]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
4	66.6±8.77[a]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
5	68.2±7.32[a]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
6	77.8±1.67[b]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
7	83.3±7.91[b]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
8	93.0±6.44[b]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
9	94.7±8.62[b]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
10	96.2±5.76[b]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
11	99.5±9.08[b]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
12	111±7.03[b]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
13	138±2.63[c]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
14	144±13.3[c]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
15	161±4.00[c]	4.00±0.00[a]	100±0.00[a]
$\bar{x}$±D.E	**94.1±32.7**	**4.00±0.00**	**100±0.00**

$\bar{x}$= Promedio, D.E= Desviación estándar. Los resultados de los análisis estadísticos con nivel de significancia de *P=>0.05*, indican que hay diferencias entre especímenes cuando el superíndice es diferente y en caso contrario no existen

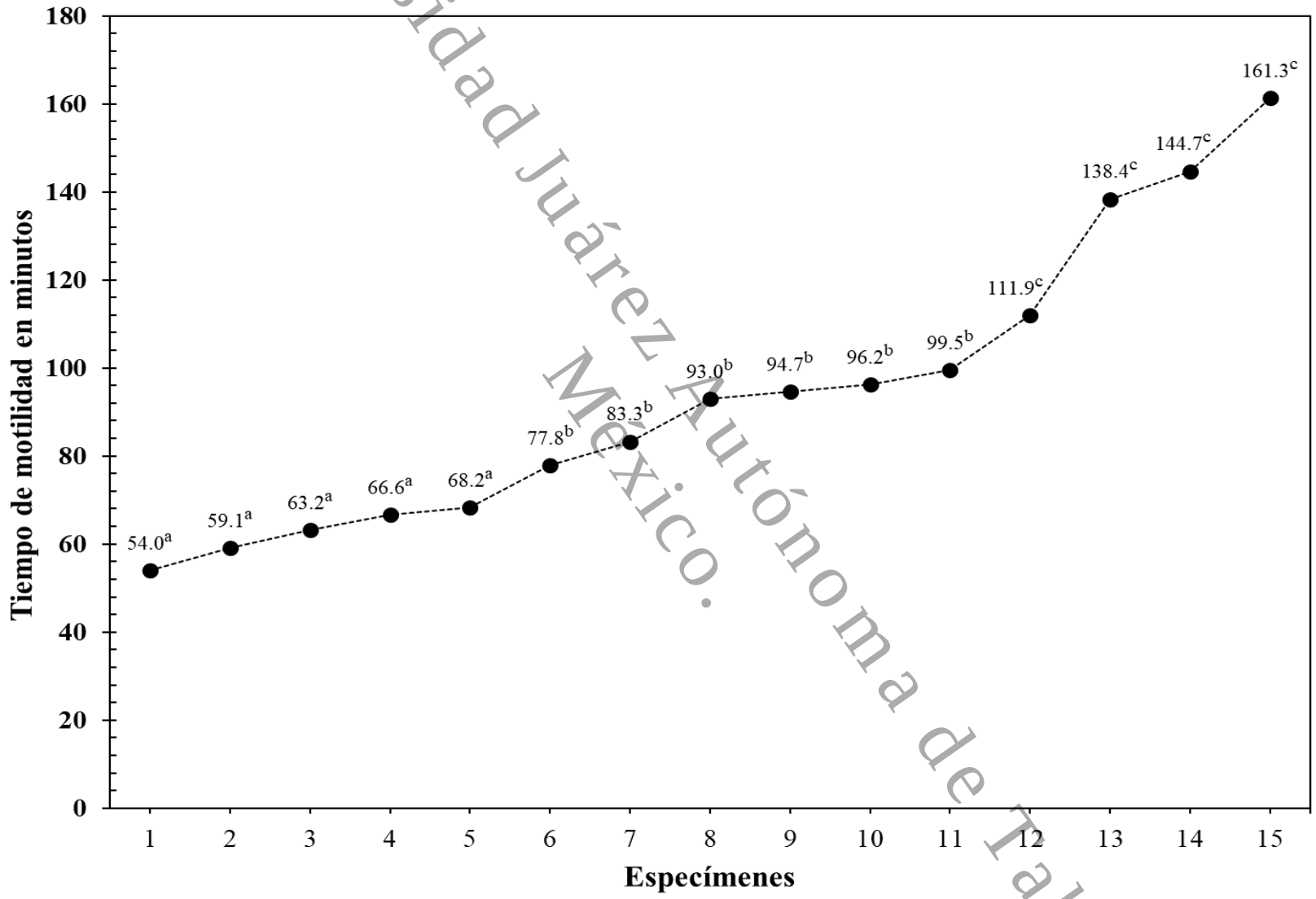

Fig. 7. Motilidad promedio, mínima y máxima de los espermatozoides de 15 especímenes adultos del pochitoque tropical *K. leucostomum.* Superíndices con vocales similares, indican que no hay diferencias significativas entre machos y en caso contrario las diferencias existen a *P=<0.05,* con la prueba de Dunn's.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Tabla 6. Número promedio, mínimo y máximo de células espermáticas estimadas en un mililitro de semen, de especímenes adultos del pochitoque tropical *K. leucostomum*.

Espécimen	Espermatozoides /mililitro de semen x10^3 ($\bar{x}$ ± D.E)
1	540.0±124.7
2	540.0±124.7
3	540.0±124.7
4	540.0±124.7
5	612.0±124.7
6	612.0±124.7
7	612.0±124.7
8	756.0±124.7
9	756.0± 124.7
10	756.0± 124.7
11	756.0± 124.7
12	756.0±124.7
13	756.0±124.7
14	756.0±124.7
15	756.0±124.7
$\bar{X}$±D.E	**669.7±98.9 X 10^3**

$\bar{x}$= Promedio, D. E= Desviación estándar. Los resultados del análisis de Kruskal-Wallis con nivel de significancia de *P=0.104*, indican que no hay diferencias entre especímenes.

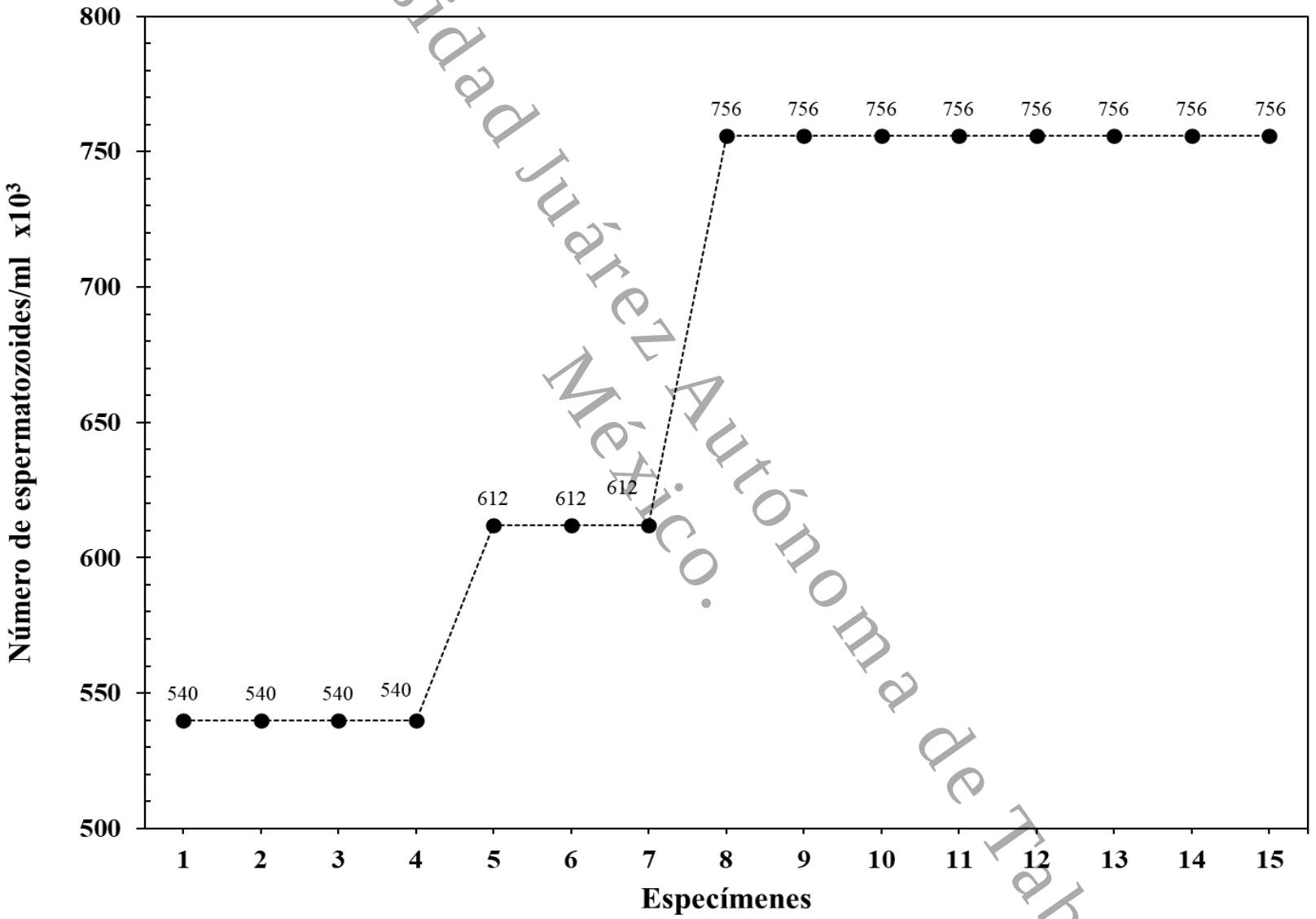

Fig. 8. Variación promedio, del número de espermatozoides por mililitro de semen en 15 machos del pochitoque tropical *K. leucostomum.*
Los resultados del análisis de Kruskal-Wallis con nivel de significancia de P=0.104, indican que no hay diferencias entre especímenes.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

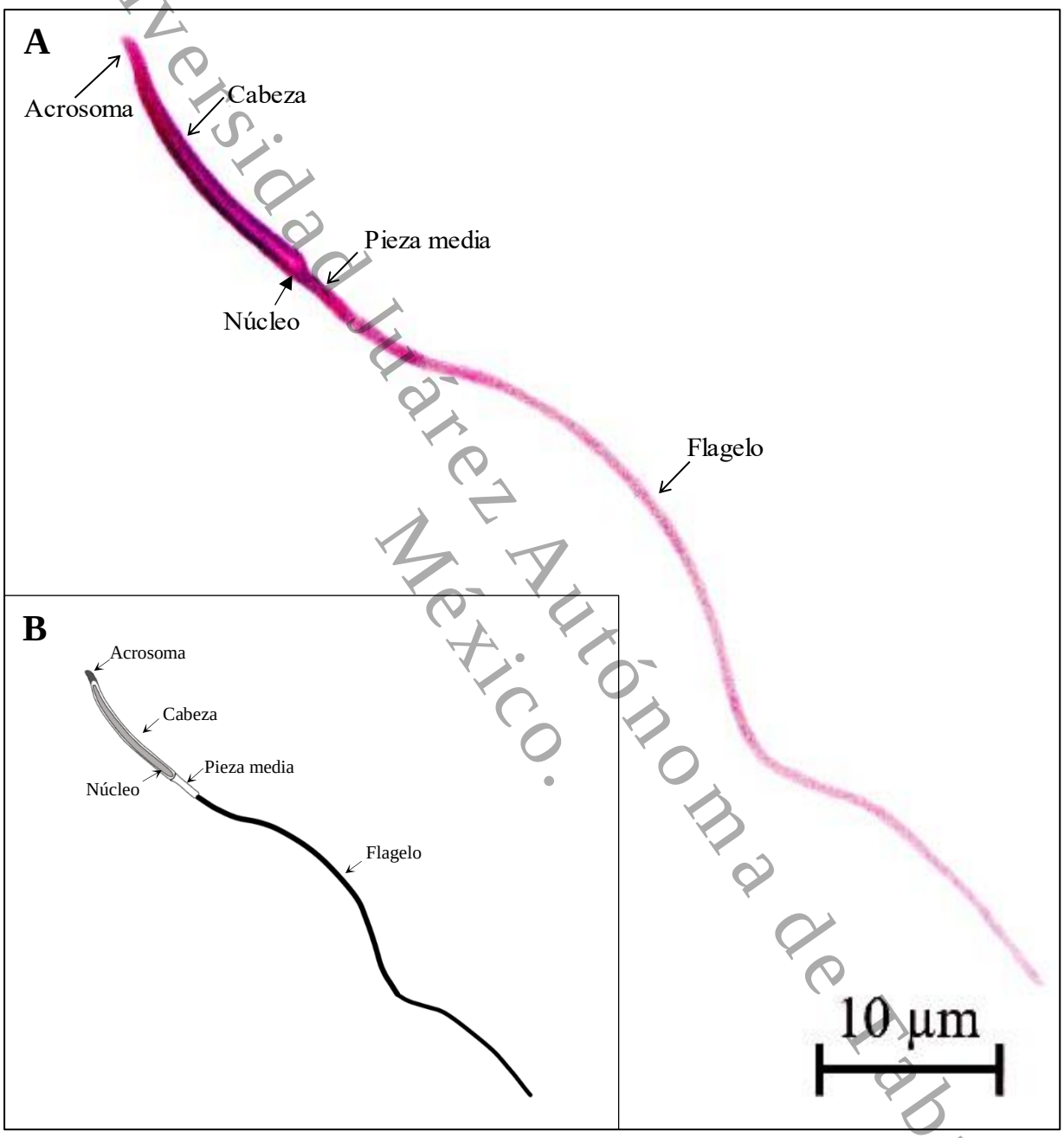

Fig. 9. Espermatozoide maduro típico del pochitoque tropical *K. leucostomum*, que se caracteriza por la cabeza, acrosoma, núcleo, pieza media y el flagelo **(A)**; y el esquema detallado del espermatozoide del pochitoque **(B)**. ***Imágenes originales por el autor: JEJJ.***

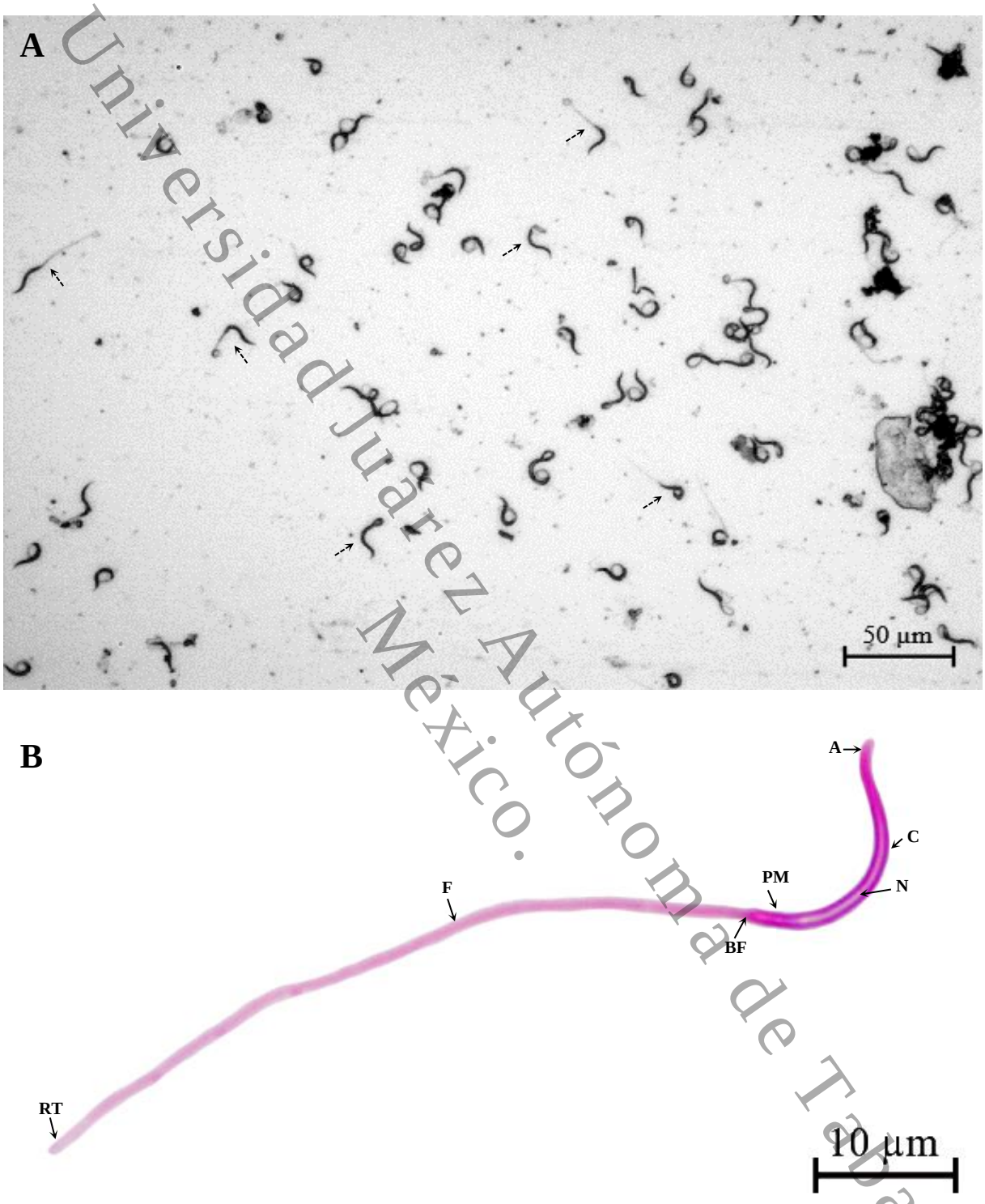

Fig. 10. Paisaje que muestra los espermatozoides típicos del pochitoque tropical *K. leucostomum*, a 10X + 1.25X del optovar por microscopia de luz transmitida en campo claro (**A)** y espermatozoide con tinción de giemsa a 40X + 1.25X del optovar, mostrando la cabeza (C), el acrosoma (A), el núcleo (N), la pieza media (PM), el flagelo (F), la base de flagelo (BF) y la región terminal de flagelo (RT) (**B**). Las flechas indican células espermáticas. ***Imágenes originales por el autor: JEJJ.***

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

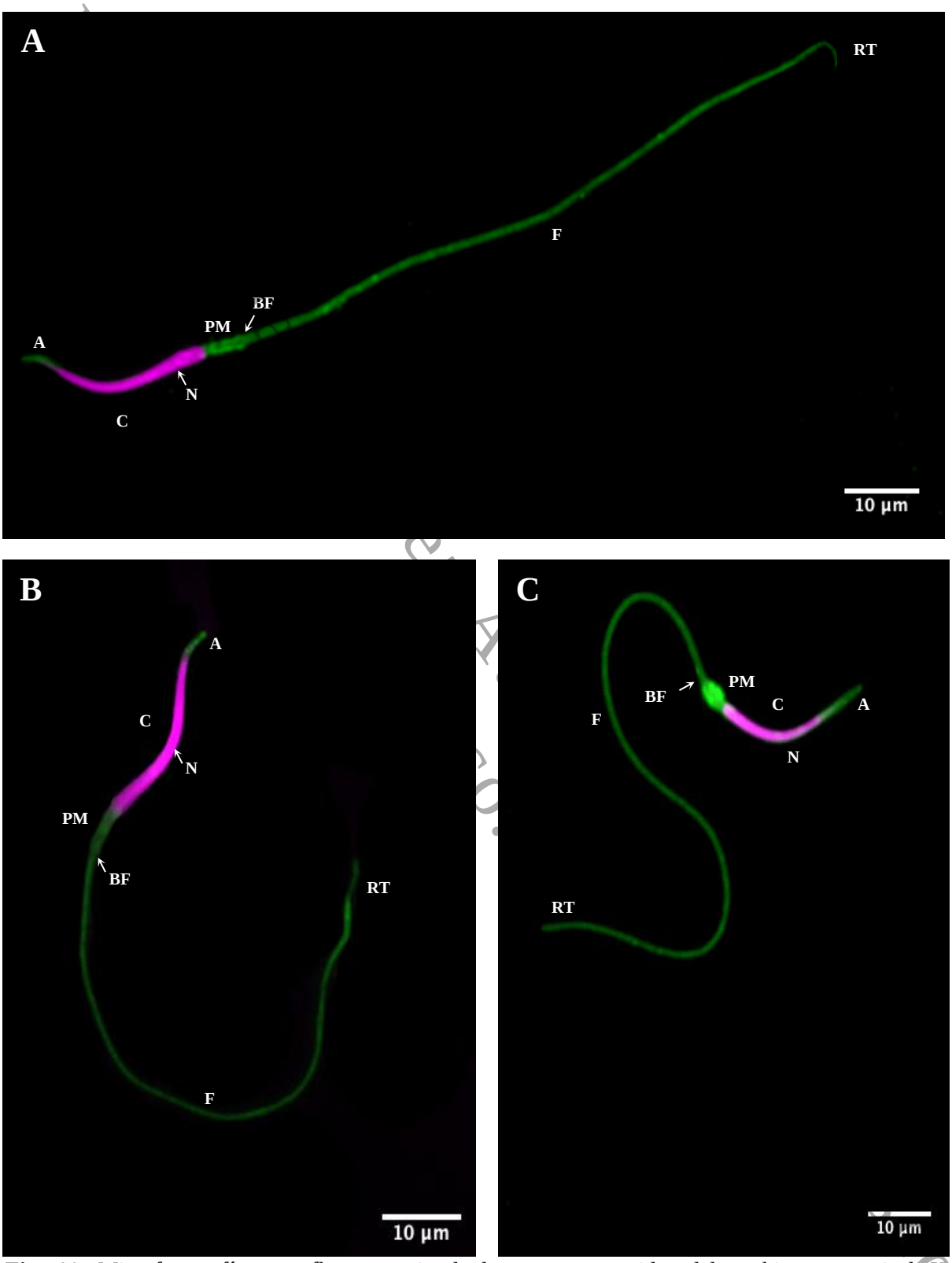

Fig. 11. Microfotografías por fluorescencia de los espermatozoides del pochitoque tropical *K. leucostomum,* se muestra la distribución de la proteína actina, sobre el citoesqueleto. El núcleo teñido con DAPI (región rosa), revela la región con ADN nuclear (N) y ADN mitocondrial (PM). Los espermatozoides muestran, la cabeza (C), el acrosoma (A), el núcleo (N), la pieza media (PM), flagelo (F), la base de flagelo (BF) y terminal de flagelo (T). ***Imágenes originales por el autor: JEJJ.***

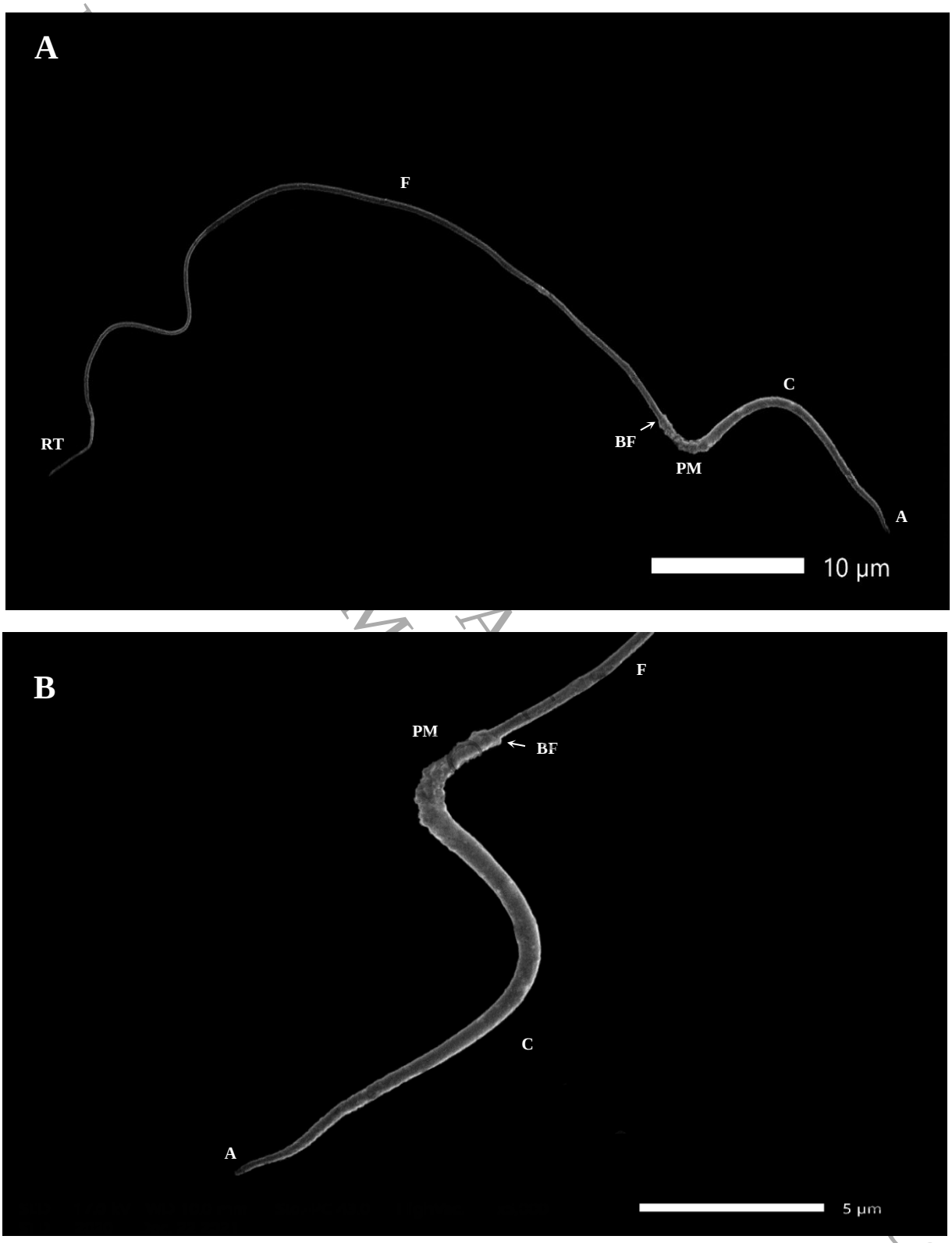

Fig. 12. Microfotografías por Microscopia Electrónica de Barrido (M.E.B) de los espermatozoides del pochitoque tropical *K. leucostomum*, con la perspectiva de un espermatozoide típico completo (**A**) y los detalles de la cabeza y la pieza media (**B**). Los espermatozoides muestran los detalles de la cabeza (C), el acrosoma (A), la pieza media (PM), flagelo (F), la base de flagelo (BF) y región terminal de flagelo (RT). ***Imágenes originales por el autor: JEJJ.***

Tabla 7. Promedio en micrómetros de las microestructuras y nivel ploide de los espermatozoides de 15 especímenes del pochitoque tropical *K. leucostomum.*

Espécimen	Área del acrosoma $\bar{x}$±D.E	Área de la cabeza $\bar{x}$±D.E	Área del núcleo $\bar{x}$±D.E	Área pieza media $\bar{x}$±D.E	Largo del flagelo $\bar{x}$±D.E	Ancho base del flagelo $\bar{x}$±D.E	Ancho término del flagelo $\bar{x}$±D.E	Longitud total del esperma $\bar{x}$±D.E	Nivel ploide (Frecuencia %)
1	0.74±0.02[a]	17.7±0.49[a]	9.10±0.52[a]	2.92±0.24[a]	55.0±0.96[a]	0.71±0.03[a]	0.54±0.07[a]	71.9±1.51[a]	1n (50)
	0.85±0.02[b]	20.4±0.62[b]	11.1±0.56[b]	3.83±0.27[b]	55.1±0.98[a]	0.90±0.07[b]	0.62±0.06[b]	72.5±1.07[a]	1n+*xn* (50)
2	0.74±0.02[a]	17.9±0.74[a]	9.15±0.53[a]	3.10±0.26[a]	55.3±1.44[a]	0.73±0.02[a]	0.58±0.07[a]	72.9±1.38[a]	1n (77)
	0.86±0.01[b]	20.3±0.74[b]	12.3±0.49[b]	4.00±0.46[b]	55.7±0.82[a]	0.92±0.05[b]	0.68±0.09[b]	73.5±0.76[a]	1n+*xn* (23)
3	0.75±0.02[a]	17.8±0.59[a]	9.47±0.39[a]	3.28±0.26[a]	55.3±1.68[a]	0.75±0.03[a]	0.57±0.06[a]	71.4±1.93[a]	1n (50)
	0.86±0.04[b]	20.0±0.54[b]	11.4±0.87[b]	4.00±0.34[b]	55.5±1.62[a]	0.92±0.06[b]	0.59±0.06[a]	72.1±1.75[a]	1n+*xn* (50)
4	0.74±0.02[a]	17.4±0.61[a]	9.03±0.54[a]	3.02±0.35[a]	56.3±2.96[a]	0.74±0.02[a]	0.56±0.06[a]	73.7±3.10[a]	1n (100)
5	0.73±0.01[a]	17.8±0.53[a]	9.44±0.51[a]	3.19±0.34[a]	54.4±2.29[a]	0.71±0.05[a]	0.55±0.06[a]	70.7±2.31[a]	1n (53)
	0.83±0.02[b]	20.0±0.87[b]	11.5±0.94[b]	3.84±0.16[b]	53.8±1.15[a]	0.91±0.09[b]	0.67±0.09[b]	71.2±1.31[a]	1n+*xn* (47)
6	0.74±0.03[a]	17.9±0.67[a]	9.29±0.41[a]	3.15±0.30[a]	54.8±3.63[a]	0.75±0.04[a]	0.56±0.04[a]	71.8±3.43[a]	1n (43)
	0.86±0.04[b]	20.4±0.73[b]	11.8±0.85[b]	4.08±0.35[b]	54.7±0.98[a]	0.93±0.06[b]	0.66±0.07[b]	72.4±1.26[a]	1n+*xn* (57)
7	0.74±0.02[a]	17.9±0.84[a]	9.43±0.48[a]	2.95±0.35[a]	53.2±3.08[a]	0.75±0.04[a]	0.57±0.05[a]	70.3±3.57[a]	1n (47)
	0.85±0.03[b]	20.1±0.79[b]	11.6±0.76[b]	3.45±0.26[b]	55.1±1.98[a]	0.89±0.04[b]	0.66±0.08[b]	73.0±2.45[a]	1n+*xn* (53)
8	0.86±0.04[b]	21.1±1.09[b]	12.2±0.93[b]	4.22±0.46[b]	57.6±1.27[a]	0.97±0.08[b]	0.63±0.08[b]	74.9±1.47[a]	1n+*xn* (100)
9	0.74±0.02[a]	17.9±0.57[a]	8.89±0.54[a]	3.38±0.49[a]	56.6±2.90[a]	0.74±0.02[a]	0.56±0.05[a]	73.2±2.67[a]	1n (50)
	0.86±0.05[b]	20.5±1.07[b]	12.3±0.78[b]	4.14±0.61[b]	56.7±2.96[a]	0.89±0.08[b]	0.67±0.11[b]	73.8±2.96[a]	1n+*xn* (50)
10	0.75±0.02[a]	17.7±0.73[a]	9.00±0.61[a]	2.84±0.30[a]	55.1±0.99[a]	0.73±0.05[a]	0.56±0.07[a]	71.7±0.97[a]	1n (77)
	0.83±0.01[b]	19.4±0.36[b]	11.6±0.66[b]	3.35±0.13[b]	55.2±0.71[a]	0.90±0.06[b]	0.63±0.04[b]	72.3±0.64[a]	1n+*xn* (23)
11	0.75±0.02[a]	17.7±0.54[a]	8.65±0.60[a]	2.83±0.24[a]	53.0±4.51[a]	0.74±0.04[a]	0.60±0.06[b]	70.0±4.24[a]	1n (53)
	0.87±0.04[b]	20.2±1.04[b]	10.8±0.67[b]	3.77±0.44[b]	54.9±4.51[a]	0.91±0.05[b]	0.61±0.06[b]	72.6±4.82[a]	1n+*xn* (47)
12	0.74±0.01[a]	18.1±0.61[a]	9.27±0.48[a]	2.64±0.31[a]	53.5±1.83[a]	0.73±0.05[a]	0.57±0.07[a]	71.1±1.89[a]	1n (83)
	0.86±0.03[b]	20.8±0.89[b]	11.2±0.59[b]	3.75±0.17[b]	54.0±1.72[a]	0.94±0.08[b]	0.62±0.06[b]	71.5±2.02[a]	1n+*xn* (17)
13	0.76±0.04[a]	18.0±0.55[a]	9.41±0.50[a]	2.94±0.32[a]	54.5±1.73[a]	0.75±0.03[a]	0.55±0.03[a]	71.5±2.04[a]	1n (47)
	0.85±0.03[b]	19.9±0.85[b]	11.3±0.46[b]	3.76±0.26[b]	55.1±1.30[a]	0.88±0.05[b]	0.64±0.08[b]	72.4±1.72[a]	1n+*xn* (53)

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Continua Tabla 7.

Espécimen	Área del acrosoma $\bar{x}$±D.E	Área de la cabeza $\bar{x}$±D.E	Área del núcleo $\bar{x}$±D.E	Área pieza media $\bar{x}$±D.E	Largo de flagelo $\bar{x}$±D.E	Ancho base de flagelo $\bar{x}$±D.E	Ancho terminal de flagelo $\bar{x}$±D.E	Longitud del esperma $\bar{x}$±D.E	Nivel ploide (Frecuencia %)
14	0.75 ± 0.02^{a}	18.1 ± 0.67^{a}	8.79 ± 0.57^{a}	2.89 ± 0.41^{a}	61.9 ± 2.79^{b}	0.73 ± 0.03^{a}	0.60 ± 0.06^{b}	80.3 ± 2.71^{b}	1n (67)
	0.84 ± 0.02^{b}	20.2 ± 0.76^{b}	10.8 ± 0.47^{b}	3.80 ± 0.61^{b}	61.2 ± 2.40^{b}	0.91 ± 0.08^{b}	0.64 ± 0.05^{b}	79.8 ± 2.40^{b}	1n+*xn* (33)
15	0.74 ± 0.02^{a}	17.7 ± 0.74^{a}	8.96 ± 0.70^{a}	2.77 ± 0.35^{a}	54.2 ± 2.65^{a}	0.74 ± 0.04^{a}	0.51 ± 0.05^{a}	71.3 ± 2.50^{a}	1n (60)
	0.85 ± 0.02^{b}	20.5 ± 0.71^{b}	11.2 ± 0.51^{b}	3.53 ± 0.56^{b}	53.9 ± 3.70^{a}	0.87 ± 0.09^{b}	0.62 ± 0.03^{b}	71.7 ± 3.57^{a}	1n+*xn* (40)
$\bar{x}$±D.E	**0.74±0.01**	**17.8±0.20**	**9.13±0.26**	**2.97±0.18**	**55.2±2.20**	**0.73±0.01**	**0.56±0.02**	**72.3±2.52**	**1n (57)**
$\bar{x}$±D.E	**0.86±0.03**	**20.3±0.42**	**11.5±0.50**	**3.95±0.16**	**55.6±1.91**	**0.91±0.02**	**0.64±0.03**	**73.1±2.16**	**1n+*xn* (43)**

$\bar{x}$= Promedio, D. E= Desviación estándar, 1+xn= aneuploidía. Los resultados por microestructura espermática del análisis Kruskal-Wallis y de la prueba *a posteriori* de Dunn's con nivel de significancia de $P=<0.05$, indican que hay diferencias cuando el superíndice es diferente y en caso contrario no existen.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

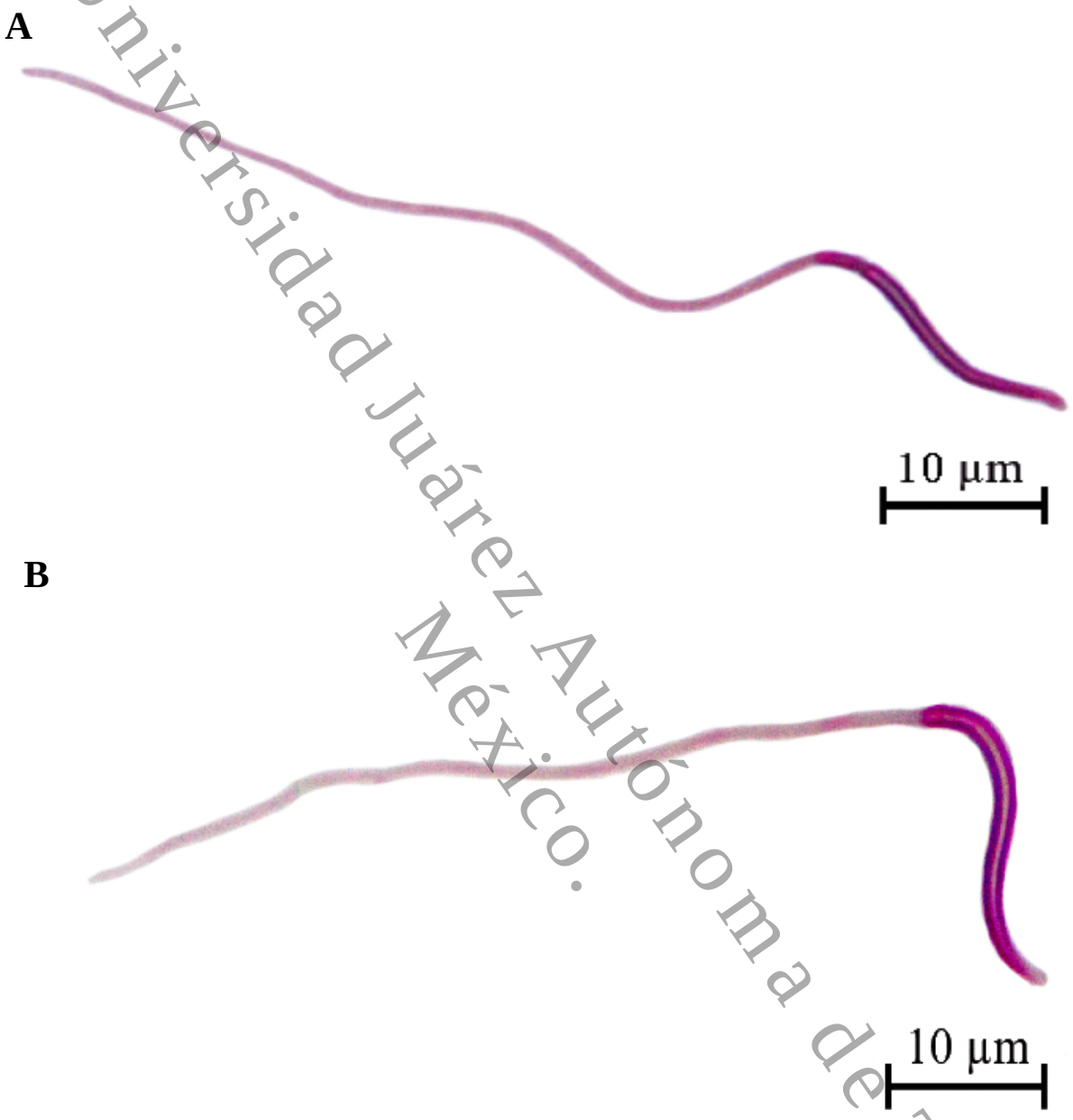

Fig. 13. Microfotografías espermáticas teñidas con giemsa de *K. leucostomum* por microscopia óptica (MOP) que muestra al espermatozoide haploide (*1n*) (**A**) y al espermatozoide aneuploide (1n+*xn*) (**B),** observadas en especímenes del pochitoque tropical a 40X + 1.25X del optovar. ***Imágenes originales por el autor: JEJJ.***

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

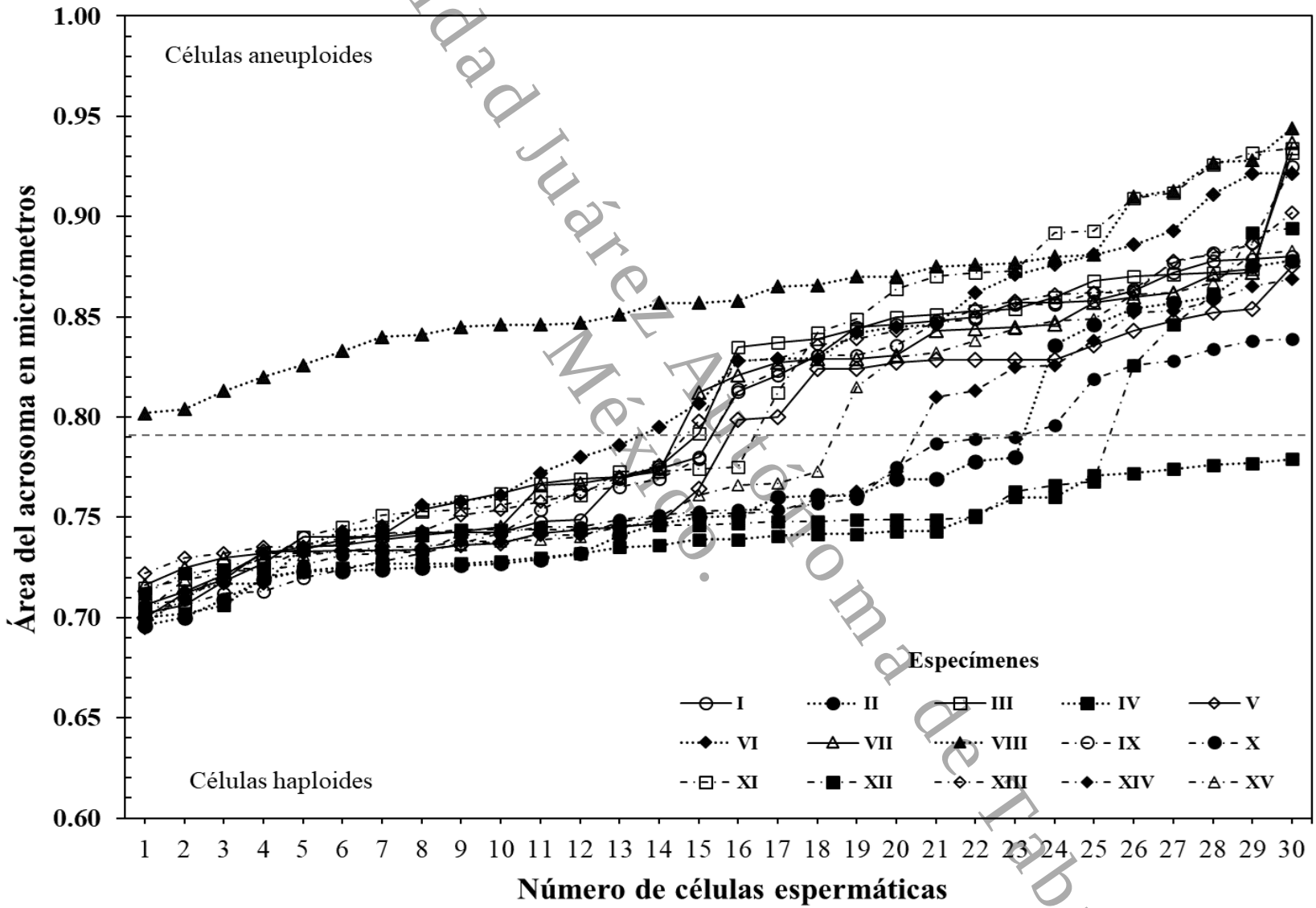

Fig. 14. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, del área del acrosoma de las células espermáticas del pochitoque tropical *K. leucostomum*. La línea horizontal punteada, indica el límite entre células haploides y aneuploides.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

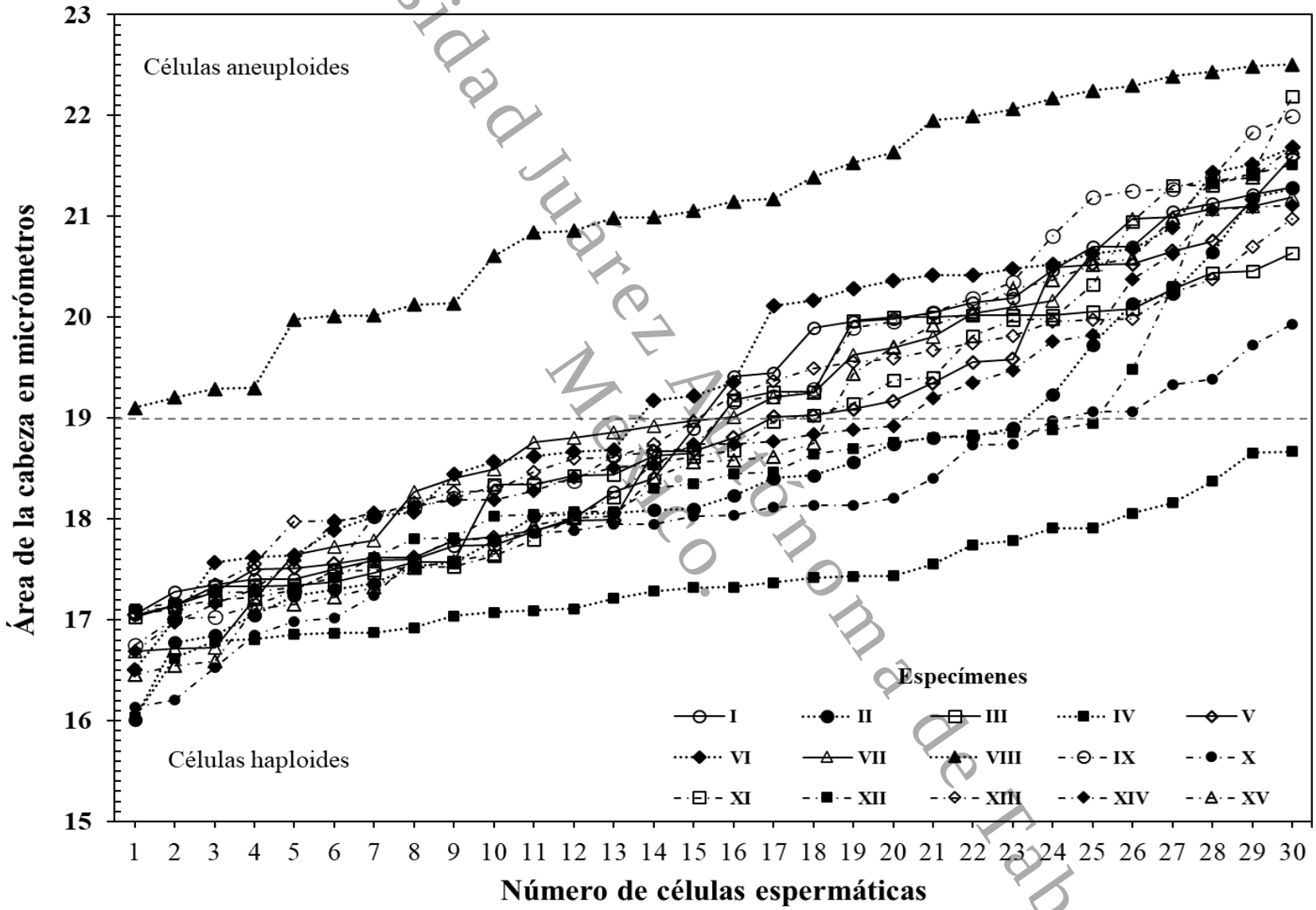

Fig. 15. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, del área de cabeza de las células espermáticas del pochitoque tropical *K. leucostomum*. La línea horizontal punteada, indica el límite entre células haploides y aneuploides.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

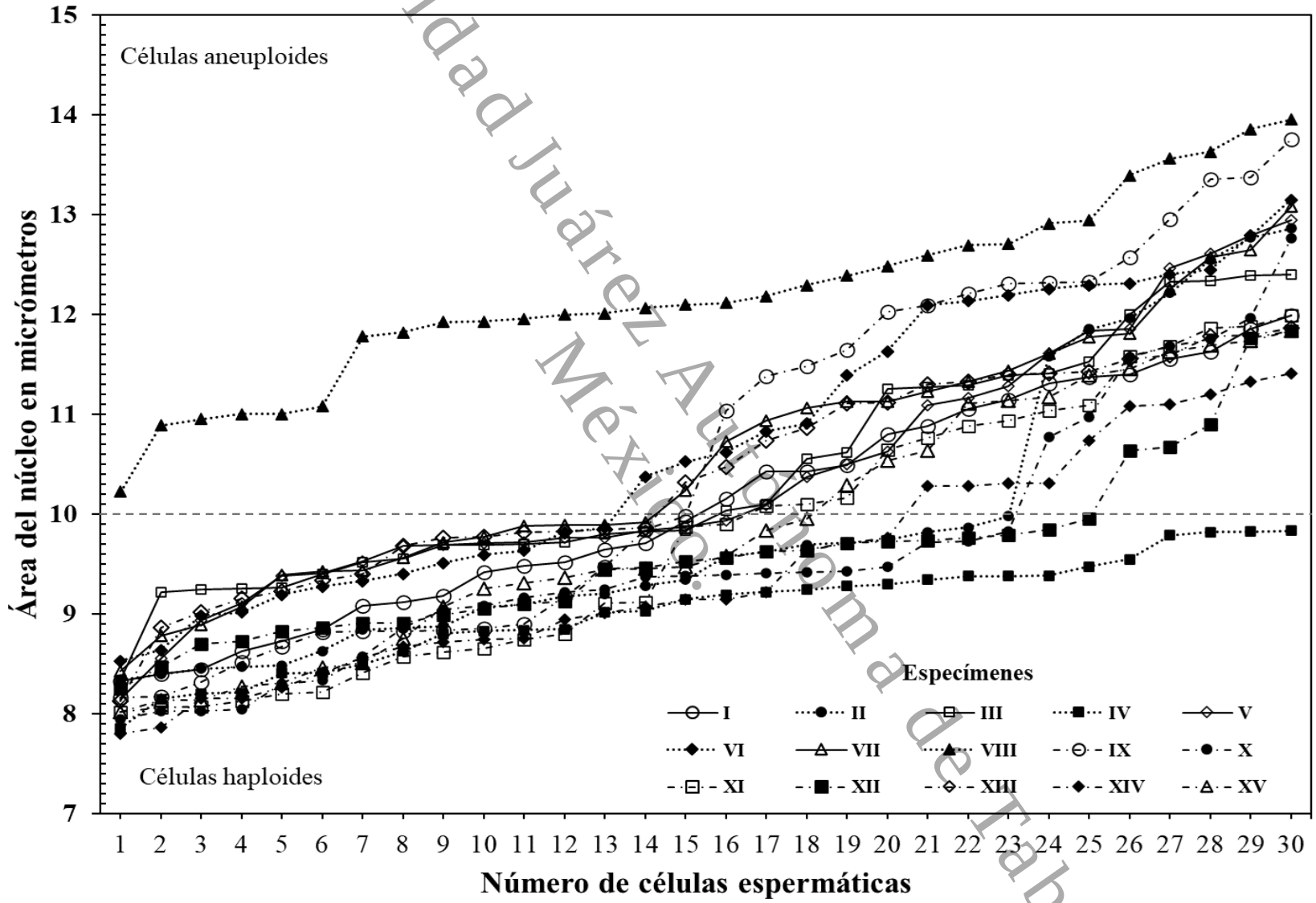

Fig. 16. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, del área del núcleo de las células espermáticas del pochitoque tropical *K. leucostomum*. La línea horizontal punteada, indica el límite entre células haploides y aneuploides.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

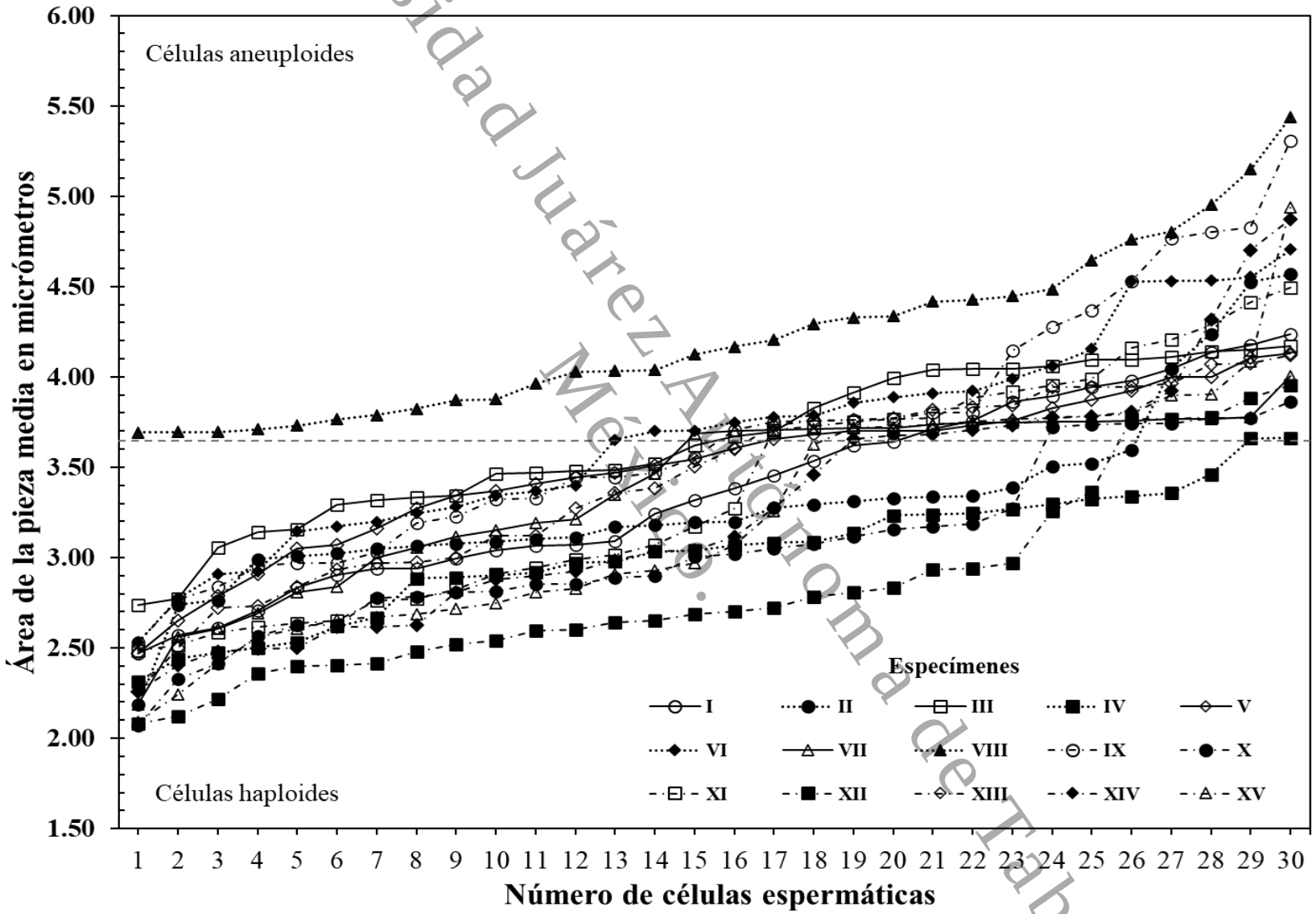

Fig. 17. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, del área de la pieza media de las células espermáticas del pochitoque tropical *K. leucostomum*. La línea horizontal punteada, indica el límite entre células haploides y aneuploides.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

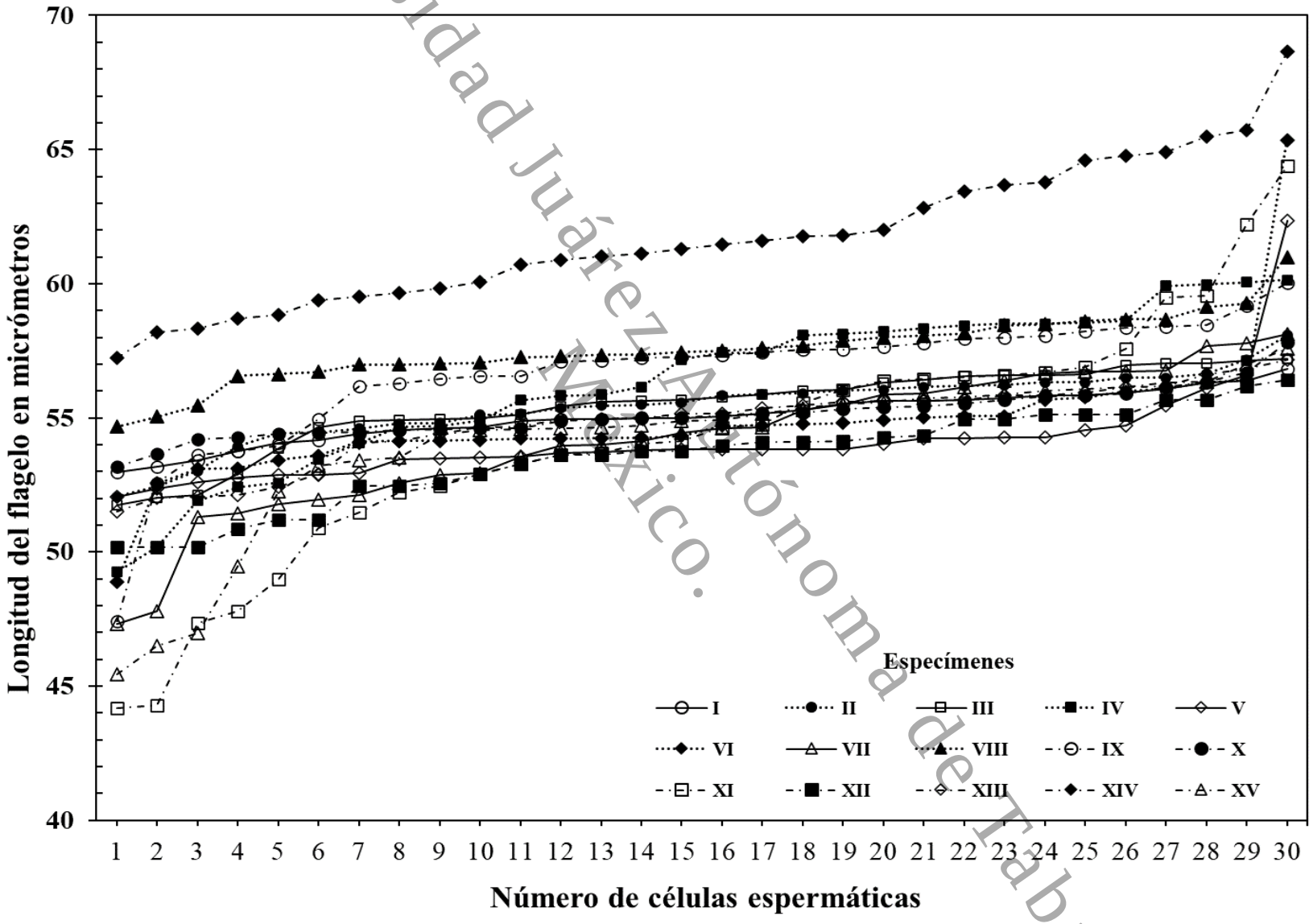

Fig. 18. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, de la longitud del flagelo de los espermatozoides del pochitoque tropical *K. leucostomum*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

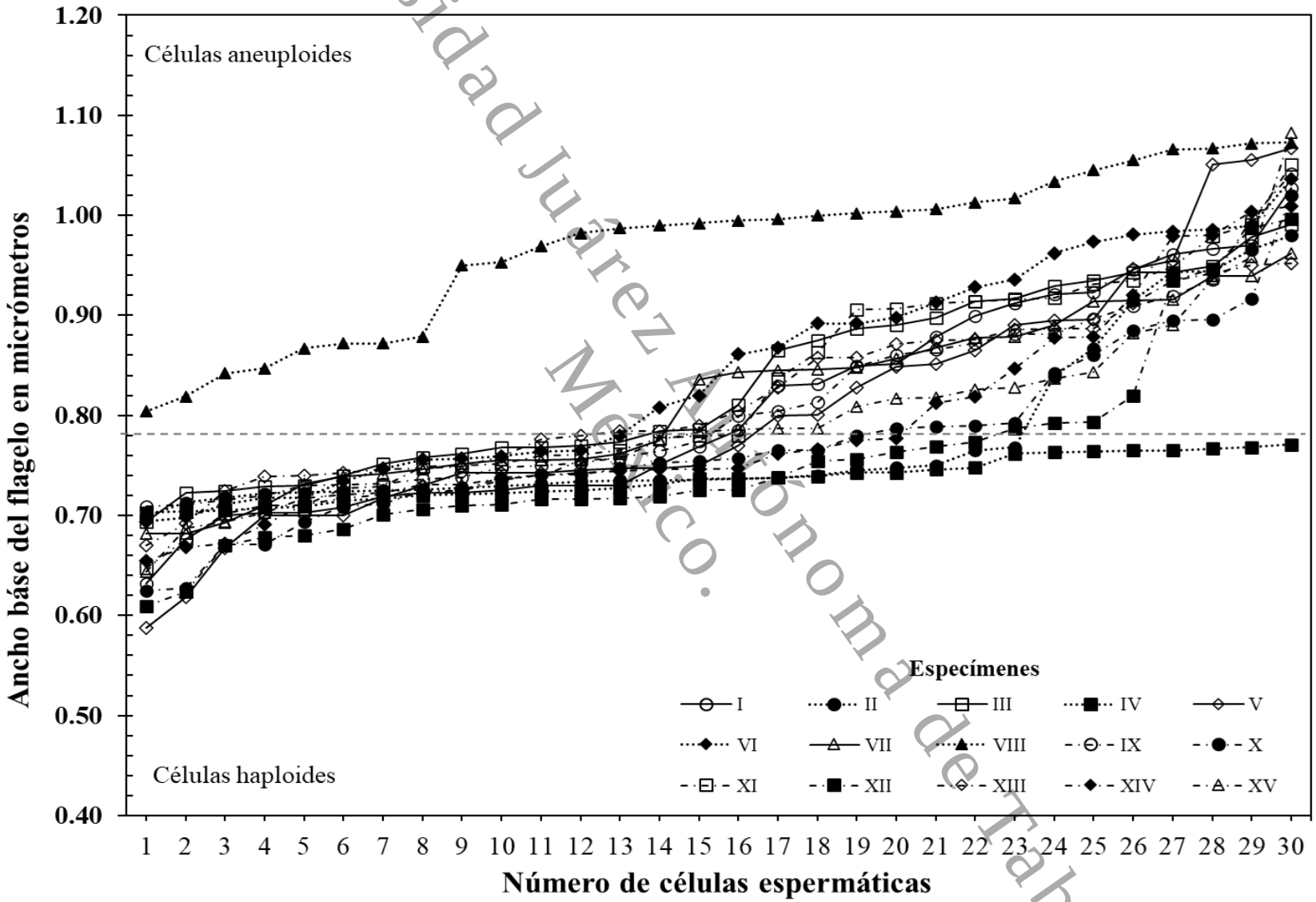

Fig. 19. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, del ancho de la base del flagelo de las células espermáticas del pochitoque tropical *K. leucostomum*. La línea horizontal punteada, indica el límite entre células haploides y aneuploides.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

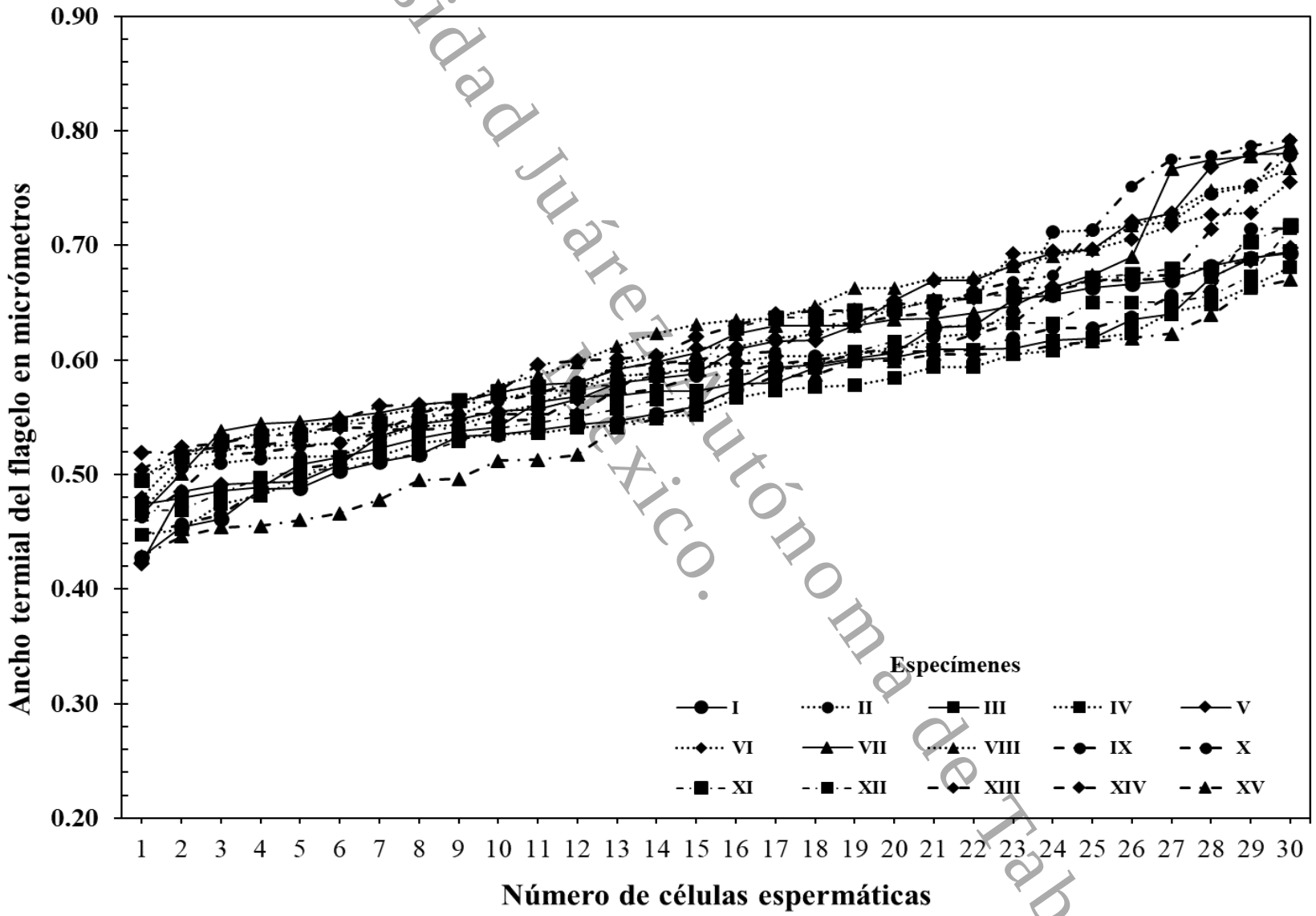

Fig. 20. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, del ancho de la región terminal del flagelo, de las células espermáticas del pochitoque tropical *K. leucostomum*.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

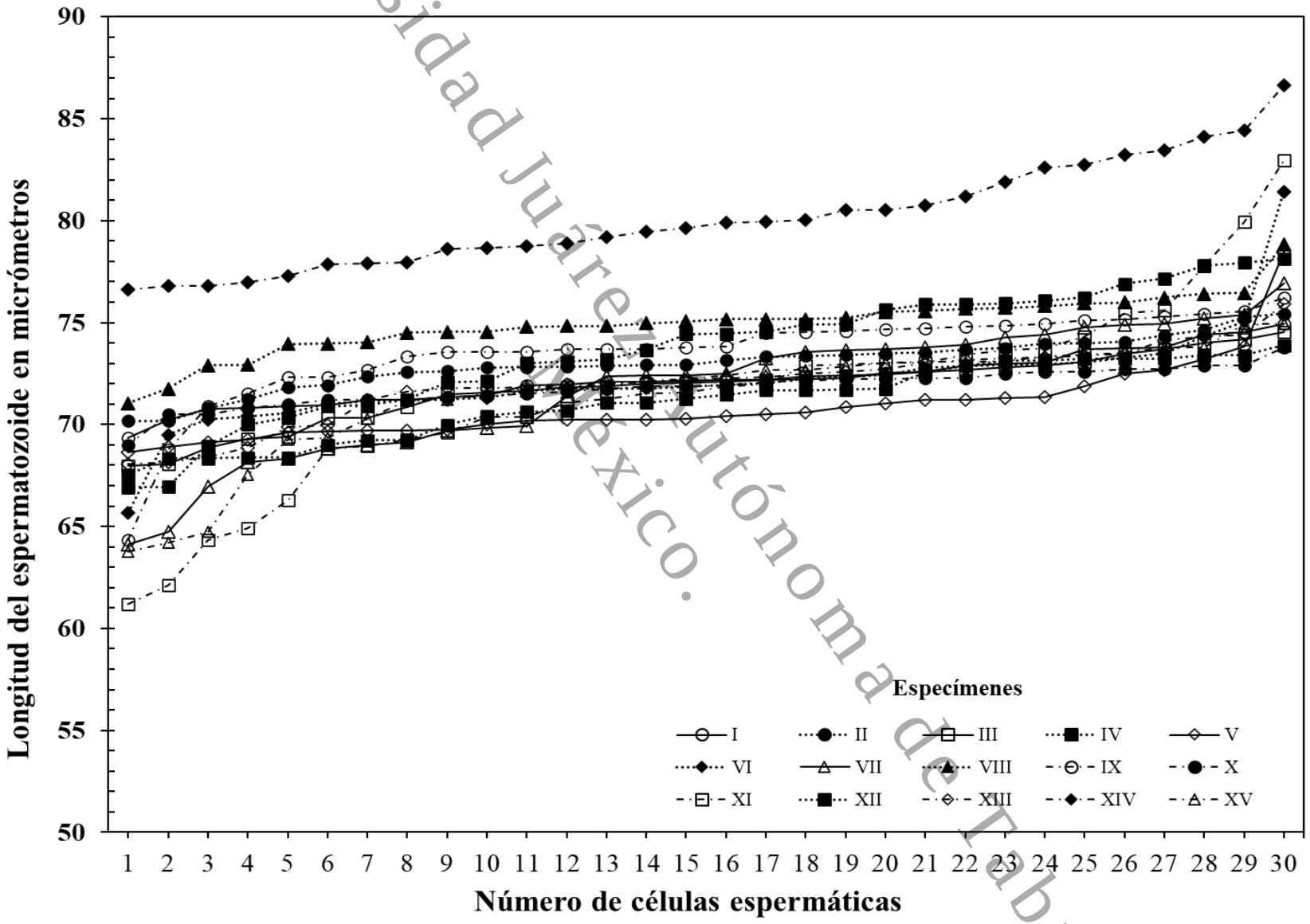

Fig. 21. Variación del tamaño, mínimo y máximo en micrómetros, de la longitud de los espermatozoides del pochitoque tropical *K. leucostomum*.

niversidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

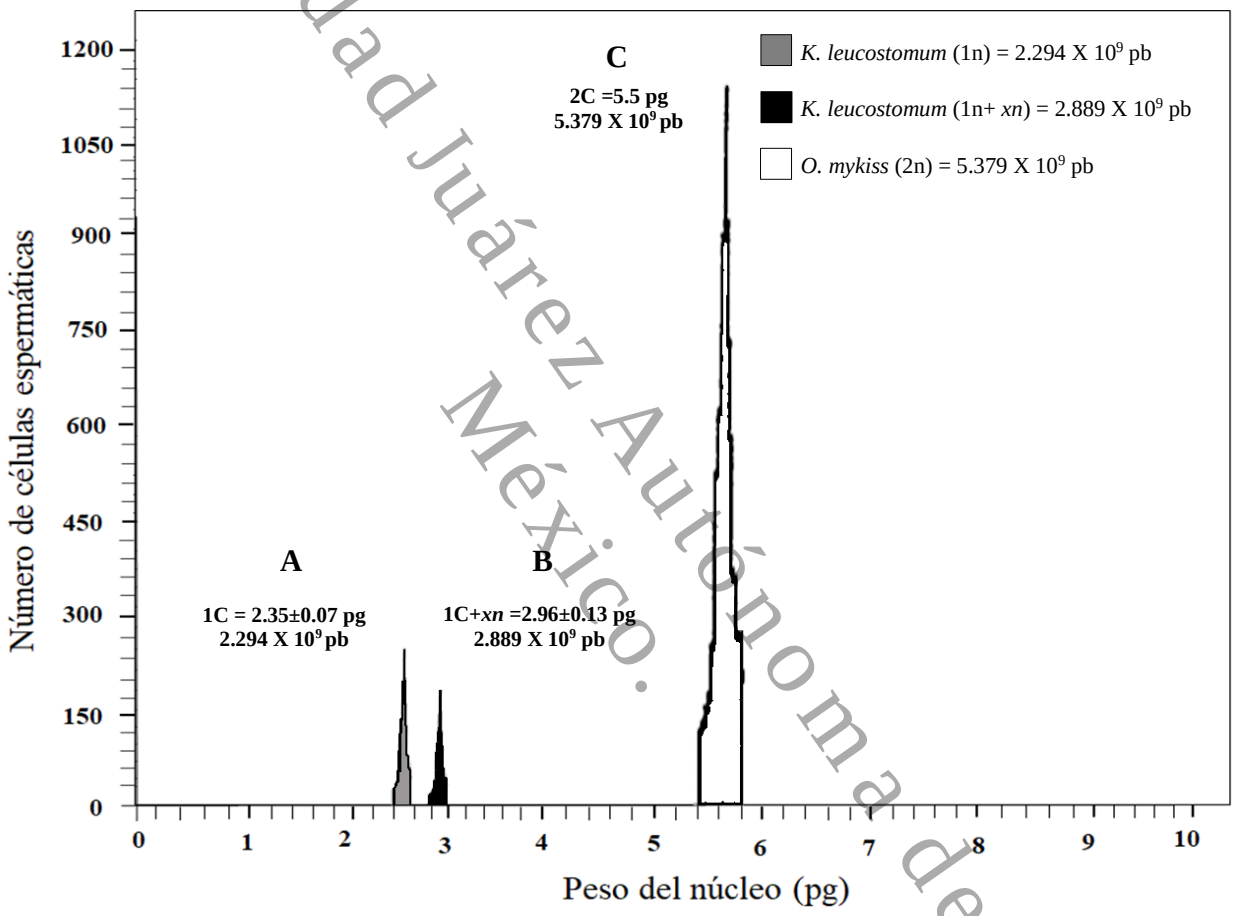

Figura 22. Peso del núcleo de las células espermáticas de *K. leucostomum* (**A y B**) determinado por medio del procedimiento estandar de citometría, con respecto al peso del núcleo diploide de la trucha arcoíris *O. mykiss* (control) (**C**).

VII.- DISCUSIÓN

En los estudios previos encaminados a comprender la reproducción de los miembros de la familia Testudines o tortugas, sobre la inducción artificial de la reproducción y la capacidad reproductiva de las hembras y machos, se han considerado en un reducido número de especies. En ello, se tienen reportes tempranos, de la inducción de la ovulación, por ejemplo, de las hembras de la hicotea *T. scripta elegans*, con el empleo de oxitocina (Tucker *et al*. 2007), así como en hembras de la tortuga carey *E. imbricata*, con la Hormona Folículo Estimulante (HFE/FSH) (Kawazu *et al*. 2014[c]) y la inducción de la ovulación y ovoposición con oxitocina, en *E. imbricata* (Kawazu *et al*. 2014[a]). Sin embargo, en los machos de las tortugas, el empleo de hormonas como estimulantes de la espermiación, no se han reportado hasta antes de lo señalado en el presente estudio para los machos de *K. leucostomum*. En dicho sentido, fueron tratados 20 especímenes adultos del pochitoque tropical, con acetato de gonadorelina, de ellos 15 (o el 75%) respondieron positivamente, al obtenerse muestras de semen de buena calidad en volumen y en las particularidades fisiológicas de la activación espermática necesarias para la fertilización; lo que indica que dicho tratamiento hormonal es viable para estimular la espermiación en los machos de los quelonios, en particular en especies del género *Kinosternon* y de su aplicación, para estudios de carácter reproductivo como el señalado para el presente documento. En los estudios realizados por Tanasanti *et al*. (2009); Sirinarumitr *et al*. (2010); Kawazu *et al*. (2014[b]); se reporta el uso de sedantes y la práctica de electroestimulación cloacal, para la obtención de semen. La colecta de semen en los estudios mencionados, fue mediocremente exitosa. Sin embargo, en esta investigación, se demuestra una manera no invasiva, para la recolecta de semen, mediante masajes en la base de cola del espécimen. Por lo anterior, la citada técnica de masajes a diferencia de la electroestimulación, puede realizarse en el campo y en el laboratorio de modo exitoso; sin perjuicio de la integridad biológica de los especímenes sometidos a la estimulación.

En las tortugas, de todos los parámetros para la evaluación de la calidad espermática de empleo general, solo se han reportado en el grupo de los Testudines, los porcentajes de motilidad espermática, que se han realizado en dos especies de tortugas marinas, como la tortuga olivácea o golfina (*L. olivácea*) (Tanasanti *et al*. 2009; Sirinarumitr *et al*. 2010) y la tortuga carey (*E. imbricata*) (Tanasanti *et al*. 2009; Sirinarumitr *et al*. 2010; Kawazu *et al*. 2014[b]). Así también, en la tortuga terrestre *S. pardalis* (Zimmerman & Mitchell, 2017) y por primera ocasión en el presente estudio, en una especie de tortuga tropical dulceacuícola *K. leucostomum*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Por otro lado, en la evaluación de los parámetros de la activación espermática, el tiempo promedio de motilidad o vitalidad espermática en el pochitoque, fue de 94.1±32.7 min. En cuanto a la evaluación del tipo o grado de movimiento espermático y el porcentaje de células motiles, los espermatozoides de los especímenes de *K. leucostomum*, presentaron movimiento progresivo promedio de 4.00±00 (con escala de 0-4), con el 100±0.00% de células motiles. Resultados similares, han sido reportados en el anfibio *Lithobates catesbeianus*, con movimiento progresivo promedio de 4.80 (con escala de 1-5) y 95% de células motiles (Pereira *et al.*2013). Sin embargo, el tipo de movimiento progresivo y el porcentaje de células motiles en *K. leucostomum*, es alto si se compara con lo registrado en otras especies de reptiles, como es el caso reportado por Johnston *et al*. (2014), para *Crocodylus porosus* movimiento promedio de tipo 2.6±0.2 (escala de 0-5) con 50.7±4.2 % de células motiles. Mientras que Assumpção *et al.* (2017), reportan en *Caiman crocodilus*, movimiento promedio de grado 3 (escala de 0-5) con el 80-90% de células motiles. Por otro lado, Zacariotti *et al.* (2007), informa que la serpiente *Crotalus durissus terrificus*, el movimiento progresivo promedio fue 2.96±0.17 (escala de 0-5) con 63.88±4.43% de células motiles.

El movimiento progresivo y el porcentaje de células motiles, son parámetros importantes para la evaluación de la calidad espermática. A pesar de ello, estudios anteriores de evaluación espermática en tortugas, no consideraron el movimiento progresivo, por lo que no es posible comparar dicho parámetro con el resultado obtenido en *K. leucostomum* pero, se reportan el porcentaje de células motiles, donde el pochitoque tropical, presenta mayor porcentaje de células motiles con respecto a otras tortugas, Sirinarumitr *et al.* (2010), observaron que el porcentaje de células motiles en *L. olivacea* y *E. imbricata* al momento de la colecta del semen, fue de 8.33±15.70% y 14±15.57%, respectivamente. Mientras que Tanasanti *et al.* (2009), reporta 28.25 % y 60% de células motiles en las mismas especies respectivamente. Por otro lado, Kawazu *et al*. (2014[b]), en otro estudio en *E. imbricata*, observó que el porcentaje de células motiles fue de 2.0% a 2.5% y Zimmerman & Mitchell (2017), reportaron que en *S. pardalys*, el porcentaje de células espermáticas motiles fue de 57±18.1%.

Tomando en cuenta las comparaciones de la motilidad espermática (tipo de movimiento y el porcentaje de espermatozoides motiles) entre *K. leucostomum* y las especies reportadas en este apartado; entonces los especímenes del pochitoque tropical, presentan en este estudio índices de fecundidad altos, ya que aquellas especies donde se reportan tipo de movimiento progresivo ≤2.5

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco México.

y de células motiles ≤30% son infértiles, pues dichos valores son considerados mínimos para la inseminación artificial exitosa en las serpientes del maíz *Elaphe guttata* (Mattson *et al.* 2007).

La concentración promedio de espermatozoides por mililitro de semen, estimado en el pochitoque tropical *K. leucostomum,* fue de 669.7±98.9 X 10^3, dicha concentración, es pequeña si se compara con lo reportado en otras especies de tortugas, por ejemplo, Tanasanti *et al*. (2009), estimaron en *L. olivacea* y en *E. imbricata*, concentraciones promedio de 67.3 X 10^6/ml y 512 X 10^6/ml respectivamente. En otro estudio, Kawazu *et al*. (2014[b]), reportó para *E. imbricata*, concentraciones promedio de 325 X 10^6/ml. Por otro lado, Zimmerman & Mitchell (2017), reportaron que los machos de *S. pardalis*, producen concentración espermática promedio de 101.62 ±91.43 X 10^6/ml. En relación con la reproducción de las hembras del Pochitoque tropical, se ha estimado que estas pueden ovopositar de uno (Iverson *et al.* 1993) a seis huevos (Giraldo *et al*. 2013); mientras en *E. imbricata* se estiman puestas de 158±29 huevos (Bjorndal, 1985), en *L. olivacea* 108 huevos (Iverson *et al.* 1993) y en *S. pardalis* hasta 37 huevos (Branch, 2008). Bajo dicho contexto, es muy probable que la concentración espermática en *K. leucostomum,* este relacionada con el número de huevos disponibles para fertilizar en el oviducto de la hembra; por ello en *K. leucostomum*, la presencia de millones de células espermáticas como en las tortugas marinas, es innecesario dado el número de huevos que se deben fertilizar.

En cuanto a la evaluación morfológica, las células espermáticas del pochitoque tropical *K. leucostomum,* son alongadas y con cabeza curva, esto es congruente con la morfología reportada en otras especies de tortugas, tales como *C. picta* (Al-Dokhi *et al.* 2007), *P. sinensis* (*Bian et al. 2013*), *M. caspica* (Hess *et al*. 1991), *S. crassicollis* (Kimsakulvech & Suttiyotin, 2020). Esta forma de espermatozoides, también es exhibida por otras especies de reptiles, tales como la iguana verde *Iguana iguana* (Vieira *et al.* 2004), en la serpiente acuática *Myrrophis chinensi* (Hao & Zhang, 2018), el cocodrilo *Crocodylus Porosus* (Fitri *et al.* 2020) y el tuatara *Sphenodon punctatus* (Healy & Jamieson, 1992). Las similitudes encontradas en la descripción morfología de los espermatozoides, entre los diferentes órdenes de reptiles mencionados; Testudines, Scuamata, Crocodilia y Rhynchocephalia, demuestran que la forma alongada, con cabeza curva, es una condición morfobiológica típica de las células espermáticas de los miembros de la clase Reptilia.

Estudios previos en reptiles, solo consideraron la documentación de la dimensión micrométrica de las microestructuras espermáticas, tales como la longitud de la cabeza, el núcleo y el acrosoma, (Al-Dokhi *et al*. 2007; Hess *et al.* 1991). Dicha circunstancia, no da la posibilidad de hacer comparaciones de lo reportado en el presente estudio para *K. leucostomum* y los espermatozoides

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

de otras especies de tortugas. Sin embargo, Kimsakulvech & Suttiyotin, (2020), en un análisis detallado en los espermatozoides de la tortuga *S. crassicollis*, midieron el área de la cabeza, del acrosoma y de la pieza media. El tamaño promedio, del área de la cabeza de los espermatozoides haploides del pochitoque tropical, es 17.8±0.20 μm^2, dicho valor, muestra similitud con el tamaño promedio de la cabeza de los espermatozoides de *S. crassicollis* con 17.14±0.20 μm^2. No obstante, la cabeza de los espermatozoides aneuploides, del pochitoque tropical, con 20.3±0.42 μm^2 son más grandes que los espermatozoides de la especie mencionada. El área del acrosoma, de los espermatozoides aneuploides del pochitoque tropical, guarda similitud en tamaño, con respecto a los espermatozoides de *S. crassicollis*, con el área acrosomal promedio de 0.85±0.01 μm^2 y 0.84±0.04 μm^2 respectivamente. Por otro lado, el área acrosomal para las células espermáticas haploides, es menor al tamaño promedio del área acrosomal de las células espermáticas de *S. crassicollis* ya que miden en promedio 0.74±0.01 μm^2. En cuanto al área de la pieza media, reportada en este estudio, las células espermáticas aneuploides del pochitoque tropical, poseen tamaño promedio más grande (3.80±0.24 μm^2) que la pieza media de *S. crassicollis* (3.67±0.16 μm^2). En este estudio, la longitud total de los espermatozoides, fue de 72.3±2.52 µm y 73.1±2.17 para los espermatozoides haploides y aneuploides respectivamente. Por lo cual, los espermatozoides del pochitoque tropical, son más largos que los espermatozoides de las tortugas *M. caspica* con 50 µm de longitud (Al-Dokhi *et al.* 2007); *C. picta* con 50-55 µm de longitud (Hess *et al*. 1991); *P. sinensis* con 70 µm de longitud (Bian *et al.* 2013)*; S. crassicollis* con 71.3±1.55 µm de longitud (Kimsakulvech & Suttiyotin, 2020). Sin embargo, la tortuga *P. scripta elegans* (*T. scripta elegans*) presenta espermatozoides más largos que *K. leucostomum,* con 70-75 µm de longitud (Kaplan *et al.* 1966).

Las biometrías de la cabeza y del núcleo espermático, permitieron la distinción de dos poblaciones de células espermáticas, las haploides normales y las aneuploides anormales. Los espermatozoides aneuploides, son citomorfológicamente similares a los espermatozoides haploides. No obstante, los espermatozoides aneuploides, presentaron incremento en el tamaño de la cabeza y de la biomasa del ADN nuclear. A sí pues, las células espermáticas haploides (normales), presentaron valor 1C= 2.35±0.07 pg y las células espermáticas aneuploides (anormales) valor 1C+*x*n= 2.96±0.13 pg. En otras tortugas de la familia Kinosternidae, se ha estimado el contenido nuclear diploide a partir del análisis de células eritrocitarias, en *K. subrubrum* el valor 2C es de 5.60±0.14 pg, mientras que en *Sternotherus odoratus*, el valor 2C es de 5.30±0.08 pg (Olmo, 1976). Tales resultados, son correspondientes con lo reportado en el presente estudio. Distintos niveles de ploidía, han sido

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

reportados en otras especies de tortuga, a partir del análisis de células somáticas de tipo eritrocitario, reportaron especímenes mosaicos de la tortuga *Platemys platycephala*, desde diploides hasta tetraploides (Bickham *et al*. 1993). Sin embargo, los especímenes mosaicos, mostraron gametos haploides independientemente del nivel de ploidía de las células somáticas. En dicho sentido, Bickham *et al.* (1988), reportó la presencia de células aneuploides eritrocitarias en *P. scripta* (*T. scripta*). En otro estudio de evaluación espermática, Gosálves *et al.* (2016), reportaron diferencias en el nivel de ploidía, en especímenes de *C. porosus*, donde mediante el análisis morfométrico del núcleo espermático, describen el hallazgo de tres poblaciones de espermatozoides, aquellos normales (n-1C) y los espermatozoides anormales (n-2C y 2n-4C).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

VIII.- CONCLUSIONES

En el presente estudio, se registró la primera obtención exitosa de semen mediante tratamiento hormonal, así también la primera evaluación de los parámetros fisiológicos y morfológicos, implicados en la calidad espermática en una especie de tortuga dulceacuícola tropical en el mundo y por tanto en el estado de Tabasco, México, utilizando como modelo al pochitoque tropical *K. leucostomum*. Por otro lado, se reporta también por primera ocasión en la especie, la ocurrencia de células espermáticas haploides normales y aneuploides anormales, con tendencia hacia la diploidía.

En lo que respecta al pochitoque tropical, es la primera ocasión que se reporta un hallazgo de mosaísmo espermático. El principio del citado evento celular de origen meiótico queda como una incógnita, que se debería resolver basado en dos hipótesis, la primera de ellas fundada en su origen por hibridación y la segunda como consecuencia de eventos forzados por las actividades antropogénicas, sobre los hábitats naturales donde esta especie vive en las tierras bajas de los pantanos de Tabasco, en el sureste de México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

IX.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aceves-Navarro, L. A., & Rivera-Hernández, B. (2019). Clima. En A. Cruz-Angón, J. Cruz-Medina, J. Valero-Padilla, F. P. Rodríguez-Reynaga, E. D. Melgarejo, E. E. Mata-Zayas, & D. J. Palma-López (Eds.), La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado (Vol. 1, pp. 61–68). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Eosin-Nigrosin Staining Procedure. En A. Agarwal, S. Gupta, & R. Sharma (Eds.). Andrological Evaluation of Male Infertility: A Laboratory Guide (pp. 73–77). Springer International Publishing.

Al-Dokhi, O. A., Al-Wasel, S. H., & Mubarak, M. (2007). Ultrastructure of spermatozoa of the freshwater turtle *Mauremys caspica* (Chelonia, Reptilia). International Journal of Zoological Research, (3): 53-64.

Alquézar-Baeta, C., Gimeno-Martos, S., Miguel-Jiménez, S., Santolaria, P., Yániz, J., Palacín, I., Casao, A., Cebrián-Pérez, J. Á., Muiño-Blanco, T., & Pérez-Pé, R. (2019). OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. PLOS Computational Biology, 15(1): 1–18.

Angelini, F., & Ghiara, G. (1984). Reproductive modes and strategies in vertebrate evolution. Bollettino Di Zoologia, (51): 121–203.

Arias-Rodriguez, L. (2001). Inactivación genética de esperma e inducción de ginogénesis y de triploidía en el botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México). 202 pp.

Arias-Rodriguez, L., Álvares-González, C. A., Rimber, J. R., Lagunes-Espinoza, L. D. C., Páramo-Delgadillo, S., Burelo-Ramos, C. M., Ruiz-Carrera, V., Gómez-Cruz, R., & del Rivero-Bautista, N. (2019). Perspectiva de los estudios de genética y biotecnología en las especies nativas. En A. Cruz-Angón, J. Cruz-Medina, J. Valero-Padilla, F. P. Rodríguez-Reynaga, E. D. Melgarejo, E. E. Mata-Zayas, & D. J. Palma-López (Eds.), La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado (Vol. 2, pp. 391–398). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Assumpção, T. I., Santos, A. L. Q., Santos, R. B., & Macedo, G. G. (2017). Assisted reproduction in alligators: physical and morphological characterization of spectacled caiman semen *Caiman crocodilus* linnaeus, 1758. International Journal of Current Science and Technology, 5 (10): 513-516.

Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2013). Biología: La vida en la tierra: Con fisiología (9a ed.). Pearson.

Barragán-Vázquez, M. del R., Zenteno-Ruiz, C. E., & López-Luna, M. A. (2019). Reptiles. En A. Cruz-Angón, J. Cruz-Medina, J. Valero-Padilla, F. P. Rodríguez-Reynaga, E. D. Melgarejo, E. E. Mata-Zayas, & D. J. Palma-López (Eds.), La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado (Vol. 2, pp. 301–310). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Bartos, J., Alkhimova, O., Dolezelová, M., De Langhe, E., & Dolezel, J. (2005). Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in Musa and Ensete (Musaceae): taxonomic implications. Cytogenetic and genome research, 109(1-3): 50–57.

Beauregard-Solís, G., Zenteno-Ruiz, C. E., Armijo-Torres, R., & Guzmán-Juárez, E. (2010). Las tortugas de agua dulce: Patrimonio zoológico y cultural de Tabasco. Kuxulkab, 12(31): 5–19.

Berry, J. F., & Iverson, J. B. (2001[a]). *Kinosternon leucostomum* (Dúmeriland Bibron) White-lipped Mud Turtle. Catalogue of American Amphibians and Reptiles. 724.1-724.8.

Berry, J. F., & Iverson, J. B. (2001[b]). *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus) Scorpion Mud Turtle. Catalogue of American Amphibians and Reptiles, 725.1-725.11.

Berry, J. F., & Iverson, J. B. (2011). *Kinosternon scorpioides* (Linneus 1766). Scorpion mud turtle. En Biology of freshwater turtle and tortoise: A compilation project of the IUCN/SSC Tortoise and freswater turtle specialist group (pp. 063.1-063.15). Chelonian Research Monographs No. 5.

Bian, X., Gandahi, J. A., Liu, Y., Yang, P., Liu, Y., Zhang, L., Zhang, Q., & Chen, Q. (2013). The ultrastructural characteristics of the spermatozoa stored in the cauda epididymidis in Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* during the breeding season. Micron, (44): 202–209.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Bickham, J. W., Hanks, B. G., Hale, D. W., & Martin, J. E. (1993). Ploidy diversity and the production of balanced gametes in male twist-necked turtles *(Platemys platycephala*). Copeia, 1993(3): 723–727.

Bickham, J. W., Hanks, B. G., Smolen, M. J., Lamb, T., & Gibbons, J. W. (1988) Flow cytometric analysis of the effects of low-level radiation exposure on natural Populations of slider turtles (*Pseudemys scripta*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 17(6): 837–841.

Bjorndal, K. A., Carr, A., Meylan, A. B., & Mortimer, J. A. (1985). Reproductive biology of the hawksbill *Eretmochelys imbricata* at Tortuguero, Costa Rica, with notes on the ecology of the species in the Caribbean. Biological Conservation, 34(4): 353-368.

Blüm, V. (1986). Vertebrate Reproduction: A textbook. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Branch, W.R. (2008). Tortoises, terrapins and turtles of Africa. Struik Publishers, Cape Town.

Carvalho, R. C., Oliveira, S. C. R. D., Bombonato, P. P., Oliveira, A. S., & Sousa, A. L. D. (2010). Morfologia dos órgãos genitais masculinos do Jurará *Kinosternon scorpioides* (Chelonia: Kinosternidae). Pesquisa Veterinária Brasileira, 30(4): 289-294.

Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Dirzo, R. (2017). Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. Proceedings of the national academy of sciences, 114(30): E6089–E6096.

Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., & Massarini, A. (2016). Invitación a la biología en contexto social (7a ed.). Editorial Médica Panamericana.

Doležel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 51(2): 127–129.

Ewert, M. A. (1991). Cold torpor, diapause, delayed hatching and aestivation in reptiles and birds. En D. Charles Deeming & M. W. J. Ferguson, (Eds.), Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles. Cambridge University Press.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Ewert, M. A., Etchberger, C. R., & Nelson, C. E. (2004). Turtle sex-determining modes and TSD patterns, and some TSD pattern correlates. En N. Valenzuela & V. Lance (Eds.), Temperature-dependent sex determination in vertebrates (pp. 21–32). Smithsonian Books.

Fauvel, C., Suquet, M., & Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. Journal of Applied Ichthyology, 26(5): 636–643.

Fernandes Araujo Chaves, L. P., Viana, D. C., Chaves, E. P., Miglino, M. A., & de Sousa, A. L. (2020). Reproductive morphophysiology of the male scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766) in captivity. Veterinary Medicine and Science, 6(3): 570-578.

Fitri, W. N., Wahid, H., Rinalfi, P. T., Raj, D., Donny, Y., & Qayyum, L. (2020). Spermatozoa morphometry and ultrastructure in estuarine crocodile *(Crocodylus porosus)*. Asian Pacific Journal of Reproduction, 9(2): 104.

Fitzpatrick, J. L., & Lüpold, S. (2014). Sexual selection and the evolution of sperm quality. Molecular human reproduction, 20(12): 1180-1189.

Flores-Villela, O., & Zug, G. R. (1995). Reproductive Biology of the Chopontil, *Claudius angustatus* (Testudines: Kinosternidae), in southern Veracruz, Mexico. Chelonian Conservation and Biology, 1(3): 181–186.

Gilbert, S. F. (2005). Biología del desarrollo (7a ed.). Editorial Médica Panamericana S.A.

Giraldo, A., Garcés-Restrepo, M. F., & Carr, J. L. (2013). *Kinosternon leucostomum* (Duméril y Bibron en Duméril y Duméril 1851). Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia, 1(1): 45-9.

Gosalvez, J., López-Fernández, C., & Johnston, S. D. (2016). Whole extra-charged DNA spermatozoa in the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) ejaculate. The Herpetological Journal, 26(4), 313-316.

Gribbins, K. (2011). Reptilian spermatogenesis: A histological and ultrastructural perspective. Spermatogenesis, 1(3): 250–269.

Hao S.-L. & Zhang Y.-P. (2018) Ultrastructure of the spermatozoon of the Chinese water snake, *Myrrophis (Enhydris) chinensis* (Reptilia: Homalopsidae), The European Zoological Journal, 85(1): 349-361

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Hartley, S.E., & Horne, M.T. (1985). Cytogenetic techniques in fish genetics. Journal of Fish Biology, (26): 575-582.

Healy J. M. and Jamieson B. G. M. 1992. Ultrastructure of the spermatozoon of the tuatara (*Sphenodon punctatus*) and its relevance to the relationships of the Sphenodontida. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 335(1274): 193–205.

Hernández-Guzmán, J., & Arias-Rodriguez, L. (2019). Los estudios de citogenética básica en la herpetofauna nativa de Tabasco. Kuxulkab, 25(53): 27–39.

Hernández-Guzmán, J., Arias-Trinidad, A., Fraire-Vázquez, A., De la cruz-Izquierdo, R. I., García-Guzmán, N. C., & Ruiz, X. (2015). Cromosomas, lesión del ADN y malformación nuclear en la tortuga dulceacuícola *Kinosternon leucostomum* (Testudines: Kinosternidae). The Biologist, 13(2): 201–211.

Hernández-Guzmán, J., Rimber-Indy, J., Yasui, G. S., & Arias-Rodriguez, L. (2014). Los cromosomas de las tortugas tropicales: *Kinosternon leucostomum*, *Trachemys scripta* y *Staurotypus triporcatus* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). Revista de Biología Tropical, 62(2): 671–688.

Hess, R. A., Thurston, R. J., & Gist, D. H. (1991). Ultrastructure of the turtle spermatozoon. The Anatomical Record, 229(4): 473–481.

Holt, W. V., & Look, K. J. W. V. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. Reproduction, 127(5): 527–535.

Hutchison, J. H., & Bramble, D. M. (1981). Homology of the plastral scales of the Kinosternidae and related turtles. Herpetologica, 37(2): 73–85.

Ippi, S., & Flores, V. (2001). Las tortugas neotropicales y sus áreas de endemismo. Acta Zoológica Mexicana, (84): 49-63.

Iverson, J. B. (1983). *Staurotypus triporcatus* (Wiegmann) Three-keeled or Giant Musk Turtle. Catalogue of American Amphibians and Reptiles. 328.1-328.2.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Iverson, J. B. (1989). The Arizona mud turtle, *Kinosternon flavescens arizonense* (Kinosternidae), in Arizona and Sonora. The Southwestern Naturalist, 34(3): 356–368.

Iverson, J. B. (1991). Phylogenetic hypotheses for the evolution of modern Kinosternine turtles. Herpetological Monographs, (5): 1–27.

Iverson, J. B. (2010). Reproduction in the red-cheeked mud turtle (*Kinosternon scorpioides cruentatum*) in southeastern Mexico and Belize, with comparisons across the species range. Chelonian Conservation and Biology, 9(2): 250–261.

Iverson, J. B. (2013). Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. Molecular Phylogenetics and Evolution, 69(3): 929–939.

Iverson, J. B., & Berry, J. F. (1980). *Claudius* Cope Narrow-bridged musk turtle. Catalogue of American Amphibians and Reptiles. 236.1-236.2.

Iverson, J. B., & Vogt, R. C. (2011). *Kinosternon acutum* Gray 1831-Tabasco mud turtle, montera, chechagua de monte. En Biology of freshwater turtle and tortoise: A compilation project of the IUCN/SSC tortoise and freswater turtle specialist group (p. 062.1-062.6). Chelonian Research Monographs No. 5.

Iverson, J. B., Balgooyen, C. P., Byrd, K. K., & Lyddan, K. K. (1993). Latitudinal variation in egg and clutch size in turtles. Canadian Journal of Zoology, 71(12): 2448-2461.

Kaplan, H. M., Glaczenski, S. S., & Hirano, T. (1966). Electron microscope study of turtle sperm. Cytologia, 31(1): 99-104.

Kawazu, I., Kino, M., Maeda, K., Yamaguchi, Y., & Sawamukai, Y. (2014[a]). Induction of oviposition by the administration of oxytocin in hawksbill turtles. Zoological science, 31(12): 831-835.

Kawazu, I., Maeda, K., Koyago, M., Nakada, K., & Sawamukai, Y. (2014[b]). Semen Evaluation of Captive Hawksbill Turtles. Chelonian Conservation and Biology, 13(2): 271–278.

Kawazu, I., Suzuki, M., Maeda, K., Kino, M., Koyago, M., Moriyoshi, M., Nakada, Ken1 & Sawamukai, Y. (2014[c]). Ovulation induction with follicle-stimulating hormone administration in hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata*. Current Herpetology, 33(1): 88-93.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Killebrew, F. C. (1975). Mitotic Chromosomes of Turtles. III. The Kinosternidae. Herpetologica, 31(4): 398–403.

Kimsakulvech, S., & Suttiyotin, P. (2020). Ultrastructural characteristics of black marsh turtle spermatozoa obtained by electroejaculation. Anat Histol Embryol, 49(6): 842–847.

Legler, J., & Vogt, R. C. (2013). The Turtles of Mexico: Land and Freshwater Forms. Univ of California Press.

Lombardi, J. (1998). Comparative vertebrate reproduction. Springer US.

López-Castañeda, A., & Zavala-Cruz, J. (2019). Hidrología. En A. Cruz-Angón, J. Cruz-Medina, J. Valero-Padilla, F. P. Rodríguez-Reynaga, E. D. Melgarejo, E. E. Mata-Zayas, & D. J. Palma-López (Eds.), La Biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado (Vol. 1, pp. 51–59). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

López-Hernández, J. C. (2017). Biología, fisiología espermática básica y efecto de la radiación ultravioleta sobre la fisiología e integridad de las células espermáticas del bagre tropical *Rhamdia laticauda*. Tesis de Maestría no publicada, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

López-Hernández, J. C., Osorio-Pérez, A., Jiménez-Félix, S. A., Páramo-Delgadillo, S., Márquez-Couturier, G., Yasui, G. S., & Arias-Rodriguez, L. (2018). La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. Revista Ciencias Marinas y Costeras, 10(1): 67–96.

Mattson, K. J., De Vries, A., McGuire, S. M., Krebs, J., Louis, E. E., & Loskutoff, N. M. (2007). Successful artificial insemination in the corn snake, *Elaphe gutatta*, using fresh and cooled semen. Zoo Biology, 26(5): 363–369.

Menkveld, R., & Kruger, T. E. (1996). Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. En A. A. Acosta & T. E. Kruger (Eds.), Basic semen analysis (pp. 53–72). Parthenon Publishing Group.

Morales-Verdeja, S. A., & Vogt, R. C. (1997). Terrestrial movements in relation to aestivation and the annual reproductive cycle of *Kinosternon leucostomum*. Copeia, 1997(1): 123–130.

Mortimer, S. T. (2000). CASA—Practical Aspects. Journal of Andrology, 21(4): 515–524.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Moskovtsev, S. I., & Librach, C. L. (2013). Methods of sperm vitality assessment. En D. T. Carrell & K. I. Aston (Eds.), Spermatogenesis: Methods and Protocols (pp. 13–19). Humana Press.

Osorio-Pérez, A. (2017). Fisiología y microestructura espermática del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus.* Tesis de Licenciatura no publicada, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

Palma-López, D. J. (2019). Suelos. En A. Cruz-Angón, J. Cruz-Medina, J. Valero-Padilla, F. P. Rodríguez-Reynaga, E. D. Melgarejo, E. E. Mata-Zayas, & D. J. Palma-López (Eds.), La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado (Vol. 1, pp. 43–49). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Pereira, M. M., Ribeiro Filho, O. P., Zanuncio, J. C., Navarro, R. D., Seixas Filho, J. T., & de Lima Ribeiro, C. D. (2013). Evaluation of the semen characteistics after induced spermiation in the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 35(3): 305-310.

Peterson, C. C., & Stone, P. A. (2000). Physiological capacity for estivation of the Sonoran mud turtle, *Kinosternon sonoriense*. Copeia, 2000(3): 684–700.

Pizzari, T., & Parker, G. A. (2009). Sperm competition and sperm phenotype. En T. R. Birkhead, D. J. Hosken, & S. Pitnick (Eds.), Sperm Biology (pp. 207–245). Academic Press.

Pozo-Montuy, G., De la Cruz-Félix, H. K., & Guzmán-Aguirre, C. C. (2019). Uso Tradicional de los vertebrados silvestres. En La biodiversidad en Tabasco. Estudio de Estado (Vol. 1, pp. 309–318). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Pudney, J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. Microscopy Research and Technique, 32(6): 459–497.

Rueda-Almonacid, J. V., Carr, J. L., Mittermeier, R. A., Rodríguez-Mahecha, J. V., Mast, R. B., Vogt, R. C., Rhodin, A. G. J., de la Ossa -Velásquez, J., Rueda, J. N., & Mittermeier, C. G. (2007). Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo No 6. Conservación Internacional. Editorial Panamericana, Formas e Impresos.

Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234(1): 1–28.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Sahatrakul K., Dhanarun K., Sujaritthanyatrakul C., Sakorncharoun P., Tanasanti M., Manawatthana S., Sanyathitiseree P. & Sirinarumitr K. (2008). Semen collection by electroejaculation and semen evaluation of olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*). Proceeding of the 46th Kasetsart University Annual Conference. Veterinary Medicine. 301-313.

SEMARNAT. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial Méxicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Publicada el 30 de diciembre de 2010 en el Diario Oficial de la Federación. Texto vigente.

Shin-Ichi, A. (1987). Differentiation of spermatogenic cells from vertebrates in vitro. International review of cytology, (109): 159–109.

Simmons, L. W., & Fitzpatrick, J. L. (2012). Sperm wars and the evolution of male fertility. Reproduction (Cambridge, England), 144(5): 519—534.

Sirinarumitr K, Patthong Y, Jaimjaturong P, Woonwong Y, Petchsamut W, Limpasuntisin P. (2009). Extender for sperm dilution in olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea)* and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) semen. Proceedings of the 5th International Symposium on Southeast Asia Sea Turtle Associative Research and Bio-logging Science. 7-10

Snook, R. R. (2005). Sperm in competition: not playing by the numbers. Trends in Ecology & Evolution, 20(1): 46–53.

Sousa, A. L., Campos-Junior, P. H. A., Costa, G. M. J., & de França, L. R. (2014). Spermatogenic cycle length and sperm production in the freshwater turtle *Kinosternon scorpioides*. Biology of Reproduction, 90(2): 35-1.

Tanasanti, M., Sujaritthanyatrakul, C., Dhanarun, K., Sahatrakul, K., Sakorncharoun, P., Manawatthana, S., Sanyathitiseree, & Sirinarumittr, K. (2009). Electroejaculation and semen evaluation in olive ridley turtle *(Lepidochelys olivacea)* and hawksbill turtle *(Eretmochelys imbricata)* in Thailand. Proceedings of the Fourth International Symposium on SEASTAR2000 and Asian Bio-logging Science (The 8th SEASTAR2000 workshop): 29–32.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Temple-Smith, P. D., Ravichandran, A., & Nunez, F. E. H. (2018). Sperm: Comparative Vertebrate. En M. K. Skinner (Ed.), Encyclopedia of Reproduction (Second Edition) (Second Edition, pp. 210–220). Academic Press.

Teska, W. R. (1976). Terrestrial Movements of the Mud Turtle *Kinosternon scorpioides* in Costa Rica. Copeia, 1976(3): 579–580.

Tucker, J. K., Thomas, D. L., & Rose, J. (2007). Oxytocin dosage in turtles. Chelonian Conservation and Biology, 6(2): 321-324.

Turtle Taxonomy Working Group [Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., and van Dijk, P.P.]. 2021. Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status (9th Ed.). In: Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., van Dijk, P.P., Stanford, C.B., Goode, E.V., Buhlmann, K.A., and Mittermeier, R.A. (Eds.). Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographs 8:1–472.

Viana, D. C., dos Santos, A. C., & de Assís Neto, A. C., A. (2015). Spermiogenesis in scorpion mud turtle, *Kinosternon scorpioides*. Revista Brasileira de Medicina Veterinaria, (34): 389-396.

Viana, D. C., dos Santos, A. C., Chaves, L. F. A., Oliveira, A. S., de Assís Neto, A. C., & de Sousa, A. L. (2014). Body and testicular biometric parameters of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). Acta Scientiarum. Biological Sciences, 36(4): 477-481.

Viana, D. C., Rui, L. A., Santos, A. C. D., Miglino, M. A., Assis Neto, A. C. D., Araujo, L. P. F. & Sousa, A. L. (2014). Seasonal morphological variation of the vas deferens of scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). Biota Neotropica, 14 (3).

Vieira, G. H., Colli, G. R., & Báo, S. N. (2004). The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard *Iguana iguana* (Reptilia, Squamata, Iguanidae) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. Journal of Anatomy, 204(6): 451–464.

Vogt, R. C., & Flores-Villela, O. (1986). Determinación del sexo en tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. Ciencia, (37): 21–32.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Vogt, R. C., & Flores-Villela, O. (1992). Effects of incubation temperature on sex determination in a community of neotropical freshwater turtles in southern Mexico. Herpetologica, 48(3): 265–270.

Vogt, R. C., & Guzman-Guzman, S. (1988). Food Partitioning in a Neotropical Freshwater Turtle Community. Copeia, 1998(1): 37–47.

World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (5a ed.). World Health Organization.

Zacariotti, R. L., Grego, K. F., Fernandes, W., Sant'anna, S. S., & de Barros Vaz Guimarães, M. A. (2007). Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). Zoo Biology, 26(2): 155–160

Zar, J. H. (1984). Biostatistical Analysis (5a ed.). Prentice Hall.

Zenteno-Ruiz, C. E., Sánchez-Alejandro, M., Cruz-Reyes, M., & Torrea-Reyes, E. (2001). Historia natural de las tortugas dulceacuícolas del Ejido Río Playa, Comalcalco, Tabasco. Kuxulkab, 6(12): 12–22.

Zimmerman, D., & Mitchell, M. A. (2017). Semen collection and ejaculate characteristics of the Leopard Tortoise (*Stigmochelys pardalis*). Conservation Physiology, 5(1): 1-9.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.