



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS

DEL ESPERMA DEL MORRO COLORADO (*Vieja fenestrata*)

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

JOSÉ MANUEL RAMÍREZ OCHOA

DIRECTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL MEZA VILLALVAZO
PROFESOR – INVESTIGADOR

CO-DIRECTOR:

DR. JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ
PROFESOR – INVESTIGADOR

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis...

Dr. Juan Pablo Alcántar Vázquez, un profesor muy capaz y con mucha experiencia. Su apoyo en todo momento fue en verdad excepcional, siempre empeñado en hacer un excelente trabajo y en enseñarme como hacer las cosas bien. Muchas gracias por todo el conocimiento y experiencias compartidas.

Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo, siempre empeñado en el trabajo de calidad, su apoyo para realizar este trabajo fue vital y único. Un profesional en toda la extensión de la palabra. Estoy muy agradecido por abrirme las puertas y apoyarme en todo momento a concluir con este proyecto.

A la Universidad del Papaloapan...

Por acogerme y ser mi segundo hogar durante los últimos 7 años, me quedo con las grandes experiencias y conocimientos adquiridos entre sus aulas y pasillos. Estaré siempre agradecido y orgulloso de ser parte de la comunidad UNPA. Mi alma mater.

Agradezco a Dios

Por permitirme llegar hasta estas instancias, gracias por brindarme el conocimiento necesario para cumplir con esta meta y por acompañarme en cada instante durante mi formación profesional. Gracias por darme este regalo tan grande.

DEDICATORIA

Este logro solo se lo puedo dedicar a mi familia...

A mis padres, los pilares más fuertes que tengo en la vida, jamás habría podido llegar a estas instancias si no fuera por ustedes. Su apoyo incondicional en las buenas y en las malas, cada uno de sus consejos, cada uno de sus regaños, cada una de las palabras motivadoras que me han dado desde que tengo memoria me han hecho llegar hasta donde estoy ahora. Me han regalado una infinidad de alegrías y ahora una más, pues esto jamás lo habría logrado sin su apoyo. A mi mamá y a mi papá... Los amo.

A mi hermana, quien también ha estado a mi lado desde el primer instante apoyándome en todo sentido. Fuiste mi modelo a seguir y estaré eternamente agradecido contigo por todo lo haces por mí. Te amo por ser la mejor hermana que existe.

A toda mi familia, a mi abuelita en especial quien jamás ha dejado de darme amor y consejos, a todos y cada uno les dedico este logro. Dios me dio una gran familia y siempre serán mi fortaleza más grande.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
AGRADECIMIENTOS _____	IV
DEDICATORIA _____	V
ÍNDICE _____	VI
ÍNDICE DE CUADROS _____	VIII
RESUMEN _____	IX
ABSTRACT _____	X
1. INTRODUCCIÓN _____	1
2. MARCO TEÓRICO _____	5
2.1 Aspectos generales del morro colorado (<i>Vieja fenestrata</i>) _____	5
2.2 Calidad espermática _____	5
2.2.1 Motilidad _____	6
2.2.2 Morfología _____	9
2.2.3 Concentración _____	11
2.2.4 Viabilidad espermática (integridad) _____	12
2.3 Métodos de análisis _____	13
2.4 Variables que afectan la calidad espermática. _____	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA _____	19
4. JUSTIFICACIÓN _____	20
5. HIPÓTESIS _____	22
6. OBJETIVOS _____	23
6.1 General _____	23
6.2 Específicos _____	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS. _____	24
7.1. Animales _____	24
7.2. Colecta de muestra espermática. _____	24
7.3. Aplicación de aditivo _____	25
7.4. Inducción con gonadotropina. _____	25
7.5 Análisis macroscópico _____	25
7.6. Análisis microscópico. _____	26
7.6.1 Concentración _____	26
7.6.2 Motilidad _____	26

7.6.3 Morfología	27
7.7 Análisis estadístico	27
8. RESULTADOS	28
8.1 Comparación de eyaculados naturales a través del periodo de experimentación	28
8.1.1 Variables macroscópicas y concentración.	28
8.1.2 Morfología.	29
8.1.3 Motilidad.	29
8.2 Efecto del aditivo comercial sobre la calidad espermática	32
8.2.1 Variables macroscópicas y concentración.	32
8.2.2 Morfología	33
8.2.3 Motilidad	34
8.3 Efecto de la hormona gonadotropina sobre la calidad espermática	35
8.3.1 Variables macroscópicas y concentración.	35
8.3.2 Morfología	36
8.3.3 Motilidad	37
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES	53
11. RECOMENDACIONES	54
Literatura citada	55

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Pág.
Cuadro 1. Investigaciones relacionadas con la caracterización espermática en peces.....	16
Cuadro 2. Valores de variables macroscópicas y concentración en el esperma del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.....	28
Cuadro 3. Características morfológicas en el esperma del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.....	30
Cuadro 4. Análisis de movilidad espermática en el esperma del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.....	31
Cuadro 5. Comparativa de valores de desplazamiento en el esperma del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.....	31
Cuadro 6. Comparación de valores macroscópicos y de concentración espermática entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>).....	32
Cuadro 7. Características morfológicas entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>).....	33
Cuadro 8. Análisis de movilidad espermática entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>).....	34
Cuadro 9. Comparativa de valores de desplazamiento entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>).....	35
Cuadro 10. Comparación de valores macroscópicos y de concentración espermática entre muestras naturales y muestras inducidas mediante gonadotropina en reproductores del morro colorado (<i>V. fenestrata</i>).....	36
Cuadro 11. Características morfológicas del esperma de morro colorado (<i>V. fenestrata</i>) natural e inducido mediante gonadotropina.....	37

RESUMEN

En la región sureste del país el morro colorado (*Vieja fenestrata*) se ha convertido en una especie candidata para la producción acuícola, pues presenta una alta demanda en el mercado. Sin embargo, la nula información que se tiene de la especie limita su potencial de cultivo. Esto hace necesario realizar estudios relacionados con el control de su reproducción, ya que el conocimiento acerca de los gametos es de vital importancia para un cultivo exitoso. Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las características espermáticas de machos del morro colorado mediante parámetros macro y microscópicos que determinan la calidad espermática, evaluando, además, la aplicación de hormonas exógenas y un aditivo comercial. Se utilizaron 30 reproductores, los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones y regímenes de alimentación. La concentración espermática, morfología y la motilidad se analizaron utilizando un sistema CASA. Los valores obtenidos para concentración mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las muestras colectadas al final del experimento con respecto a las colectadas al inicio del mismo y las inducidas hormonalmente. No se observaron diferencias significativas en la motilidad espermática la cual presentó una media de 88% de células progresivas. La morfología registró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las muestras colectadas al final del experimento y las inducidas hormonalmente. Las muestras analizadas tras la implementación del aditivo comercial no mostraron diferencias significativas. Los resultados obtenidos sugieren que las características seminales del morro colorado presentan valores similares a lo reportado por otras especies de alta demanda comercial, por lo cual, en base a la calidad espermática se podría considerar una especie óptima para la producción acuícola.

Palabras clave: Calidad espermática, morro colorado, motilidad, concentración espermática.

ABSTRACT

In the southeastern region of Mexico, morro colorado (*Vieja fenestrata*) has become an important species for aquaculture production, presenting a high demand among consumers. However, the lack of information on the species limits its cultivation potential. Therefore, is necessary to carry out studies related to the reproduction management, since knowledge about gametes is of vital for successful cultivation. Hence, the objective of this study was to evaluate the sperm characteristics of males from morro colorado, studying macro and microscopic parameters that determine sperm quality, also evaluating the application of exogenous hormones and a commercial additive. Thirty male breeders were used, which were kept under the same conditions and feeding regimens. Sperm concentration, morphology and motility were analyzed using a CASA system. The values of sperm concentration showed significant differences ($P < 0.05$) in the samples collected at the end of the experiment with respect to those collected at the beginning and those induced hormonally. No significant differences were observed in sperm motility, which presented an average of 88% progressive cells. The morphology registered significant differences ($P < 0.05$) between the samples collected at the end of the experiment and those induced hormonally. The samples analyzed after the implementation of the commercial additive did not show significant differences. The results obtained suggest that the seminal characteristics of the morro colorado present values similar to those reported in other species with high commercial demand. Hence based on the sperm quality, it could be considered an optimal species for aquaculture production.

Keywords: Sperm quality, motility, sperm concentration, morro colorado.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de un escenario de incertidumbre económica y ambiental, la actividad acuícola se encamina como una de las principales alternativas para cubrir las necesidades alimenticias de la población (FAO, 2018). Actualmente, la acuicultura contribuye con un 46% de la producción total de organismos acuáticos, esto con un valor aproximado de 114.5 millos de toneladas, estimadas en un valor de primera venta de 263,600 millones de USD (FAO, 2020). De este total, la acuicultura de agua dulce representa más del 50% del total de la producción acuícola mundial, encaminándose a ser el principal foco de producción acuícola hacia el año 2050 (FAO, 2020).

En México, la producción dulceacuícola presenta un gran potencial, a pesar de haberse establecido recientemente en el país, por lo cual se encuentra aún en etapa de desarrollo (Avilés-Quevedo & Vázquez-Hurtado, 2006). Dentro del país, la producción de peces dulceacuícolas se lleva a cabo en 23 de los 32 estados de la república, siendo los principales productores: Morelos, Nayarit, Jalisco, Veracruz y Yucatán (INES, 2018). Sin embargo, esta producción se ha inclinado principalmente a especies exóticas, desplazando a las especies nativas, acto que puede, a largo plazo, poner en riesgo el equilibrio ecológico de la región (PNUD México, 2017).

Para contrarrestar lo anterior, en los últimos años varios grupos de investigación han reforzado los estudios encaminados al cultivo de peces nativos (Flores-Nava & Brown, 2010). Además de que estas especies presentan una amplia aceptación en el mercado, en el aspecto de investigación científica y tecnológica se han estudiado por diversas razones como, su elevada capacidad reproductiva, su alta tolerancia ante cambios ambientales, sus tasas

elevadas de crecimiento e incluso una alta proporción de carne para su consumo (Martínez-Palacios & Ross, 1994).

Bajo este contexto, el cultivo de peces nativos es una alternativa importante, no solo para abastecer la necesidad de alimento, sino para recuperar las poblaciones nativas que han sido desplazadas por la introducción de especies exóticas (McCrary *et al.*, 2001).

En la región del sureste del país, el morro colorado, también llamado mojarra negra (*Vieja fenestrata*) es un pez nativo, muy apreciado por su sabor y en ello va su color, tamaño y textura. *V. fenestrata* es un pez perteneciente a la familia Cichlidae que encuentra principalmente en la región del Papaloapan (FishBase, 2019). En la región sur del país representa un recurso natural de gran potencia para la acuicultura, pues es relativamente abundante, está adaptada al trópico y habita aguas someras sin mucho movimiento, como lagunas mesotróficas, cenotes y canales superficiales. Algunas poblaciones han migrado a los valles de los ríos inferiores con aguas de flujo lento a moderado. Se alimenta principalmente de materia vegetal, complementada con invertebrados e insectos acuáticos. (FishBase, 2019).

Debido al gran potencial de la especie, en los últimos años, el cultivo de *V. fenestrata* ha comenzado a tomar importancia en la zona sur del país, siendo ya el foco de estudios en algunas instituciones. Sin embargo, la principal limitante hasta ahora para su cultivo es la falta de información en aspectos nutricionales y etológicos, resaltando su control reproductivo.

El control de la reproducción es un tópico muy importante en acuicultura y es uno de los factores limitantes del éxito reproductivo, donde la calidad de los gametos es crucial

(Zohar & Mylonas, 2001), pues de esta dependen los porcentajes de fertilización (López-Hernández *et al.*, 2018).

El control de la función reproductiva de los peces en cautiverio es esencial para la sustentabilidad de la producción acuícola comercial. En este sentido se es necesario el conocer y estudiar los factores que afectan la calidad de los gametos, como es el caso de los espermatozoides (Zohar & Mylonas, 2001; Rurangwa *et al.*, 2004; Herráez *et al.*, 2017). La calidad espermática se entiende como la capacidad y habilidad de un espermatozoide para fertilizar de manera exitosa un óvulo, generando el desarrollo de un embrión viable (Bobe & Labbé, 2010; Dumorne *et al.* 2017; López-Hernández *et al.*, 2018).

Dentro del sector acuícola, el análisis de la calidad espermática permite predecir la capacidad de los reproductores para generar células sexuales que sean capaces de fecundar el óvulo (López-Hernández *et al.*, 2018). Esto, contribuye con el mejoramiento de las técnicas de fertilización *in vitro* así como con el desarrollo de metodologías de crioconservación o con procesos biotecnológicos aplicados al mejoramiento genético de las especies (Bobe & Labbé, 2010; Fauvel *et al.*, 2010). En este sentido, para poder considerar viables los espermatozoides de un pez, estos deben de cumplir con los requerimientos básicos de calidad espermática (Rurangwa *et al.*, 2004; Herráez *et al.*, 2017).

Para evaluar la calidad espermática de un pez, se puede analizar parámetros tanto cuantitativos como cualitativos que se relacionen directamente con la habilidad fecundante de la célula espermática (Fauvel *et al.*, 2010; López-Hernández *et al.*, 2018). Ahora bien, el análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA por sus siglas en inglés, computer-assisted sperm analysis) es una de las herramientas más útiles en la actualidad para el análisis objetivo de los parámetros relacionados con la calidad espermática. Los sistemas

CASA pueden rastrear una gran cantidad de células espermáticas simultáneamente y permiten mediciones de parámetros como concentración, morfología y motilidad en términos de proporción de células móviles, velocidad de los espermatozoides y trayectorias (Rurangwa *et al.*, 2004; Fauvel *et al.*, 2010; Gennotte *et al.*, 2012).

Bajo este contexto, el análisis de la calidad espermática de *V. fenestrata* permitirá predecir la viabilidad de la especie para su producción acuícola, mejorando a su vez la domesticación de la especie y abriendo paso para futuras mejoras genéticas (Fauvel *et al.*, 2010). Todo esto permitirá no solo repoblar las poblaciones naturales de la especie sino también contribuirá en la satisfacción de la demanda alimenticia de la región, garantizando un desarrollo sostenible en la producción de morro colorado, esto en términos económicos, sociales y ambientales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Aspectos generales del morro colorado (*Vieja fenestrata*)

El género *Vieja* representa un grupo de cíclidos que se encuentran en las vertientes del Atlántico y el Pacífico de América del Norte desde el sur de México hasta Panamá (Kullander, 2003). De manera más específica el género *Vieja* se extiende en las costas del Pacífico, se extiende desde el Río Tequistlán (=Tequisistlán), Oaxaca, México, hasta el Lago Coatepeque en el Salvador. Mientras que, en las costas de la vertiente Atlántica, van desde el Río Chachalacas, Veracruz, México, hasta el Río Chagres en Panamá (McMahan *et al.*, 2015).

De manera más específica, la especie *V. fenestrata*, es un cíclido nativo de la región del Papaloapan, en los últimos años ha generado un especial interés por parte de grupos investigadores debido a la demanda que posee en la región sureste del país. Esto principalmente por su apreciado sabor, tamaño y llamativa coloración (FishBase, 2019). Actualmente *V. fenestrata* representa un recurso natural de gran potencial acuícola, gracias a su adaptación a las condiciones climatológicas de la región y a su relativa abundancia, sin embargo, no existe actualmente mucho conocimiento acerca de los hábitos biológicos de la especie, lo cual la limita para su producción acuícola. Esto hace aún más necesaria la investigación relacionada con los aspectos biológicos y reproductivos, como lo es la calidad espermática.

2.2 Calidad espermática

La calidad espermática se define como la habilidad y la capacidad que posee una célula espermática para fertilizar de manera exitosa un óvulo, activando el desarrollo de un embrión

viable (Rurangwa *et al.*, 2004; Bobe & Labbé, 2010; Fauvel *et al.*, 2010; Dumorné *et al.*, 2018; López-Hernández *et al.*, 2018).

Dentro del sector acuícola, la importancia de la calidad espermática radica en que esta permite predecir la capacidad fecundante de los reproductores, contribuyendo en la mejora de técnicas de fertilización *in vitro* (Bobe & Labbé, 2010). Además, el análisis espermático permite el desarrollo de metodología de crioconservación y biotecnologías aplicadas al mejoramiento genético de las especies, en especial cuando se trata de especies de poco conocimiento biológico como es el caso del morro colorado, en donde se necesita espermatozoides de alta calidad para obtener líneas genéticas viables para la producción acuícola (Fauvel *et al.*, 2010; Kowalski & Cejko, 2019).

Ahora bien, para considerar viables los espermatozoides de un pez, estos deben de cumplir con los requerimientos básicos de la calidad espermática. En este sentido, la evaluación espermática se puede medir en función de cualquier parámetro que esté directamente relacionado con la habilidad fecundante del espermatozoide, entre ellos se puede mencionar: la motilidad, morfología, concentración, número total de espermatozoides, viabilidad y/o integridad del ADN (Rurangwa *et al.*, 2004; Fauvel *et al.*, 2010; Martínez & Carrasco, 2010; Herráez *et al.*, 2017).

2.2.1 Motilidad

El tiempo de motilidad o periodo de actividad de los espermatozoides posterior a su activación, básicamente es la capacidad de movilidad y movimiento de los espermatozoides desde el momento en que estos son activados con agua o fluido ovárico, hasta la disminución o cese total del movimiento flagelar (Arias-Rodríguez, 2001). La motilidad depende principalmente de las reservas de ATP intracelular, el cual se encuentra presente antes de la

activación por reacciones enzimáticas. Esta activación ocurre por los cambios iónicos y de osmolaridad que suceden cuando los espermatozoides entran en contacto con el agua una vez liberados en el proceso de reproducción (Linhart *et al.*, 2002). La reducción del contenido de ATP conlleva a la disminución del movimiento espermático (Rurangwa *et al.*, 2002; Dziewulska *et al.*, 2012).

Dado que la motilidad integra diferentes características del fluido celular y seminal, se considera como el estimador más objetivo y confiable para evaluar la calidad del espermatozoide (Kime *et al.*, 2001; Rurangwa *et al.*, 2004).

Bajo el sistema CASA, se puede analizar el movimiento espermático, capturando de manera objetiva el desplazamiento de cada espermatozoide y registrando el comportamiento de los mismos. Ahora bien, se deben considerar distintas variables para medir el desplazamiento espermático, las cuales se presentan a continuación (del Gallego *et al.*, 2017; Valverde *et al.*, 2018):

a) Velocidad curvilínea (VCL): Distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria con respecto al tiempo ($\mu\text{m/s}$).

b) Velocidad rectilínea (VSL): Es la distancia en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria del espermatozoide, se observa tomando en cuenta el espacio recorrido con respecto al tiempo ($\mu\text{m/s}$).

c) Velocidad media (VAP): Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media de circulación en el periodo de observación ($\mu\text{m/s}$).

d) Índice de linealidad (LIN): Relación porcentual entre la velocidad rectilínea y velocidad curvilínea ($\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$).

e) Índice de rectitud (STR): Linealidad de la distancia de trayectoria promedio, obtenida de la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad media ($STR = (VSL/VAP) \times 100$).

f) Índice de oscilación (WOB): Relación porcentual entre la velocidad media y la velocidad rectilínea ($WOB = (VAP/VSL) \times 100$).

g) Motilidad Progresiva (PM): Expresado como la dirección que la célula toma en su trayectoria motil, lo cual indica si el espermatozoide está en su máxima capacidad progresiva para fecundar el óvulo desde el momento de la activación. MP se puede estimar cualitativamente en base a los patrones de movimiento de los espermatozoides activados como se describe a continuación (Menkveld & Kruger, 1996):

Grado 4. Máximo movimiento progresivo de los espermatozoides (óptimo para la fertilización).

Grado 3. Disminución del movimiento progresivo de los espermatozoides, junto con el incremento de los movimientos laterales que promedian aproximadamente de dos a tres anchos el cuerpo del espermatozoide (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).

2.2.2 Morfología

Numerosos trabajos se han enfocado al estudio de la morfología de células espermáticas de peces, y han demostrado la diversidad de formas, así como de la composición estructural y ultraestructural de los espermatozoides (Rurangwa *et al.*, 2004; Herráez *et al.*, 2017).

A través de los procesos de selección natural, los arreglos microestructurales de los espermatozoides se han optimizado en base a las estrategias de fertilización de cada especie, sin embargo, en casi todas, la anatomía espermática consiste en tres segmentos: cabeza, pieza media y flagelo (Ciereszko *et al.*, 2017).

La cabeza de acuerdo a la especie puede variar en forma y tamaño, esta transporta los genes del macho en un núcleo de formas variables. En los peces puede existir la ausencia de acrosoma, esto debido a la presencia del micrópilo en el óvulo (Zohar & Mylonas, 2001; Islam & Akhter, 2011).

La pieza media se encuentra sujeta a la cabeza de las células espermáticas y está constituida principalmente por mitocondrias las cuales participan en la aportación de energía para el movimiento flagelar (Rurangwa *et al.*, 2004; Dzyuba *et al.*, 2017). Además, están presentes dos centriolos, el proximal y el distal los cuales también contribuyen en el movimiento del flagelo.

El flagelo es el aparato motil de las células espermáticas, su función es impulsar el movimiento de la célula hasta alcanzar y penetrar el óvulo a través del canal micropilar (Dzyuba & Cosson, 2014). Generalmente está constituido por el axonema en un arreglo de nueve pares de microtúbulos periféricos y un par de microtúbulos centrales conocidos como

complejo 9 + 2, el cual se encuentra recubierto por una membrana plasmática (Jamieson, 1991).

Todas las estructuras y componentes que integran las células espermáticas son importantes para determinar la calidad del desempeño espermático (Linhart *et al.*, 2003). Hasta la fecha se ha demostrado que los espermatozoides morfológicamente normales nadan más rápido, realizan un recorrido lineal y por ende presentan una mayor frecuencia de golpe flagelar (Gimeno-Miquel, 2015). Por el contrario, cualquier tipo de alteración o anomalía en las células espermáticas son causantes de baja fertilidad. Estas alteraciones se puedan encontrar en la cabeza, flagelo o en el metabolismo dentro del mecanismo de producción y transducción de energía celular (Gimeno-Miquel, 2015). Se debe tener en cuenta, que los espermatozoides de los peces son células aisladas que están sujetas a entornos variables desde las gónadas hasta el proceso de fertilización en el medio en el cual sean liberados, en este sentido, pueden ser dañados durante el recorrido desde los testículos hasta el medio externo. Además, también pueden ser alterados por xenobióticos, mutaciones genéticas, por envejecimiento o ser parcialmente degradados por los mismos protocolos de conservación (Fauvel *et al.*, 2010).

La presencia de un número elevado de espermatozoides anormales, se puede presentar por diversos trastornos tales como: varicocele, sepsis seminal, estrés y/o exposición a agentes externos nocivos (Lo Nostro, 2000; Hecker *et al.*, 2006; Bobe & Labbé, 2010). Bajo este contexto, dado la existencia de una relación entre la morfología espermática y la fertilidad, se deben de presentar resultados globales de la morfología espermática para la especie, en especial cuando esta se encuentra poco estudiada.

2.2.3 Concentración

La concentración de células espermáticas en el líquido seminal también es frecuentemente empleada en la caracterización de la calidad espermática (Arias-Rodríguez, 2001). Esta concentración se expresa como el número de espermatozoides por mililitro (células mL⁻¹) de semen sin diluir (Gennotte *et al.*, 2012).

El número total de espermatozoides, puede estar relacionado con la estación reproductiva, tratamientos hormonales, porcentajes de fecundación de la especie, disponibilidad de alimento, las propiedades nutricionales del alimento y con la calidad del agua (Murakami *et al.*, 2014). La concentración de espermatozoides varía además entre los individuos de la misma especie y por supuesto entre las diferentes especies, por ello, se recomienda que dicho parámetro se determine en las muestras de semen de cada uno de los reproductores estudiados (Murakami *et al.*, 2014).

El conteo de espermatozoides en peces se realiza bajo diluciones de semen (espermatozoide/agua destilada) implementadas en todas las especies estudiadas y ajustada a la especie en cuestión (Fauvel *et al.*, 2010). El método estándar en peces (esperma/mililitro), generalmente es un conteo de células espermáticas implementando un hemocitómetro (cámara Neubauer) (Arias-Rodríguez, 2001; Rurangwa *et al.*, 2004), esto con el fin de obtener un número total de espermatozoides por macho reproductor. Este número indicará un promedio aproximado de células espermáticas producidas por dicho reproductor en el proceso de espermatogénesis (Rurangwa *et al.*, 2004; Schulz *et al.* 2010; Dzyuba & Cosson, 2014; Herráez *et al.*, 2017).

El número de células espermáticas necesarias para fertilizar un óvulo es equivalente a un espermatozoide por cada óvulo del pez, sin embargo, esto es en los casos muy precisos

de fertilización *in vitro*. En realidad, realmente no existe un valor o número preciso de células espermáticas viables, esto debido a que los valores están en función del número de óvulos a fertilizar, en este sentido se estima que un mínimo de mil espermatozoides puede garantizar la fertilización exitosa de aproximadamente cien óvulos (Satterfield & Flickinger, 1995).

2.2.4 Viabilidad espermática (integridad)

La importancia de la evaluación del daño en el ADN radica en que estas alteraciones serían potencialmente transmitidas a la siguiente generación. En años recientes se han implementado diferentes técnicas para poder detectar distintos tipos de alteraciones del ADN. Los diferentes marcadores del ácido desoxirribonucleico como el bromuro de etidio, pueden utilizarse para demostrar el fraccionamiento del ADN (entre más lesiones presente el material genético indicará una menor integridad del mismo, lo que conlleva a que disminuya la posibilidad de concluir con el proceso embrionario) (Fauvel *et al.*, 2010). Otras técnicas para medir la integridad del ADN son estudios como el “TUNEL” y “CASA”, sin embargo, hasta el momento no han sido ampliamente utilizados para investigaciones relacionadas con la calidad espermática en peces (Fauvel *et al.*, 2010). Las causas relacionadas con la presencia significativa de alteraciones genéticas en espermatozoides y su consecuencia sobre la fertilidad es un tema poco estudiado hasta ahora.

La viabilidad espermática nos indica el porcentaje de espermatozoides que pueden realizar el proceso de fecundación con éxito, independientemente de si estos presentan la capacidad motora para concluir el proceso de manera natural (Cabrita *et al.*, 2010; Gasparini & Evans, 2013). Este valor se determina identificando los espermatozoides inmóviles, los cuales, bajo una observación se contabilizan y se separan de los vivos. La separación de estos, se realiza implementando una tinción (de Eosina), para que después de unos minutos se

puedan observar las imágenes tomadas con el microscopio (Salirrosas *et al.*, 2017). Gracias a la implementación de técnicas de reproducción asistida como el ICSI (por sus siglas en inglés) se ha logrado comprobar que incluso espermatozoides que no son viables al 100% pueden producir fetos totalmente normales (Vásquez & Echeverri, 2007).

2.3 Métodos de análisis

Debido a que los espermatozoides necesitan ser células móviles y capaces de activarse para lograr alcanzar y penetrar el ovocito para fecundarlo es importante contar con un sistema de evaluación seminal que proporcione información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra, así como de la calidad media de las células espermáticas. Esto es posible hacerlo mediante el sistema CASA.

El equipo CASA, involucra una cámara de video conectada a un microscopio de interfase y a una computadora que digitaliza las imágenes del tamaño y el movimiento de las células espermáticas (Agüero, 2012). El equipo CASA permite el cálculo del conteo total de una muestra seminal, la cantidad de espermatozoides móviles y la concentración, así como también todos los valores de velocidad, movimiento lateral, progresivo y linealidad de la trayectoria espermática (Brogliatti, 2008). Además, cuenta con un ocular de campo claro de 10x, 20x o 100x, el cual permite seleccionar la especie, el aumento e incluso la temperatura de análisis (Fauvel *et al.*, 2010; del Gallego *et al.*, 2017).

El sistema CASA también se ha implementado como una herramienta para la identificación de sub-poblaciones espermáticas para una gran cantidad de especies. El establecimiento de subpoblaciones se realiza con base a una serie de datos objetivos proporcionados por el mismo sistema. El porcentaje de células vivas presentes en la muestra y la calidad de las mismas, permiten identificar la existencia de sub-poblaciones de

espermatozoides que presentan distintos patrones de movimiento y que coexisten en la misma muestra espermática, lo cual es una visión más real, ya que en una muestra en realidad se encuentra una población heterogénea de células espermáticas (Muiño *et al.*, 2006). En este sentido, el estudio de sub-poblaciones espermáticas podría conducir a un aumento significativo de la información obtenida durante el análisis de la calidad espermática.

Bajo este contexto, los diferentes instrumentos disponibles en el sistema CASA han demostrado poseer altos niveles de precisión, utilizando la metodología de clasificación espermática. Diseñado especialmente para programas de control de calidad y con la capacidad para diseñar matrices de clasificación específicas, CASA es una herramienta sumamente útil para el análisis objetivo de la calidad espermática en peces (Rurangwa *et al.*, 2004; Fauvel *et al.*, 2010; del Gallego *et al.*, 2017).

2.4 Variables que afectan la calidad espermática.

En la mayoría de los peces se presenta una fecundación externa, por lo cual, las células espermáticas están sometidas al estrés del medio ambiente (Valdebenito *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, los factores físicos, químicos y fisiológicos que pueden afectar la calidad de las células espermáticas son muy variados, dependiendo de la especie y del medio en donde habita (Rudolfsen *et al.*, 2008; Valdebenito *et al.*, 2009).

La temperatura, por ejemplo, influye sobre la velocidad y letargo de los espermatozoides, esta incide sobre el metabolismo de las células espermáticas alterando los patrones de motilidad después de su activación en la gran mayoría de las especies. En general, las bajas temperaturas prolongan la motilidad a través del tiempo y reducen la velocidad de desplazamiento (Vladič & Jätrevi, 1997; Alavi & Cosson, 2005).

Otra variable de importancias es el pH, el cual es un balance entre las diferentes secreciones, y aunque algunos autores no consideran el pH como un regulador primario, la realidad es que tiene importancia sobre el efecto de activación espermática (Musa, 2010). Este factor, en las soluciones activadoras de la motilidad espermática también afecta de distintas maneras la actividad flagelar de las células espermáticas dependiendo de la especie (Woolsey *et al.*, 2006). De manera general, el pH adecuado para las células espermáticas se encuentra entre 6.5 y 8.5, valores fuera de este rango tienden a inhibir el movimiento flagelar (Tabares *et al.*, 2005).

Existen además otros factores que pueden afectar la calidad espermática, tales como: osmolaridad, dióxido de carbono, niveles de oxígeno disuelto, metales pesados, protones, cationes y sustratos metabolizables para la iniciación y mantención de la motilidad (Rudolfsen *et al.*, 2008; Valdebenito *et al.*, 2009). Todos estos factores deben de tomarse en cuenta para un correcto análisis de la calidad espermática, puesto que son reguladores de la motilidad y activación de los espermatozoides una vez que estos son liberados al medio externo (Valdebenito *et al.*, 2009).

Ahora bien, dentro de la investigación acuícola se han desarrollado distintas herramientas y técnicas para la evaluación objetiva y cuantitativa de la calidad de los gametos (Fauvel *et al.*, 2010). En el caso de las células espermáticas, se han establecido variables relacionadas con la capacidad fecundante de las mismas, tales como: concentración de espermatozoides, morfometría, procesos de motilidad, integridad de la membrana y ADN de los espermatozoides y mediciones del estado energético. Estas variables, se han cuantificado y evaluado a través del sistema CASA, el cual ha comprobado ser un sistema útil y confiable.

En años recientes, diversos autores han evaluado la calidad espermática de especies acuícolas, así como las diferentes variables que pueden afectar a esta. En la mayoría de los trabajos, se ha implementado y detallado el uso del sistema CASA para la evaluación de las características espermáticas. Sin embargo, hasta ahora existen muy pocos trabajos de caracterización espermática en especies nativas, por lo cual nuestra investigación sirve como un trabajo base para futuras investigaciones relacionadas con la calidad espermática no solo del morro colorado, sino para otras especies nativas con potencial acuícola.

A continuación, se presentan en el cuadro 1 algunas de las investigaciones relacionadas con la caracterización espermática en peces.

Cuadro 1. Investigaciones relacionadas con la caracterización espermática en peces.

Autor	Titulo	Aportaciones
Linhart <i>et al.</i> , 2000.	Evaluación de la calidad espermática en <i>Cyprinus carpio</i> post-congelación.	Elaboraron métodos de criopreservación para la carpa común. Analizaron el rendimiento de fertilización, de eclosión de los embriones, las malformaciones larvianas y el porcentaje y la velocidad de la motilidad en espermatozoides congelados/descongelados con respecto a espermatozoides frescos. Los resultados indicaron que la congelación no afecta la tasa de eclosión, ni las malformaciones larvianas. En el resto de variables si se observó una influencia significativa de la crioconservación.
Viveiros & Godinho, 2009.	Crioconservación y análisis espermático es especies de agua dulce nativas de Brasil.	Evaluaron los parámetros de volumen espermático, motilidad, medios de congelación, métodos de congelación y calidad espermática post-congelación en especies nativas de Brasil. Además, discuten sobre la técnica de crioconservación como medio para garantizar la diversidad genética y conservar las especies nativa, así como el desarrollo de programas para el cuidado de los mismos.

Gennotte et al., 2012.	Análisis de la calidad espermática en machos XX, XY e YY del cíclido <i>Oreochromis niloticus</i> .	Evaluaron la calidad espermática (motilidad, concentración, número total de espermatozoides e índice gonadosomático) en machos revertidos (XX) y super machos (YY) del cíclido <i>Oreochromis niloticus</i> , con respecto a machos normales (XY). Los resultados demostraron que el genotipo y los tratamientos de reversión sexual no alteran los niveles de calidad espermática en los reproductores machos de la tilapia del Nilo.
Cejko et al., 2014.	Evaluación de la calidad del esperma al comienzo del período reproductivo en <i>Cyprinus carpio</i> .	Analizaron la calidad espermática durante un periodo de desove estimulado hormonalmente con Ovopel. Se evaluó mediante el sistema CASA los parámetros de porcentaje de espermatozoides móviles, espermatozoides progresivamente móviles, velocidad curvilínea, velocidad en línea recta, linealidad del movimiento, índice de oscilación, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia cruzada de latido. Los resultados indican que la estimulación hormonal con Ovopel no afecta de manera significativa los parámetros de calidad espermática de <i>Cyprinus carpio</i> .
Salirrosas et al., 2017.	Evaluación de la calidad espermática en súper machos YY de la tilapia roja <i>Oreochromis niloticus</i> .	Se evaluó la influencia de los genotipos sexuales en la calidad espermática, comparando la calidad espermática de una población introducida de tilapia roja macho con genético YY y XY. Los resultados mostraron una mejor movilidad espermática, motilidad, viabilidad, confluencia y menos anomalías en los machos con doble cromosoma Y (machos YY), sin embargo, el peso corporal de los individuos fue significativamente mejor en los machos XY.
Alcántar- Vázquez et al., 2022.	Sperm kinetics and motility subpopulation in XY and YY Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) males	Se evaluaron las características espermáticas en machos YY de <i>Oreochromis niloticus</i> con respecto a machos normales XY de la misma especie. Se analizaron parámetros tales como

volumen, concentración y motilidad mediante el sistema CASA. Los resultados que se obtuvieron indican que las características seminales de los machos reproductores YY no se ven afectados negativamente por el genotipo sexual, incluso presentan valores significativamente más altos de volumen y concentración espermática.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De manera general, la reproducción representa un cuello de botella típico en la producción animal, en este sentido, la evaluación de la calidad de los gametos juega un papel fundamental en la práctica de la acuicultura, determinando con frecuencia los beneficios del cultivo de una especie (Kowalski & Cejko, 2019). Por otro lado, la estimación de la calidad espermática es una herramienta básica para el investigador que trabaja con especies que comienzan a domesticarse donde se necesita espermatozoides de alta calidad para obtener líneas genéticas viables para la producción acuícola (Fauvel *et al.*, 2010; Kowalski & Cejko, 2019).

El uso de gametos de alta calidad de reproductores de peces en cautiverio es de gran importancia para asegurar la producción de descendencia viable para la acuicultura. Ahora bien, actualmente uno de los métodos más efectivos para analizar la calidad espermática en peces es el sistema CASA, el cual ha demostrado ser útil para analizar de manera objetiva las variables relacionadas con la calidad de los espermatozoides en peces de importancia comercial como la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A pesar de que el morro colorado es un cíclido como la tilapia del Nilo, se desconocen los aspectos básicos de la calidad de sus gametos, pues hasta ahora, no existen estudios relacionados con la calidad espermática de esta especie nativa. El poco conocimiento que se tiene hasta ahora acerca de su biología y más específicamente de la calidad de sus gametos, limita su potencial a futuro como una especie acuícola de gran envergadura, al no permitir su mejoramiento genético. Esto conlleva a que *V. fenestrata* sea explotada directamente del medio natural, generando una disminución de las poblaciones silvestres y poniendo a la especie en potencial riesgo.

4. JUSTIFICACIÓN

En la acuicultura moderna, uno de los puntos de interés común entre el acuicultor y el científico ha sido la rentabilidad del cultivo, la cual depende totalmente de que la especie cultivada sea capaz de reproducirse en cautiverio. Bajo este contexto, la calidad de los gametos es un factor que determina el éxito o fracaso de la reproducción, pues de esta depende la capacidad de producción de los organismos.

No obstante, la industria acuícola se ha centrado más en la calidad de los huevos y las larvas, sin tomar en cuenta que la calidad de las células espermáticas de los reproductores también afecta la fertilización, así como la producción de larvas sanas. De esta forma, en los criaderos comerciales, la calidad espermática de los reproductores a menudo es inadecuada y no siempre proporciona una fertilización exitosa ya sea en inseminación artificial o natural.

El morro colorado, es señalado como una especie potencial, debido a un conjunto de características, tales como su valor comercial (a nivel regional), su atractiva coloración, así como su adaptación a la temperatura y fotoperiodo de la región.

Si bien en la actualidad el morro colorado solo es explotado directamente del medio natural, el descenso de los volúmenes existentes en campo y las tendencias al incremento en los precios de las especies nativas pueden hacer que esta situación cambie en un futuro cercano; por lo que será necesario implementar los diferentes aspectos que conlleva un manejo adecuado en la explotación acuícola.

Debido a lo anterior, probablemente una perspectiva más real e inmediata no solo para la explotación intensa de *V. fenestrata* sino para su repoblación en los ecosistemas naturales puede encontrarse en su cultivo.

En este sentido, la domesticación de *V. fenestrata*, así como la posible producción controlada, están ligadas al éxito reproductivo, y en particular a la fertilización final de los ovocitos maduros. Ahora bien, para alcanzar esto, se requiere una evaluación de la calidad espermática que permita predecir la viabilidad de los reproductores para una producción acuícola rentable, así como para mejorar y desarrollar técnicas de crioconservación y biotecnologías relacionadas con la calidad de los espermatozoides.

5. HIPÓTESIS

Las características espermáticas del morro colorado (*Vieja fenestrata*) cumplen con los estándares macroscópicos y microscópicos que determinan la viabilidad de los reproductores en los cultivos acuícolas.

6. OBJETIVOS

6.1 General

- Evaluar las características espermáticas del cíclido nativo morro colorado (*Vieja fenestrata*) como especie potencial para cultivo.

6.2 Específicos

- Determinar las características macroscópicas y microscópicas de los espermatozoides del cíclido nativo morro colorado (*Vieja fenestrata*)
- Evaluar la motilidad y morfología de los espermatozoides del cíclido nativo morro colorado (*Vieja fenestrata*).
- Evaluar la viabilidad del morro colorado (*Vieja fenestrata*) como especie potencial para el cultivo acuícola en relación a las características espermáticas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Animales

Se seleccionó un primer lote de 30 reproductores de aproximadamente 350-500 g de peso y 12-15 meses de edad pertenecientes a la Universidad del Papaloapan. Los organismos seleccionados fueron identificados en base a la diferenciación de la papila genital establecida para representantes de la familia Cichlidae y haciendo uso de una cánula. El experimento se desarrolló en las instalaciones de la Unidad Acuícola Experimental pertenecientes a la Universidad del Papaloapan, campus Loma Bonita y se aclimataron por 30 días antes de iniciar el experimento. Se alimentaron 2 veces al día con alimento comercial (Purina Agribands) al 32% de proteína (energía digestible 3.00 Kcal/g).

7.2. Colecta de muestra espermática.

Para realizar la colecta de semen, los reproductores fueron previamente anestesiados por inmersión en agua con 2-fenoxietanol (0.5 mL de 2-fenoxietanol por cada litro de agua). Una vez anestesiados se les colocó un paño húmedo sobre la cabeza para reducir el estrés. Para efectuar la colecta del esperma se limpió el área de la papila genital con agua destilada y el esperma se obtuvo mediante la técnica descrita por Abascal *et al.* (2007), la cual consistió en realizar un suave masaje abdominal en dirección antero-posterior y colectar el esperma una vez saliera del poro genital directamente en un microtubo Eppendorf. Este proceso se realizó con cada uno de los reproductores de manera repetitiva con el fin de obtener la mayor cantidad de muestra posible por cada reproductor. Las colectas se realizaron cada 14 días durante 40 semanas, dividiendo los grupos de muestras colectadas en periodos de 10 semanas.

7.3. Aplicación de aditivo

Después de un periodo de descanso (de aproximadamente 30 días después de la última colecta espermática), a 10 reproductores de la Universidad del Papaloapan se le suministró un aditivo comercial de marca BIOprotec, Aquanu3[®] a través del alimento. Para esto, se preparó un kg de alimento con aditivo (2 g de aditivo por kg de alimento) adherido mediante aceite comercial. Se alimentaron con este aditivo durante 40 días, pues es el periodo en el cual las células espermáticas se desarrollan y maduran en las gónadas. De esta forma se garantizó poder evaluar el efecto del aditivo a través del alimento sobre la calidad de los espermatozoides.

7.4. Inducción con gonadotropina.

Con el fin de estimular la producción de células sexuales en los reproductores del primer lote, 10 peces fueron inyectados bajo la aleta pectoral una única ocasión utilizando hormona gonadotropina (GONAFORTE[®] Gonadotropina 2500 Unidades frasco de 10 ml en solución inyectable). La recolección de las muestras se inició de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2 aproximadamente 72 horas después de aplicar la hormona.

7.5 Análisis macroscópico

Se evaluaron los parámetros, volumen, pH y color. Debido a que no existen antecedentes relacionados con la caracterización espermática de *V. fenestrata*, la evaluación macroscópica se realizó en base a la repetibilidad de los datos obtenidos, tomando como normal el valor que más se repitió en cada variable. Para volumen se observó la cantidad de eyaculado en los tubos Eppendorf inmediatamente después de coleccionar la muestra. Para pH, se tomó una alícuota de cada muestra y se colocaron sobre tiras reactivas de pH marca MilliporeSigma, posteriormente se compararon los resultados con lo establecido en las instrucciones de las

tiras. En cuanto al color, se realizó una tabla con diferentes tonos de blanco y se comparó cada muestra con la tabla para determinar el color de cada una.

7.6. Análisis microscópico.

7.6.1 Concentración

La concentración espermática se evaluó en cada una de las muestras colectadas, para ello se utilizó una dilución de 1:200 (eyaculado (5 μ L) /agua destilada (995 μ L). Se colocaron 8 μ L de la dilución en una cámara de Neubauer y se dejó reposar entre 5 y 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo se observó la cámara con la ayuda del sistema computarizado de análisis espermático (por sus siglas en inglés CASA) bajo el objetivo 20x, se capturaron cuatro campos con un número indefinido de células y se calculó la concentración (Rurangwa *et al.*, 2004). El número total de espermatozoides para los organismos se calculó mediante una relación entre el volumen de la muestra y la concentración de espermatozoides.

7.6.2 Motilidad

Se realizó la activación espermática mediante una dilución de 1/2 (muestra espermática y agua dulce) homogeneizada previamente en un agitador orbital durante un minuto en todas las muestras obtenidas a excepción de las inducidas mediante gonadotropina. Posteriormente, se colocaron 5 μ L de semen en un portaobjetos para su observación en una platina atemperada a 28°C bajo el objetivo 20x. Se capturaron cuatro campos para medir cuantitativamente la movilidad de los espermatozoides en el sistema CASA, mediante la evaluación de los siguientes parámetros: motilidad total, motilidad progresiva, velocidad curvilínea, velocidad en línea recta y linealidad (Rurangwa *et al.*, 2002; Gennotte *et al.*, 2012).

7.6.3 Morfología

Para cada muestra espermática colectada se realizó una dilución 1/50 (eyaculado/solución alcohólica) y se homogeneizó en un agitador orbital durante un minuto. Se colectaron 5 μ L de la dilución en un portaobjetos a través de un barrido de una gota de la muestra y se dejó secar durante 24 horas a temperatura ambiente.

Una vez pasadas las 24 horas, los frotis se tiñeron utilizando un kit de tinción marca HYCEL (Hemocolorante rápido para frotis sanguíneo). Para la tinción se siguieron las instrucciones del mismo kit (HEMOCROM-FIX HYCEL), colocando primero el colorante rojo (hemocolorante 1) durante 10 minutos, posteriormente se colocó el colorante azul (hemocolorante 2) por 5 minutos. Finalmente, el sistema CASA (previamente configurado con la tinción) determinó por diferencia de los tipos normales y anormales un análisis citomorfológico. Todo este proceso se realizó bajo el objeto 40x.

7.7 Análisis estadístico

Se aplicaron pruebas de homogeneidad y homocedasticidad en los datos obtenidos a lo largo del experimento, comparando las características macro y microscópicas de las muestras colectadas en periodos de 10 semanas, así como también las muestras inducidas mediante gonadotropina y las muestras colectadas después de aplicar el aditivo comercial en la dieta de los reproductores. Una vez cumplidos los supuestos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95%, posteriormente un análisis de Tukey en las características microscópicas y una prueba t de Student para las características macroscópicas.

8. RESULTADOS

8.1 Comparación de eyaculados naturales a través del periodo de experimentación

8.1.1 Variables macroscópicas y concentración.

En el Cuadro 2 se presentan los valores de color, pH, volumen y concentración obtenidos en *V. fenestrata* a través del periodo de experimentación. A la semana 10 se observó una coloración translúcida, ligeramente similar al agua. Las muestras presentaron un color blanco lechoso a partir de la semana 20. En cuanto al pH se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), con las muestras colectadas a la semana 10 mostrando un valor de pH más bajo que las colectadas durante el resto del periodo de evaluación. No se presentaron diferencias significativas para el volumen colectado a lo largo de las semanas evaluadas. Finalmente, la concentración espermática presentó diferencias significativas ($P < 0.05$), mostrando un número de espermatozoides superior a las semanas 30 y 40 en comparación con las semanas 10 y 20.

Cuadro 2. Valores de variables macroscópicas y concentración en el esperma del morro colorado (*V. fenestrata*) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.

Periodo	Color	pH	Volumen (mL)	Concentración ($\times 10^9$ células mL ⁻¹)
10 semanas	Crema - translúcido	6.6 ± 0.5^b	0.19 ± 0.08^a	0.34 ± 0.04^b
20 semanas	Blanco lechoso	7.5 ± 0.3^a	0.29 ± 0.10^a	0.50 ± 0.25^b
30 semanas	Blanco lechoso	7.5 ± 0.3^a	0.25 ± 0.09^a	2.18 ± 1.02^a
40 semanas	Blanco lechoso	7.5 ± 0.1^a	0.24 ± 0.05^a	2.34 ± 0.61^a

mL: mililitros de eyaculado. Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

8.1.2 Morfología.

A continuación, en el cuadro 3 se presentan los parámetros morfológicos observados en *V. fenestrata* a través del periodo de experimentación. De manera general, el esperma del morro colorado presenta una cabeza de forma redonda, similar a lo reportado en la tilapia del Nilo. En cuanto a la longitud, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las muestras colectadas en la semana 10, las cuales presentaron una longitud inferior al resto de las muestras colectadas en los periodos posteriores. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los periodos de muestreo con respecto a lo ancho de la cabeza. Finalmente, tanto el área como el perímetro de la cabeza, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las células espermáticas colectadas en la semana 30 y 40 en comparación con las colectadas en la semana 10 y 20.

8.1.3 Motilidad.

En los Cuadros 4 y 5 se presenta el análisis de velocidad y los valores de desplazamiento espermático obtenidos en reproductores de *V. fenestrata* a lo largo del periodo de experimentación. En cuanto al análisis de velocidad presentado en el cuadro 4, no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en ninguno de los periodos evaluados, así como en las variables analizadas.

Cuadro 3. Características morfológicas en el espermatozoide del morro colorado (*V. fenestrata*) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.

Periodo	Parámetros morfológicos				
	Forma	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Area (μm)	Perímetro (μm)
Semana 10	Redonda	1.63 ± 0.15^b	1.33 ± 0.17^a	1.87 ± 0.34^b	5.08 ± 0.46^b
Semana 20	Redonda	1.99 ± 0.22^a	1.57 ± 0.30^a	2.69 ± 0.74^b	6.18 ± 0.80^b
Semana 30	Redonda	2.16 ± 0.18^a	1.61 ± 0.22^a	4.05 ± 0.89^a	7.96 ± 1.26^a
Semana 40	Redonda	2.26 ± 0.06^a	1.49 ± 0.21^a	4.79 ± 0.34^a	8.49 ± 0.68^a

Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

En lo que respecta a los valores de desplazamiento se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la velocidad rectilínea y en la velocidad promedio de los espermatozoides. En el primer caso, las células colectadas en la semana 40 presentaron una velocidad rectilínea estadísticamente superior a las células muestreadas en la semana 10. Por su parte, las muestras colectadas en la semana 20 y 30 no mostraron diferencias significativas. Para la velocidad promedio, las células espermáticas obtenidas en la semana 30 y 40 mostraron valores superiores a lo observado en las semanas 10 y 20.

Cuadro 4. Análisis de movilidad espermática en el esperma del morro colorado (*V. fenestrata*) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.

Periodo	Parámetros de movilidad espermática		
	Células motiles progresivas (%)	Células motiles no progresivas (%)	Células estáticas (%)
Semana 10	88.1 ± 4.9 ^a	11.8 ± 5.0 ^a	0.08 ± 0.0 ^a
Semana 20	85.7 ± 2.3 ^a	14.2 ± 2.2 ^a	0.07 ± 0.0 ^a
Semana 30	88.4 ± 3.1 ^a	11.4 ± 3.1 ^a	0.10 ± 0.1 ^a
Semana 40	88.5 ± 3.4 ^a	11.3 ± 3.4 ^a	0.20 ± 0.1 ^a

Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras ± desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

Cuadro 5. Comparativa de valores de desplazamiento en el esperma del morro colorado (*V. fenestrata*) a partir de la siembra inicial en los estanques de experimentación.

Periodo	Parámetros de velocidad de desplazamiento		
	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)
Semana 10	109.24 ± 13.86 ^a	24.19 ± 6.15 ^b	31.60 ± 8.56 ^b
Semana 20	121.0 ± 32.9 ^a	27.10 ± 4.31 ^{ab}	35.34 ± 8.21 ^b
Semana 30	130.75 ± 22.07 ^a	30.83 ± 2.68 ^{ab}	57.91 ± 4.05 ^a
Semana 40	132.0 ± 32.01 ^a	32.08 ± 3.23 ^a	56.30 ± 3.34 ^a

*VCL = Velocidad curvilínea, VSL = Velocidad rectilínea, VAP = Velocidad promedio. Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

8.2 Efecto del aditivo comercial sobre la calidad espermática

8.2.1 Variables macroscópicas y concentración.

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de color, pH, volumen y concentración obtenidos en reproductores de *V. fenestrata*. Los resultados obtenidos en las muestras espermáticas de reproductores alimentados con aditivo comercial no presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a las muestras colectadas de manera natural en ninguno de los parámetros evaluados.

Cuadro 6. Comparación de valores macroscópicos y de concentración espermática entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (*V. fenestrata*).

Muestra	Color	pH	Volumen (mL)	Concentración ($\times 10^9$ células mL ⁻¹)
Natural	Blanco lechoso	7.4 \pm 0.2 ^a	0.24 \pm 0.07 ^a	2.41 \pm 1.00 ^a
Aditivo	Blanco lechoso	7.4 \pm 0.3 ^a	0.25 \pm 0.08 ^a	2.40 \pm 0.49 ^a

mL: mililitros de eyaculado. Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

8.2.2 Morfología

En el cuadro 7 se comparan los parámetros morfológicos observados en espermatozoides de *V. fenestrata* obtenidos de manera natural y obtenidos después de alimentar con un aditivo comercial. De los parámetros morfológicos analizados, únicamente se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el ancho de la cabeza, en donde las muestras espermáticas de reproductores alimentados con aditivo mostraron un tamaño estadísticamente menor con respecto a lo observado en muestras naturales

Cuadro 7. Características morfológicas entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (*V. fenestrata*).

Muestra	Parámetros morfológicos				
	Forma	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Area (μm)	Perímetro (μm)
Natural	Redonda	2.26 ± 0.15^a	1.56 ± 0.21^a	4.51 ± 0.37^a	8.03 ± 1.16^a
Aditivo	Redonda	2.21 ± 0.20^a	1.36 ± 0.20^b	4.21 ± 0.91^a	7.76 ± 0.69^a

Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

8.2.3 Motilidad

En los Cuadros 8 y 9 se presenta el análisis de velocidad y los valores de desplazamiento espermático obtenidos en muestras de reproductores alimentados con aditivo y en muestras obtenidas de manera natural. Dentro de los porcentajes de motilidad espermática no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Con respecto a los parámetros de velocidad de desplazamiento, en las muestras de los reproductores alimentados con aditivo se observó una velocidad promedio estadísticamente superior ($P < 0.05$) con respecto a las muestras obtenidas de manera natural. Sin embargo, en los parámetros de velocidad curvilínea y velocidad rectilínea las células espermáticas de ambos grupos no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 8. Análisis de movilidad espermática entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (*V. fenestrata*).

Muestra	Parámetros de movilidad espermática		
	Células motiles progresivas (%)	Células motiles no progresivas (%)	Células estáticas (%)
Natural	87.4 ± 3.8 ^a	12.5 ± 3.9 ^a	0.1 ± 0.0 ^a
Aditivo	88.0 ± 3.3 ^a	11.8 ± 3.2 ^a	0.1 ± 0.1 ^a

Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras ± desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

Cuadro 9. Comparativa de valores de desplazamiento entre muestras naturales y muestras colectadas después de la alimentación con aditivo comercial en reproductores del morro colorado (*V. fenestrata*).

Muestra	Parámetros de velocidad de desplazamiento		
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
Natural	124.29 \pm 9.77 ^a	32.09 \pm 3.05 ^a	54.51 \pm 3.74 ^b
Aditivo	127.3 \pm 24.92 ^a	31.20 \pm 2.73 ^a	57.44 \pm 3.83 ^a

*VCL = Velocidad curvilínea, VSL = Velocidad rectilínea, VAP = Velocidad promedio. Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

8.3 Efecto de la hormona gonadotropina sobre la calidad espermática

8.3.1 Variables macroscópicas y concentración.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados de color, pH, volumen y concentración obtenidos en reproductores de *V. fenestrata*. Las muestras inducidas mediante gonadotropina mostraron un color translúcido muy similar al agua. Por su parte, los eyaculados colectados en este mismo periodo mostraron una coloración crema-translúcido.

En cuando al pH, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, mientras que el volumen de los eyaculados inducidos presentó diferencias significativas ($P < 0.05$), registrando una media que duplica la media registrada en los eyaculados naturales.

Finalmente, la concentración espermática registró diferencias significativas ($P < 0.05$), con las muestras naturales presentando una concentración de células espermáticas significativamente mayor a lo observado en las muestras inducidas.

Cuadro 10. Comparación de valores macroscópicos y de concentración espermática entre muestras naturales y muestras inducidas mediante gonadotropina en reproductores del morro colorado (*V. fenestrata*).

Muestra	Color	pH	Volumen (mL)	Concentración ($\times 10^9$ células mL ⁻¹)
Natural	Crema-translúcido	6.8 ± 0.6^a	0.20 ± 0.08^b	0.33 ± 0.04^a
Inducida	Translúcido	6.2 ± 0.3^a	0.40 ± 0.10^a	0.14 ± 0.03^b

mL: mililitros de eyaculado. Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

8.3.2 Morfología

En el Cuadro 11 se comparan los parámetros morfológicos observados entre espermatozoides de *V. fenestrata* obtenidos de manera natural e inducida. La forma de la cabeza no varió entre las muestras naturales e inducidas, mostrando de manera constante una forma redonda en las células espermáticas. Sin embargo, los cuatro parámetros morfológicos evaluados (longitud, ancho, área y perímetro) mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), con las células

espermáticas obtenidas a través de la inducción hormonal registrando valores más bajos que los observados en las muestras obtenidas naturalmente.

Cuadro 11. Características morfológicas del esperma de morro colorado (*V. fenestrata*) natural e inducido mediante gonadotropina.

Muestra	Parámetros morfológicos				
	Forma	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Area (μm)	Perímetro (μm)
Natural	Redonda	1.66 ± 0.16^a	1.33 ± 0.16^a	1.89 ± 0.31^a	5.16 ± 0.45^a
Inducido	Redonda	1.27 ± 0.19^b	1.02 ± 0.15^b	1.18 ± 0.37^b	3.88 ± 0.62^b

Los valores representan el promedio representativo de cada grupo de muestras \pm desviación estándar. Valores con superíndices con diferente letra entre columnas indican diferencias significativas. Tukey, $P < 0.05$.

8.3.3 Motilidad

Los espermatozoides colectados de las muestras inducidas no pudieron ser activados, por lo tanto, no fue posible realizar el análisis de motilidad correspondiente.

9. DISCUSIÓN

Hasta la fecha no hay ningún antecedente acerca de la calidad espermática para el morro colorado (*Vieja fenestrata*). Este pez, comienza a despegar como una especie potencial para la actividad acuícola, sin embargo, aún es muy limitada la información que se tiene sobre este. De tal manera que, para realizar el presente experimento, se trabajó sobre la adaptación de los animales a las condiciones de los estanques, al alimento comercial y a la manipulación humana para la colecta espermática. Cabe señalar que el tiempo necesario para aclimatar un macho para la recolección de muestras espermáticas está muy influenciada por la persona encargada de coleccionar la muestra y puede llevar de uno hasta seis meses para lograr la recolección del esperma no contaminado (sin contacto con agua, orina, heces o cualquier sustancia que pueda afectar la activación de las células) (Beirão *et al.*, 2019). Además, se probaron diferentes proporciones (macho: hembra), así como diferentes densidades de peces por estanque con el fin de reducir el estrés y la agresividad entre los mismos reproductores. Lo anterior, se llevó a cabo durante varias semanas con el fin de lograr que los reproductores no presentaran altos niveles de estrés y así obtener muestras espermáticas viables que no se vieran afectadas por cualquier tipo de alteración del sistema endócrino, derivado de la poca adaptación de los peces a las condiciones de cautiverio y al manejo humano. Finalmente, se logró no solo caracterizar el esperma sino también se observó la evolución en la madurez de las células sexuales de la especie.

Gracias a la caracterización macroscópica se logró observar durante el experimento la maduración sexual por parte de los organismos. El pH mostró una tendencia a incrementarse conforme la maduración de las muestras también aumentó. Se observaron valores de pH ligeramente por debajo del nivel neutral, alcanzando un valor mínimo de 6 en

muestras inmaduras. Esto va de la mano junto con la coloración de las mismas, ya que, al presentar valores de pH más bajos el semen se tornó más pálido llegando a ser ligeramente translúcido. Por otro lado, las muestras colectadas a partir de la semana 30 que presentaron un pH entre 7.5 y 8 presentaron una coloración blanca-lechosa. Estos valores concuerdan con lo reportado por Alavi *et al.* (2005) y de Castro & Patil (2019) los cuales evaluaron los parámetros de calidad espermática en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) respectivamente, reportando valores de pH que van de 7 a 8 y estableciendo que muestras seminales con un pH inferior significan inmadurez sexual de los organismos o bien una alteración gonadal. Con base en estos resultados, se podría determinar que, para el morro colorado, un pH superior a 7 también es un indicativo de madurez sexual en los reproductores y por ende una mayor calidad espermática.

En lo que respecta al color del semen, por lo general se establece como un indicador de la calidad, ya que el color característico de cada especie está relacionado con el hecho de que los espermatozoides de los peces obtienen la capacitación y maduración durante la migración a lo largo del conducto eferente (Bustamante-González *et al.*, 2018), pues muestras inmaduras no presentan la coloración blanca y opaca que caracterizó a las muestras que se obtuvieron después de la semana 30 y que indican madurez sexual. Si bien la coloración observada puede ser característica de la especie, es importante mencionar que es similar a la coloración del semen reportado para el género *Oreochromis* (Nakamura *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016; Triastuti *et al.*, 2018) Esta similitud tiene sentido debido a que ambas especies pertenecen a la familia *Cichlidae*.

En cuanto al volumen seminal, durante la etapa de experimentación este no se vio afectado a pesar de que las muestras presentaron inmadurez hasta la semana 20, el volumen

no presentó diferencias significativas. Sin embargo, es importante aclarar que, en dichas muestras, el volumen total consistió en mayor medida de líquido seminal y no de células espermáticas, y por este motivo la coloración se tornó translúcida en las primeras muestras colectadas. Ahora bien, en cuanto a las muestras inducidas mediante gonadotropina, se observó un incremento significativo, aumentando dos veces el volumen con respecto a lo observado en muestras colectadas de manera natural. A pesar de este incremento, estas muestras también estuvieron formadas en mayor medida de líquido seminal y no de células espermáticas. Esto podría ser resultado de la poca adaptación que presentaban en ese instante los organismos a los estanques experimentales pues al incrementar el estrés en los animales se ve afectado el sistema endócrino y por ende la producción de células sexuales (Fauvel *et al.*, 2010). Se debe mencionar que un primer efecto de la hormona exógena es precisamente el incremento en el volumen seminal (Loir & Billard, 1990; Terán *et al.*, 2004; García *et al.*, 2011; Pérez-Albelo, 2021), de tal forma que, el uso de gonadotropina si generó un efecto sobre los reproductores, sin embargo, este se limitó únicamente al incremento de líquido seminal y no al número de células espermáticas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pardo-Carrasco *et al.* (2016), los cuales aplicaron extracto de pituitaria de carpa en el yamú (*Brycon amazonicus*), observando un incremento significativo en el volumen de eyaculado y una disminución en la concentración espermática, sugiriendo que el extracto de pituitaria de carpa influye más en la producción de líquido seminal que en el proceso de espermatogénesis. Ahora bien, se debe tener en cuenta que en algunas especies acuícolas el incremento del líquido seminal está asociado con la madurez sexual de los reproductores y la adquisición de capacidad fertilizante de los espermatozoides, es decir, capacitación espermática dentro de los conductos seminíferos (Schulz & Miura, 2002). Chowhury & Joy (2007), mencionan que la sobreproducción de líquido seminal permite una especie de

hidratación gonadal, lo cual contribuye en la prolongación y estabilización de la viabilidad de los espermatozoides. De esta forma, la aplicación de la hormona gonadotropina en el morro colorado pudo haber dado paso a la madurez de las células espermáticas, sin embargo, esto se habría reflejado únicamente en el proceso antecesor de la producción de espermatozoides, es decir, en la producción de una gran cantidad de líquido seminal.

Para las muestras colectadas después del uso del aditivo comercial no se observaron diferencias significativas con respecto a las colectadas de manera natural, lo cual puede indicar que la implementación de este aditivo a través del alimento no influye sobre el volumen total del eyaculado en el morro colorado. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Abbass *et al.* (2012), quienes evaluaron el propóleo y el polen de abeja como suplemento alimenticio para la tilapia del Nilo, observando un nulo efecto sobre la calidad espermática, además de un incremento significativo en las anomalías en la cabeza de los espermatozoides. Singh *et al.* (2022) por su parte, evaluaron bacterias probióticas (*Lactobacillus plantarum*) como suplemento alimenticio en la carpa común, y aunque reportaron una reducción en el estrés patógeno y una mejora en la inmunidad de los peces, no lograron observar ningún efecto del probiótico sobre la eficiencia reproductiva de los organismos. En este sentido, es posible que el aditivo implementado en nuestro trabajo no genere un efecto sobre la calidad del semen, o bien, la concentración utilizada no fuera lo suficientemente alta para inducir un efecto positivo, no obstante, es importante realizar nuevos estudios, así como administrar otros tipos de suplementos alimenticios. Contrario a lo observado en nuestro experimento Domínguez-Castanedo *et al.* (2015) evaluaron la suplementación del carotenoide astaxantina en la dieta sobre la calidad de semen en el pez tetra (*Moenkhausia sanctaefilomenae*) y reportaron un incremento significativo en el

volumen seminal tras la aplicación del suplemento. Marín & Eduardo (2019), establecieron que el suministro de suplementos alimenticios ricos en vitaminas tales como E y C, ayuda a mejorar el desempeño del sistema inmune y la calidad espermática de los reproductores de la tilapia (*Oreochromis sp*) incrementando la salud de las poblaciones en los estanques de cultivo, lo cual es necesario para una buena reproducción. Por otro lado, Enzeline *et al.* (2022) probaron una dieta suplementada con *Bacillus sp* en el bagre africano, reportando un incremento de 2 a 4 veces el volumen obtenido de cada reproductor.

Numerosos estudios han abordado la eficacia de los aditivos y suplementos, no obstante, la mayoría de estos trabajos se han enfocado en las hembras reproductoras, siendo pocos los estudios que se han centrado en la calidad del esperma y del semen (Sumon *et al.*, 2022). Ante esto se debe tener en cuenta que los efectos de los suplementos alimenticios también aumentan la producción de esperma de los testículos, con acciones estimulantes en dos componentes conocidos como secciones intertubulares (o intersticiales) y tubulares (Valcarce *et al.*, 2015), demostrando además, que algunos probióticos estimulan las células de Leydig (Valcarce *et al.*, 2015; Sumon *et al.*, 2022), por lo cual vuelve indispensable realizar estudios de mayor profundidad a los efectos de los aditivos alimenticios sobre los procesos reproductivos de los reproductores y la calidad espermática en especies potencialmente importantes para el sector acuícola.

Ahora, comparando nuestros resultados con lo reportado en otras especies acuícolas de importancia comercial, el volumen seminal en muestras maduras en el morro colorado, se encuentra 1.3 veces por arriba de la media reportada por Salirrosas *et al.* (2017) quien evaluó la calidad espermática en machos XY y YY de tilapia del Nilo. Es importante mencionar que

la cantidad de semen por eyaculado estaría, en teoría, dentro de los parámetros normales para los peces pertenecientes a la familia de los cíclidos.

Con respecto a otras especies comerciales, autores como Öğretmen *et al.* (2005) y Cejko *et al.* (2014) han evaluado la calidad espermática en la carpa común (*Cyprinus carpio*), obteniendo valores que duplican a los observados en nuestra investigación. Cruz-Casallas *et al.* (2007), reportan volúmenes de 1.8 mL en el sábalo (*Brycon amazonicus*), una especie nativa de Colombia y Venezuela, que ha generado una alta demanda comercial en los últimos años y por lo cual, se iniciaron estudios relacionados al control de su reproducción (Casallas *et al.*, 2006). De Castro & Patil (2019), evaluaron la calidad espermática en el salmón del Atlántico, reportando un volumen de eyaculado superior a los 11 mL, no obstante, este valor probablemente obedece a que el salmón, a diferencia de las otras especies mencionadas, dispersa el esperma a lo largo de la columna de agua, que es en donde ocurre el desove de las hembras, mientras que las especies dulceacuícolas, colocan los desoves en el sustrato, por tal motivo, se necesita un menor volumen de eyaculado con el fin de garantizar la fertilización del mayor número de huevos. Por otra parte, la baja producción de semen del morro colorado, con respecto a la carpa común y el sábalo, puede ser resultado de la poca domesticación que se tiene hasta el momento de la especie, pues se ha comprobado que la adaptación de los peces a las condiciones de los estanques puede influir en los niveles de estrés de los organismos, afectando el sistema endócrino y con ello la producción de hormonas que ayudan a generar y madurar las células sexuales (Barandica & Tort, 2008). Bajo este contexto, la domesticación del morro colorado, aunado a la selección de líneas genéticas mejoradas, podría incrementar los volúmenes totales en los eyaculados de organismos bajo cautiverio, pues se ha demostrado que factores tales como la temperatura, la domesticación, la nutrición

y la manipulación humana, influyen de manera significativa en la producción de células sexuales, así como el éxito reproductivo (Fauvel *et al.*, 2010).

Es importante mencionar que, en trabajos previos realizados en la tilapia del Nilo y carpa común, los reproductores utilizados alcanzan pesos de hasta 800 g mientras que en nuestro trabajo los organismos utilizados no rebasaron los 500 g de peso. En este sentido, Guerrero-Quiroz *et al.* (2008) mencionan que un mayor volumen de eyaculado se relaciona directamente con tallas y pesos superiores. Esto debido a que en peces existe una relación significativa entre el número de espermatozoides y el tamaño del organismo, por lo cual, el uso de machos con un mayor tamaño y peso también incrementarían, en teoría, el volumen total del eyaculado.

En lo que respecta a la concentración espermática se observó un incremento conforme se avanzó en el periodo experimental, mostrando diferencias significativas entre las muestras colectadas a partir de la semana 30 y las colectadas hasta la semana 20. Al final del experimento (semana 40) el promedio de la concentración espermática fue 6.8 veces mayor a la media observada al inicio del trabajo (semana 10). El aumento en el número total de espermatozoides es muy importante, pues se ha establecido que un incremento en la concentración espermática aumenta el porcentaje de huevos fertilizados, así como también permite llevar a cabo técnicas como la fertilización *in vitro* (López-Hernández *et al.*, 2018). Todo esto resulta beneficioso cuando se habla de una especie nativa la cual se intenta establecer dentro del sector acuícola para su producción en masa.

En cuanto a los eyaculados inducidos mediante gonadotropina se observó una media estadísticamente menor en comparación con las muestras obtenidas de manera natural. Esto contrasta con lo reportado por Cejko *et al.* (2017) quienes evaluaron tratamientos hormonales

de hCG en la locha espinosa (*Cobitis taenia*), reportando un incremento en el número de células sexuales maduras con respecto a la producción de machos no tratados. Los resultados obtenidos en nuestro experimento nuevamente podrían ser causados por la poca adaptación de los organismos a los estanques de cultivo. Ante esto, Tvedt *et al.* (2001) probaron un tratamiento de GnRHa sobre la especie *Hippoglossus hippoglossus*, reportando también una disminución en el número de espermatozoides después de la aplicación de la hormona, sugiriendo que algunas especies podrían no responder de manera positiva en todos los aspectos de calidad espermática tras la aplicación de hormonas exógenas en los reproductores. Por su parte, Pardo Carrasco *et al.* (2016), aplicaron hormonas hCG y GnRHa en el *Brycon amazonicus* sin observar ningún efecto sobre la concentración espermática en ninguno de los tratamientos. De esta forma, además de la poca adaptación de nuestros organismos a los estanques, la hormona gonadotropina podría no generar ningún efecto sobre el número de espermatozoides, o bien como se mencionó anteriormente, tener un efecto tardío y no un efecto visible pocas horas después de la administración, por lo cual se habría observado una concentración menor con respecto a las muestras colectadas posteriormente de manera natural.

Otro punto importante, es la dosis y el tiempo de administración de la hormona a los reproductores. Se ha establecido que, si se administra un tratamiento hormonal demasiado temprano en la época reproductiva o bien en reproductores sexualmente inmaduros, la terapia puede fallar o generar células sexuales de mala calidad (Gardes *et al.*, 2000). Por otro lado, un nivel demasiado alto de hormona también puede tener efectos nocivos sobre la calidad de los espermatozoides (Gardes *et al.*, 2000; Mylonas *et al.*, 2009). Las dosis y tiempos de aplicación en nuestro trabajo se basó en antecedentes de especies como la tilapia del Nilo o

la tenguayaca, sin embargo, los valores de dosis adecuadas para el morro colorado aún son desconocidas, por ende, es necesario realizar trabajos puntuales de inducción hormonal sobre la especie para obtener un efecto completamente beneficioso en cuanto a la calidad espermática.

Por otro lado, los eyaculados obtenidos después del uso del aditivo comercial presentaron una concentración ligeramente superior con respecto a los eyaculados naturales, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre estas muestras. En este sentido, Aboelward *et al.* (2020) establecen que los aditivos para piensos son sustancias que benefician no solo la nutrición del pez, sino también la tasa de crecimiento del animal, su salud y su bienestar en general. Por otra parte, Alemayehu *et al.* (2018), mencionan que la aplicación de aditivos también puede reducir el nivel de estrés en los organismos. En base a esto, el uso del aditivo durante el periodo de espermatogénesis del morro colorado podría haber mejorado la calidad y el número de gametos, produciendo un ligero incremento en el número de células espermáticas. Sin embargo, para evaluar la calidad se requiere realizar estudios de fertilización *in vitro*, así como *in vivo*. El uso prolongado de este aditivo podría mejorar de manera significativa la producción de células espermáticas, por lo cual se deberán de continuar con estudios que además de prolongar el periodo de aplicación, también pruebe diferentes aditivos comerciales que corroboren con los datos obtenidos en nuestro experimento.

Con respecto a otras especies, el número total de espermatozoides observados en el morro colorado fue superior a lo reportado por Salirrosas (2017) y Alcántar-Vázquez *et al.* (2022), quienes evaluaron las características espermáticas en la tilapia roja (*Oreochromis* spp) y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) respectivamente. En nuestra investigación,

se muestra una concentración espermática aproximadamente 1.3 veces mayor en comparación a lo reportado en la tilapia, no obstante, se debe recalcar que la tilapia es un pez ampliamente domesticado, lo cual podría influir en una disminución del número de espermatozoides producidos, pues al estar en cautiverio se disminuye la competencia natural y se vuelve innecesario la generación excesiva de gametos (Smitherman *et al.*, 1988; Osure & Phelps, 2006).

Contrario a lo anterior, especies dulceacuícolas de importancia comercial tales como la carpa común y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), muestran concentraciones de espermatozoides por mililitro muy por encima de lo observado en el morro colorado. Kowalski, & Cejko (2019), establecen que el número de células espermáticas por eyaculado, puede verse afectado por las condiciones externas presentes en el medio que habitan las diferentes especies. En este sentido, especies de aguas rápidas producen un mayor número de espermatozoides para garantizar la fertilización del mayor número de huevos posibles (Lahnsteiner *et al.*, 1996; Pearse *et al.*, 2009; Berejikian *et al.*, 2013), caso contrario ocurre con especies que habitan aguas someras, como lo es el morro colorado (FishBase, 2019), el cual, al fertilizar los desoves puestos sobre el sustrato no necesita un elevado número de espermatozoides para poder fertilizar de manera exitosa la mayor cantidad de huevos. Esto resulta conveniente a nivel de producción, pues facilita la técnica de fertilización *in vitro*, ya que únicamente se necesitaría la extracción manual del esperma y colocarlo sobre el desove sin necesidad de un flujo constante de agua que mezcle los gametos, pues de manera natural, la fertilización ocurre en aguas tranquilas (Bhujel, 2000; Piamsomboon *et al.*, 2019), a diferencia de la fertilización artificial en peces como la trucha o el salmón, los cuales requieren un flujo constante de agua que ayude a que los gametos puedan fertilizarse con

éxito (Munkittrick & Moccia, 1984; Lahnsteiner *et al.*, 1996; Hugunin *et al.*, 2008) volviendo esta técnica más compleja en estas especies.

Es importante mencionar, que no existen antecedentes previos referentes a la calidad de los gametos en el morro colorado, por lo cual, los datos observados hasta el momento, pueden ser resultado de los factores mencionados anteriormente, o bien, pueden ser las características propias de la especie.

Con respecto a la morfología espermática, se observó un incremento significativo en el tamaño de la cabeza de los espermatozoides analizados en la semana 30 y 40 en comparación con los analizados en la semana 10 y 20. Estas diferencias radican principalmente en el área y perímetro de la cabeza. Este aumento en el tamaño puede ser un indicativo de la madurez progresiva que presentaron las células espermáticas a lo largo del periodo experimental. Ante esto Fauvel *et al.* (2010) mencionan que el tamaño y la forma de las células espermáticas afectan directamente el porcentaje de fertilización, siendo los espermatozoides de mayor tamaño los que tienen una mayor probabilidad de llegar hasta el huevo y fertilizarlo.

Otro aspecto de importancia es la forma de la cabeza espermática, en nuestro trabajo las células espermáticas presentaron una forma redonda, similar a la forma de los espermatozoides de la tilapia del Nilo reportado por López-Hernández *et al.* (2018). Esta característica morfométrica, nuevamente, puede deberse al hábitat característico de estos dos ciclidos y a la conducta de reproducción, en la cual los peces esparcen el esperma sobre el desove, y al no existir corrientes de agua, las células espermáticas no necesitan tener una forma ovalada o fusiforme para poder desplazarse hasta el huevo (Stockley *et al.*, 1997; López-Hernández *et al.*, 2018; Piamsomboon *et al.*, 2019).

Comparando la morfología del espermatozoides observado en el morro colorado con respecto a la de otras especies de importancia comercial, a pesar de que muestran una forma similar a la de los espermatozoides de la tilapia, los valores morfométricos obtenidos para el morro colorado en general son superiores a los reportados por Alcántar-Vázquez *et al.* (2022), quienes caracterizaron la morfología espermática de la tilapia del Nilo en machos XY y machos YY. Es decir, el espermatozoides de *V. fenestrata* presentó un tamaño aproximadamente 3.5 veces mayor al de la tilapia, esto puede ser una característica de la especie que le proporcione una ventaja para lograr la fertilización del huevo en su medio natural y que resultaría beneficioso para el uso de técnicas como la fertilización *in vitro*. Alavi *et al.* (2008) caracterizaron espermatozoides de la familia Cyprinidae, reportando valores morfométricos parecidos a los observados en nuestro trabajo. Si bien la familia Cyprinidae cuenta con un gran número de especies, los principales trabajos se han realizado en especies dulceacuícolas de importancia comercial (Kano, 2000; Daniela *et al.*, 2018), de las cuales, muchas habitan en regiones con características ambientales similares a las del morro colorado, por lo cual, no sería extraño que presentaran valores morfométricos similares. Tuset *et al.* (2008) reportaron valores morfométricos para espermatozoides de trucha arcoíris, mucho mayores a los observados en el morro colorado. El tamaño superior de las células espermáticas puede ser característico de la especie, sin embargo, es importante mencionar la domesticación, así como la selección de líneas genéticas mejoradas que han existido para la producción de la trucha, y por lo cual, los espermatozoides han podido alcanzar tamaños que los vuelven más competentes para fertilizar el huevo.

En el presente estudio se observó que la elipticidad, elongación y rugosidad de las células espermáticas mostraron valores superiores a lo reportado por Alcántar-Vázquez *et al.*

(2022) y Salirrosas *et al.* (2017) en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y tilapia roja (*Oreochromis* spp), respectivamente. Estos valores complementan la morfometría de la cabeza, y al ser constantes indican que se conserva la misma forma de la cabeza aun cuando el promedio de la talla puede cambiar (Salirrosas *et al.*, 2017). De lo contrario, cualquier tipo de anomalía en la forma de la cabeza podría ocasionar un bajo porcentaje de fertilización (López-Hernández *et al.*, 2018). No obstante, la constante repetición de la forma redonda en los datos obtenidos para el morro colorado y la similitud de estos datos con lo reportado para la tilapia de Nilo, permite establecer que esta forma redonda es característica del morro colorado. Esta morfología, como se mencionó anteriormente, probablemente puede conferirle cierta ventaja en relación al hábitat de la especie, con el fin de garantizar una fertilización exitosa. Al no existir estudios previos relacionados a morfometría espermática del morro colorado, los datos obtenidos se pueden tomar como los más cercanos a las características reales de la especie y como base para futuros estudios.

Finalmente, la motilidad es la condición por la cual el espermatozoide puede alcanzar el huevo para lograr exitosamente la fertilización (Tabares *et al.*, 2005) y ha sido considerada como una de las principales variables de calidad espermática en peces (Rurangwa *et al.*, 2004), por lo cual en nuestro trabajo también resultó uno de los parámetros más importantes a determinar.

La evolución de la motilidad a lo largo del experimento no mostró diferencias significativas, es decir, que incluso en muestras inmaduras como las observadas en la semana 10 y 20 el porcentaje de células motiles progresivas se mantuvo en un porcentaje superior al 85%. López-Hernández *et al.* (2018) establecen que el porcentaje de motilidad espermática en peces debe ser superior al 80% para ser consideradas viables, pues porcentajes inferiores

al 70% resultan ineficientes para la aplicación de tecnologías tales como la fertilización *in vitro* y la criopreservación, además, de que no garantizan una producción adecuada de crías para el cultivo acuícola. En nuestro trabajo el porcentaje de células motiles progresivas alcanzaron un porcentaje de hasta el 88.5% en muestras maduras, de tal manera que aún con la poca domesticación de la especie esta presenta una motilidad espermática adecuada para la implementación de tecnologías que permitirán, en teoría, mejorar su producción en cautiverio.

Al igual que para otros parámetros, la aplicación de aditivo como suplemento alimenticio, no incrementó de manera significativa la motilidad total de los espermatozoides. Esto contrasta con lo reportado por Abbass *et al.* (2012), ellos probaron polen de abeja como suplemento alimenticio en tilapia del Nilo, observado un incremento de más del 25% en la motilidad espermática con respecto al tratamiento control. Mehdinejad *et al.* (2018) implementaron la bacteria *Pediococcus acidilactici* y nucleótidos como probióticos y analizaron el desempeño reproductivo en las carpas doradas (*Carassius auratus*), observaron un incremento de más del 2% en la motilidad espermática, concluyendo que los probióticos dietéticos combinados con nucleótidos tienen un papel positivo en la calidad de los espermatozoides. De este modo, será importante administrar nuevas concentraciones, así como probar otra clase de aditivos en el morro colorado, pues la motilidad espermática podría mejorar gracias a estos suplementos alimenticios, que junto con la domesticación de la especie podría mejorar aún más el porcentaje de motilidad observado y superar el 90%.

En base a los valores de desplazamiento, de manera general los espermatozoides de del morro colorado presentaron una velocidad alta tanto en eyaculados colectados de manera natural como en eyaculados obtenidos después de la alimentación con aditivo comercial. Los

valores de desplazamiento observados en el morro colorado son superiores a lo reportado por Alcántar-Vázquez *et al.* (2022) en machos XY y YY de la tilapia del Nilo, lo cual resulta beneficioso para la producción de esta especie, así como para la obtención de larvas a lo largo del año. Como se mencionó previamente, la motilidad es uno de los parámetros más importantes para la reproducción de peces en estanques, en el caso de la tilapia del Nilo al ser una de las especies con mayor producción a nivel mundial y el morro colorado presentar una motilidad y velocidad superior al de la tilapia del Nilo, es garantía de una gran viabilidad de la especie para la producción en masa, para la aplicación de técnicas de producción, así como para la obtención de larvas a lo largo del año.

10. CONCLUSIONES

1. La calidad espermática de *V. fenestrata* presenta de manera general características muy similares a la tilapia del Nilo a pesar de la nula domesticación que se tiene de la especie hasta la fecha, cumpliendo los parámetros de una especie viable para su cultivo.
2. La calidad de los espermatozoides del morro colorado es adecuada para la producción de la especie en cautiverio, pues parámetros tales como la motilidad y concentración mejoran de manera significativa después de un periodo de aclimatación, alcanzando niveles viables dentro del sector acuícola.
3. El uso de aditivos a través del alimento mejoró parámetros como la concentración y morfología.

11. RECOMENDACIONES

1. El presente estudio puede ser la base para futuras investigaciones y mejoras para la especie, en este sentido, es importante complementar la información obtenida, realizar análisis de calidad de huevos, larvas y diferentes condiciones de los estanques que permitan una reproducción viable de la especie.
2. Implementar aditivos comerciales con los cuales se hayan presentado mejoras en la calidad espermática para otras especies de importancia acuícola.
3. Seleccionar líneas genéticas de la especie que presenten una mayor adaptación a las condiciones de producción.

Literatura citada

- Abascal, F. J., Cosson, J., & Fauvel, C. (2007). Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology*, 70(2), 509-522.
- Abbass, A. & El Asely, A., & Moahmed, K. (2012). Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 851-859.
- Aboelward, A., Eid, A., KA, M., Tonsy, H. D., & Ayyat, A. N. (2020). Effect of Digestrom® on growth performance and feed utilization of red tilapia (*O. niloticus* × *O. mossambicus*). *Egyptian Journal for Aquaculture*, 10(1), 65-83.
- Agüero, G. (2012). *Evaluación de las características semifinales de sementales bovinos mediante el analizador seminal computarizado (CASA)*. Universidad central de Venezuela. 71 p.
- Alavi, S. M. H., & Cosson, J. (2005). Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, 29(2), 101-110.
- Alavi, S. M. H., Psenicka, M., Rodina, M., Policar, T., & Linhart, O. (2008). Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquatic Living Resources*, 21(1), 75-80.
- Alcántar-Vázquez, J. P., Fernández-Santos, J., & Meza-Villalvazo, V. M. (2022). Sperm kinetics and motility subpopulation in XY and YY Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) males. *Aquaculture Research*, 53(3), 932-939.

- Alemayehu, T. A., Geremew, A., & Getahun, A. (2018). The role of functional feed additives in tilapia nutrition. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 9(2), 1g-1g.
- Almeida, D. B., da Costa, M. A. P., Bassini, L. N., Irene, C., Calabuig, P., Moreira, C. G. Á., & Moreira, M. (2016). Sperm evaluation in strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Advances in Agriculture*, 6(2).
- Arias-Rodríguez, L. (2001) *Inactivación genética de espermatozoides e inducción de ginogénesis y de triploidía en el botete diana Sphoeroides annulatus (Jenyns, 1842)* (Doctoral dissertation, Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México).
- Avilés-Quevedo, S., & Vázquez-Hurtado, M. (2006). Fortalezas y debilidades de la acuicultura en México. *EN MÉXICO*, 69.
- Barandica, C. L. M., & Tort, L. (2008). Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 32(123), 267-284.
- Bhujel, R. C. (2000). A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture*, 181(1-2), 37-59.
- Beirão, J., Boulais, M., Gallego, V., O'Brien, J. K., Peixoto, S., Robeck, T. R., & Cabrita, E. (2019). Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology* 133, 161-178

- Berejikian, B. A., Campbell, L. A., & Moore, M. E. (2013). Large-scale freshwater habitat features influence the degree of anadromy in eight Hood Canal *Oncorhynchus mykiss* populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(5), 756-765.
- Bobe, J., & Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 535-548.
- Brogliatti, M. (2008). Inseminación artificial a tiempo fijo: el porqué de los intentos fallidos. *Centro de Inseminación Artificial La Argentina Chica*, 10, 22-25.
- Bozkurt, Y., Seçer, S., Tekin, N., & Akçay, E. (2005). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) sperm with glucose based extender. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1(1), 21-25.
- Bustamante-González, J. D., Cortés-García, A., & Rodríguez-Gutiérrez, M. (2018). Growth and sperm quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei: Salmonidae) during the reproductive season. *Hidrobiológica*, 28(2), 163-170.
- Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P. J., Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Sarasquete, C., & Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432, 389-401.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., & Herráez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 623-635.

- Casallas, P. E. C., Santamaría, Y. M. V., & Robles, M. M. (2006). Manejo hormonal de la función reproductiva de peces tropicales bajo. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuicola*, 2(2).
- Casallas, P. C., Robles, V. M., & Santamaría, Y. V. (2006). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 152-159.
- Cejko, B., Judycka, S., Juchno, D., Boroń, A., Leska, A., Jablonska, O., Anna P. & Kowalski, R. (2017). Hormonal treatment affects sperm motility in the spined loach (*Cobitis taenia*, Pisces, Cobitidae). *Aquaculture Research*, 48, 5139-5145.
- Cejko, B. I., Krejszeff, S., Judycka, S., Sarosiek, B., Dietrich, M., Kucharczyk, D., & Kowalski, R. K. (2014). Sperm quality and selected biochemical markers of seminal plasma at the beginning of the reproductive period of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture International*, 22(1), 111-122.
- Ceulemans, S., Coutteau, P., & Robles, R. (2009). Innovative feed additives improve feed utilization in Nile tilapia. *Agricultural Science and Technology Information*, 12(6), 63-67.
- Chowdhury, I., & Joy, K.P., (2007). Seminal vesicle and its role in the reproduction of teleosts. *Fish Physiology Biochemistry*. 33, 383-398
- Ciereszko, A., Dietrich, M. A., & Nynca, J. (2017). Fish semen proteomics—New opportunities in fish reproductive research. *Aquaculture*, 472, 81-92.
- Cruz-Casallas, P. E., Medina-Robles, V. M., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2007). Seasonal variation of sperm quality and the relationship between spermatocrit and sperm

- concentration in yamú *Brycon amazonicus*. *North American Journal of Aquaculture*, 69(2), 159-165.
- Daniela, R., Mihail, C., Mioara, C., Nino, M., & Nicoleta, D. (2018). Research on reproductive performance of carp breeds (*Cyprinus carpio* L.) frasinet, ineu and ropsa. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 18(6.2), 513-520.
- de Castro, P. L., & Patil, J. G. (2019). Comparative gonad histology and semen quality of normal (XY) and neo-males (XX) of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Research*, 50(11), 3171-3180.
- del Gallego, R., Sadeghi, S., Blasco, E., Soler, C., Yániz, J. L., & Silvestre, M. A. (2017). Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm. *Animal Reproduction Science*, 177, 97-104.
- Dumorne, K., Figueroa, E., Cosson, J., Lee-Estevez, M., Ulloa-Rodríguez, P., Valdebenito, I., & Farias, J. G. (2018). Protein phosphorylation and ions effects on salmonid sperm motility activation. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 727-737.
- Dziewulska, K., Rzemieniecki, A., & Domagała, J. (2011). Sperm motility characteristics of wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) as a basis for milt selection. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(4), 1047-1051.
- Dziewulska, K., Rzemieniecki, A., Baranowska-Bosiacka, I., Domagała, J., & Chlubek, D. (2012). The parameters of energetic status of the wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) spermatozoa. *Aquaculture Research*, 43(1), 139-148.

- Dzyuba, B., Bondarenko, O., Fedorov, P., Gazo, I., Prokopchuk, G., & Cosson, J. (2017). Energetics of fish spermatozoa: the proven and the possible. *Aquaculture*, 472, 60-72.
- Dzyuba, V., & Cosson, J. (2014). Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. *Reproductive Biology*, 14(3), 165-175.
- Enzeline, V., Nasrullah, H., Sudrajat, A. O., Zairin Jr, M., Alimuddin, A., & Widanarni, W. (2022). Spermatogenesis and sperm quality of male African catfish fed with *Bacillus* sp. NP5 probiotic supplemented diet. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 15(1), 339-349.
- FAO. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 250 pp.
- FAO. 2020. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma. 243 pp.
- Fauvel, C., Suquet, M., & Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 636-643.
- Fernández-Santos, J. (2019). *Evaluación de la calidad espermática en machos YY de tilapia del Nilo (Oreochromis niloticus)*. (Tesis de Maestría). Universidad del Papaloapan.
- FishBase. (2019). *Vieja fenestrata (Günther, 1860)*. *Fish Base: The SPECIES Table*. En: <https://www.fishbase.se/Summary/SpeciesSummary.php?id=26784&lang=spanish> en diciembre de 2020.

- Flores-Nava, A., & Brown, A. (2010). *Peces nativos de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo*. FAO. Serie Acuicultura en Latinoamérica, ISBN 978-92-5-306658-2
- García, M. D. J. C., Sánchez, W. M. C., Vidal, U. H., Rodríguez, L. A., Vera, A. M., López, J. M. V., & Patiño, R. (2011). Evaluación de la calidad espermática del robalo chucumite (*Centropomus parallelus*) usando implantes de GnRH-a bajo condiciones de laboratorio. *Horizonte Sanitario*, 17(32).
- Gardes, L., Villanove, P., Buchet, V., & Fauvel, C., (2000). Induced spawning of red drum, *Sciaenops ocellatus*: use of multivariate and univariate analysis methods in the search for side effects of LH-RHa treatments and ovarian development state upon spawn quality. *Aquatic Living Resources*, 13, 19-27
- Gasparini, C., & Evans, J. P. (2013). Ovarian fluid mediates the temporal decline in sperm viability in a fish with sperm storage. *PLoS One*, 8(5), e64431.
- Gennotte, V., François, E., Rougeot, C., Ponthier, J., Deleuze, S., & Mélard, C. (2012). Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Theriogenology*, 78(1), 210-217.
- Gimeno Miquel, I. M. (2015). *Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Guerrero Quiroz, L. A., Roa Vidal, J., Moreno Martínez, J. M., Taylor Preciado, J., León Sánchez, R., & Avalos García, O. (2008). Evaluación de la calidad del semen de

- tilapia en reproductores (*Oreochromis* spp). *Avances en la investigación científica en CUCBA*, 537-542.
- Hecker, M., Murphy, M. B., Coady, K. K., Villeneuve, D. L., Jones, P. D., Carr, J. A., & Giesy, J. P. (2006). Terminology of gonadal anomalies in fish and amphibians resulting from chemical exposures. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 103-131.
- Herráez, M. P., Ausió, J., Devaux, A., González-Rojo, S., Fernández-Díez, C., Bony, S., & Robles, V. (2017). Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish. *Aquaculture*, 472, 45-59.
- Hugunin, H. A., Parsons, J. E., & Nagler, J. J. (2008). The influence of coelomic fluid on in vitro fertilization success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 281(1-4), 155-157.
- INES (Instituto Nacional de Economía Social). 2018. *Acuicultura, historia y actualidad en México*. Gobierno de México. En: <https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/acuicultura-historia-y-actualidad-en-mexico?idiom=es#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20acu%C3%ADcola%20en%20M%C3%A9xico,los%20cuales%20el%2070%25%20de> en diciembre de 2020.
- Islam, M. S., & Akhter, T. (2011). Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. *Advances in Life Sciences*, 1(1), 11-19.
- Jin, Y. H., Davie, A., & Migaud, H. (2019). Temperature-induced testicular germ cell loss and recovery in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *General and Comparative Endocrinology*, 283, 113227.

- Kanoh, Y. (2000). Reproductive success associated with territoriality, sneaking, and grouping in male rose bitterlings, *Rhodeus ocellatus* (Pisces: Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes*, 57(2), 143-154.
- Kime, D. E., Van Look, K. J. W., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., & Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 425-433.
- Kovacik, A., Tirpak, F., Tomka, M., Miskeje, M., Tvrda, E., Arvay, J., & Massanyi, P. (2018). Trace elements content in semen and their interactions with sperm quality and RedOx status in freshwater fish *Cyprinus carpio*: A correlation study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 399-407.
- Kowalski, R. K., & Cejko, B. I. (2019). Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135, 94-108.
- Kullander, S.O., 2003. Family Cichlidae (Cichlids). In: Reis, R.E., Kullander, S.O., & Ferraris, C.J., Jr. (Eds.), *Checklist of the Freshwater Fishes of Central and South America*. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 605–654.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., & Weismann, T. (1996). Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research*, 27(9), 659-671.
- Linhart, O., Rodina, M., & Cosson, J. (2000). Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*, 41(3), 241-250.

- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S. D., Shelton, W. L., & Rodina, M. (2002). Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *Reproduction-Cambridge*, 124(5), 713-719.
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S. D., Rodina, M., Gela, D., & Shelton, W. L. (2003). Effects of ions on the motility of fresh and demembrated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) and paddlefish (*Polyodon spathula*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 203-205.
- Lo Nostro, F. L. (2000). *Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, Synbranchus marmoratus Bloch, 1795 (Teleostei, synbranchidae)* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Loir, M., & Billard, R. (1990). Hormonal control of gamete production in male teleost fish. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia*, 25, 43-52.
- López-Hernández, J. C., Osorio-Pérez, A., Jiménez-Félix, S. A., Páramo-Delgadillo, S., Márquez-Couturier, G., Yasui, G. S., & Arias-Rodríguez, L. (2018). Artículo de Revisión: La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Journal of Marine and Coastal Sciences*, 67-96.
- Martínez-Palacios, C. A., & Ross, L. G. (1994). Biología y cultivo de la mojarra latinoamericana *Cichlasoma urophthalmus*. México. *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*. p. 191-203 (No. 639.375 M3).
- Martínez, J. G., & Carrasco, S. P. (2010). Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 3-23.

- McCrary, J. K., Van Den Berghe, E. P., McKaye, K. R., & Pérez, L. L. (2001). El cultivo de tilapias: una amenaza a las especies ícticas nativas en Nicaragua. *Encuentro*, (58), 9-19.
- McMahan, C. D., Matamoros, W. A., Piller, K. R., & Chakrabarty, P. (2015). Taxonomy and systematics of the herichthyins (Cichlidae: Tribe Heroini), with the description of eight new Middle American Genera. *Zootaxa*, 3999(2), 211-234.
- Mehdinejad, N., Imanpour, M.R., & Jafari, V. (2018). Combined or individual effects of dietary probiotic, *Pediococcus acidilactici* and nucleotide on reproductive performance in goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-8,
- Menkveld, R., & Kruger, T. E. (1996). Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. *Basic Semen Analysis*, 53-72.
- Munkittrick, K. R., & Moccia, R. D. (1984). Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production-scale artificial fertilization program. *Theriogenology*, 21(4), 645-659.
- Murakami, A. E., Rodrigueiro, R. J. B., Santos, T. C., Ospina-Rojas, I. C., & Rademacher, M. (2014). Effects of dietary supplementation of meat-type quail breeders with guanidinoacetic acid on their reproductive parameters and progeny performance. *Poultry Science*, 93(9), 2237-2244.
- Musa, N. (2010). *Sperm activation in Nile tilapia Oreochromis niloticus and the effects of environmentally relevant pollutants on sperm fitness*. (Doctoral dissertation, institute of aquaculture. University of Stirling. 130 p.).

- Mylonas, C., & Fostier, A., & Zanuy, S. (2009). Broodstock management and hormonal manipulation of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 516-34.
- Nakamura, M., Nozu, R., Ijiri, S., Kobayashi, T., Hirai, T., Yamaguchi, Y., & Grau, G. E. (2015). Sexual characteristics of high-temperature sterilized male Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoological Letters*, 1(1), 1-7.
- Öğretmen, F., İnanan, B. E., Kutluyer, F., & Kayim, M. (2015). Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*, 83(9), 1548-1552.
- Osure, G. O., & Phelps, R. P. (2006). Evaluation of reproductive performance and early growth of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) with different histories of domestication. *Aquaculture*, 253(1-4), 485-494.
- Pardo Carrasco, S. C., Zaniboni Filho, E., Arias, J. A., Suárez Mahecha, H., Atencio García, V. J., & Cruz Casallas, P. (2016). Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 134–139.
- Pearse, D. E., Hayes, S. A., Bond, M. H., Hanson, C. V., Anderson, E. C., Macfarlane, R. B., & Garza, J. C. (2009). Over the falls? Rapid evolution of ecotypic differentiation in steelhead/rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Heredity*, 100(5), 515-525.

- Pérez Albelo, I. (2021). *Uso de diferentes tipos de gonadotropinas (purificadas vs recombinantes) para inducir la maduración sexual en machos de anguila europea* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Piamsomboon, P., Mehl, N. S., Sirivaidyapong, S., & Wongtavatchai, J. (2019). Assisted reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Milt preservation, spawning induction and artificial fertilization. *Aquaculture*, 507, 139-143.
- PNUD México (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo). 2017. *Manual de buenas prácticas para la producción de tenguayaca (Petenia splendida) con el método de Acuaponía*. Plan de reconversión productiva de Tilapia de Mozambique por Tenguayaca en la población de Andrés Quintana Roo, comunidad limítrofe a la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an. Proyecto GEF 00089333 "Aumentar las Capacidades Nacionales para el Manejo de las Especies Exóticas Invasoras (EEI) a través de la Implementación de la Estrategia Nacional de EEI". Bayona-Miramontes, A. E., Cruz-Santander, I., Briceño-Domínguez, D. R. ECONCIENCIA A.C. Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo, México. 58 pp.
- Rudolfson, G., Figenschou, L., Folstad, I., & Kleven, O. (2008). Sperm velocity influence paternity in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 39(2), 212-216.
- Rurangwa, E., Biegniewska, A., Slominska, E., Skorkowski, E. F., & Ollevier, F. (2002). Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa

- motility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 131(3), 335-344.
- 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(1-4), 1-28.
- Salirrosas-Fernández, R. D. 2015. *Evaluación de la calidad espermática en reproductores de Oreochromis niloticus, Tilapia Roja, YY y XY*. (Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas. 37 pp.).
- Salirrosas, D., Leon, J., Arqueros-Avalos, M., Sanchez-Tuesta, L., Rabanal, F., & Prieto, Z. (2017). YY super males have better spermatic quality than XY males in red tilapia *Oreochromis niloticus*. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 349-355.
- Satterfield Jr, J. R., & Flickinger, S. A. (1995). Factors influencing storage potential of preserved walleye semen. *The Progressive Fish-Culturist*, 57(3), 175-181.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 390-411.
- Schulz, R.W., & Miura, T. (2002) Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 43-5.
- Sierra-De la Rosa, J. F. (2007). Técnicas para el control de maduración de especies ícticas nativas. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuicola*, 3(3).

- Singh, T., Pandey, A., Khairnar, S., & Tyagi, A. (2022). Efficacy of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) supplementation in the diet on growth and nutritional composition of *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 10
- Smitherman, R. O., Khater, A. A., Cassell, N. I., & Dunham, R. A. (1988). Reproductive performance of three strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 70(1-2), 29-37.
- Stockley, P., Gage, M. J. G., Parker, G. A., & Møller, A. P. (1997). Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *The American Naturalist*, 149(5), 933-954.
- Sumon, M. A. A., Molla, M. H. R., Hakeem, I. J., Ahammad, F., Amran, R. H., Jamal, M. T., & Hasan, M. (2022). Epigenetics and Probiotics Application toward the Modulation of Fish Reproductive Performance. *Fishes*, 7(4), 189.
- Tabares, C. J., Tarazona, A. M., & Ángel, M. O. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarías*, 18(2), 149-161.
- Terán, P., Rosales, M., Dumas, S., Cortés, H. P., & Alcántar, J. P. (2004). Características reproductivas del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) en cautiverio. *Panorama Acuícola Magazine*, 3(20), 3-29.
- Triastuti, J., Kintani, D., Luqman, E. M., & Pujiastuti, D. Y. (2018). The motility and motion duration of jatimbulan tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatozoa in different salinity. En *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 137, No. 1, p. 012023). IOP Publishing.

- Tuset, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Słowińska, M., De Monserrat, J., & Ciereszko, A. (2008). Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 69(8), 1033-1038.
- Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J. & Power, J. (2001). The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hipoglossus*. *Aquaculture*, 194, 191-200.
- Valcarce, D. G., Pardo, M. Á., Riesco, M. F., Cruz, Z., & Robles, V. (2015). Effect of diet supplementation with a commercial probiotic containing *Pediococcus acidilactici* (Lindner, 1887) on the expression of five quality markers in zebrafish (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) testis. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 18-21.
- Valdebenito, I. (2008). Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40(2), 115-123.
- Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V., & Fernández, J. (2009). Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos de medicina veterinaria*, 41(2), 97-106.
- Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., & Zambrana-Jiménez, A. (2018). Evaluación de la cinética y movilidad espermática de verracos en condiciones tropicales [Assessment of boar sperm kinetics and motility in tropical conditions]. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 12, 125-132.

- Vásquez, F., & Echeverri, D. V. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Salud Uninorte*, 23(2), 220-230.
- Viveiros, A. T. D. M., & Godinho, H. P. (2009). Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 137-150.
- Vladić, T., & Jätvi, T. (1997). Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout-the effect of water temperature. *Journal of Fish Biology*, 50(5), 1088-1093.
- Woolsey, J., Holcomb, M., Cloud, J. G., & Ingermann, R. L. (2006). Sperm motility in the steelhead *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): influence of the composition of the incubation and activation media. *Aquaculture Research*, 37(3), 215-223.
- Zohar, Y., & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. In: *Reproductive biotechnology in Finfish aquaculture* (pp. 99-136). Elsevier.