

Fisiología y criopreservación del espermatozoide en teleósteos

Jesús Dámaso Bustamante-González^{1*}, Martha Rodríguez-Gutiérrez², Araceli Cortés-García², Edith Arenas-Ríos³, Gerardo Figueroa-Lucero⁴ y Alejandro Ávalos-Rodríguez⁵

¹Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X). Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, CDMX, 04906, México.

²Laboratorio de Reproducción Genética y Sanidad Acuícola. Depto. El Hombre y su Ambiente (UAM-X).

³Laboratorio de Bioquímica del Espermatozoide. Depto. de Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa (UAM-I), Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, CDMX, 09340. México.

⁴Planta Experimental de Producción Acuícola. Depto. de Hidrobiología (UAM-I).

⁵Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción. Depto. De Producción Agrícola y Animal (UAM-X).

*email: jesusbustamantegonzalez@gmail.com

Resumen

El espermatozoide de teleósteos, al igual que ocurre en todos los organismos que se reproducen sexualmente, tiene la función de transportar el material genético al ovocito. En el caso de los teleósteos que tienen fecundación interna y externa, el espermatozoide revela alta diversidad fisiológica y morfológica que varía de acuerdo a las especies, por lo tanto, estas características se deben tomar en cuenta para la criopreservación. El objetivo de la presente revisión es dar a conocer la fisiología del espermatozoide y a partir de ella, revisar los principales daños que se producen tras el proceso de criopreservación.

Palabras clave: morfología, integridad de la membrana, daño mitocondrial, movilidad, daño ADN.

Summary

Physiology and cryopreservation of spermatozoa in teleosts

Sperm in fish, as in all organisms that reproduce sexually, has the same function, which is to transport the genetic material to the oocyte and restore diploidy. In the case of teleosts that have internal and external fertilization, the sperm reveals a high physiological and morphological diversity that varies according to the species; therefore, these characteristics must be taken into account for cryopreservation. Thus, the objective of this review is to make known the physiology of the spermatozoa and implement protocols that optimize cryopreservation.

Keywords: morphology, membrane integrity, mitochondrial damage, mobility, DNA damage.

Introducción

Los espermatozoides de los teleósteos difieren de otros vertebrados en características como forma de la cabeza, longitud, posición del flagelo, número de mitocondrias y ausencia generalizada del acrosoma (Lahnsteiner y Patzner, 2008). Una característica de los espermatozoides con fecundación externa es que son inmóviles aún después de la espermiación y su activación metabólica depende del medio acuático, determinada por la concentración de iones característicos de cada especie en conjunto con la osmolaridad, a través de una gama de mecanismos, modulada por la membrana, aumento de pH intracelular y alteración del gradiente intracelular que permite, iniciar la movilidad para fecundar al óvulo (Browne *et al.*, 2015; Lahnsteiner y Patzner, 2008).

Por tanto, el conocimiento de la fisiología del espermatozoide es esencial para la conservación del germoplasma a través de la criobiología, herramienta biotecnológica que permite el mantenimiento de gametos a largo plazo con numerosas aplicaciones como: i) selección genética, ii) conservación de especies silvestres y amenazadas, iii) sincronización y disponibilidad de gametos aún fuera de la etapa reproductiva, iv)

reducción del número de reproductores en especies cultivadas y v) disminución en la transmisión enfermedades de tipo parasitario (Dietrich *et al.*, 2014; Öğretmen *et al.*, 2016).

La criopreservación de espermatozoides ha sido estudiada en más de 200 especies de peces y crustáceos obteniendo resultados favorables pero variables (Ciereszko *et al.*, 2013; Dietrich *et al.*, 2014; Nahiduzzaman *et al.*, 2012), por lo que, cada protocolo es específico para la especie de interés y en algunos casos se alcanzan tasas de fertilización cercanas a las de semen fresco (Medina *et al.*, 2005).

Por lo anterior, debido a que la criopreservación de espermatozoides involucra procesos intracelulares que afectan la supervivencia y la capacidad fecundante, el objetivo de la presente revisión es dar a conocer la fisiología del espermatozoide de teleósteos y proponer la aplicación de protocolos para su criopreservación.

Espermatozoide de teleósteos

El espermatozoide tiene la función de transportar el material genético al ovocito para lo cual está equipado con estructuras como: cabeza, pieza media y flagelo, la cabeza, contiene el núcleo y por lo tanto el ADN paterno, en la pieza media se inserta el flagelo que varía en longitud (Eddy, 2006).

Una característica distintiva en los teleósteos son las mitocondrias que varían en número, por lo regular se ubican en la pieza media, aunque en algunos peces se pueden localizar cerca del núcleo. No obstante, e independientemente de su posición, su función es suministrar la energía necesaria para el movimiento flagelar. Todas estas características han permitido estudiar y comparar la ultraestructura en múltiples teleósteos (Lahnsteiner y Patzner, 2008).

Espermatogénesis

La célula germinal masculina se produce en la gónada, testículos, que en los teleósteos son estructuras saculares pareadas en posición ventral a la vejiga natatoria, por su estructura histológica se reconocen dos tipos: lobulares y tubulares (Rodríguez, 1992).

La espermatogénesis es el proceso en el cual las espermatogonias crecen, se dividen por meiosis, y se diferencian en espermatozoides (Billard *et al.*, 1982). La duración en los teleósteos se ve influenciada por la temperatura del agua y es corta en contraste con los mamíferos (Nóbrega *et al.*, 2009).

De acuerdo con Carrillo *et al.* (2009) y Grier y Uribe (2009), la espermatogénesis se puede dividir en dos etapas:

- Etapa 1: *Proliferación*. Consiste en la proliferación mitótica de las espermatogonias que dan origen a los espermatocitos primarios, éstos entran en meiosis I dando lugar a dos células llamadas espermatocitos secundarios, que ya son haploides y al dividirse, en la meiosis II, generarán cuatro espermátidas también haploides, que suelen ser de morfología variable.
- Etapa 2: *Maduración o espermiogénesis*. En esta etapa las espermátidas se diferencian en espermatozoides, pierden citoplasma, conservan mitocondrias y núcleo y a partir del centriolo desarrollan el flagelo.

Una vez maduros, los espermatozoides son liberados del testículo y se acumulan en el conducto eferente, listos para ser expulsados al medio exterior y fertilizar a los gametos femeninos.

En el testículo también se encuentran células somáticas denominadas:

- *Células de Sertoli*: Ubicadas dentro de los túbulos seminíferos, conocidas también como células nodrizas, debido a que se encargan de dar soporte estructural y nutritivo, sintetizan proteínas como las fijadoras de andrógenos (ABP: por sus siglas en inglés, *Androgen Binding Protein*) necesarias para transportar esteroides a través del torrente sanguíneo hacia las células blanco, además de otras proteínas como la inhibina y activina. Las células de Sertoli también actúan como barrera para impedir el contacto entre las células germinales y el sistema vascular, así como de fagocitar residuos de espermatozoides (Grier y Uribe, 2009; Rodríguez, 1992; Tabares *et al.*, 2005).
- *Células de Leydig*: ubicadas en la periferia de los túbulos, su función principal es la síntesis de testosterona, así como producir otros esteroides necesarios para la espermatogénesis y la expresión de caracteres sexuales secundarios (Grier y Uribe, 2009; Rodríguez, 1992; Tabares *et al.*, 2005).

Morfología del espermatozoide

La estructura del espermatozoide en teleósteos revela alta diversidad morfológica, la cual se refleja en la forma y dimensión de la cabeza; número, forma y localización de las mitocondrias; la forma y tamaño de la fosa nuclear y del núcleo; el arreglo de los centriolos para formar la pieza media y número de flagelos (Figura 1) (Lahnsteiner y Patzner, 2008).

Los espermatozoides de algunas especies presentan cabeza esférica, ovoide o alargada, la forma del núcleo es variable y ésta relacionada con la complejidad de la espermatogénesis y espermiogénesis (Billard, 1986; Billard, 1990a; Grier, 1981; Lahnsteiner y Patzner, 2008; Rodríguez, 1992).

La pieza media está formada por un flagelo rodeado por una vaina mitocondrial; el número de mitocondrias presentes es dependiente de la especie y del hábitat reproductivo (Coward *et al.*, 2002). El flagelo consta de un cilindro delgado y largo que sobresale de la cabeza, con un rango de 25-100 μm de longitud y 0,4-1 μm de diámetro, el cual contiene: el axonema, principal organelo activo responsable del movimiento del espermatozoide (Ulloa-Rodríguez *et al.*, 2017) y en algunos peces como los de la familia Apogonidae esta reportada la presencia de dos flagelos (Lahnsteiner y Patzner, 2008).

Los flagelos se forman por el axonema compuesto por 9 microtúbulos dobles en la periferia y dos microtúbulos centrales, formando la estructura clásica 9+2 pares de microfibrillas y una membrana plasmática que confiere al espermatozoide la capacidad dinámica para regular diferentes actividades celulares y rutas de señalización que pueden conducir a la activación de la movilidad (Tabares *et al.*, 2005; Warner y Satir, 1974), además de formar una especie de aleta en el plano horizontal confiriéndole una forma acintada (Cosson *et al.*, 1999). Tabares *et al.* (2005) reportaron que es posible que esta estructura se haya formado evolutivamente para favorecer el movimiento del espermatozoide bajo ciertas condiciones acuosas.

En los teleósteos la espermiogénesis de acuerdo con Wootton y Smith (2014), se clasifica en tres tipos, atendiendo la posición del flagelo con relación al núcleo.

- Tipo I: Los centriolos migran aproximándose al núcleo, arrastrando tras de sí al flagelo y a la membrana celular, formándose el canal citoplasmático. En la superficie nuclear se forma una hendidura y el núcleo gira 90° con respecto al axonema del flagelo; los centriolos se dirigen adentro de la fosa, alojándose total o parcialmente, teniendo como resultado que el eje del flagelo sea perpendicular al núcleo.
- Tipo II: No hay rotación nuclear, el diplosoma migra en la dirección del núcleo, pero no entra en la fosa, y el flagelo se ubica asimétricamente.

- Tipo III: El flagelo es central, no hay rotación nuclear, tampoco hay formación de la fosa nuclear ni del canal citoplasmático (Madhavi *et al.*, 2015; Quagio y Olivera, 2008).

Por otra parte, la cabeza, se diferencia de otros vertebrados por la carencia de acrosoma, adaptación funcional por la presencia del micrópilo en el ovocito (Bustamante *et al.*, 2016), orificio que permite la entrada del espermatozoide al óvulo y producir la singamia (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010). No obstante, hay reportes de presencia de acrosoma en Sarcopterigios, que corresponden a los peces con aletas lobuladas de las subclases: Actinistia, Cladistia y Dipnoi o peces pulmonados, y dentro de los Actinopterygios están los Chondrostei, peces con esqueleto principalmente cartilaginoso y escamas de tipo ganoide, como el peje lagarto (Lahnsteiner y Patzner, 2008).

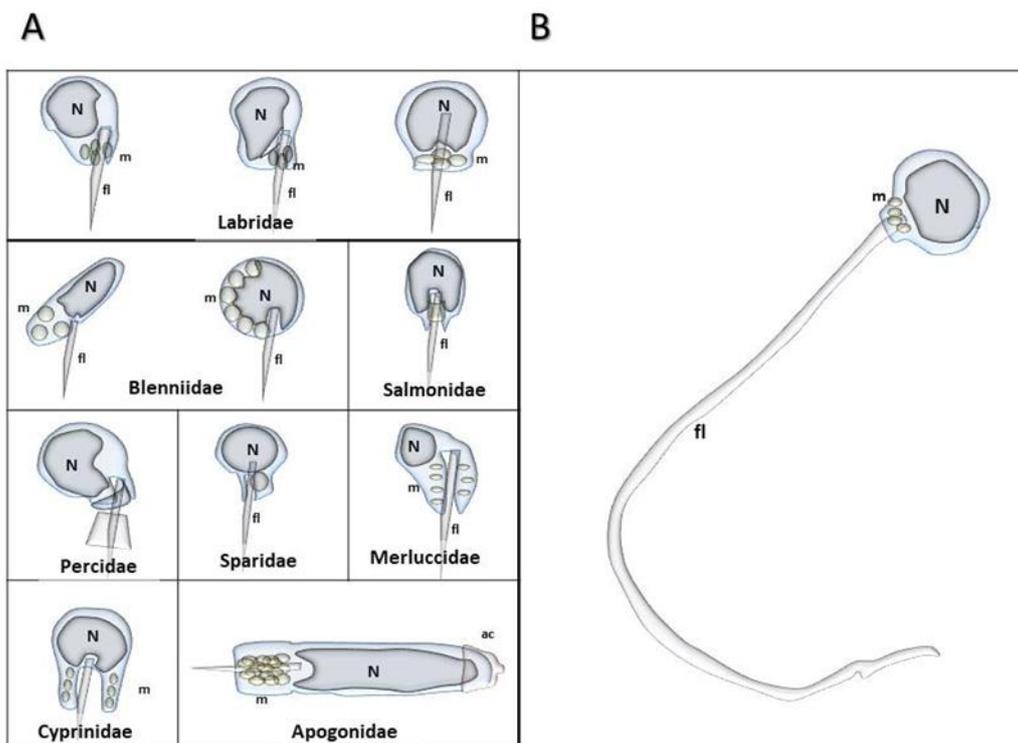


Figura 1. Representación esquemática de la ultraestructura de algunos espermatozoides de teleósteos. Los esquemas del inciso A se basaron de Ulloa-Rodríguez *et al.* (2017); el inciso B se basó en las imágenes presentadas en Ohta *et al.* (1993). Donde N=núcleo (ubicado en la cabeza del espermatozoide); m=mitocondria (ubicadas en la pieza media) y fl= flagelo.

De acuerdo al tipo de fertilización, interna o externa, los espermatozoides de los teleósteos pueden dividirse en dos grupos: introespermatozoides y aquaespermatozoides (Jamieson, 1991; Tabares *et al.*, 2005). En familias con desarrollo vivíparo y fertilización interna, por ejemplo, Cottidae, Embiotocidae o Poecilidae, el espermatozoide es del tipo introespermatozoides; que en general poseen un núcleo alargado y una pieza media relativamente grande con numerosas mitocondrias; la cabeza mide alrededor de 10 μm , la pieza media 5 μm y el flagelo entre 30 a 40 μm . Aunque, algunas especies con fecundación interna como en la familia Goodeidae (*Sebastes marmoratus*; Cuvier, 1829) presentan espermatozoides con morfología similar a los de fertilización externa (Lahnsteiner y Patzner, 2008).

Los espermatozoides de fecundación externa, los aquaespermatozoides, tienen una organización más simple. En su mayoría presentan cabeza ovoide o esférica que mide 5

μm en su extensión máxima, la pieza intermedia es pequeña y mide 2-4 μm de longitud y contiene pocas mitocondrias, entre 1-6 y flagelo entre 30 a 40 μm (Lahnsteiner y Patzner, 2008).

Capacitación espermática

Los espermatozoides de mamíferos maduran y adquieren movilidad durante el paso a través del epidídimo. Métodos similares de maduración y adquisición de la movilidad espermática se han reportado en algunos peces (Inaba, 2008).

En general, los espermatozoides en los peces, obtienen la capacidad fecundante durante la migración espermática a lo largo del conducto eferente, que se acompaña con la producción de plasma seminal con pH básico y rico en bicarbonato (HCO_3^-) que hidrata al espermatozoide (Mochida *et al.*, 1999; Schulz y Miura, 2002).

La hidratación y migración de los espermatozoides también están reguladas por el sistema endocrino y aunque los espermatozoides en el testículo han completado la espermiogénesis, en algunas especies todavía son incapaces de fertilizar al óvulo (Schulz y Miura, 2002).

Los espermatozoides de peces con fecundación externa se encuentran inmóviles en el testículo y en el conducto espermático y solo al tener contacto con un medio acuoso se vuelven metabólicamente activos, ya que responden a condiciones fisicoquímicas como cambios en la presión osmótica, balance iónico, temperatura y pH, perdiéndose pocos segundos después (Alavi y Cosson 2005, 2006; Bustamante *et al.*, 2016). Los medios que son hiper o hiposmóticos con relación al líquido seminal desencadenan la movilidad de los espermatozoides en teleósteos y se determina a través de la sensibilidad a la osmolaridad y concentraciones iónicas. Este fenómeno está relacionado con las actividades de canales iónicos en la membrana y gobierna los mecanismos de movilidad de los axonemas (Alavi y Cosson, 2006).

De acuerdo con Alavi y Cosson (2006) en Salmonidae y Acipenseridae los iones de K^+ son clave en la movilidad en combinación con la presión osmótica y en otras especies la movilidad se evita cuando la presión osmótica es alta como en la familia Cyprinidae, o baja en peces marinos.

Los cationes, principalmente divalentes, tales como Ca^{2+} son antagonistas con el efecto inhibitorio de K^+ sobre la movilidad (Alavi y Cosson, 2006). En muchas especies, el influjo de Ca^{2+} y el flujo de K^+ o Na^+ a través de canales iónicos específicos cambian el potencial de membrana y eventualmente conducen a un aumento en la concentración de AMPc en la célula, que constituye la iniciación de la movilidad a partir de la osmolaridad, presión osmótica y concentraciones de iones de K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , HCO_3^- y Mg^{2+} (Alavi y Cosson, 2006).

Inhibición y activación de la movilidad espermática

La osmolaridad y la composición iónica del plasma seminal previenen la movilidad en los conductos espermáticos y es dependiente de cada especie (Billard, 1986).

El plasma seminal no sólo inmoviliza a los espermatozoides, también proporciona los nutrientes necesarios para el metabolismo, así como su protección (Ingermann, 2008). Las mitocondrias, hasta entonces, se encuentran con bajo potencial de membrana con el fin de preservar las pocas reservas energéticas y disminuir la formación de compuestos de oxidación endógenos que pondrían en riesgo la integridad de membranas o compuestos citoplasmáticos (Alavi y Cosson, 2006; Tabares *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la movilidad de los espermatozoides de peces de tipo aquaespermatozoides depende de la osmolaridad y ionicidad del agua, debido a que los activan a través de una serie de mecanismos que incluyen el cambio y función de la morfología de la membrana celular, aumento del pH intracelular y alteración del gradiente entre concentración extra e intracelular de iones y osmolitos (Alavi y Cosson, 2006; Browne *et al.*, 2015).

En algunos cíclidos como la tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) se ha detectado la presencia de un factor de inmovilización del espermatozoide en el plasma seminal, una glicoproteína de alto peso molecular denominada SPPI 120, Mr = 120.000, que es secretada por las células de Sertoli y células epiteliales del conducto espermático, y que también está unida a la cabeza del espermatozoide (Mochida *et al.*, 1999).

La SPPI 120 existe en plasma seminal, como homopolímero de Mr = 1.000.000, por lo cual, la cuantificación de ésta glicoproteína puede ser un parámetro de calidad del espermatozoide (Ciereszko, 2008).

La activación de la movilidad, implica la respuesta a los cambios iónicos, que conducen en última instancia a la transducción de señales intracelulares y finalmente, la maquinaria móvil, el axonema, que es activado mediante la fosforilación de las subunidades asociadas con las dineínas responsables de la conversión de energía química de hidrólisis de ATP a energía mecánica para llevarla a cabo, la cual es dependiente del número de mitocondrias y de las reservas energéticas disponibles (Browne *et al.*, 2015; Gagnon y de Lamirande, 2006; Inaba, 2008).

La criopreservación en el contexto de la reproducción

La criobiología es la ciencia que trata de conservar la vida a bajas temperaturas, la cual frena o ralentiza los procesos biológicos. La posibilidad de suspender la actividad celular durante un tiempo indefinido y lograr una posterior activación ha sido una herramienta fundamental para la conservación y reproducción de numerosas especies.

La criopreservación del semen en peces implica, en primer lugar, mezclarlo con diluyentes que eviten la activación espermática y, segundo la utilización de crioprotectores que minimicen el daño que producen los cristales de hielo durante la congelación y descongelación (Maria *et al.*, 2006).

Actualmente esta técnica presenta numerosas aplicaciones como: i) conservar el semen, ii) sincronizar la disponibilidad de gametos, iii) reducir el número de reproductores, iv) reducir el riesgo de transmisión de enfermedades principalmente de tipo parasitario, v) conservar la variabilidad genética, vi) facilitar el transporte de especies, vii) protección de especies amenazadas o en peligro de extinción, y viii) disponibilidad de espermatozoides durante todo el año, independientemente de la temporada y estado de madurez sexual de los peces (Dietrich *et al.*, 2014; Öğretmen *et al.*, 2016).

El éxito de la criopreservación de células y tejidos se logró en el siglo XX, con la introducción del glicerol como agente crioprotectante (ACP) durante el proceso de congelación (Polge *et al.*, 1949), y posteriormente con el descubrimiento del dimetil sulfóxido (DMSO) (Lovelock y Bishop, 1959), así como por la sustitución a partir de la década de los 50 de nieve carbónica que alcanzaba -79 °C por nitrógeno líquido con el que se logran -196 °C (Paz, 2009).

En la acuicultura, la criopreservación de espermatozoides dio inicio con Blaxter (1953) quien fertilizó huevos de arenque (*Clupea harengus* Linnaeus, 1758) con semen congelado. A partir de entonces se ha mostrado cada vez mayor interés por esta técnica, principalmente en especies de interés comercial.

Con base en las distintas revisiones bibliográficas, hasta la fecha, se ha intentado la criopreservación de más de 200 especies de peces y crustáceos con resultados favorables, pero variables, por lo que, cada protocolo debe ser estandarizado de acuerdo a la especie de interés (Nahiduzzaman *et al.*, 2012; Paz, 2009).

Cada protocolo de criopreservación implica varios parámetros que deben ser estandarizados y evaluados para mejorar la supervivencia de los espermatozoides, ya que durante este proceso se ocasionan daños irreversibles a nivel celular, afectando su calidad y tasas de supervivencia (Aramli *et al.*, 2015; Bernáth *et al.*, 2016; Dietrich *et al.*, 2016; Judycka *et al.*, 2016a). Entre ellos se incluyen: i) composición del diluyente, ii) agente crioprotector, iii) concentración del agente crioprotector, iv) unidad de envasado (criopaja), y v) velocidad de congelación y descongelación; los cuales deben ser evaluados con el fin de crear un protocolo exitoso para la especie de interés, de tal manera que, todas estas variables puedan interactuar para garantizar la viabilidad del espermatozoide (Aramli *et al.*, 2015; Bernáth *et al.*, 2016; Judycka *et al.*, 2016b; Ögretmen *et al.*, 2014).

Por tal motivo, el número insuficiente de espermatozoides viables durante la criopreservación es razón de incertidumbre, cuando se necesita fertilizar grandes cantidades de óvulos, se estima que el número de espermatozoides necesarios para una fertilización exitosa es de al menos 10 veces más, en contraste con semen fresco, por eso se necesitan grandes volúmenes de semen criopreservado (Billard, 1992; Ciereszko *et al.*, 2013).

Diluyentes

Son soluciones isotónicas cuyo fin es imitar el medio en que se encuentran los espermatozoides dentro del testículo o conducto eferente, para mantener la inactividad de los espermatozoides e incrementar el volumen seminal sobre todo en especies cuya producción es en microlitros (Ohta y Izawa, 1996; Sieme *et al.*, 2016).

Dichas soluciones están basadas principalmente en la composición química del plasma seminal de la especie, porque deben mantener inmóviles a los espermatozoides por periodos cortos donde la presión osmótica y el pH deben ajustarse para favorecer la supervivencia espermática (Valdebenito *et al.*, 2009).

Entre las soluciones diluyentes se utilizan azúcares como: sacarosa, maltosa, trehalosa, galactosa, fructosa y glucosa, así como, NaCl, cuya efectividad es dependiente de la osmolaridad y concentración iónica para cada especie, además de soluciones salinas tamponadas como: tampones fosfato, tris o bicarbonato potásico (Paz, 2009).

Entre los diluyentes más utilizados están: Diluyente Ginzburg Fish Ringer, Solución salina balanceada Hanks (HBSS), Diluyente Erdah y Graham, Solución de sacarosa, glucosa, fructuosa (Dietrich *et al.*, 2016; Nynca *et al.*, 2016, 2017; Ramírez-Merlano *et al.*, 2010). A la fecha los diluyentes y crioprotectores han sido reportados como factores clave para la viabilidad celular (Nynca *et al.*, 2016).

Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad, cuya finalidad es mantener la viabilidad celular, previendo el daño celular durante el proceso de congelación y descongelación al disminuir la formación de cristales de hielo. Su entrada a la célula produce la salida de agua intracelular y disminuye la temperatura de nucleación del hielo, evitando que se formen cristales en el interior antes de que la célula se deshidrate (Paz, 2009; Sieme *et al.*, 2016).

No obstante, el crioprotector no solo está diseñado para la prevención de la criogénesis sino también ayuda a la célula a iniciar la movilidad subsecuentemente cuando el espermatozoide es descongelado y empieza a mover el flujo de ATP hacia el flagelo (Ramírez-Merlano *et al.*, 2010).

Los crioprotectores se dividen en dos tipos de acuerdo a la permeabilidad de la membrana a) permeables: metanol (MET), etanol, propanol, propilenglicol (PG), glicerol y dimetil sulfóxido (DMSO) y b) no permeables: glucosa, lactosa, sacarosa (Paz, 2009; Ramírez-Merlano *et al.*, 2010).

En el campo de la acuicultura el DMSO, el MET y el PG han sido probados en diferentes concentraciones con el objetivo de establecer el tiempo de equilibrio necesario para proteger las células de la toxicidad, deshidratación y formación de cristales de hielo (Nahiduzzaman *et al.*, 2012; Routray *et al.*, 2007).

Además de los permeables y no permeables podemos encontrar agentes naturales como: yema de huevo; que es lipoproteica, o proteicas como la leche en polvo, albúmina de suero bovino (BSA) o extractos proteicos de soja, que ejercen protección específica sobre la membrana plasmática (Paz, 2009).

Efectos de la criopreservación en el espermatozoide

Daño morfológico

La calidad espermática está determinada entre otros factores por su morfología, existe una correlación positiva entre los espermatozoides anormales y la disminución de fertilidad, debido a ello, la evaluación de la magnitud de los daños morfológicos es esencial después de la criopreservación para determinar la pérdida de la capacidad fecundante, debido a la influencia significativa, entre la morfología, integridad y función del espermatozoide (Bustamante *et al.*, 2016; Cabrita *et al.*, 2005; Ramírez-Merlano *et al.*, 2010).

Esta reportado que la criopreservación provoca daños irreversibles al espermatozoide, tales como la ruptura de la membrana plasmática en la cabeza, pieza media, flagelo y mitocondrias, ocasionados por la formación de cristales de hielo y por el consecuente flujo de agua al interior de la célula (Drokin *et al.*, 1998; Martínez y Pardo, 2010; Ramírez-Merlano *et al.*, 2010; Zhang *et al.* 2003).

Hay reportes donde analizaron el efecto del crioprotector en la morfología espermática, por ejemplo, Felizardo *et al.* (2010) utilizaron cuatro combinaciones de crioprotectores permeables y no permeables: DMSO + yema de huevo, DMSO + lactosa, MET + yema de huevo y MET + lactosa. Los resultados indicaron que las muestras tratadas con lactosa como crioprotector extracelular fueron las que presentaron mayor frecuencia de anomalía versus yema de huevo. Entre las principales alteraciones se reportaron: cabezas aisladas, microcefalia, macrocefalia, flagelos enrollados, rotos, fracturados y aislados.

Así mismo, Ramírez-Merlano *et al.* (2011) indicaron las mismas alteraciones morfológicas en espermatozoides de *Pseudoplatystoma metaense* Bleeker, 1862, al emplear DMSO y MET postdescongelación; y Martins (2008) evidenció microcefalia en espermatozoides de *Zungaro jahu* Ihering, 1898, al utilizar DMSO (Tabla 1). Sin embargo, Lahnsteiner *et al.* (1992) reportaron que los cambios en la morfología pueden producirse antes de la congelación o inmediatamente después del contacto con el diluyente, aumentando a medida que se prolonga el tiempo de exposición al crioprotector, por lo cual es necesario evaluar la morfología antes y después de la incorporación del crioprotector.

Integridad de la membrana

La membrana plasmática es una estructura constituida por una bicapa lipídica que delimita a la célula, juega un papel fundamental en la respuesta del espermatozoide al entorno, regular actividades celulares y rutas de señalización que conducen a la activación de la movilidad (Márián *et al.*, 1993; Tabares *et al.*, 2005).

De acuerdo con Paz (2009) durante la criopreservación espermática la estructura de la membrana plasmática puede perder su estructura lipídica, cuando los lípidos que la componen alcanzan su punto de transición, la membrana puede desorganizarse, empaquetándose para formar pequeñas micelas, afectando a la permeabilidad y otras funciones celulares ya que los lípidos se desorganizan y las proteínas que hay entre ellos formando canales de permeabilidad o moléculas de reconocimiento, se ven afectados.

La superficie celular tiene regiones o dominios diferentes con funciones específicas, la pérdida del mosaico fluido durante la congelación conlleva a que esta regionalización se pierda, afectando la recepción y envío de señales que inician la movilidad, o el reconocimiento de la membrana entre los gametos (Paz, 2009).

En este sentido, el uso de un crioprotector adecuado resulta fundamental para evitar daños en la integridad de la membrana, por ejemplo, Dietrich *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la glucosa y MET sobre la criopreservación en trucha (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) reportando el 50% de espermatozoides con membrana plasmática intacta tras la descongelación, resultados similares a los obtenidos por Ustuner *et al.* (2016) para la misma especie al utilizar yema de huevo más plasma seminal.

En otro estudio, Viveiros *et al.* (2015) reportaron el efecto del metilglicol, MET y DMSO sobre la integridad de la membrana en espermatozoides de la piraicanjuba, o salmón de río (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850) y del curimba (*Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836). Los resultados mostraron mayor porcentaje de integridad de la membrana con metilglicol al 10% con 57% \pm 11 y 78% \pm 14 al suplementar el medio con glucosa (Tabla 1).

Daño mitocondrial

La función de las mitocondrias en la activación espermática, es suministrar energía en forma de ATP necesaria para mantener la movilidad (Medina *et al.*, 2005). Estudios previos han confirmado que la criopreservación puede dañar la mitocondria, por ejemplo, Boryshpolets *et al.* (2007) demostraron que la congelación y descongelación de espermatozoides de (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) llevó a una reducción del contenido de ATP de 46 nmol ATP/10⁹ espermatozoides a 10 nmol ATP/10⁹.

Otros estudios han reportado el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de mitocondrias funcionales, porque su número se reduce significativamente como fue el caso en la dorada roja (*Pagrus major* Temminck y Schlegel, 1843) (Liu *et al.*, 2007); trucha arco iris (*O. mykiss*) (Ogier de Baulny *et al.*, 1997) y bagre europeo (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758) (Ogier de Baulny *et al.*, 1999) (Tabla 1). No obstante, Restrepo *et al.* (2013) demostraron que a pesar de que la criopreservación altera la integridad mitocondrial, las mitocondrias retienen la capacidad de preservar el acoplamiento respiratorio requerido para la síntesis de ATP.

Sin embargo, O'Connell *et al.* (2002) indicaron que el daño mitocondrial durante la criopreservación en el esperma de peces es variable y se requiere de un protocolo específico, ésta hipótesis, se demuestra para los espermatozoides de la especie humana en que la técnica convencional de criopreservación es eficiente, como para preservar estas estructuras (Honeyfield y Krise, 2011, Labbé *et al.*, 2001).

Esta reportado que la funcionalidad de las mitocondrias depende de la integridad de sus membranas, del acoplamiento de la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones hacia el oxígeno, para que puedan proveer energía a la célula, por tal motivo el metabolismo energético mitocondrial es la fuente de generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Kowaltowski *et al.*, 2009).

Los complejos mecanismos redox en el microambiente mitocondrial, son capaces de controlar la producción de ERO a niveles requeridos para la funcionalidad normal de este organelo. Sin embargo, las situaciones de estrés oxidante que causan daño en la membrana mitocondrial, pueden perjudicar la eficacia respiratoria promoviendo la liberación de ERO (Ferramosca *et al.*, 2013).

Movilidad espermática

La duración de la movilidad espermática en peces de fecundación externa varía de pocos segundos a minutos en función de la especie estudiada (Alavi y Cosson, 2005, 2006); y es uno de los parámetros que presenta mayor correlación con las tasas de fertilización.

En los últimos años se ha incrementado el interés por la preservación espermática tanto desde un punto de vista conservacionista como comercial, con el objetivo de alcanzar tasas de movilidad postdescongelación similares a las muestras en fresco. Los mejores resultados se han obtenido en ciprínidos, con resultados medios de elevada movilidad postcongelación en especies como *Tinca* Linnaeus, 1758 (Lujic *et al.*, 2017); *Barbodes gonionotus* Bleeker, 1849 (Boonthai *et al.*, 2016); *Labeo calbasu* Hamilton, 1822 (Nahiduzzaman *et al.*, 2012); y *C. carpio* (Irawan *et al.*, 2010). Así como en los siguientes salmónidos: *O. mykiss* (Nynca *et al.*, 2017); *Coregonus clupeaformis* Mitchell, 1818 (Nynca *et al.*, 2016); *Thymallus* Linnaeus, 1758; *Salmo marmoratus* Cuvier, 1829 (Horváth *et al.*, 2015); *Coregonus lavaretus* Linnaeus, 1758, *Salmo trutta* Linnaeus, 1785, *Salvelinus fortinalis* Mitchell, 1815 (Judycka *et al.*, 2016b). Sin embargo, los resultados obtenidos en especies marinas distan todavía de lo conseguido en otras especies, lo que implica trabajar en el desarrollo de nuevos protocolos específicos o, al menos, mejorar existentes. Para protocolos específicos de las diferentes familias de teleosteos de agua dulce y agua salada se sugiere revisar a Gallego y Asturiano (2018).

Daño del ADN

La fragmentación del DNA del espermatozoide se considera una característica relevante que determina baja calidad, es imprescindible que, tras la fecundación, la información genética se transmita sin errores a la siguiente generación ya que está correlacionada con la mutagénesis (Figueroa *et al.*, 2013).

La evaluación del daño del DNA después de la criopreservación permite mejorar los protocolos de criopreservación mediante su optimización para reducir las crio lesiones de la cromatina (Cartón-García *et al.*, 2013) ya que éstas alteraciones podrían tener consecuencias en la progenie (Pérez-Cerezales *et al.*, 2009).

El mecanismo por el cual se produce el daño del DNA durante la criopreservación no está del todo dilucidado, pero se ha atribuido al estrés oxidante, principal responsable de la fragmentación de la cadena de ADN.

Está reportado que las bases nitrogenadas, en particular la guanina, son los principales objetivos del ataque de las ERO, generando 8-hidroxi,2'-desoxiguanosina (8-OHdG), lo cual debilita el enlace entre la guanina y ribosa, dando lugar a la pérdida de la base oxidada, desestabilizando la estructura del ADN y propiciando roturas de hebras localizadas (Aitken *et al.*, 2012; Cabrita *et al.*, 2014; Thomson *et al.*, 2009).

Tabla 1. Principales daños a espermatozoides de teleósteos, ocasionados por la criopreservación.

Parámetros	Descripción	Especie	Referencia
Morfológicos Ultraestructura	Cambio de la distribución de partículas en la superficie del protoplasma de cabeza y flagelo	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salmo trutta</i>	Drokin <i>et al.</i> (1998); Taddei <i>et al.</i> (2001); Ramírez-Merlano <i>et al.</i> (2010)
	Daños en la membrana	<i>Paralichthys olivaceus</i> , <i>Silurus glanis</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Brycon orbignyanus</i> , <i>Prochilodus lineatus</i>	Watson <i>et al.</i> (1981); Zhang <i>et al.</i> (2003); Ramírez-Merlano <i>et al.</i> (2010); Ustuner <i>et al.</i> (2016); Viveiros <i>et al.</i> (2015)
	Reducción en número de mitocondrias	<i>Pagrus major</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Silurus glanis</i>	Ogier de Baulny <i>et al.</i> (1997); Ogier de Baulny <i>et al.</i> (1999); Liu <i>et al.</i> (2007)
Funcionalidad mitocondrial	Disminución de ATP	<i>Silurus glanis</i> , <i>Cyprinus carpio</i>	Ogier de Baulny <i>et al.</i> (1997); Ogier de Baulny <i>et al.</i> (1999); Boryshpolets <i>et al.</i> (2009)
	Aumento de ATP	<i>Silurus asotus</i>	
Daño a ADN		<i>Dicentrarchus labrax</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Sparus aurata</i> , <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Labbe <i>et al.</i> (2001); Zilli <i>et al.</i> (2003); Cabrita <i>et al.</i> (2005); Pérez-Cerezales <i>et al.</i> (2009); Cartón-García <i>et al.</i> (2013); Kuppusamy y Natesan, (2014)
Viabilidad	Disminución de la movilidad	<i>Thymallus</i> , <i>Hucho</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Lahnsteiner <i>et al.</i> (1996a, 1996b)
	Disminución del tiempo de activación	<i>Barbus barbus</i> , <i>Chondrostoma nasus</i> , <i>Ctenopharyngodon idella</i> ,	
	Alto porcentaje de movimientos circulares	<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> , <i>Leuciscus cephalus</i> ,	Lahnsteiner <i>et al.</i> (2000) Warnecke y Pluta, (2003)
	Reducción de la velocidad del nado	<i>Rutilus meidingerii</i> , <i>Vimba</i>	

Sin embargo, Kopeika *et al.* (2004) reportaron que la oxidación de las bases nitrogenadas por efecto del estrés oxidante, no siempre provoca la ruptura de la hebra y estas pueden ser introducidas al embrión, cuando el sistema de reparación de las escisiones presentes en el huevo está activado.

Sikorsky *et al.* (2004) mencionaron que además del daño a las bases nitrogenadas, las ERO crean sitios abásicos, dímeros de timidina y muchos otros que retrasan la progresión del ADN polimerasa. Aitken *et al.* (2009) proponen que algunas regiones de cromatina son particularmente propensas a sufrir criolesiones y sugieren que producen baja

eficiencia de la remodelación de la cromatina durante la espermiogénesis, lo cual puede crear un estado de vulnerabilidad que permite que las ERO generadas ataquen y fragmenten el ADN durante el proceso de criopreservación.

Los estudios de Kuppusamy y Natesan, (2014) han demostrado el daño al ADN en espermatozoides criopreservados en *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878, reportando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (semen fresco); así mismo, Pérez-Cerezales *et al.* (2009) reportaron en *O. mykiss* un incremento de $6,1\% \pm 0,3$ a $14\% \pm 0,6$, entre el control y muestras criopreservadas, resultados superiores a los obtenidos por Cabrita *et al.* (2005) para la misma especie $11,2\% \pm 9,2$ y $30,3\% \pm 13,9$ respectivamente. Así mismo, en *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, Cartón-García *et al.*, (2013) reportaron un aumento mínimo de $2,2\% \pm 0,2$ a $2,5\% \pm 0,2$ (control y criopreservadas), resultados que difieren a los reportados por Cabrita *et al.* (2005) para la misma especie $31,4\% \pm 15,8$ y $41,4\% \pm 15,0$ respectivamente y en *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758, Zilli *et al.* (2003) obtuvieron $37,7\% \pm 11,1$ y $65,2\% \pm 10,2$ entre el control y muestras criopreservadas (Tabla 1).

Conclusiones

La fisiología de los espermatozoides de teleósteos varía en función de la familia estudiada, aunque se suele mantener la estructura clásica formada por cabeza, pieza intermedia, pieza principal y pieza final. En los peces de fecundación externa, el movimiento del espermatozoide se inicia al ser liberado al medio acuoso por un choque hiposmótico (en especies de agua dulce) o hiperosmótico (en especies de agua salada). Todas estas diferencias (fisiológicas y morfológicas) dependen de las estrategias reproductivas de cada especie, y son probablemente la causa de la elevada variabilidad que podemos encontrar en teleósteos. Durante la criopreservación se producen una serie de cambios en la estructura y funcionalidad de los diferentes orgánulos celulares, por lo que un gran porcentaje de espermatozoides acaban sufriendo un daño durante la congelación y descongelación. En este sentido, el estudio de la fisiología espermática y la optimización de protocolos de criopreservación se presentan como dos retos para la mejora del conocimiento de la biología reproductiva de teleósteos marinos.

Agradecimientos

A los revisores anónimos, a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y al CONACyT por la beca número 465467.

Bibliografía

1. Aitken, R. J., De Iulius, G. N., McLachlan, R. I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*, 32: 46-56.
2. Aitken, R. J., Jones, K. T., Robertson S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *Journal of Andrology*, 33: 1096-1106.
3. Alavi, S. M. H, Cosson, J. (2005). Sperm motility in fishes (I) effects of temperature and pH: A review. *Cell Biology International*, 29: 101-110.
4. Alavi, S. M. H, Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes (II) effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30: 1-14.
5. Aramli, M. S., Golshahi, K., Nazari, R. M., Aramli, S., Banan, A. (2015). Effectiveness of glucose-methanol extender for cryopreservation of *Huso huso* spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 162: 37-42.
6. Bernáth, G., Bokor, Z., Zarski, D., Várkonyi, L., Hegyi, Á., Staszny, Á., Urbányi, B., Radóczy, I. J., Horváth, Á. (2016). Commercial-scale out-of-season cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm and its application for fertilization. *Animal Reproduction Science*, 170: 170-177.
7. Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 39: 65-79.
8. Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Development*, 26: 877-920.
9. Billard, R. (1990a). Spermatogenesis in teleost fish. In: G. E. Lamming. (Ed.). *Marshall's Physiology of Reproduction Vol. II*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 183-212.
10. Billard, R. (1990b). Artificial insemination in fish. En: *Marshall's Physiology of reproduction*. G.E. Lamming (Ed). 2: 870-888.
11. Billard, R. (1992). Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100: 263-298.
12. Blaxter, I. H. S. (1953). Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172: 1189-1190.
13. Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Nimrat, S., Vuthiphandchai, V. (2016). Semen collection methods affect the bacterial composition of post-thawed semen of silver barb (*Barbodes gonionotus*). *Animal reproduction science*, 166: 90-98.
14. Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Rodina, M., Hulak, M., Linhart, O. (2007). Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L). *Cryobiology*, 59: 291-296.
15. Browne, R. K., Kaurova, S. A., Uteshev, V. K., Shishova, N. V., McGinnity, D., Figie, C. R. I, Mansour, N., Agnew, D., Wu, M., Gakhova, E. N., Dzyuba, B., Cosson, J. (2015). Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*, 83: 1-13.
16. Bustamante, G. J. D., González, R. M., Rodríguez, G. M., Cortés, G. A., Ávalos, R. A. (2016). Methodologies for spermatoc evaluation in teleost. *International Journal of Aquatic Science*, 7(2): 95-106.
17. Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Herráez M. P. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50: 144-153.
18. Cabrita, E., Martínez-Páramo, S., Gavaia, P. J., Riesco, M. F., Valcarce, D. G., Sarasquete, M. P., Robles, V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432: 389-401.
19. Carrillo, M., Zanuy, S., Bayarri, M. J. (2009). El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. In: Carrillo, E. M. A. (Ed.). *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de acuicultura, Madrid, España. pp. 175-233.
20. Cartón-García, F., Riesco, M. F., Cabrita, E., Paz, H. M., Robles, V. (2013). Quantification of lesions in nuclear and mitochondrial genes of *Sparus aurata* cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 402(403): 106-112.

21. Ciereszko, A. (2008). Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. En: Mohammad, H. A. S., Cosson, J. J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.). *Fish spermatology*. Alpha Science, Oxford, pp. 215-240.
22. Ciereszko, A., Dietrich, G. J., Nynca, J., Liszewska, E., Karol, H., Dobosz, S. (2013). The use of concentrated extenders to improve the efficacy of cryopreservation in whitefish spermatozoa. *Aquaculture*, 408: 30-33.
23. Cosson, J., Billard, R., Ciber, C. T., Dréanno, C. (1999). Ionic factors regulating the motility of fish sperm. En: C. Gagnon. (Ed.) *The Male Gamete: from basic knowledge to clinical applications*. Vienna: Cache river press. 161-186.
24. Coward, K., Bromage, N. R., Hibbitt, O., Parrington, J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12(1): 33–58.
25. Dietrich, G. J., Nynca, J., Dobosz, S., Zalewski, T., Ciereszko, A. (2014). Application of glucose-methanol extender to cryopreservation of semen of sex-reversed females rainbow trout results in high post-thaw sperm motility and fertilizing ability. *Aquaculture*, 434: 27-32.
26. Dietrich, M. A., Dietrich, G. J., Mostek, A., Ciereszko, A. (2016). Motility of carp spermatozoa is associated with profound changes in the sperm proteome. *Journal of Proteomics*, 138: 124-135.
27. Drokin, S., Stein, H., Bartscherer, H. (1998). Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta F. Fario*). *Cryobiology*, 37: 263-270.
28. Eddy, E.M. (2006). The spermatozoon. En: Knobil, Neills's. (Eds.). *Physiology of reproduction*. Academic Press, Elsevier. 3269 p.
29. Felizardo, V.O., Mello, R. A., Murgas, L. D. S., Andrade, E. S., Drumond, M. M., Rosa, P. V. (2010). Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 122: 259-263.
30. Ferramosca, A., Provenzano, S. P., Montagna, D. D., Coppola, L., Zara, V. (2013). Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology*, 82: 78-83.
31. Figueroa, E., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Merino, O., Isachenko, V., Valdebenito, I. (2013). Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture*, 372: 119-126.
32. Gagnon, C., de Lamirande, E. (2006). Controls of sperm motility. En: De Jonge, C., Barratt, C. (Eds.). *The sperm cell, production, maturation, fertilization, regeneration*. Cambridge University Press, pp. 108-132.
33. Gallego, V., Asturiano, J. F. (2018). Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. *Reviews in Aquaculture*. 1-28. doi: 10.1111/raq.12253
34. Grier, H. J. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 21(2): 345-357.
35. Grier, H. J., Uribe A. M. C. (2009). The testis and spermatogenesis in teleosts. En: B. G. M. Jamieson. (Ed.). *Reproductive Biology and Physiology of fishes (Agnathans and bony fishes)*. Science Publishers. USA. pp. 119-141.
36. Honeyfield, D. C., Krise, W. F. (2011). Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. En: Tiersch, T. R., Green, C. C. (Eds.). *Cryopreservation in aquatic species*. 2nd edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge. pp. 146-161.
37. Horváth, A., Labbé, C., Jesensek, D., Hoitsy, G., Bernáth, G., Kaezkó, D., Bokor, Z., Urbáyi, B. (2015). Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. *Journal of Applied Ichthyology*, 31: 119-124.
38. Inaba, K. (2008). Molecular mechanisms of the activation of flagellar motility in sperm. En: Mohammad, H. A. S., Cosson, J. J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.). *Fish spermatology*. Alpha Science, Oxford, pp. 267-279.
39. Ingermann, R. L. (2008). Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. En: Mohammad, H. A. S., Cosson, J. J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.). *Fish spermatology* Alpha Science, Oxford, pp. 241-266.
40. Irawan, H., Vuthiphandchai, V., Nimrat, S. (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal reproduction science*, 122: (3-4), 236-243.

41. Jamieson, B. G. M., Leung, L. K. P. (1991). Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. En: B.G.M Jamieson. (Ed.). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge Univ. Press, p. 56.
42. Judycka, S., Ciereszko, A., Dobosz, S., Zalewski, T., Dietrich, G. J. (2016a). Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 245: 89-93.
43. Judycka, S., Nynca, J., Liszewska, E., Dobosz, S., Zalewski, T. (2016b). Potassium ions in extender differentially influence the post-thaw sperm motility of salmonid fish. *Cryobiology*, 1-9.
44. Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D. M., Holt, W. V. (2004). Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*, 61:1661-73.
45. Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radiccal Biology and Medicine*, 47(4): 333-343.
46. Kuppusamy, U. R., Natesan, M. (2014). Effect of DNA damage caused by cryopreservation of spermatozoa using a modified Single cell gell electrophoresis in the freshwater catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Fowler, 1936). *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(7): 515-519.
47. Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maise, G. (2001). Effects of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60 (3): 397-404.
48. Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A. (1992). Fine structure changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture*, 103: 73-84.
49. Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A. (1996a). Cryopreservation of semen of the grayling *Thymallus thymallus* and the Danube salmon *Hucho hucho*. *Aquaculture*, 144: 265-274.
50. Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A. (1996b). Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* semen quality for cryopreservation. *Journal of Applied Aquaculture*, 6: 47-73.
51. Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 54: 1477-1496.
52. Lahnsteiner, F., Patzner, R. A. (2008). Sperm morphology and ultrastructure in fish. En: Mohammad. H. A. S., Cosson, J. J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.). *Fish spermatology*. Alpha Science, Oxford, pp. 1-61.
53. Liu, Q. H., Li, J., Zhang, S. C., Xiao, Z. Z., Ding, F. H., Yu, D. D., Xu, X. Z. (2007). Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology*, 67: 1168-1174.
54. Lujčić, J., Bernath, G., Marinović, Z., Radojković, N., Simić, V., Ćirković, M., Urbányi, B., Horváth, A. (2017). Fertilizing capacity and motility of tench *Tinca tinca* (L., 1758) sperm following cryopreservation. *Aquaculture Research*, 48: 102-110.
55. Lovelock, J. E., Bishop, M. (1959). Prevention of freezing injury to cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*, 183: 1394-1395.
56. Madhavi, M., Kailasam, M., Mohanla, D. L. (2015). Ultrastructure of sperm of the spotted scat (*Scatophagus argus*, Linnaeus, 1766) observed by scanning and transmission electron microscopy. *Animal Reproduction Science*, 153: 69-75.
57. Maria, A. N., Viveiros, A. T. M., Freitas, R. T. F., Oliveira, A. V. (2006). Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260: 298-306.
58. Márián, T., Krasznai, Z., Balkay, L., Balázs, M., Emra, M., Bene, L., Trón, L. 1993. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41 (2): 291-297.
59. Martínez, J. G., Pardo, C. S. (2010). Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana*, 15 (2): 3-24.
60. Martins, M. D. (2008). Reprodução induzida de jaú (*Zungaro jahu*): análise das características seminais e ovocitárias. Dissertação em Zootecnia. Universidad Federal de Lavras, Lavras, Brasil. 111 pp.

61. Medina, R. V. M., Velasco, S. Y. M., Cruz, C. P. E. (2005). Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18 (1): 34-48.
62. Mochida, K., Kondo, T., Matsubara, T., Adachi, S., Yamauchi, K. (1999). A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Development Growth, Differentiation*, 41: 619-627.
63. Nahiuzzaman, Md., Mahbubul, Md., Kumar, R. P., Akhtar, H. Md., Reza, H. M. A., Tiersch, T. R. (2012). Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. *Animal Reproduction Science*, 136: 133-138.
64. Nóbrega, R.H., Batlouni, S. R., França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35 (1): 197-206.
65. Nynca, J., Judycka, S., Liszewska, E., Dobosz, S., Grudniewska, J., Arai, K., Fujimoto, T., Ciereszko, A. (2016). Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from salmonidae species. *Aquaculture*, 464(1): 340-348.
66. Nynca, J., Judycka, S., Liszewska, E., Dobosz, S., Ciereszko, A. (2017). Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*, 477: 23-27.
67. O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 1: 704-709.
68. Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Maisse, G. (1997). Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*, 34: 141-149.
69. Ogier de Baulny, B., Labbé, C., Maisse, G. (1999). Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*, 39: 177-184.
70. Ögretmen, F., İnanan, B. E., Öztürk, M. (2014). Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Cryobiology*, 68: 107-112.
71. Ögretmen, F., İnanan, B. E., Kutluyer, F., Kayim, M. (2016). Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Teriogenology*, 83(9): 1548-1552.
72. Ohta, T., Kato, K. H., Abe, T., Takeuchi, T. (1993). Sperm morphology and distribution of intramembranous particles in the sperm heads of selected freshwater teleosts. *Tissue and cell*, 25(5): 725-735.
73. Ohta, H., Izawa, T. (1996). Diluent for cold storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142: 107-118.
74. Osipova, V.P., Berberova, N.T., Gazzaeva, R.A., Kudryavtsev, K.V. (2016). Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm. *Cryobiology*, 72: 112-118.
75. Paz, H. M. (2009). Criopreservación de gametos y embriones. En: Carrillo, E. M. A. (Ed.). *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en la acuicultura*. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, pp. 477-530.
76. Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Cabrera, E., Martínez-Pastor, F., de Paz, P., Herráez, M. P. (2009). Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology*, 71: 605-613.
77. Polge, C., Smith, A. U., Parks, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature (Abstr.)*, 164 (4172): 666-667.
78. Quagio-Grassiotto, I., Olivera, C. (2008). Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 247 (1): 55-66.
79. Ramírez-Merlano, J. A., Medina, R. V. M., Cruz-Casallas, P. E. (2010). Criopreservación espermática en peces, un acercamiento en Siluriformes. *Orinoquia*, 14(1): 59-71.
80. Ramírez-Merlano, J. A., Medina-Robles, V. M., Cruz-Casallas, P. E. (2011). Criopreservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43: 135-144.

81. Restrepo, B. G., Úsuga, S. A., Rojano, B. A. (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial de semen de equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1): 69-81.
82. Rodríguez, G. M. (1992). *Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces*. A.G.T Editor. México, D.F. 79 p.
83. Routray, P., Verma, D. K., Sarkar, S. K., Sarangi, N. (2007). Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33 (4): 413–427.
84. Schulz, R. W., Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 43-56.
85. Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169: 2-5.
86. Sikorsky, J. A., Primerano, D. A., Fenger, T. W., Denvir, J. (2004). Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323: 823-830.
87. Tabares, C. J., Tarazona, A. M., Olivera, A. M. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18 (2): 149-161.
88. Taddei, A.R., Barbato, F., Abelli, L., Canese, S., Moretti, F., Rana, K.J., Fausto, A.M., Mazzini, M. (2001). Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology*, 42: 244-255.
89. Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iulius, G. N., Zieschang, J. A., Clark, A. M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24: 2061-2070.
90. Ulloa-Rodríguez, P., Figueroa, E., Díaz, R., Lee-Estevez, M., Short, S., Fariás, J. G. (2017). Mitochondria in teleost spermatozoa. *Mitochondrion*, 34: 49-55.
91. Ustuner, B., Alcay, S., Toker, M. B., Nur, Z., Gokce, E., Sonat, F. A., Gul, Z., Duman, M., Ceniz, C., Uslu, A., Sagirkaya, H., Soylu, M. K. (2016). Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminalplasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal Reproduction Science*, 164: 97-104.
92. Valdebeniro, I.N. (2007). Efecto de la cafeína en la motilidad y fertilidad espermática de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Información Tecnológica*. 18(2): 61-65.
93. 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.
94. Viveiros, A. T. M., Nascimento, A. F., Leal, A. C., Gonçalves, A. C. S., Ordão, L. H., Cosson, J. (2015). Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41: 193-201.
95. Warnecke, D., Pluta, H. J. (2003) Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L) sperm using dimetil-acetamida as the main cryoprotectant. *Aquaculture*, 187: 361-375.
96. Warner, F. D., Satir, P. (1974). The structural basis of ciliary bend formation: radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding. *The Journal of Cell Biology*, 63: 35–63.
97. Watson, P. F. (1981). The effects of cold shock on sperm cell membranes. En "*The effects of Low Temperatures on Biological Membranes*" (Eds G.J. Morris and A. Clarke.). (Academic Press: London). pp. 189-218.
98. Wootton, R. J., Smith, C. (2014). *Reproductive Biology of Teleost Fishes*. Wiley Blackwell, Oxford, 496 pp.
99. Zhang, Y. Z., Zhang, S. C., Liu, X. Z., Xu, Y. Y., Wang, C. L., Sawant, M. S., Li, J., Chen, S. L. (2003). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60 (5): 989-996.
100. Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S. (2003). Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47: 227-35.