

# Ultraestructura espermática en peces teleósteos con especial énfasis en el orden Cyprinodontiformes

Magela Rodao, 2015

Trabajo Especial I

Licenciatura en Bioquímica

Orientadora: Gabriela Casanova

Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión

Facultad de Ciencias-UdelaR

# INDICE

INTRODUCCIÓN -----	1
Estructura testicular de teleósteos -----	2
Espermatogénesis de teleósteos -----	5
El espermatozoide de teleósteos -----	9
Morfología espermática -----	9
Introesperma & Aquaesperma (Jamieson, 1991) -----	10
Espermatozoides primitivos y evolucionados (Mattei, 1988) -----	10
ORDEN CYPRINODONTIFORMES -----	12
Estructura testicular -----	13
El espermatozoide -----	13
Suborden Cyprinodontoidei -----	14
Anablepidae -----	14
Fundulidae -----	16
Goodeidae -----	17
Poeciliidae -----	18
Suborden Aplocheiloidei -----	20
Aplocheilidae -----	20
Nothobranchiidae -----	21
Rivulidae -----	22
CONSIDERACIONES FINALES -----	25
BIBLIOGRAFÍA -----	27

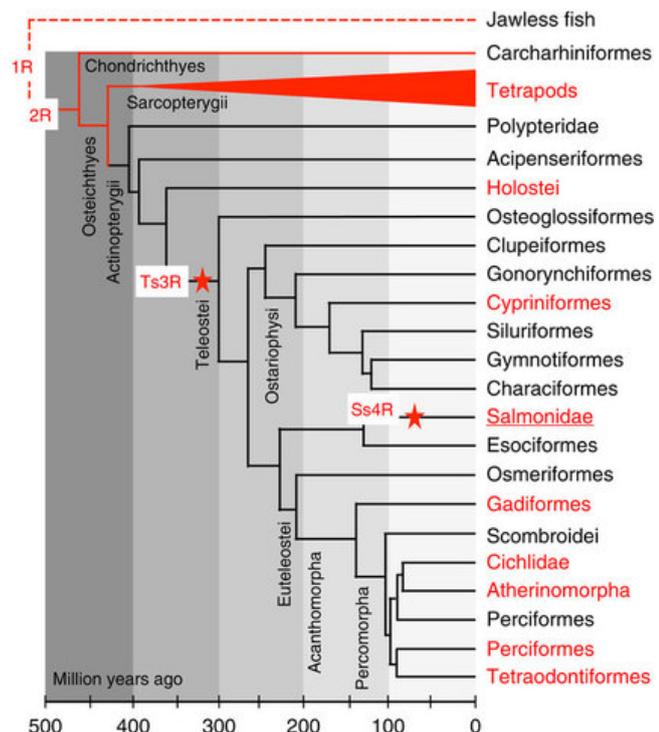
\* Fotos en tapa: izquierda, tomada de Thiaw y col., 1986; centro, tomada de Grier, 1973; derecha, tomada de Grier, 1975.

## INTRODUCCIÓN

Los peces son el grupo de vertebrados que presenta mayor diversidad biológica, morfológica y ecológica, lo que se refleja principalmente en la diversidad de estrategias reproductivas desarrolladas.

Dentro de los peces, el orden Cyprinodontiformes reúne familias con modos reproductivos variados existiendo oviparidad, ovoviviparidad, viviparidad e incluso hermafroditismo funcional (Figura 1). Esta diversidad de modos reproductivos, se acompaña de una diversidad importante de morfologías espermáticas. Sin embargo, a nivel de familia y subfamilia principalmente, muchos de estos caracteres ultraestructurales están muy conservados, por lo que han sido ampliamente utilizados en sistemática, a la hora de resolver interrogantes relacionadas con el posicionamiento taxonómico y con las relaciones de parentesco entre los diferentes grupos de peces. De todas maneras, debemos tener en cuenta que los datos con los que se cuenta hasta el momento corresponden a estudios sobre la ultraestructura del espermatozoide correspondiente a una proporción pequeña de las más de 20000 especies de teleósteos. (Wootton & Smith, 2014; Lahnsteiner & Patzner, 2008).

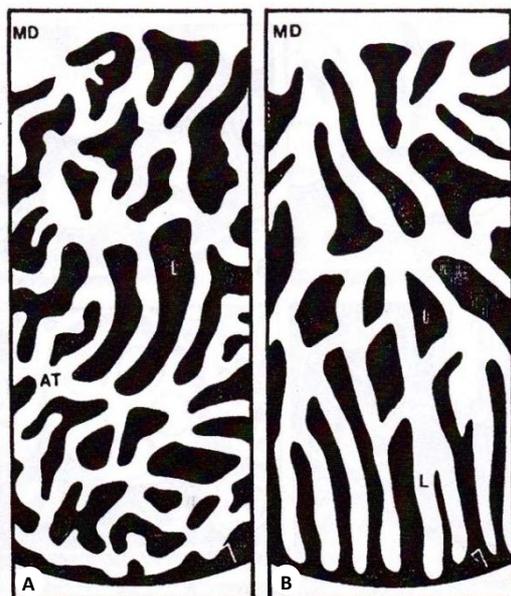
**Figura 1.** Posiciones evolutivas de vertebrados. Las estrellas rojas marcan los momentos de duplicación del ADN. Grupos de especies en las que una secuencia del genoma está disponible se muestran en rojo. Tomado de Berthelot y col., 2014.



## ***Estructura testicular de teleósteos***

Aunque los peces presentan una gran variedad de estrategias reproductivas, mantienen una organización testicular relativamente conservada. En los teleósteos, los testículos son generalmente estructuras pares ubicadas en posición dorsal en la cavidad peritoneal y recubiertos por una envoltura fibrosa conocida como túnica albugínea. Sin embargo, los peces adultos de algunas especies, pueden presentar un solo testículo surgido como resultado de una fusión durante las fases de desarrollo. En otras especies ambos testículos están presentes pero uno de ellos es más pequeño y no es funcional (Coward y col., 2002). Los testículos están constituidos por dos compartimientos, uno germinal y otro intersticial separados por una membrana basal. El compartimiento germinal está formado por células germinales y células de Sertoli; mientras que el compartimiento intersticial está compuesto por tejido conectivo que contiene células de Leydig (esteroidogénicas), fibroblastos, fibras colágenas, mastocitos y macrófagos, células sanguíneas, vasos sanguíneos y fibras amielínicas. (Grier, 1993; Schulz y col., 2010). A diferencia de lo que ocurre en vertebrados amniotas (aquellos cuyo embrión genera un amnios que permite su desarrollo en un medio acuoso; comprende: reptiles, aves y mamíferos), en vertebrados anamniotas (aquellos cuyo embrión carece de amnios, anfibios y peces), las células de Sertoli se disponen rodeando grupos de células germinales que se encuentran en un mismo estadio de desarrollo, por lo que se dice que la espermatogénesis ocurre en cistos. Ambos tipos celulares mantienen una relación íntima, en la cual las células de Sertoli son las encargadas de regular y proporcionar la entrada de nutrientes, factores de crecimiento y de diferenciación necesarios para las células germinales, a la vez que las protege de agentes dañinos y de su propio sistema inmune. Durante la fase mitótica, ambos tipos celulares aumentan en número. A diferencia de lo que pasa en mamíferos, donde las células de Sertoli proliferan hasta la pubertad; en peces adultos, las células de Sertoli conservan su capacidad proliferativa (Schulz y col., 2005), lo que resulta en un epitelio germinal activo durante toda la vida adulta, o al menos hasta la senescencia (Wootton & Smith, 2014).

El epitelio germinal del testículo de teleósteos presenta tres tipos de arreglo: tubular anastomosado, lobular irrestricto y lobular restricto (Grier, 1993; Parenti & Grier, 2004). En los testículos tubulares anastomosados, el compartimiento germinal forma un sistema de túbulos continuos que se ramifican y se abren en los ductos espermáticos (Figura 2A). En ellos, las espermatogonias y las células de Sertoli se distribuyen a lo largo de los túbulos. A medida que avanza la espermatogénesis, los cistos permanecen en la misma posición y cuando esta finaliza los espermatozoides son liberados al lumen del túbulo. Una vez allí, son transportados hacia los ductos espermáticos. Por su parte, los teleósteos de aparición tardía (Figura 1), incluyendo los que integran el grupo Atherinomorpha (integrado por los órdenes Beloniformes, Cyprinodontiformes y Atheriniformes), exhiben un testículo lobular en el que el epitelio germinal se dispone radialmente desde el centro hacia la periferia formando lóbulos que terminan ciegamente cerca de la túnica albugínea (Figura 2B) (Grier, 1993).



**Figura 2.**

**A)** Testículo tubular anastomosado, en el que el compartimiento germinal forma un sistema tubular continuo.

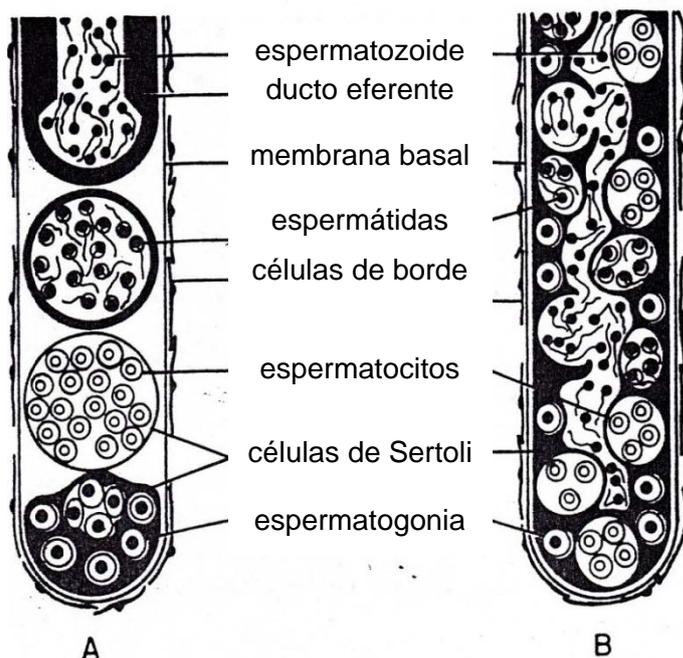
**B)** Testículo lobular, los lóbulos terminan en la periferia.

AT. Túbulos anastomosados; L. lóbulos; MD. Ducto principal. Tomado de Grier (1993).

El tipo testicular lobular puede presentarse como irrestricto o restricto (Figura 3). En el primero, al igual que en el testículo tubular anastomosado, las espermatogonias se encuentran distribuidas a lo largo de todo el lóbulo. Los cistos no migran durante su desarrollo y en el momento de la espermiación los

procesos de las células de Sertoli se separan y el contenido del cisto queda en contacto con la luz del lóbulo liberándose los espermatozoides (Grier, 1981).

Por su parte, en el testículo con distribución “espermatogonial restringida” (lóbulo restricto), las espermatogonias menos diferenciadas están confinadas al extremo distal del lóbulo, cerca de la túnica albugínea, mientras que los cistos con esperma maduro se encuentran cercanos a los ductos espermáticos que están localizados centralmente en el testículo. Existe un ordenamiento creciente de los cistos que migran desde el extremo distal del lóbulo hacia los ductos espermáticos a medida que avanza la maduración. En este tipo de testículo los lóbulos no poseen luz, la espermiación ocurre cuando los cistos se abren liberando a los espermatozoides directamente en los ductos espermáticos (Grier, 1981).



**Figura 3.** Diagrama esquemático de los tipos de arreglos testiculares.

**A)** representación de testículo espermatogonial restringido.

**B)** representación de testículo espermatogonial no restringido.

Tomado de Grier y col. (1980).

La distribución de estos arreglos testiculares en los teleósteos muestra un claro patrón filogenético. Mientras el tipo testicular tubular anastomosado es encontrado en los teleósteos de taxones más primitivos, el tipo lobular es típico de los teleósteos superiores. Además, el tipo lobular restringido es un carácter diagnóstico en Atherinomorpha (Parenti & Grier, 2004).

## ***Espermatogénesis de teleósteos***

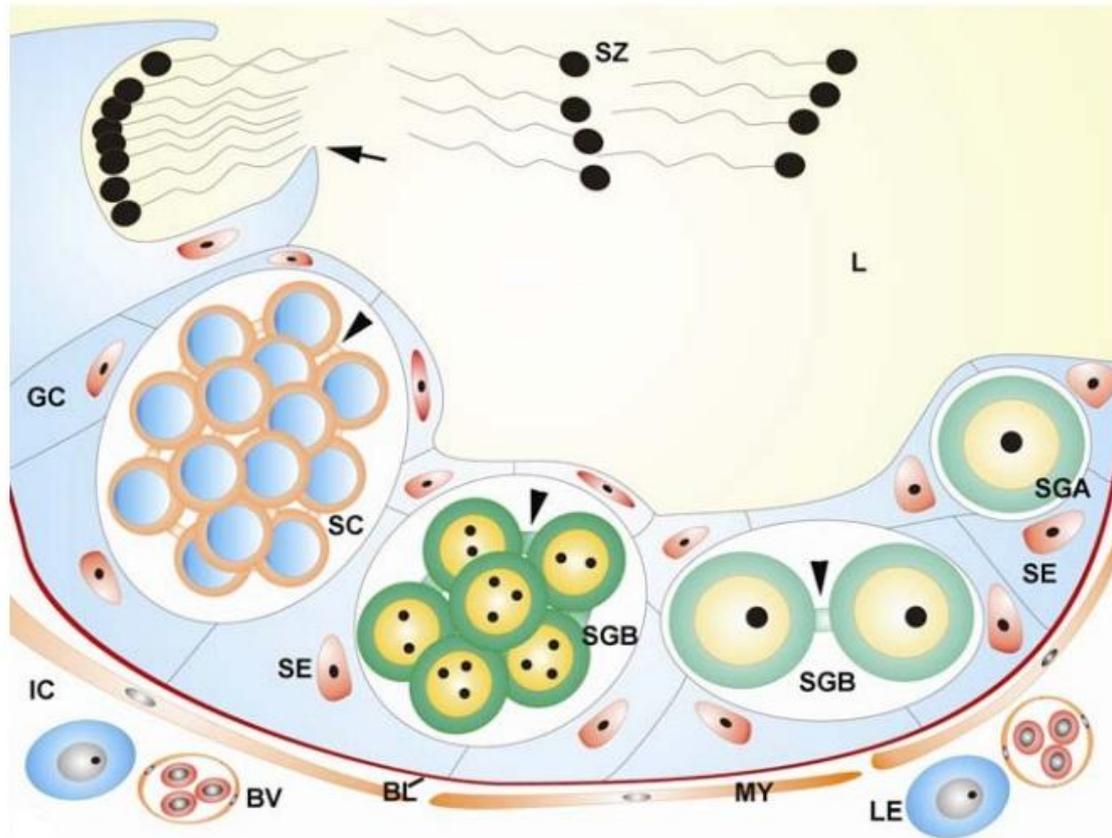
La espermatogénesis es un proceso altamente organizado y coordinado, en el que las espermatogonias (diploides) proliferan y se diferencian formando espermatozoides maduros. En teleósteos, el proceso de espermatogénesis varía dependiendo de la especie y el ambiente que habite, pero está altamente conservado en vertebrados y de modo general puede dividirse en tres etapas principales (Nóbrega, y col., 2009):

- 1) proliferativa o espermatogonial, en la que cada espermatogonia sufre rápidas y sucesivas divisiones mitóticas (produciendo diferentes generaciones de espermatogonias);
- 2) meiótica, en la que el material genético es duplicado, recombinado y segregado (espermatoцитos primarios y secundarios produciendo espermátidas haploides);
- 3) espermiogénica, en la que las espermátidas sufren drásticos cambios morfológicos y funcionales (condensación nuclear y formación del flagelo) dando lugar al espermatozoide

Siguiendo de modo esquemático los criterios propuestos por Schulz y col. (2010), podemos identificar las siguientes etapas de las células germinales: la espermatogonia tipo A indiferenciada (Aind) puede diferenciarse a tipo A diferenciada (Adif) que mantiene algunas características morfológicas similares a la primera (como el material citoplasmático electrodensó ó “nuage”, característico de las células germinales primordiales) pero con una capacidad de autorenovación muy reducida. Una posterior división, da lugar a la espermatogonia B, de la que usualmente hay varias generaciones. El número de generaciones varía entre especies y su cantidad está genéticamente determinada (Rey Vázquez, 2012). La última generación de espermatogonias B, emerge del final de la mitosis y entra en meiosis I pasando a espermatoцитos primarios que carecen de nuage. Al final de la meiosis I emergen los espermatoцитos secundarios que rápidamente pasan por la segunda división meiótica produciendo cuatro espermátidas haploides por cada espermatogonia

que entra en meiosis. Los puentes citoplasmáticos son los responsables del desarrollo sincrónico en el cisto y están presentes desde la primera división espermatogonial hasta las últimas etapas de la espermiogénesis. Finalmente, las espermatidas entran en espermiogénesis, donde sufren importantes rearrreglos morfológicos para dar lugar a la formación de espermatozoides (Figura 4).

La espermiogénesis descrita para *Danio rerio* puede dividirse en cuatro etapas y probablemente es típica de otros teleósteos (Rupik y col., 2011; Wootton & Smith, 2014). Las espermatidas tempranas permanecen unidas por puentes citoplasmáticos. Cada una tiene un núcleo esférico cuya membrana nuclear presenta un surco poco profundo (fosa), localizado hacia el lado del núcleo donde eventualmente se encuentran los centriolos. En la segunda etapa las histonas son sustituidas gradualmente por protaminas (que son sintetizadas en las espermatidas) lo que progresivamente resulta en una mayor compactación de la cromatina, volviéndose la espermatida más pequeña. El centriolo distal forma el cuerpo basal y el flagelo comienza a formarse. En la tercera etapa continúa el proceso de compactación de la cromatina y el flagelo en formación se rodea de mitocondrias. En la cuarta etapa el núcleo presenta forma esférica con cromatina muy condensada. En esta etapa, el exceso de citoplasma es eliminado y fagocitado por las células de Sertoli. Durante la tercera y cuarta etapas, las espermatidas pierden los puentes citoplasmáticos que las mantenían conectadas entre sí, y también su asociación con las células de Sertoli. Al final de la espermiogénesis los cistos se abren, liberando los espermatozoides hacia el lumen. En general, los espermatozoides de teleósteos (principalmente en las especies marinas), no son completamente móviles sino hasta que han sido expuestos al medio acuático externo o al fluido ovárico, aunque los cambios en el pH de los conductos espermáticos durante la maduración final, puede desencadenar un cierto grado de motilidad (Coward y col., 2002).



**Figura 4.** Organización de testículo de peces, esquema de sección transversal. El testículo está dividido en compartimiento germinal (GC) y compartimiento intersticial (IC). El compartimiento germinal presenta células de Sertoli (SE) y células germinales, está delineado por una membrana basal (BL) y células mioides (MY). Se representan espermatogonias A (SGA) y espermatogonias B (SGB); espermatoцитos (SC) y espermatozoides (SZ) que salen a la luz del lóbulo (L) por la apertura del espermatoцisto (flecha). Nótese la presencia de puentes citoplasmáticos a partir de SGB (punta de flecha). En el compartimiento intersticial encontramos las células de Leydig (LE) cercanas a los vasos sanguíneos (BV). (Tomado de Nóbrega, y col., 2009).

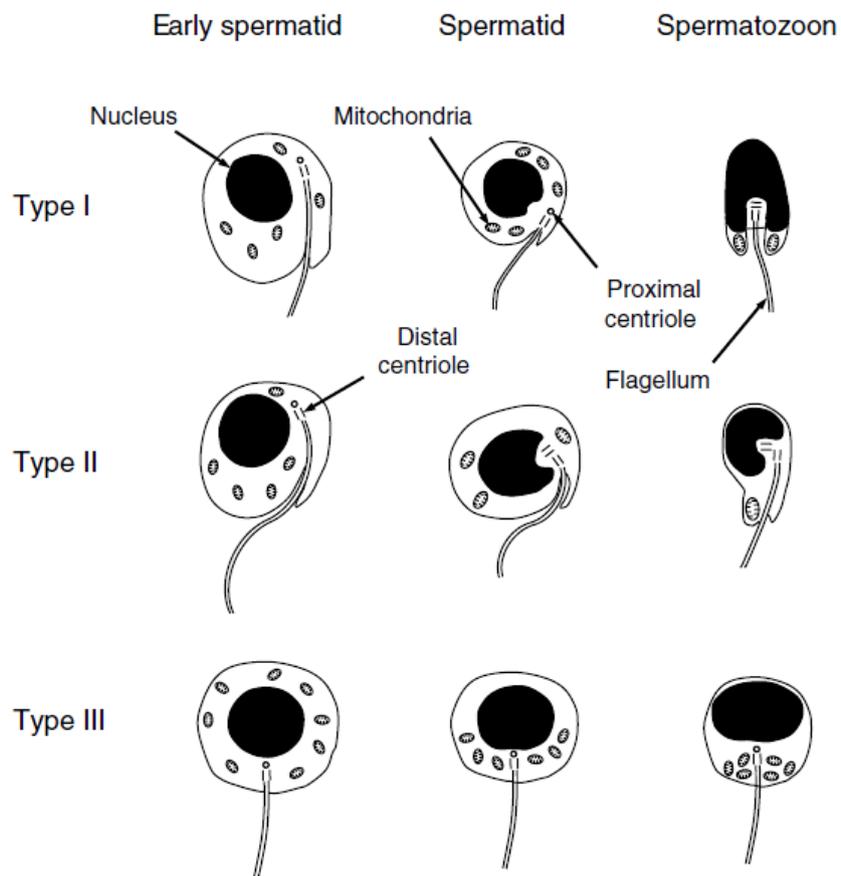
En los teleósteos se han definido tres tipos de espermiogénesis según la posición del flagelo en relación al núcleo (Wootton & Smith, 2014) (Figura 5).

En el tipo I los centriolos migran aproximándose al núcleo, arrastrando tras de sí al flagelo y a la membrana celular, formándose así el canal citoplasmático. En la superficie nuclear se forma una hendidura o fosa y el núcleo gira alrededor de 90° con respecto al axonema del flagelo. Los centriolos se mueven hacia dentro de la fosa, alojándose en ella total o parcialmente. Como

resultado de este mecanismo el eje del flagelo será perpendicular al núcleo (Mattei, 1970).

En el tipo II no hay rotación nuclear. Los centriolos migran en la dirección del núcleo pero no entran en la fosa y el flagelo resulta paralelo al núcleo (Mattei, 1970).

En la espermiogénesis de tipo III el flagelo es central, no hay rotación nuclear, tampoco hay formación de fosa nuclear ni de canal citoplasmático. (Quagio-Grassiotto & Oliveira, 2008).



**Figura 5.** Diagramas de los tipos I, II y III de espermiogénesis. Tomado de (Wootton & Smith, 2014).

## ***El espermatozoide de teleósteos***

La estructura espermática ha sido estudiada solo en un número limitado de especies de teleósteos. A pesar de ello revela una alta diversidad morfológica, principalmente entre familias sistemáticas. La diversidad se refleja en la forma de la región de la cabeza; el número, forma y localización de las mitocondrias; la forma y tamaño de la fosa nuclear; el arreglo de los centríolos y la ocurrencia de estructuras especiales de estabilización centriolar como microfilamentos o material electrondenso; o el número, longitud y estructura del flagelo. En este aspecto, existen varias revisiones detalladas tratando dicha divergencia estructural (Baccetti, 1991; Jamieson, 1991; Mattei, 1991).

### **Morfología espermática**

En el espermatozoide de peces teleósteos, como en otros vertebrados, pueden reconocerse tres regiones: cabeza, pieza media, y cola. La forma de la cabeza del espermatozoide es variable aunque más pequeña que en peces condriictios. El “complejo centriolar” está formado por el centríolo proximal y el distal. Generalmente se ubica en la región de la fosa nuclear dónde a menudo existen estructuras de estabilización que anclan el flagelo a la cabeza. La pieza media también es más pequeña que en condriictios, contiene un número variable de mitocondrias y está delimitada por una invaginación de la membrana plasmática ó “canal citoplasmático” el cual separa las mitocondrias del flagelo. El citoesqueleto flagelar ó axonema presenta un patrón de 9+2 pares de microtúbulos. La membrana plasmática que lo recubre puede expandirse lateralmente formando aletas. (Wootton & Smith, 2014)

El espermatozoide de teleósteos se diferencia del resto de los espermatozoides de vertebrados en que carece de acrosoma. Esta no es una característica exclusiva de teleósteos, ya que abarca a todos los peces que integran la subclase Neopterygii. La ausencia de acrosoma es una adaptación funcional a la presencia de un micropilo en el ovocito. Esta particularidad estructural es el único rasgo en común que presentan los espermatozoides en este grupo sistemático (Lahnsteiner & Patzner 2008).

De las revisiones realizadas por Jamieson, 1991 y Mattei, 1991; surgen algunas clasificaciones generales de espermatozoides.

### **Introsperma & Aquasperma (Jamieson, 1991)**

Según se trate de peces de fecundación interna o externa, los espermatozoides de teleósteos pueden dividirse en dos grupos. Las especies con fecundación interna, generalmente tienen un espermatozoide llamado “introsperma” (Jamieson, 1991), caracterizado por presentar un núcleo elongado y una pieza media relativamente grande con numerosas mitocondrias. Sin embargo existen algunas especies de peces de fecundación interna que exhiben la morfología espermática típica de especies con fecundación externa, como los espermatozoides descritos hasta ahora para la familia Goodeidae.

Las especies con fecundación externa tienen una organización espermática más simple y son clasificados como “aquasperma” (Jamieson, 1991). En su mayoría presentan un núcleo ovoide o esférico de menor tamaño que en introsperma. La pieza media es también más pequeña y contiene solo unas pocas mitocondrias (la mayoría de 1-6). Dicho espermatozoide puede ser mono o biflagelado (Lahnsteiner & Patzner 2008).

### **Espermatozoides primitivos y evolucionados (Mattei, 1988)**

Mattei (1988) clasificó los espermatozoides de teleósteos como primitivos o evolucionados.

De acuerdo a lo planteado por Mattei, el espermatozoide primitivo resulta de una espermiogénesis simple. En la espermátida temprana, el centriolo distal da lugar al flagelo a medida que el diplosoma se mueve dentro del citoplasma hacia la futura base del núcleo. Debido a que el centriolo distal está unido a la membrana celular, la membrana se retrae hacia adentro dando lugar a la

formación del canal citoplasmático. Una rotación posterior genera el eje flagelar que estará ubicado perpendicular a la base del núcleo, mientras las mitocondrias se agregan alrededor de la base del flagelo. Esta morfología del espermatozoide muestra variaciones: los centríolos pueden ubicarse a mayor o menor profundidad dentro de la fosa nuclear. A nivel del aparato flagelar, la membrana plasmática del flagelo puede extenderse formando estructuras aplanadas (aletas laterales). Estas variaciones pueden encontrarse aún dentro de una misma familia (Arezo y col., 2007).

El espermatozoide evolucionado por su parte, sería el resultado de modificaciones ocurridas durante el curso de la espermiogénesis, haciéndose principalmente evidentes en la estructura del aparato flagelar. Dentro del grupo de espermatozoides evolucionados encontramos:

- espermatozoide con un mitocondrion, (formado por fusión mitocondrial);
- espermatozoide aflagelado;
- espermatozoide biflagelado, (ambos centriolos forman flagelo);
- espermatozoide de cabeza elongada;
- espermatozoide con flagelo lateral (no se produce rotación nuclear, resultando el eje flagelar paralelo al núcleo).

Además, muchos de estos espermatozoides presentan diferentes patrones de diferenciación intratubular (ITD).

Los diferentes patrones de espermiogénesis así como las variaciones en la estructura espermática están conservadas dentro de los taxones, por lo que es de utilidad su empleo en análisis filogenéticos (Jamieson, 1991).

## **ORDEN CYPRINODONTIFORMES**

El orden Cyprinodontiformes comprende dos subórdenes que incluyen diez familias con 109 géneros y aproximadamente 1013 especies (Nelson, 2006).

### **Suborden Cyprinodontoidei**

Familias:

- Anablepidae
- Cyprinodontidae
- Fundulidae
- Goodeidae
- Poeciliidae
- Profundulidae
- Valenciidae

### **Suborden Aplocheiloidei**

Familias:

- Aplocheilidae
- Nothobranchiidae
- Rivulidae

La mayoría presenta fecundación externa, mientras que la fecundación interna está presente en algunos miembros pertenecientes a cuatro familias: Rivulidae, Goodeidae, Anablepidae y Poeciliidae (Evans & Meisner, 2009).

La fecundación en especies con introesperma se da, generalmente, a través de estructuras especializadas, presentes tanto en machos como en hembras (ej, gonopodio y gonoporo). Gracias a estas adaptaciones, el macho transfiere un paquete de espermatozoides al interior de la hembra, dicho paquete puede presentar una membrana que lo recubre (espermatóforo) o carecer de ella (espermatozeugma) (Kunz, 2004).

## ***Estructura testicular***

De acuerdo con el trabajo de Grier y col. (1980) sobre la organización testicular de los peces teleósteos, Rosen & Parenti (1981) describieron el tipo testicular lobular restringido como un carácter diagnóstico de los peces atherinomorfos. Hasta ahora, esta estructura testicular ha sido ratificada en al menos 79 especies de atherinomorfos que integran sus tres órdenes. De éstos, 27 especies pertenecen al orden Cyprinodontiformes (Parenti & Grier, 2004).

## ***El espermatozoide***

El porcentaje de especies de Cyprinodontiformes cuyo espermatozoide ha sido caracterizado, al menos en parte, es bajo y generalmente se limita a especies de interés comercial o científico. A pesar de ello, las descripciones existentes abarcan una buena cantidad de familias pertenecientes a este orden. Sin embargo, el nivel de detalle alcanzado en el análisis de las características subcelulares en dichas descripciones es muy dispar, existiendo algunos artículos científicos en los que se hace una descripción exhaustiva de la anatomía espermática de una especie y otros en los que se analiza exclusivamente la estructura y disposición del flagelo. Por consiguiente, resulta particularmente complejo sistematizar la información disponible hasta el momento.

De acuerdo a la bibliografía disponible actualmente sobre este tema, se sabe que los espermatozoides de especies pertenecientes a una misma familia, pueden compartir características ultraestructurales tales como el grado y forma de compactación de la cromatina, la forma final del núcleo, el número y disposición de las mitocondrias en la pieza media, el número de flagelos y el número de aletas flagelares (Jamieson, 1991). Esto también ocurre a nivel de las células de la línea germinal. Como se mencionó antes, el número de divisiones mitóticas de las espermatogonias varía según el grupo filogenético de la especie en estudio. En este sentido, algunas investigaciones estereológicas muestran que en Cyprinodontiformes las espermatogonias sufren diez divisiones mitóticas (Nóbrega y col., 2009).

Este orden pertenece a la subclase Neopterygii y la infraclase Teleostei, por lo tanto, los espermatozoides de todas las especies (hasta ahora estudiadas) pertenecientes a Cyprinodontiformes poseen las características generales mencionadas antes.

## **Suborden Cyprinodontoidei**

### **Anablepidae**

Comprende 3 géneros y 15 especies distribuidas en aguas dulces y salobres desde el sur de México hasta el sur de Sudamérica (Nelson, 2006). Los géneros *Jenynsia* y *Anableps* son vivíparos (Evans & Meisner, 2009).

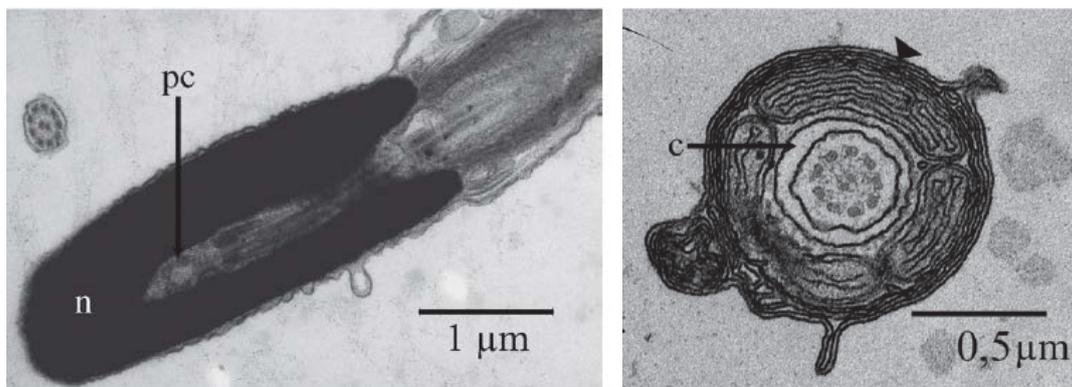
Se ha descrito la ultraestructura espermática para dos especies: *Anableps anableps* y *Jenynsia lineata*.

Ambas especies presentan fecundación interna y sus espermatozoides comparten algunas características de su morfología ultraestructural. El espermatozoide posee cabeza y núcleo elongados y una fosa nuclear profunda en la que se alojan los dos centriolos. La pieza media está conformada por mitocondrias modificadas cuyas crestas se observan paralelas en las secciones ultrafinas. El canal citoplasmático separa físicamente al collar mitocondrial del axonema. Entre la hoja mitocondrial y el canal citoplasmático hay una red submitocondrial de filamentos. Presentan un flagelo único cuyo axonema posee el patrón clásico de 9+2 dobletes de microtúbulos. La membrana plasmática que rodea el flagelo se expande lateralmente formando estructuras membranosas similares a aletas (Jamieson, 1991).

En *Anableps anableps*, el espermatozoide maduro mide alrededor de 40  $\mu\text{m}$  de longitud y consiste de una cabeza elongada (aprox. 3.4  $\mu\text{m}$ ), una pieza media relativamente larga (3.9  $\mu\text{m}$ ) y flagelo de aprox. 32.6  $\mu\text{m}$ . En el núcleo la cromatina se organiza formando acúmulos granulares electrondensos grandes y numerosos. La fosa nuclear es profunda, de posición axial, y su longitud alcanza por lo menos la mitad de la longitud nuclear. Dentro de la fosa se alojan ambos centriolos, los cuales presentan un arreglo en ángulo recto entre

sí. El extremo anterior del centriolo distal está embebido en un anillo de material osmiofílico. La pieza media contiene hileras longitudinales de 2 o 3 mitocondrias modificadas con crestas paralelas. El canal citoplasmático separa el collar mitocondrial del axonema (Figura 6). Desde el extremo posterior del núcleo y extendiéndose a lo largo de la pieza media se encuentran hileras de microtúbulos periféricos, para los que se ha propuesto una posible función estabilizadora. (Greven & Schmahl, 2006).

En el espermatozoide de *Jenynsia lineata* la pieza media contiene una hoja mitocondrial formada por mitocondrias fusionadas con crestas paralelas. Entre la hoja mitocondrial y el canal citoplasmático que la separa del axonema, hay una red submitocondrial que consiste de filamentos encerrados entre dos membranas. Los filamentos están separados por una distancia constante de alrededor de 3 Å y forman un patrón regular tridimensional (Dadone & Narbaits, 1967).

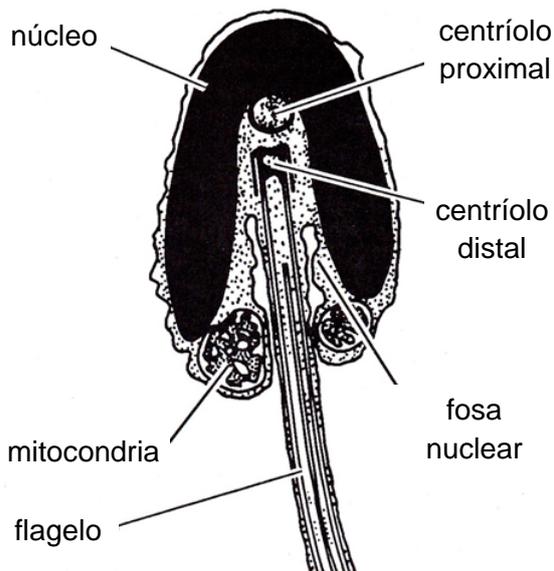


**Figura 6.** Micrografía electrónica de transmisión del espermatozoide de *Anableps anableps*. A la izquierda, corte longitudinal mostrando la cabeza y la pieza media; a la derecha corte transversal de la pieza media mostrando las mitocondrias, el axonema y el canal citoplasmático. pc = centriolo proximal, n = núcleo, c = canal citoplasmático, cabeza de flecha: membrana. Tomado de Greven y Schmahl, 2006.

## Fundulidae

Familia de peces con reproducción ovípara que habitan América del Norte, Bermudas y Cuba. Presenta cuatro géneros con aproximadamente 50 especies (Nelson, 2006).

La ultraestructura espermática de esta familia ha sido descrita únicamente para *Fundulus heteroclitus*. En esta especie, la cabeza del espermatozoide es ligeramente ovoide y aplanada, de 1.3  $\mu\text{m}$  de ancho, 1.0  $\mu\text{m}$  de espesor y 2.25  $\mu\text{m}$  de largo, con la región anterior ligeramente más gruesa que la posterior (Brummett y Dumont, 1979). El núcleo es uniformemente denso y en su sección longitudinal tiene forma de herradura determinada por una fosa nuclear profunda que aloja a los dos centriolos (Yasuzumi, 1971; Selman y Wallace, 1986). El punto de inserción del flagelo está rodeado por un collar de unas pocas mitocondrias muy grandes (Figura 7). El axonema tiene el patrón clásico de 9+2 pares de microtúbulos. El flagelo mide de 30-50  $\mu\text{m}$  de longitud y presenta dos aletas flagelares (Jamieson, 1991).



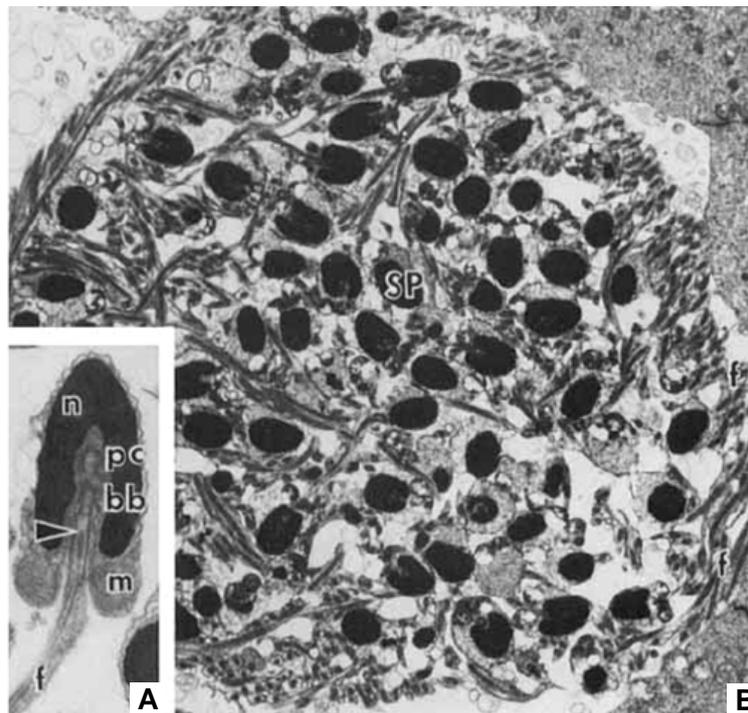
**Figura 7.** Diagrama de la sección longitudinal de *Fundulus heteroclitus*.

Tomado de Jamieson, 1991

## Goodeidae

Esta familia comprende 18 géneros con aproximadamente 40 especies de las cuales la mayoría presenta fecundación interna y es vivípara. Se distribuyen en las aguas dulces de México y Nevada, Estados Unidos (Nelson, 2006). En esta familia se ha reportado la formación de spermatozeugmata (Grier, 1981).

El espermatozoide maduro ha sido descrito para 4 especies: *Ameca splendens*, *Ataenobius toweri*, *Characodon lateralis* y *Senotoca eiseni* (Grier y col., 1978). Presenta cabeza con núcleo ligeramente elongado, donde la fosa nuclear aloja al complejo centriolar. La pieza media consiste de un solo anillo de mitocondrias localizado detrás del núcleo. El flagelo consta de un axonema con la clásica conformación de 9+2 pares de microtúbulos. La membrana plasmática que lo rodea se pliega formando dos aletas laterales (Figura 8). (Grier y col., 1978; Jamieson, 1991).



**Figura 8.** A. Micrografía electrónica del espermatozoide maduro de *Characodon lateralis* x10400. n = núcleo, pc = centriolo proximal, bb = cuerpo basal, m = mitocondria, f = flagelo, flecha = par central de microtúbulos. B. Micrografía electrónica de espermatozeugmata de *Ameca splendens* x3300. SP = espermatozoide, f = flagelo. Modificada de Grier y col. 1978.

## Poeciliidae

Habitán agua dulce y salobre desde Estados Unidos al sur de América del Sur y también en África. Posee 37 géneros con 304 especies (Nelson 2006). Todos los pecílidos son vivíparos a excepción de *Tomeurus gracilis* (Kunz, 2004). Al igual que en goodeidos, en esta familia también se ha reportado la formación de spermatozeugmata; mientras en Goodeidae el flagelo de los espermatozoides se ubica en la superficie del espermatozeugmata, en Poeciliidae los espermatozoides se ubican con su núcleo hacia la superficie del espermatozeugmata (Grier, 1981; Grier y col., 2005; Vicentini y col., 2010).

El espermatozoide maduro ha sido ampliamente descrito para las siguientes especies: *Gambusia affinis* (Grier, 1975), *Poecilia latipinna* (Grier, 1973), *Poecilia reticulata* (Asai, 1971; Billard y col., 1970) y *Xiphophorus helleri* (Jonas-Davies et al., 1983); mientras que para: *Poropanchax normani* (= *Aplocheilichthys normani*) y *Procatopus lamberti* (= *Aplocheilichthys lamberti*) (Thiaw y col., 1986) y *Phalloceros caudimaculatus* (Vicentini y col., 2010) la descripción ha sido únicamente flagelar.

Dentro de la familia Poeciliidae, la cabeza (y por lo tanto el núcleo) de todas las especies descritas hasta el momento, tiene forma de cono alargado y la cromatina está fuertemente condensada. Basalmente el núcleo es redondeado y levemente más estrecho (Figura 9). La longitud reportada para el núcleo es relativamente uniforme entre las diferentes especies: 3,5  $\mu\text{m}$  en *Gambusia affinis* y 3,7  $\mu\text{m}$  en *Poecilia reticulata* y *Xiphophorus helleri*. Las observaciones al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) reportan una fosa profunda que ocupa aproximadamente el tercio posterior del núcleo, y aloja al cuerpo basal y a la región anterior del axonema.

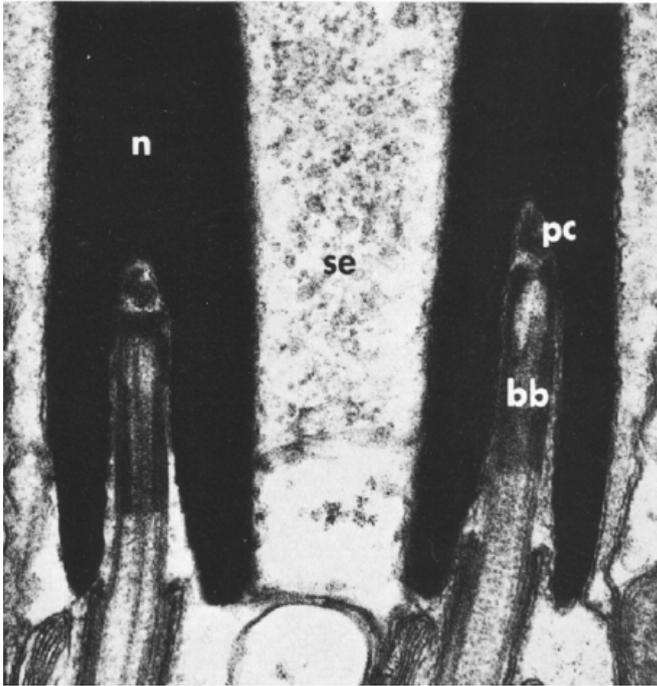
La pieza media en algunas de las especies estudiadas parece contener muchas mitocondrias separadas en hileras longitudinales (Mizue, 1969). Este arreglo longitudinal de mitocondrias, con crestas longitudinales, ha sido descrito para *X. helleri* (Jonas-Davies y col., 1983), *G. affinis*; *P. latipinna* y *P. reticulata* (Jamieson, 1991). En estas especies las mitocondrias se apoyan en un largo cilindro citoplasmático (8  $\mu\text{m}$  en *P. reticulata*) que reviste al axonema

pero que se encuentra separado del mismo por el canal citoplasmático (Jamieson, 1991). En sección longitudinal del axonema, las mitocondrias aparecen dispuestas a cada lado del axonema existiendo aproximadamente entre 7 y 8 hileras. En sección transversal puede observarse que cada hilera mitocondrial presenta forma de C y posee dos a cuatro mitocondrias que abrazan al axonema. Las mitocondrias exhiben varias crestas dispuestas regularmente, todas paralelas a las membranas mitocondriales interna y externa.

De los dos centriolos de la espermatida, solo el centriolo distal del cuerpo basal del flagelo, persiste intacto en el espermatozoide maduro en *Gambusia affinis*, *Poecilia latipinna*, *Poecilia reticulata* y *Xiphophorus helleri* (Jamieson, 1991).

Estas 4 especies presentan, al igual que *Phalloceros caudimaculatus*, *Poropanchax normani* y *Procatopus lamberti*, un flagelo con la estructura axonémica clásica de 9+2 pares de microtúbulos, que en *P. reticulata* es de 45.76 µm de largo (Skinner & Watt, 2007). En *Gambusia affinis*, *Poecilia latipinna*, *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus helleri*, *Poropanchax normani* y *Procatopus lamberti* la membrana plasmática que rodea al flagelo, forma dos aletas laterales que son muy cortas y en las primeras cuatro especies raramente igualan el ancho del axonema (Thiaw y col., 1986; Jamieson, 1991). En el extremo posterior del flagelo las aletas laterales se pierden, el par central de microtúbulos del axonema desaparece y los dobletes periféricos se aproximan a la membrana plasmática (Jamieson, 1991).

Tanto el núcleo alargado como las largas hojas mitocondriales de estos pecílidos son características de espermatozoides de fecundación interna (Nicander, 1968).



**Figura 9.** Micrografía electrónica de transmisión de la cabeza de dos espermatozoides maduros de *Gambusia affinis* rodeados por una célula de Sertoli (se). Se observa un núcleo compacto (n); cuerpo basal (bb); vestigios el centriolo proximal (pc). x34.800 Tomada de Grier, 1975.

## Suborden Aplocheiloidei

### Aplocheilidae

Son peces de agua dulce que habitan Madagascar, Seychelles, subcontinente Indio, Sri Lanka y archipiélago Indo-Malayo. Esta familia está integrada por dos géneros y al menos siete especies (Nelson 2006).

Solo existe una descripción parcial de la estructura flagelar del espermatozoide de *Aplocheilus lineatus*. Esta especie presenta un espermatozoide cuyo axonema muestra el arreglo clásico de 9+2 pares de microtúbulos, sin diferenciación intratubular y sin brazos externos en los dobletes. La membrana plasmática que lo recubre puede presentar 1 o 2 aletas flagelares, siendo más frecuentes los espermatozoides con 2 aletas (Thiaw y col., 1986).

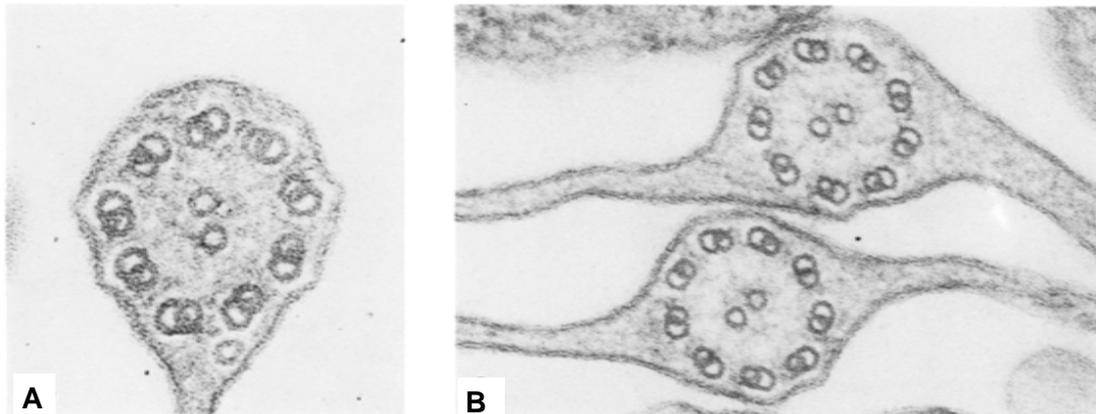
## Nothobranchiidae

Habitán agua dulce en África continental, desde el sur del Sahara hasta Sudáfrica. Integrada por más de 250 especies distribuidas en al menos seis géneros (Nelson 2006).

Para esta familia solo se encuentran descripciones del flagelo espermático para las siguientes especies: *Aphyosemion guignardi* (= *Scriptaphyosemion guignardi*), *Aphyosemion nigriflavi* (= *Scriptaphyosemion guignardi*), *Aphyosemion herzogi*, *Aphyosemion riggenbachi*, *Aphyosemion spelndopleure*, *Epiplatys ansorgii*, *Epiplatys bifasciatus*, *Epiplatys chaperi*, *Epiplatys fasciolatus*, *Fundulusoma thierryi* (= *Nothobranchius thierryi*) y *Nothobranchius steinforti* (Thiaw y col., 1986).

El espermatozoide de todas ellas presenta un axonema clásico del tipo 9+2. A excepción de lo observado en *Aphyosemion guignardi*, todos los axonemas presentan los brazos externos de dineína en los dobletes. *Fundulusoma thierryi* y *Aphyosemion spelndopleure* presentan diferenciación intratubular (ITD) en todos los tubulos A del axonema (Figura 10). En *A. riggenbachi* los túbulos A de los dobletes 1, 5 y 6 presentan ITD; en *Nothobranchius steinforti* se observa ITD en todos los tubulos B y en el par central. El resto de las especies no presenta diferenciación intratubular.

El espermatozoide de *Aphyosemion guignardi*, *Aphyosemion nigriflavi* y *Fundulusoma thierryi* presenta una sola aleta flagelar. En *Aphyosemion riggenbachi*, *A. spelndopleure* y *Nothobranchius steinforti* en cambio, es posible encontrar espermatozoides con 1 o 2 aletas flagelares en frecuencias similares. Si bien en *Fundulusoma thierryi* y *Epiplatys ansorgii* puede observarse 1 ó 2 aletas, hay predominancia de 1 aleta flagelar. Por último, únicamente en tres especies: *Epiplatys bifasciatus*, *Epiplatys chaperi* y *Epiplatys fasciolatus* se observó la presencia de 1, 2 o 3 aletas laterales, con una predominancia de 2 aletas en todos los casos. (Thiaw y col., 1986).



**Figura 10.** **A.** Corte transversal del flagelo del espermatozoide maduro de *Fundulusoma thierryi* x180.000. Se observa ITD en todos los túbulos A y una sola aleta. **B** Corte transversal del flagelo del espermatozoide maduro de *Aphyosemion spelndopleure* x120.000. Se observa ITD en todos los túbulos A y dos aletas laterales. Tomada de Thiaw y col., 1986.

### Rivulidae

Comprende 28 géneros y por lo menos 236 especies distribuidas en las aguas dulces del sur de la Florida en Estados Unidos, a través de América Central hasta Uruguay (Nelson 2006).

Existen descripciones de la ultraestructura espermática para las siguientes especies de esta familia: *Austrolebias charrua*, *Austrolebias reicherti*, *Austrolebias viarius*, *Cynolebias wittei* (= *Nematolebias wittei*), *Rivulus marmoratus* (= *Kryptolebias marmoratus*) y *Rivulus punctatus* (= *Melanorivulus punctatus*).

Todas las especies descritas presentan cabeza esférica pequeña, pieza media corta con pocas mitocondrias y un único flagelo cuyo axonema muestra la estructura clásica de 9+2 pares de microtúbulos. La membrana plasmática que lo recubre presenta aletas flagelares (Figura 11).

La pieza media de *Austrolebias charrua* contiene mitocondrias redondeadas arregladas en una sola capa alrededor del axonema. Es posible observar distinto número de aletas flagelares en los espermatozoides de un mismo ejemplar, pudiendo encontrarse flagelos con 2, 3 o 4 aletas laterales a lo largo

de toda su longitud (Arezo y col. 2007). Mientras tanto, en *A. reicherti* y *A. viarius* los flagelos presentan predominancia en la ocurrencia de dos aletas pero ocasionalmente presentan tres. (García y col. 2009). *Cynolebias wittei* presenta indistintamente una o dos aletas flagelares (Thiaw et al, 1986).

Para *Rivulus marmoratus* y *Rivulus punctatus* la información disponible es más completa.

El espermatozoide de *R. marmoratus* ha sido descrito por Kweon y col. (1998). La cabeza tiene alrededor de 1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro. En su interior el núcleo presenta la cromatina dispuesta en acúmulos grandes y densos.

La fosa nuclear de posición axial, posee una longitud que puede alcanzar la mitad del diámetro nuclear y aloja al centriolo proximal. El centriolo distal se localiza fuera de ésta, en la base de la cabeza. Ambos centriolos presentan la fórmula microtubular 9+0 y se orientan formando un ángulo de 45° entre sí. Una red de microfibrillas conecta el centriolo proximal con el núcleo, mientras que el extremo anterior del centriolo distal está rodeado por un anillo de material osmiofílico.

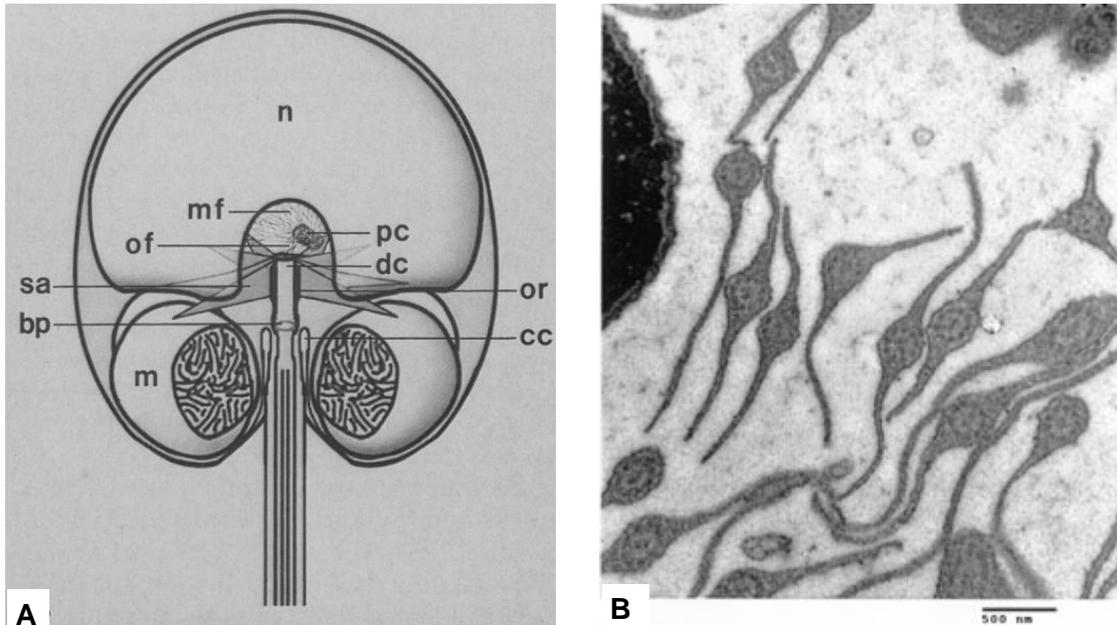
La pieza media contiene siete mitocondrias de tamaño similar formando un collar que rodea la base del flagelo y está separada de éste por el canal citoplasmático.

El flagelo mide aproximadamente 26  $\mu\text{m}$  de longitud. Su axonema presenta oclusión en los túbulos A de los dobletes 1, 5 y 6. La membrana plasmática que lo reviste, forma dos aletas laterales que están ausentes en la porción caudal y proximal del flagelo. (Kweon y col. 1998).

*R. punctatus* también posee núcleo con cromatina homogenamente condensada, formando acúmulos interrumpidos por áreas electronlúcidas.

La fosa nuclear está localizada medial al núcleo, presenta forma de arco y aloja al centriolo proximal. Al igual que en *R. marmoratus* el centriolo distal se encuentra fuera de la fosa y está rodeado por un anillo de fibras electrondensas.

La pieza media es simétrica y en su región apical presenta un anillo de cinco mitocondrias esféricas dispuestas en una sola capa y el annulus o anillo de Jensen (estructura electrodensa que delimita el inicio del flagelo), mientras que en la región basal presenta varias vesículas. (Cassel y col. 2014)



**Figura 11. A.** Diagrama esquemático de la organización del espermatozoide de *Rivulus marmoratus*. bp = placa basal, cc = canal citoplasmático, dc = centriolo distal, m = mitocondria, mf = microfibrillas, n = núcleo, of = filamento osmiofílico, or = anillo osmiofílico, pc = centriolo proximal, sa = aparatos satelitales. Tomado de Kweon y col. 1998. **B.** Micrografía electrónica de transmisión del corte transversal de flagelos espermáticos de *Austrolebias reicherti*. Tomada de García y col. 2009.

## CONSIDERACIONES FINALES

En síntesis: hasta el presente, solamente se ha descrito el espermatozoide completo de cinco de las diez familias pertenecientes al orden Cyprinodontiformes. De otras tres, solo se dispone de información ultraestructural parcial, referida en todos los casos al flagelo. De las familias Profundulidae y Valenciidae no fue posible hallar publicaciones referidas a este tema, a pesar de haberse realizado una exhaustiva búsqueda bibliográfica.

Sin embargo, los datos recabados me permitieron sistematizar la información disponible, teniendo en cuenta las características ultraestructurales compartidas y diferenciales del espermatozoide que ha sido descrito para algunas especies de las familias correspondientes a dicho orden. La tabla 1 resume la información ultraestructural general de los espermatozoides pertenecientes a las familias de Cyprinodontiformes para las que existe una descripción completa, y da una idea aproximada de las diferencias y similitudes existentes entre espermatozoides de diferentes familias. Si bien las características y medidas reportadas en ella pertenecen a una sola especie, coinciden con las descritas para las demás especies de esa familia.

**Tabla 1.** Familias para las que existe descripción de espermatozoide completo y esquema general de la cabeza y la pieza media de espermatozoides maduros.

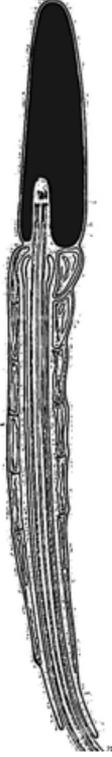
-- sin datos reportados

\* Modificado de Billard y col., 1970.

\*\* Modificado de Kweon y col., 1998.

En los esquemas se refleja las proporciones aproximadas de tamaño para cada espermatozoide.

**Tabla 1.**

Familia	Anablepidae	Fundulidae	Goodeidae	Poeciliidae	Rivulidae
<b>Cabeza</b>					
Largo en $\mu\text{m}$	3.4	2.25	--	3.7	1.8
Forma	Elongada	Ovoide y aplanda	Ligeramente elongada	Cono alargado	Esférica
Fosa nuclear	Profunda	Profunda	Profunda	Profunda	Poco profunda
<b>Pieza media</b>					
Largo en $\mu\text{m}$	3.9	--	--	8	--
mitocondrias	Varias hileras	Una hilera	Una hilera	Varias hileras	Una hilera
<b>Flagelo</b>					
Largo en $\mu\text{m}$	32.6	30-50	--	45	26
Axonema	9+2	9+2	9+2	9+2	9+2
Aletas	si	si	si	si	si
	--	2	--	2	1,2 ,3 o 4
					
				*	**

## BIBLIOGRAFÍA

**Arezo, M. J., D'Alessandro, S., Papa, N., De Sà, R., & Berois, N.** (2007). Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell*, 39(2), 89-98.

**Asai, T.** (1971). Fine structure of centriolar complex in spermiogenesis of the viviparous teleost fish *Lebistes reticulatus*. *J. Nara Med. Assoc*, 22, 371-382.

**Baccetti, B.** (1991). *Comparative spermatology 20 years after*. Raven Press.

**Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., ... & Guiguen, Y.** (2014). The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature communications*, 5.

**Billard, R., Escaffre, A. M., & Tramasaygues, N.** (1970). La spermatogénèse de *Poecilia reticulata*. IV—La spermiogénèse. Etude ultrastructurale. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 10, No. 3, pp. 493-510). EDP Sciences.

**Brummett, A. R. & Dumont, J. N.** (1979). Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Zoology*, 210(3), 417-433.

**Cassel, M., Ferreira, A., & Mehanna, M.** (2014). Ultrastructural features of spermatogenesis in *Melanorivulus punctatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Micron*, 62: 1-6.

**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.

**Dadone, L. & Narbaitz, R.** (1967). Submicroscopic structure of spermatozoa of a cyprinodontiform teleost, *Jenynsia lineata*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 80(2), 214-219.

**Evans, J.P. & Meisner, A.D.** (2009). Copulatory structures: taxonomic overview and the potential for sexual selection. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Chapter 4: 138–180. Enfield: Science Publishers. Jamieson, B.G.M., Ed.

**García, G., Loureiro, M., Berois, N., Arezo, M. J., Casanova, G., Clivio, G., & Olivera, A.** (2009). Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(3): 620-635.

**Greven, G., & Schmahl, G.** (2006). A note on the spermatozoon ultrastructure of the four-eyed fish *Anableps anableps* (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes). *Z. Fischkunde*, 83-88.

**Grier, H. J.** (1973). Ultrastructure of the testis in the teleost *Poecilia latipinna*: Spermiogenesis with reference to the intercentriolar lamellated body. *Journal of ultrastructure research*, 45(1), 82-92.

**Grier, H. J.** (1975). Spermiogenesis in the teleost *Gambusia affinis* with particular reference to the role played by microtubules. *Cell and tissue research*, 165(1), 89-102.

**Grier, H.J.** (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am. Zool.* 21, 345–357.

**Grier, H. J.** (1993). Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In L. D. Russell, and M. D. Griswold (eds.), *The Sertoli cell*, pp. 704–730. Cache River Press, Clear-water, Florida.

**Grier, H.J.; J. M. Fitzsimons & J. R. Linton** (1978). Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in goodeid teleosts. *J. Morph.* 156:419-438.

**Grier H. J., Linton J. R., Leatherland J. F& De Vlaming V. L.** (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am J Anat*, 159:331–345.

**Grier, H. J.; Uribe, M. C.; Paretni, L. R. & De la Rosa-Cruz, G.** (2005). *Fecundity, the germinal epithelium, and folliculogenesis in viviparous fishes.* pp.191-226 In: Uribe, M. C. & Grier, H. J. (eds.). *Viviparous fishes.* Florida, New Life Publication Homestead.

**Jamieson, B.G.M.** (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa.* Chapter 5 and 17. Cambridge University Press, Cambridge.

**Jonas-Davies, J.A.C., Winfrey, V and Olson, G.E.** (1983). Plasma membrane structure in spermatogenic cells of the swordtail (Teleostei, Xiphophorus helleri). *Gamete Research* 4, 309-324.

**Kunz, Y. W.** (2004). *Developmental biology of teleost fishes* (Vol. 28). Chapter 8: 131-146. Springer Science & Business Media.

**Kweon, H. S., Park, E. H., & Peters, N.** (1998). Spermatozoon ultrastructure in the internally self-fertilizing hermaphroditic teleost, *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Copeia*, 4:1101-1106.

**Lahnsteiner, F. & Patzner, R. A.** (2008). Sperm morphology and ultrastructure in fish. *Fish spermatology*, Chapter 1: 1-61. Alavi, S.M.H. et al. Eds.

**Mattei, X.** (1970). Spermio-genése comparé des poisson. In: Baccetti, B. (Ed.), *Comparative Spermatology.* Academic Press, New York, pp. 57–72.

**Mattei, X.** (1988). The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. *Biol. Cell* 63: 151-158.

**Mattei, X.** (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 69(12), 3038-3055.

**Mizue, K.** (1969). Electronmicroscopic study on spermiogenesis of black sailfin molley, *Mollienesia latipinna* Le Sverp. *Bulletin Faculty of Fisheries, Nagasaki University* 25, 9-24.

**Nelson, J. S.** (2006). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.

**Nicander, L.** (1968). Gametogenesis and the ultrastructure of germ cells in vertebrates. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress on Artificial Reproduction in Animals, Paris* 1, 89-107.

**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 Physiol. Biochem.* 35, 197–206.

**Parenti, L. R., & Grier, H. J.** (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44(5), 333-348.

**Quagio-Grassiotto, I., & Oliveira, C.** (2008). Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 247(1), 55-66.

**Rey Vázquez, G.** (2012). Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_5165\\_ReyVazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5165_ReyVazquez.pdf)

**Rosen, D. E. & L. R. Parenti.** (1981). Relationships of *Oryzias*, and the groups of atherinomorph fishes. *Amer. Mus. Novit.* 2719:1–25.

**Rupik, W., Huszno, J. & Klag, J.** (2011). Cellular organisation of the mature testes and stages of spermiogenesis in *Danio rerio* (Cyprinidae: Teleostei) – structural and ultrastructural studies. *Micron* 42, 833–839.

**Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., Franca, L.R., Vilela, D.A.R., Godinho, H.P.** (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891–898.

**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.

**Selman K. & Wallace RA.** (1986) Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Am Zool*; 26:173–192.

**Skinner, A. M., & Watt, P. J.** (2007). Phenotypic correlates of spermatozoon quality in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology*, 18(1), 47-52.

**Thiaw, O. T., Mattei, X., Romand, R. & Marchand, B.** (1986). Reinvestigation of spermatic flagella structure: the teleostean Cyprinodontidae. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Reserch* 97, 109-118.

**Vicentini, C. A.; Muñoz, M. E. & Vicentini, I. B. F.** (2010). Ultrastructural aspects of spermatogenesis in *Phalloceros caudimaculatus* (Teleostei, Poeciliidae). *Int. J. Morphol.*, 28(3):951-956.

**Wootton, R. J., & Smith, C.** (2014). *Reproductive biology of teleost fishes*. Chapter 4: 45-80. John Wiley & Sons Eds.

**Yasuzumi F.** (1971) Electron microscope study of the fish spermiogenesis. *J. Nara Med. Assoc.* 22, 343-355