



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

*Iztapalapa*

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS GLICOSÍDICOS EN LA MEMBRANA  
DE ESPERMATOZOIDES DE *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes)  
(Pisces: Atherinopsidae)**

TESIS

Que para obtener el grado de  
Maestra en Biología

PRESENTA

**B.E. GABRIELA ATEMPA FONG**

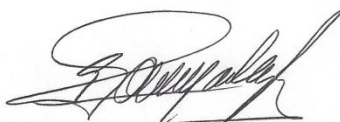
México, D.F. 2014

La Maestría en Biología de la  
Universidad Autónoma Metropolitana  
pertenece al Padrón de  
Postgrados de Calidad del CONACyT.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada:

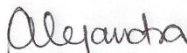
**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS GLICOSÍDICOS EN LA MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES DE *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes)**

(Pisces: Atherinopsidae).



Dr. Humberto González Márquez

Presidente



Dra. Alejandra Serrato Díaz

Secretaria



Dra. Irma Jiménez Morales

Vocal



Dra. María del Rocío Zarate Hernández

Vocal

# DEDICATORIA

---

A mi querido esposo por todo tu apoyo, amor y paciencia y por animarme siempre que lo necesité, gracias por importarte tanto.

A mi amada hija por toda tu paciencia, comprensión y por los momentos que no estuve contigo, gracias por tener siempre fe en mí.

A mi padre † porque tú creías en mí.

A mi madre

A mi hermano Pedro, mi cuñada Silvia y mis sobrinos Katia y Kevin

A mis cuñados Carlos y Cristian

# AGRADECIMIENTOS

---

Primeramente a Dios por permitirme llegar a la culminación de este Proyecto.

A mi esposo e hija que sin su gran apoyo, amor y paciencia no lo hubiera logrado.

A mi madre por tu apoyo cada vez que lo necesité.

Al Dr. Gerardo Figueroa Lucero, por asumir la dirección del trabajo, por su orientación y apoyo, gracias.

A la Dra. Irma Jiménez Morales por su apoyo incondicional, comprensión, asesoría y sus muy atinadas observaciones además de haberme facilitado materiales y reactivos para la buena realización del trabajo.

Al Dr. Humberto González Márquez, por sus magníficas asesorías y apoyo y también por facilitarme material para la realización de este proyecto.

A la Dra. Alejandra Serrato Díaz por tu aporte tan importante para la elaboración de la Tesis, gracias por tu apoyo.

A la Dra. María del Rocío Zarate Hernández por tu apoyo, interés y atenta lectura a esta Tesis, gracias por tus observaciones.

A la Dra. Irene Barriga Sosa, por su interés y apoyo en mi trabajo y sus valiosos consejos y por facilitarme materiales y equipo para el buen desarrollo del trabajo.

Al Dr. José Luis Sánchez Millán, por tus consejos tan valiosos y tan atinados, por tu apoyo incondicional en todo momento.

A la M. en B.E. Ingrid S. Camarena Novelo, por tu valiosa aportación sin la cual no habría avanzado con éxito a la siguiente etapa.

# AGRADECIMIENTOS

---

A la M. en B. E. Irma Urbina, por tu apoyo y por facilitarme fotografías para la buena realización del proyecto.

A la M. en B. Laura Georgina Núñez García, por el apoyo concedido en todo momento.

A Mis valiosas compañeras futuras Hidrobiólogas: Nancy, Amalia, Larissa y Daniela por su apoyo moral y ayuda cuando la necesité.

Al Hidrobiólogo Víctor Márquez y futuro Biólogo Alejandro López, por enseñarme todo lo que sé, respecto a dar un buen mantenimiento a los peces y por su ayuda constante.

Al Dr. José Miguel Betancourt, y todos los integrantes del Área de Biología Celular y Molecular, por su amable atención y apoyo y el fácil acceso al microscopio de fluorescencia.

Al Lab. Angel Rivera, por el apoyo incondicional y por el acceso al equipo prestado para la buena realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que recibí durante el estudio de la Maestría con CVU No. 418807.

**La constancia y el estudio hacen a los hombres y mujeres grandes, y los hombres y mujeres grandes son el porvenir de la patria.**

Frase modificada de *Benito Juárez García*

**La instrucción es la base de la prosperidad de un pueblo.**

*Benito Juárez García*

**Las grandes almas tienen voluntades; las débiles, tan solo deseos.**

*Proverbio chino*



Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la Planta Experimental de Producción Acuícola (Pexpa), Departamento de Hidrobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Gerardo Figueroa Lucero y en el Laboratorio de Andrología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Irma Jiménez Morales y el Dr. Humberto González Márquez. Forma parte de los proyectos CONACyT-CB-2009-1-130220; UAM-I 2010-2014 y PROMEP UAM-I-CA-130.



# RESUMEN

---

Se determinó la presencia, los patrones de distribución y la frecuencia de aparición de los residuos glicosídicos en la membrana de los espermatozoides de la población silvestre de *Chirostoma humboldtianum*, procedente de la presa Villa Victoria, Estado de México. Las muestras de semen se obtuvieron de adultos sexualmente maduros, sin uso de anestésicos. La caracterización de los residuos glicosídicos se llevó a cabo por medio de lectinas de origen vegetal: ConA (*Canavalia ensiformis*), WGA (*Triticum vulgare*), PNA (*Arachis hypogaea*), PSA (*Pisum sativum*), y UEA (*Ulex europaeus*), unidas a isotiocianato de fluoresceína (FITC), para lo cual se contabilizaron 100 campos para cada lectina. Los residuos glicosídicos que se detectaron sobre la superficie de la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum* fueron:  $\alpha$ Man,  $\alpha$ Glc, GlcNAc(b1,4GlcNAc)1-2,  $\beta$ -galactosa, manosas terminales, glucosa, y Fuc que están presentes en la cabeza, pero en el flagelo del espermatozoide es escasa o nula la presencia de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa y de N-acetilglucosamina, encontrándose cinco patrones diferentes (ANOVA  $<0.05$ ), de los cuales dos son significativos por su frecuencia en todos los espermatozoides analizados, el patrón A (concentración de fluorescencia entre el límite de la cabeza y el flagelo) y el patrón B (concentración de fluorescencia en el centro de la cabeza) con un promedio del 32.2% de incidencia en ambos, el patrón C con un 4.6% el patrón D con un 5.2%, el patrón E con un 12.8% y Z con un 13.6%, este último es un conjunto de diferentes patrones, no definidos. Como una forma indirecta de medición de la composición y funcionalidad y de la membrana del espermatozoide se analizó el vigor de nado que se consideró en escala 5, es decir, los espermatozoides presentaron movimiento vigoroso y rectilíneo y se encontró más del 75% de espermatozoides en movimiento, con una viabilidad del 80.43% y una concentración espermática de  $1.82 \times 10^{10}$  espermatozoides /  $\mu$ L.

# ABSTRACT

---

We determined the presence, distribution patterns and the frequency of occurrence of glycosidic residues in the membrane of the sperm of the wild population of *Chirostoma humboldtianum*, from Villa Victoria Dam, State of Mexico. Semen samples were obtained from sexually mature adults without the use of anesthetics. The characterization of the glycosidic residue are carried out by means of lectins from plants: ConA (*Canavalia ensiformis*), WGA (*Triticum vulgare*), PNA (*Arachis hypogaea*), PSA (*Pisum sativum*), and UEA (*Ulex europaeus*) together fluorescein isothiocyanate (FITC), for which 100 fields were counted for each lectin . Glycosidic residues were detected on the surface membrane of sperm *C. humboldtianum* were  $\alpha$ Man,  $\alpha$ Glc, GlcNAc (b 1, 4GlcNAc) 1-2,  $\beta$  - galactose, mannose terminal glucose, and Fuc present in head, but in the flagellum of the sperm is little or no presence of  $\alpha$  - mannose,  $\alpha$  - glucose and N- acetylglucosamine, finding five different patterns (ANOVA < 0.05), two of which are significant for their frequency in all sperm analyzed, the pattern a (concentration limit of fluorescence between the head and the flagellum) and pattern B (concentration of fluorescence in the center of the head) with an average of 32.2 % incidence in both the C pattern 4.6% D pattern with 5.2%, the pattern E with 12.8% and 13.6% Z, the latter is a set of different patterns, not defined . As an indirect measurement of the composition and functionality of the sperm membrane vigor swimming was considered in level 5, namely, the sperm showed strong and linear motion and found more than 75% of sperm analyzed movement, with a viability of 80.43 % and a sperm concentration of  $1.82 \times 10^{10}$  sperm /  $\mu$ L

# ÍNDICE GENERAL

---

DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
FRASES .....	vii
LUGAR DE REALIZACIÓN PROYECTO .....	viii
RESUMEN.....	ix
ÍNDICE GENERAL .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS .....	xvii
ABREVIATURAS.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES .....	3
Con A .....	11
WGA .....	12
PNA .....	13
PSA .....	13
UEA .....	14
Estudios con lectinas en espermatozoides de cerdos ( <i>Sus scrofa ssp</i> ) .....	15
Uso de lectinas en peces .....	16
Descripción anatómica del testículo de <i>Chirostoma humboldtianum</i> .....	18
Soporte neuroendocrinológico de la reproducción .....	20
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	21
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVOS .....	22
Objetivo general .....	22
Objetivos particulares .....	22

# ÍNDICE GENERAL

---

MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
Ejemplares .....	23
Técnica de obtención del semen .....	23
Viabilidad .....	24
Vigor de nado .....	24
Movimiento de los espermatozoides.....	24
Concentración espermática .....	25
Preparación de las lectinas .....	25
Microscopía confocal .....	25
Preparación de la muestra .....	25
Preparación prueba control .....	26
RESULTADOS .....	28
Descripción del espermatozoide.....	28
Viabilidad .....	29
Vigor de nado .....	30
Movimiento de los espermatozoides .....	30
Concentración espermática .....	30
Representación esquemática de los patrones de distribución de los azúcares encontrados en <i>C. humboldtianum</i> .....	30
Patrones de distribución de los azúcares .....	31
Con A .....	33
WGA .....	35
PNA .....	36
PSA.....	38
UEA .....	39

# ÍNDICE GENERAL

---

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
DISCUSIÓN .....	42
CONCLUSIONES .....	46
BIBLIOGRAFÍA .....	48
ANEXO 1 .....	60

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Fig. 1 Esquema de algunas moléculas glucosiladas de la membrana plasmática .....	3
Fig. 2 Esquema modificado representativo de tres tipos de lectinas de plantas .....	6
Fig. 3 Representación esquemática de reconocimiento de carbohidratos en superficie celular .....	10
Fig. 4 Esquema modificado de la localización de restos azucarados mediante el empleo de lectinas .....	10
Fig. 5 Estructura de la Concanavalina A.....	11
Fig. 6 Sitio de reconocimiento a carbohidratos en WGA .....	12
Fig. 7 Representación esquemática de la estructura tridimensional de la lectina WGA ( <i>Triticum vulgare</i> ) .....	12
Fig. 8 Esquema representativo de la estructura tridimensional de la lectina PSA( <i>Pisum sativum</i> ) .....	14
Fig. 9 Testículo de <i>C.humboldtianum</i> . Estadio IV. Dilataciones (D), surcos (S), fusión posterior (Fp).....	20
Fig.10 Corte longitudinal del testículo de <i>C. humboldtianum</i> En donde se observa los conductos llenos de espermatozoides 25 x .....	20
Fig. 11 Representación esquemática del mecanismo que controla la función reproductora de los teleósteos .....	21
Fig. 12 Fotografía digital que muestra la técnica de recogida del semen en <i>Chirostoma humboldtianum</i> .....	21

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Fig. 13 Muestra de espermatozoides de <i>C. humboldtianum</i> , teñidos con la técnica de eosina-nigrosina .....	25
Fig. 14 Imagen de una muestra de un corte histológico de espermatozoides de <i>Chirostoma humboldtianum</i> .....	30
Fig. 15. Espermatozoides de <i>C. humboldtianum</i> teñidos con la técnica de eosina-Nigrosina .....	30
Fig. 16 Esquema representativo de los patrones presentados con mayor frecuencia en cada una de las lectinas Con A, WGA, PNA, PSA y UEA.....	32
Fig. 17 Fotografías de los patrones encontrados en común en las lectinas ConA, WGA, PNA, PSA, UEA en microscopía confocal.....	33
Fig. 18 Promedios de la proporción de los patrones en común presentados entre las lectinas empleadas (Con A, WGA, PNA, PSA y UEA) .....	34
Fig. 19 Marcaje con la lectina Con A-FITC.....	35
Fig. 20 Gráficas comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-Z de la lectina Con A .....	35
Fig. 21 Marcaje con la lectina WGA-FITC.....	36
Fig. 22 Gráfica comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-Z de la lectina WGA.....	34
Fig. 23 Marcaje con la lectina PNA-FITC.....	35
Fig. 24 Gráfica comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-Z de la lectina PNA .....	35

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Fig. 25 Marcaje con la lectina PSA-FITC.....	39
Fig. 26 Gráfica comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-Z de la lectina PSA.....	40
Fig. 27 Marcaje con la lectina UEA-FITC.....	41
Fig. 28 Gráfica comparativa entre las medias de la proporción de los patrones A-Z de la lectina UEA.....	41



# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos .....	6
Tabla 2. Principales lectinas empleadas en estudios de reproducción asistida.....	9
Tabla 3. Tabla que muestra las cantidades empleadas para la preparación de los azúcares para la prueba control .....	28
Tabla 4. Resultados las observaciones en el microscopio confocal.....	33
Tabla 5 y 6 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de las cinco lectinas (Con A, WGA, PNA, PSA y EUA). Anexo 1.....	60

# ABREVIATURAS

---

ConA: Concanavalina A, lectina de *Concanavalian ensiformis*.

ConA-FITC: lectina ConA marcada con isotiocianato de fluoresceína

Fuc: fucosa

glu: glucosa

Gal: galactosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

kDa: kilodalton

Man: manosa

μl : microlitro

PNA: Lectina de *Arachis hypogaea*, cacahuete

PNA-FITC: lectina PNA unida a isotiocianato de fluoresceína

PSA: Lectina de *Pisum sativum*, chícharo

PSA-FITC: lectina PSA unida a isotiocianato de fluoresceína

UEA: Lectina de la planta *Ulex europaeus*.

UEA-FITC: lectina UEA unida a isotiocianato de fluoresceína

WGA-FITC: lectina WGA unida a isotiocianato de fluoresceína

WGA: Lectina de *Triticum vulgare*, trigo.

# INTRODUCCIÓN

---

Las especies del género *Chirostoma* son endémicas del Altiplano Central de México y presentan una distribución discontinua restringida a algunos cuerpos lénticos en las cuencas de los sistemas Lerma-Chapala y Río Grande de Santiago. Actualmente comprende un grupo de 18 especies y seis subespecies (Barbour, 1973b).

*Chirostoma humboldtianum*, es la primera especie íctica descrita para la ciencia en México, filogenéticamente, se considera el ancestro que dió origen a las especies de dimensiones mayores denominadas coloquialmente “peces blancos”. Ha sido de gran importancia sociocultural desde épocas prehispánicas, particularmente en la cuenca de México. Los mexicas lo llamaban “amilotl” (Ezcurra, 2003).

En la mayoría de los peces teleósteos (como *C. humboldtianum*) de fecundación externa los espermatozoides se encuentran inmóviles en el fluido seminal y son activados sólo después de tomar contacto con un medio acuoso. El tiempo de actividad flagelar es breve en la mayoría de las especies. Los factores que activan este proceso son diferentes para cada especie. Sin embargo, en casi todas, factores como la osmolaridad, temperatura, pH y composición iónica tienen una función clave en activar o modelar la actividad flagelar. La mayoría de los espermatozoides de peces teleósteos presentan una estructura primitiva (Valdebenito, Fletcher, Vera y Fernández, 2009), pequeña cabeza redonda con núcleo, muy pocas mitocondrias redondeadas, y los flagelos (Cabrita, Robles y Herráez, 2009) y carecen de acrosoma, por lo que fecundan los oocitos penetrando a través del micropilo, (Valdebenito, et al., 2009).

Los peces blancos actualmente enfrentan una serie de problemas asociados con la sobrepesca, contaminación y falta de regulación, que ha traído consigo la disminución del tamaño de las poblaciones en el medio silvestre. Un aspecto básico de la biología de las

# INTRODUCCIÓN

---

especies lo constituye la caracterización de la estructura y la composición bioquímica de la membrana de los espermatozoides, entre otros aspectos no menos importantes de la biología básica de la especie; en especial para este género, del cual la información es sumamente escasa.

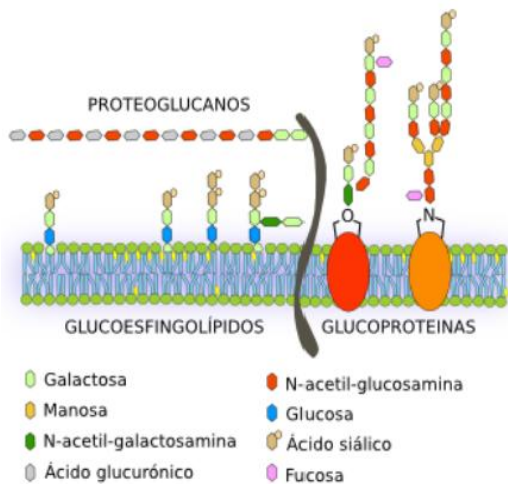
El estudio de la composición de la membrana de espermatozoides de peces con fertilización externa es de suma importancia en la pesca debido a los peligros del medio externo que los espermatozoides tienen a sostener después de la espermiación. Varios autores han investigado el contenido de la membrana plasmática en fosfolípidos, colesterol y lipoproteínas y su interacción para comprender cómo su composición afectará a la calidad del esperma e influir en su capacidad de fecundar con éxito los huevos (Beirão, 2011).

En el presente trabajo se determinaron los residuos glicosídicos en la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum*, sus patrones de distribución y su frecuencia, esto permitirá en el futuro abordar diferentes estudios que conlleven a desarrollar biotecnologías que permitan un manejo adecuado para su conservación o cultivo, asimismo se describe la morfología del espermatozoide, y como una forma de medición indirecta de la composición y funcionalidad de la membrana plasmática, (Beirão, 2011) se analizó la movilidad, viabilidad y concentración del esperma.

# ANTECEDENTES

---

Las membranas plasmáticas de células eucariotas poseen carbohidratos unidos mediante enlaces covalentes a los componentes lípidos y proteínicos, a este conjunto de glúcidos o carbohidratos se les denomina glucáliz. Según la especie y el tipo de célula, el contenido de carbohidratos de la membrana varía entre 2 y 10% del peso de la membrana plasmática. El grado de desarrollo del glucocáliz depende del tipo celular (Molist, Pombal y Megías, 2011). En las glucoproteínas, el carbohidrato se presenta como un oligosacárido corto ramificado que en condiciones típicas posee menos de 15 azúcares por cadena. Los azúcares observados con mayor frecuencia en estas cadenas de carbohidratos son: D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, L-Fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina y Ácido N-acetilneuramínico (Fig.1). No se puede considerar a los glúcidos como moléculas inertes sino que tienen papeles importantes en el funcionamiento celular, fundamentalmente actúan como lugares de reconocimiento y unión.



**Fig. 1** Esquema de algunas moléculas glucosiladas de la membrana plasmática. Los glucolípidos son principalmente esfingolípidos con diferente composición de glúcidos.

Algunos proteoglicanos tienen su parte proteica insertada entre las cadenas de ácidos grasos. Numerosos glúcidos de la membrana forman parte de las glucoproteínas, formando enlaces tipo O (con los aminoácidos serina) o tipo N (con los aminoácidos asparragina). (Molist et. al., 2011).

# ANTECEDENTES

---

Principales funciones de los carbohidratos de membrana:

- Proteger la superficie celular contra la interacción de otras proteínas extrañas o lesiones físicas o químicas.
- Papel en el reconocimiento celular, y en los procesos de rechazos de injertos y trasplantes.
- Participan en los procesos de coagulación de la sangre y en las reacciones inflamatorias, entre otras.
- Fecundación: los espermatozoides distinguen los óvulos de la propia especie de los de especies diferentes.

La investigación sobre el conocimiento de la ultraestructura y composición bioquímica de los espermatozoides en su mayoría se refiere a mamíferos, en la que se ha demostrado que la superficie de los espermatozoides se encuentra cubierta por una serie de moléculas ricas en carbohidratos (Matas-Parra, 1997). La mayoría de los residuos de los azúcares están unidos a proteínas las cuales están integradas dentro de la membrana plasmática o asociadas libremente con ésta (Matas-Parra, 1997).

La determinación de la composición del glicocáliz se ha determinado utilizando lectinas específicas, las cuales se unen a varios tipos de cadenas laterales de azúcares. Se estima que hay cientos de glicoproteínas formando el glicocáliz, estas son sintetizadas por los espermatozoides, por el epitelio de los conductos eferentes, por el epididímo y posiblemente otras por las glándulas accesorias que se asocian con el espermatozoide a través de su tránsito por los distintos conductos y su almacenamiento posterior. La presencia del glicocáliz está relacionada con la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide (Sansegundo, 2008), ya que todos los componentes de la membrana

# ANTECEDENTES

---

plasmática del espermatozoide y su interacción son esenciales para la función celular correcta y por lo tanto alteraciones sobre ellos puede afectar seriamente la funcionalidad del espermatozoide (Beirão, 2011).

Las lectinas, permiten evaluar el estado del acrosoma de una población espermática y ver el porcentaje de espermatozoides que sufren una reacción acrosómica prematura. Las lectinas también pueden utilizarse como marcadores para evaluar la morfología espermática, es decir, para valorar la forma del espermatozoide que consta de tres piezas: cabeza, pieza intermedia o cuello y flagelo. Asimismo se emplean las lectinas para el estudio y mayor comprensión de la fisiología de la interacción entre espermatozoide y ovocito (Montoya, Ten, Mendiola, Guerrero & Bernabeu, 2008).

Se han observado dominios en espermatozoides de hámster (*Mesocricetus auratus*) y conejo (*Oryctolagus cuniculus*) con el empleo de lectinas y se ha demostrado que diferentes disacáridos se distribuyen heterogéneamente en la superficie de los espermatozoides y que los sitios de unión de la lectina, están generalmente presentes en mayor densidad en la cabeza que en el flagelo (Knobil y Neill, 2006).

Asimismo, las lectinas pueden emplearse para estudiar la redistribución que sufren las glicoproteínas de la membrana plasmática del espermatozoide, gracias a su capacidad de unirse selectivamente a determinadas secuencias oligosacarídicas. Su patrón representativo de marcaje puede ser útil a la hora de estudiar el estado funcional de la población espermática y predecir su valor fecundante (Montoya-Ureta et al., 2008).

Los neoglicoconjugados son carbohidratos específicos capaces de reconocer proteínas receptoras en las membranas espermáticas. Generalmente los neoglicoconjugados más

# ANTECEDENTES

---

utilizados son los marcados con fluoresceína y biotina. Estos carbohidratos marcados son capaces de detectar la evolución que experimentan las proteínas específicas de la membrana del espermatozoide en el proceso de capacitación espermática. Se ha determinado la distribución topográfica de las proteínas presentes en la superficie del espermatozoide de toro (*Bos Taurus*) y se han estudiado los cambios que experimenta una proteína con afinidad a la fucosa durante la reacción acrosómica en el espermatozoide de verraco (*Sus scrofa domestica*) (Matas, 1997). Las lectinas han sido utilizadas en estudios de reproducción asistida y se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Principales lectinas empleadas en estudios de reproducción asistida (Montoya et al., 2008).

<b>Lectina</b>	<b>Localización</b>	<b>Secuencia oligosacáridica reconocida</b>
Con A	<i>Cannavalia enzyformis</i>	$\alpha$ -D-glucosa y $\alpha$ -D-manosa
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	N-acetilglucosamina y ac. Siálico
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	$\beta$ -galactosa
SBA	<i>Soja</i>	N-acetil-D-galactosamina
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	Metil-2-acetamina-2-desoxi-D-galactosa
PSA	<i>Pisum savitum</i>	residuos de manosa
AAA	<i>Anguilla anguilla</i>	Restos de fucosa
LEA	<i>Licopersicum esculentum</i>	N-acetil-lactosamina
TPA	<i>Tetragonolobus purpureus</i>	residuos de fucosa
UEA	<i>Ulex europaeus</i>	antígeno fucosilado H

Se ha incorporado la utilización de lectinas asociadas con fluoresceínas como marcadores de acrosoma y de modificaciones en la membrana plasmática en espermias eyaculadas (Cox, Fernández, Saravia, y Santa María, 1998).

La enzima, peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con las lectinas WGA, PNA y Con A se ha utilizado con buenos resultados para analizar la distribución de los hidratos de



# ANTECEDENTES

---

carbono en espermatozoides de cerdo durante la capacitación in vitro y la reacción acrosomal así como la evaluación de la integridad del acrosoma. (Vázquez et al., 1996).

El estudio de las lectinas fue iniciado por Stillmark en 1888, al describir el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semillas de castor (*Ricinus communis*). La proteína responsable de la aglutinación de los eritrocitos la denominó Ricina (Cummings y Etzler, 2009). Más tarde, Hellin descubrió que el extracto tóxico de semillas de *Abrus precatorius* también producía aglutinación de las células rojas, la proteína responsable se denominó Abrina (Hernández et al., 1999). A las lectinas se les denomina: aglutininas vegetales, hemaglutininas, fitohemaglutininas o fitoaglutininas (Del Brío & Riera, 1995).

Si bien, existen varias propuestas para definir a las lectinas, la más aceptada es que: las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, fijadoras de carbohidratos con capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados, (Hernández, 1999).

Por otro lado algunas lectinas son mitogénicas, es decir, presentan la capacidad de inducir la proliferación de células específicas (Huan & Chih, 2009). Así, la fitohemaglutinina A induce la proliferación de los linfocitos B y T; la concanavalina A, de los linfocitos T esta actividad mitogénica puede inhibirse por el monosacárido que fija específicamente la lectina, por ejemplo, la actividad mitogénica de la concanavalina A puede inhibirse por manosa y la fitohemaglutinina por la N-acetilglucosamina (Battaner, 2013).

En las plantas se han detectado principalmente en los cotiledones y endospermos, las que constituyen entre el 2 y el 10 % del total de proteínas de las semillas. La concentración de éstas, decrece progresivamente durante el proceso de germinación (González-León, Casa de Armas, & González-Chávez, 2011); mientras que en el reino animal se han encontrado

# ANTECEDENTES

---

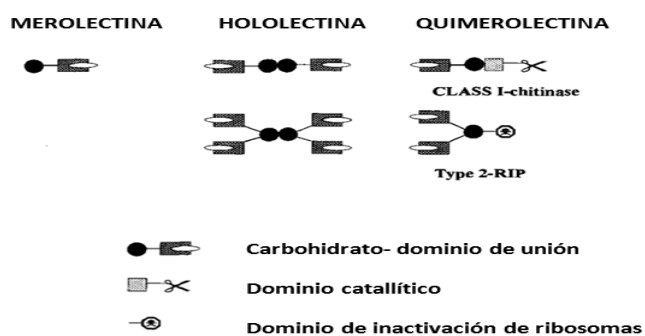
en invertebrados, tales como crustáceos, anélidos y moluscos. Están presentes fundamentalmente en la hemolinfa y órganos sexuales.

Las lectinas de acuerdo a Peumans y Van Damme, (1995) se clasifican en:

**Merolectinas:** son proteínas pequeñas que poseen exclusivamente un dominio de unión a carbohidratos. Debido a su naturaleza monovalente no pueden precipitar glicoconjugados o aglutinar células (Fig 2).

**Hololectinas:** poseen dos o más dominios de unión a carbohidratos idénticos u homólogos. Este grupo incluye todas las lectinas con múltiples sitios de unión, las cuales tienen la capacidad de aglutinar células o precipitar glicoconjugados. La mayoría de las lectinas extraídas de plantas se incluyen en esta categoría (Fig 2).

**Quimerolectinas:** son proteínas de fusión que poseen un dominio de unión a carbohidratos y un dominio con actividad catalítica u otra actividad biológica que actúa independientemente del dominio de unión a carbohidratos. Dependiendo del número de sitios de unión al azúcar las quimerolectinas se comportan como merolectinas u hololectinas (Fig 2).



**Figura 2.** Esquema modificado representativo de tres tipos de lectinas de plantas, merolectinas, hololectinas y quimerolectinas (Peumans y Van Damme, 1995).

# ANTECEDENTES

---

La primera lectina que fue obtenida en forma cristalina fue la concanavalina A del frijol *Canavalia ensiformis* en 1919 por James B. Sumner (Modificada de Hernández, 1999).

**Tabla 2.** Lectinas vegetales utilizadas para el estudio de glicoproteínas y su clasificación según su especificidad hacia monosacáridos. (modificada de Hernández et al., 2005).

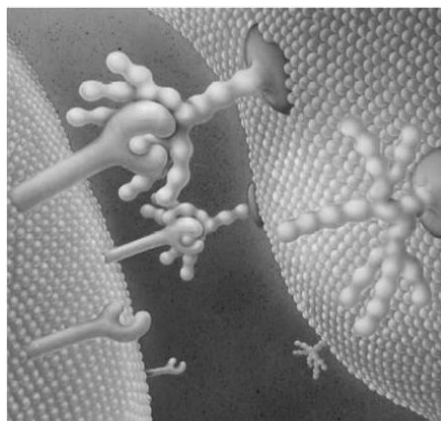
<b>MONOSACARIDO</b>	<b>LECTINA</b>	<b>ABREVIATURA</b>
$\alpha$ -D-manosa, $\alpha$ -D-glucosa	<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A
	<i>Lens culinaris</i>	LCA
$\beta$ -galactosa, N-acetil- $\alpha$ -Dgalactosamina	<i>Ricinus communis</i>	RCA
	<i>Glycine max</i>	SBA
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL
	<i>Triticum vulgare</i>	WGA
$\alpha$ -D-fucosa	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA
	<i>Ulex europaeus</i>	UEA
$\alpha$ -N-acetilneuramínico	<i>Limulus polyphemus</i>	LPA
manosas terminales, glucosa	<i>Pisum sativum</i>	PSA

Las lectinas forman parte de conjugados como lectina-lectina, lectina-enzimas y lectina-anticuerpos, lo que ha permitido el desarrollo de técnicas cromatográficas como la cromatografía de afinidad para la purificación de glicoproteínas. Las interacciones de estas proteínas con células pueden inhibirse en muchos casos por azúcares, por lo que se ha llegado a la conclusión de que se enlazan a sacáridos de la superficie celular (Fig.3), esto ha permitido el desarrollo de marcadores para técnicas histoquímicas y de microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática. Generalmente se utilizan lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes como la fluoresceína (Hernández et al., 1999). También permiten evaluar el estado del acrosoma de una población espermática y ver el porcentaje de espermatozoides que sufren la reacción

# ANTECEDENTES

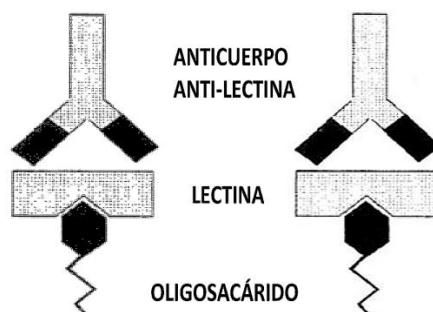
---

acrosómica prematura. Las lectinas pueden utilizarse como marcadores, para evaluar la morfología espermática.



**Fig. 3** Representación esquemática de reconocimiento de carbohidratos en superficie celular (Sharon & Lis, 2007).

Las lectinas pueden entrecruzar glicoproteínas y glicolípidos en las membranas de la misma célula para varios propósitos de organización en un amplio rango de procesos.



**Fig. 4** Esquema modificado de la localización de restos azucarados mediante el empleo de lectinas (Del Brío & Riera, 1995).

# ANTECEDENTES

---

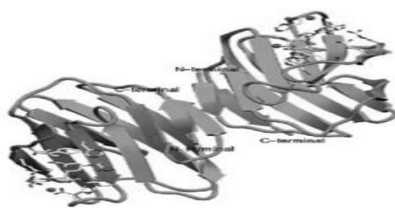
## **Concanavalina A** (*Canavalia ensiformis* Agglutinin)

La concanavalina A (Con A) (Fig 5), es una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*, cuyo contenido varía entre 1 y 3 % en peso. Debido a sus propiedades bioquímicas, la Con A fue clasificada por Sumner y Howell en 1936 como una lectina. La preparación de reactivos especiales con esta proteína permite separar e identificar glicoproteínas y polisacáridos en el estudio de las estructuras celulares (Ganem & Martín, 2000).

La Con A es una de las lectinas más caracterizadas, su estructura cuaternaria, es tetramérica constituida por cuatro subunidades idénticas de masa molecular relativa (Mr) 26.500 cada una de las cuales contiene un  $\text{Ca}^{+2}$  y un  $\text{Mn}^{+2}$  requeridos para su actividad (Martínez, 2009).

Forma complejos con metil  $\alpha$ -D- manopiranosido,  $\alpha$  - D - glucopiranosido,  $\alpha$  -Man - ( 1-3 ) - [  $\alpha$  -Man- (1-6 ) ] -Man. y  $\beta$  - GlcNAc - ( 1-2 ) -  $\alpha$  -Man - ( 1-3 ) - [  $\beta$  - GlcNAc - ( 1-2 ) -  $\alpha$  -Man- (1-6 ) ] -Man.

Se une metil  $\alpha$ -D- manopiranosido con una constante de asociación de  $0,82 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , que corresponde a un total de 5,3 kcal mol<sup>-1</sup> de energía libre, liberada en la unión (Davina, Booma, Field & Naismith, 1999).



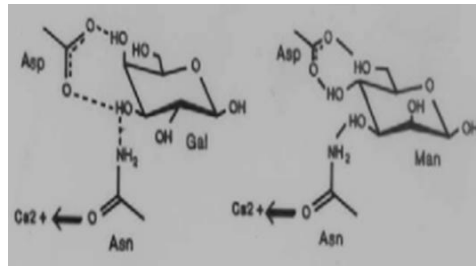
**Fig. 5 Estructura de la Concanavalina A.** La Concanavalina A es una lectina obtenida de *Canavalia ensiformis*, se presenta como un dímero con dos regiones opuestas para el sitio de unión a carbohidratos (Torres, 2010).

# ANTECEDENTES

---

## WGA (Wheat Germ Agglutinin)

WGA (Fig. 6), aglutininas del germen de trigo, son purificadas a partir de las semillas germinadas del trigo común (*Triticum vulgare*); se unen a ciertas porciones de carbohidratos sobre las glicoproteínas de la superficie celular y se utilizan para identificar a ciertas poblaciones celulares e inhibir o estimular algunas actividades inmunológicas o fisiológicas.



**Fig. 6** Sitio de reconocimiento a carbohidratos en WGA (Hernández, 2005)



**Fig. 7** Representación esquemática de la estructura tridimensional de la lectina WGA (*Triticum vulgare*). (Van Damme et al., 1998)

# ANTECEDENTES

---

## **PNA (Peanut Agglutinin)**

La aglutinina de cacahuete (*Arachis hypogaea*) se une preferentemente a la T-antígeno, una galactosil ( $\beta$ -1, 3) N -acetilgalactosamina estructura presente en muchos glicoconjugados tales como M y N grupos sanguíneos, por lo tanto se emplea para aglutinar eritrocitos humano.

(Molecular Probes, 2003), gangliósidos, glicoproteínas y glicolípidos asociados con la membrana (Vectorlabs). La investigación ha demostrado que PNA puede ser selectiva para acrosomas en la rata y el espermatozoide de humano (Molecular Probes, 2003), por lo que la integridad acrosomal se puede determinar usando fluoresceína conjugada con aglutinina de cacahuete ( PNA -FITC), (Szász, et. al., 2000). La distribución de las estructuras oligosacáridicas es importante para la interacción lectina-carbohidrato, como en el caso de la lectina de *Arachis hypogaea*, donde la presencia de estructuras oligosacáridicas de manera continua no afecta el reconocimiento (Hernández et al., 2005).

## **PSA (Pisum Savitum Agglutinin)**

La lectina del chícharo *Pisum sativum* (PSA) (Fig. 8) permite reconocer terminales de manosas, glucosa y glucosamina de glicoconjugados localizados en la matriz acrosomal, por lo que asociada con una fluoresceína puede identificar espermatozoides con el acrosoma dañado o ausente. El yoduro de propidio (PI) es una tinción nuclear y por lo mismo sirve como tinción de contraste (Cox et al., 1998).

# ANTECEDENTES

---



**Fig. 8** Esquema representativo de la estructura tridimensional de la lectina PSA (*Pisum sativum*) (Van Damme et al., 1998)

## **UEA (*Ulex Europaeus* Agglutinin)**

Aglutinina que reacciona con las proteínas séricas, útil para el marcaje de endotelios vasculares (Histopat Laboratoris, 2013). Los hematíes A2, son aglutinados por la lectina de *Ulex europaeus* (anti-H) (García, Lippi & Valverde, 2001), se une al antígeno H del grupo sanguíneo O (Roa, I., Araya, Villaseca, Roa, J., 1997). También esta lectina es usada como herramienta para la evaluación de la glicosilación intestinal, (Valdés, Maroto, Cruz, de la Fe-Rodríguez, & Hernández, 2012). Se ha establecido como un excelente marcador para las células endoteliales humanas (Laboratories Vector).

Esta lectina que tiene afinidad por el residuo glicosídico L-Fuc $\alpha$ 1y se extrae de la semilla de tojo (Del brío, et. al., 1995) o *Ulex europaeus* que es un arbusto espinoso perenne.

En general, las lectinas, que se unen a residuos específicos de azúcar, se han utilizado como sondas moleculares para la caracterización de hidratos de carbono en la superficie de las células, o en los tejidos post inclusión y corte del órgano de interés. Dado que los restos de carbohidratos de glicoproteínas típicamente muestran una especificidad notable con respecto a las células de diferente etapa de desarrollo o tejidos diferentes, el patrón de tinción de las lectinas se puede utilizar como una herramienta analítica para distinguir



# ANTECEDENTES

---

diferentes células de interés, además puede ayudar a identificar tipos de células específicas y para desentrañar las interacciones entre células somáticas y la línea germinal en el proceso de determinación del sexo y la espermatogénesis (Tokalov & Gutzeit, 2007).

## **Estudios con lectinas en espermatozoides de cerdos (*Sus scrofa ssp*)**

Jiménez y colaboradores (2003), determinaron la distribución de los carbohidratos de la superficie de los espermatozoides de cerdo durante la capacitación y la reacción acrosomal ya que estos procesos pueden estar asociados con cambios específicos en el contenido y la distribución de carbohidratos de la superficie. Se analizaron treinta y nueve eyaculados de machos fértiles de diversas razas de cerdos. Fueron detectados residuos de N-acetilglucosamina, de manosa y fucosa siálico por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo usando lectinas conjugados con FITC. La lectina WGA, se encontró vinculada a la cabeza y la cola de los espermatozoides frescos, y la intensidad de fluorescencia (FI) se redujo en espermatozoides capacitados y se redujo aún más en los espermatozoides con acrosoma reaccionado. La lectina Con-A se encontró unida de forma homogénea en la cabeza y la pieza intermedia del espermatozoide fresco y aumentó en espermatozoides capacitados, principalmente en la región acrosomal. En espermatozoides con acrosoma reaccionado, la fluorescencia se concentró en la frontera de la región acrosomal. No fue posible detectar nada con la lectina UEA por microscopía de fluorescencia. Modificaciones del glucocálix en espermatozoides observados en este estudio permiten conocer a las modificaciones moleculares que acompañan a la capacitación y la reacción acrosomal.

Fábrega y colaboradores, (2012) emplearon las lectinas aglutinina PNA, LCA, PSA, WGA, HPA, PHA -L, SBA y UEA- I para identificar los cambios en la naturaleza y la

# ANTECEDENTES

---

localización de las glicoproteínas en espermatozoides porcinos que migran a lo largo del conducto del epidídimo. Asimismo realizaron procedimientos complementarios con citometría de flujo, análisis de la localización de lectina en la membrana de los espermatozoides utilizando microscopía de fluorescencia y la caracterización electroforética de la superficie principal de receptores de glicoproteína en espermatozoides implicados en la unión a lectina. Observaron diferentes patrones de expresión de lectina entre las regiones del epidídimo asociadas a la maduración del mismo, que pueden estar correlacionadas con el grado de maduración de los espermatozoides eyaculados. (Fàbrega et al., 2012).

## **Uso de lectinas en peces**

Las lectinas para el estudio de las glicoproteínas de la membrana también se ha llevado a cabo en peces, principalmente sobre el análisis de las glicoproteínas de la membrana de plasma durante la espermatogénesis y en los espermatozoides de los géneros *Xiphophorus maculatus* y del chilensis *Elasmobranch Schroederichthys* (Rojas, et al. 2001). Las lectinas utilizadas fueron ConA y WGA mediante microscopía láser confocal. En *Xiphophorus*, una especie vivípara que presenta espermatozoides acrosomales, espermatoцитos primarios y espermátidas de forma redondeada, mostró que toda la superficie de la célula se marcó por ambas lectinas. En espermatozoides maduros se observó una fluorescencia discreta y no aleatoria exclusivamente en la superficie de la cabeza del espermatozoide; Tokalov y Gutzeit en 2007 estudiaron las células testiculares primarias de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y Medaka (*Oryzias latipes*), describen el patrón de unión de lectinas unidas a FITC, mediante microscopía confocal. Las diferencias observadas en la tinción de las lectinas de diferentes tipos de células primarias, se puede utilizar para identificar los tipos de células particulares, para controlar su diferenciación in vitro o para enriquecer tipos de

# ANTECEDENTES

---

células particulares, ya que los restos de carbohidratos de glicoproteínas muestran típicamente una especificidad notable con respecto a las células de diferente etapa de desarrollo o tejidos diferentes, asimismo estos autores indican que el patrón de tinción de las lectinas se puede utilizar como una herramienta analítica para distinguir diferentes células de interés, lo mismo que en análisis histoquímicos de testículos las diferentes lectinas, muestran notablemente diferentes patrones de tinción asociados con etapas del desarrollo de la espermatogénesis en células de mamíferos.

Un aspecto relevante lo constituye la caracterización seminal ya que permite identificar parámetros de normalidad, con el fin de seleccionar e identificar posibles donantes para los bancos de germoplasma de peces salmónidos (Fresneda, 2004). En ese sentido, Cabrita, (2009) apunta que existen daños que afectan los parámetros de calidad de los espermatozoides como: motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática, metabolismo, entre otros, que determinan las principales funciones de los espermatozoides de los peces para llegar y entrar en el óvulo durante la fertilización.

Yanagimachi y colaboradores (2013), realizaron un estudio sobre atracción del espermatozoides en la región del micropilo de peces y de insectos y determinaron que en los peces, no hay indicación de que los espermatozoides son atraídos por los huevos desde la distancia, pero una vez cerca de la abertura externa del micropilo, exhiben movimientos dirigidos hacia él, lo que sugiere que existe una glicoproteína en esta región definida para atraer a los espermatozoides. La atracción de los espermatozoides a la apertura micropilo es específico especie y es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. La lectina empleada fue WGA unida a FITC y tiñió fuertemente la zona externa del micropilo. Los peces usados para este estudio incluyeron: black flounder (*Pleuronectes obscurus*), barfin flounder (*Verasper moseri*),

# ANTECEDENTES

---

starry flounder (*Platichthys stellatus*), herring (*Clupea pallasii*), bitterling (*Rhodeus ocellatus*), steelhead (a.k.a., rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss*]), and medaka (*Oryzias latipes*).

Estudios empleando lectinas unidas a FITC, pueden ser una herramienta útil para detectar daños como los mencionados anteriormente, ya que el conocimiento de los gametos de los peces desde el punto de vista biológico, fisiológico y metabólico, se pueden desarrollar tecnologías como la crioconservación, fertilización in vitro, conservación de embriones, androgénesis y ginogénesis acordes con las estrategias reproductivas de las especies (Tabares, Tarazona & Olivera, 2005).

## **Descripción anatómica del Testículo de *Chirostoma humboldtianum*.**

Los testículos de esta especie (Fig. 9), son órganos pares, alargados, de forma triangular y contorno irregular, de color blanquecino nacarado, con la base orientada lateralmente, el mesenterio pigmentado (mesorquio) parte del vértice superior lateral y se une a la pared corporal; el vértice interno presenta un vaso sanguíneo que recorre toda la longitud de la gónada y se prolonga en su extremo anterior a través de un filamento delgado. La longitud y el volumen de las gónadas presentan variaciones dependiendo de la etapa reproductiva en la que se encuentre el organismo, la presencia de surcos distribuidos heterogéneamente a lo largo de la gónada, también puede variar en tamaño número y pigmentación e indican el grado de madurez de la gónada.

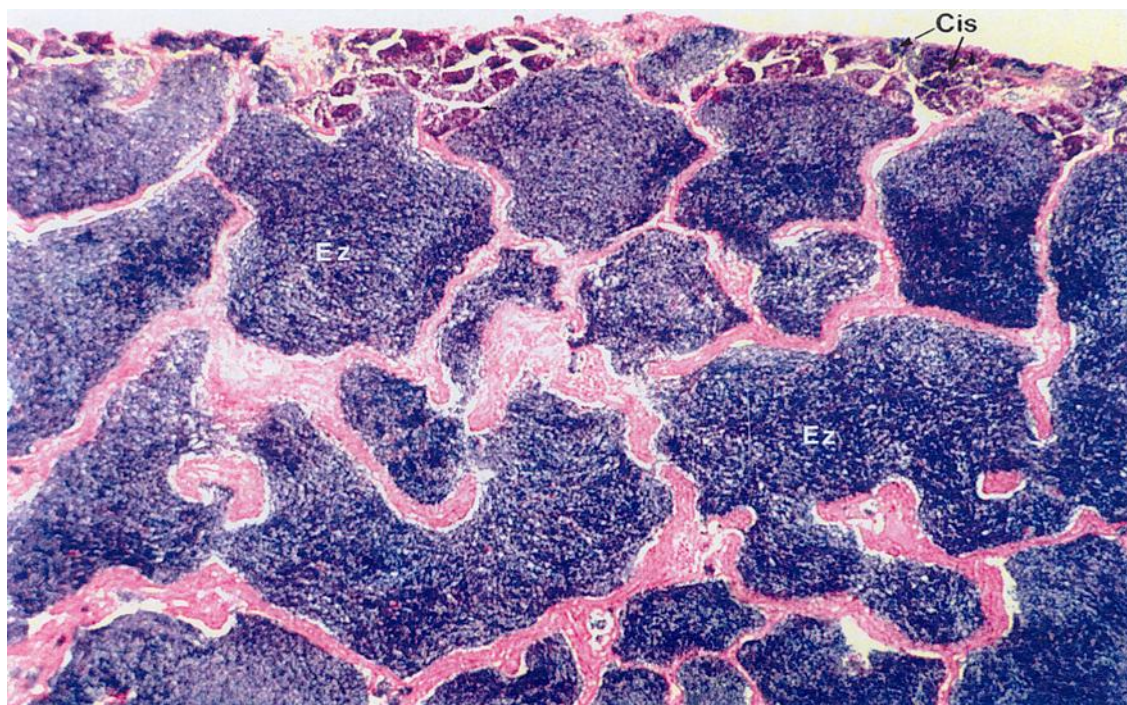
# ANTECEDENTES

---



**Fig. 9** Testículo de *C.humboldtianum*. Estadio IV. Dilataciones (D), surcos (S), fusión posterior (Fp).

Fotografía tomada por el Dr. Gerardo Figueroa Lucero.



**Fig. 10** Corte longitudinal del testículo de *C. humboldtianum* En donde se observa los conductos llenos de espermatozoides (Ez) y cistos de diferentes tipos celulares (Cis). H-E 125x. Fotografía tomada por el Dr. Gerardo Figueroa Lucero.

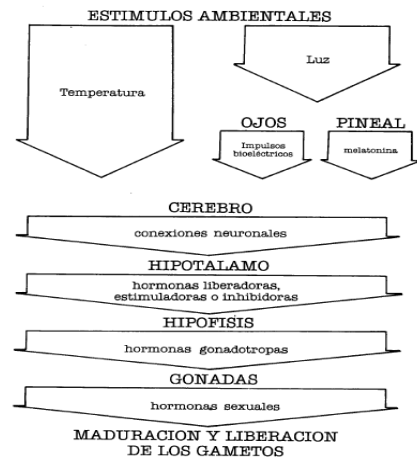
# ANTECEDENTES

---

## Soporte neuroendocrinológico de la reproducción

En la filogenia de los vertebrados se presentan dos sistemas de información: el sistema de comunicación neural y el sistema de comunicación hormonal. La función fotorreceptora se basa fundamentalmente en el primero, la función glandular o secretora lo hace en el segundo. Existe sin embargo un sistema que posee ambas peculiaridades: el sistema neuroendocrino y que es fundamental para el control de la reproducción.

La percepción de estímulos ambientales como el fotoperiodo y la temperatura (entre otros) está regida por el sistema nervioso e incluye el paso desde los receptores sensoriales al cerebro (Fig. 11); no se sabe con exactitud cómo llega esta información al hipotálamo, pero una vez allí, hace que se produzcan las hormonas hipotalámicas que son transportadas a través de los axones neuronales a la hipófisis, donde inhibirán o estimularán la liberación de las gonadotrofinas actúan sobre las gónadas induciéndolas a producir esteroides gonadales que serán los artífices finales del proceso de crecimiento gonadal, maduración y puesta (Zanuy & Carrillo, 1987).



**Fig. 11** Representación esquemática del mecanismo que controla la función reproductora de los teleósteos (Zanuy & Carrillo, 1987).

# PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

---

¿Cuáles residuos glicosídicos se encontrarán presentes sobre la membrana de espermatozoides *C. humboldtianum* y cuáles serán sus patrones y frecuencia?

# HIPÓTESIS

---

Los residuos glicosídicos que se encuentren en la superficie de la membrana de los espermatozoides de *Chirostoma humboldtianum* serán característicos y únicos de esta especie.

Si se emplean lectinas marcadas se podrán determinar los azúcares presentes, sus patrones y su frecuencia.

# OBJETIVOS

---

## **Objetivo general**

Determinar por medio de las lectinas vegetales Con A, WGA, PNA, PSA y UEA unidas al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína los azúcares que se encuentran presentes en la membrana de los espermatozoides de *Chirostoma humboldtianum* y cuál es su distribución y frecuencia.

## **Objetivos particulares**

- Analizar por medio del microscopio confocal la presencia de los azúcares que reconocen cada una de la lectinas empleadas.
  
- Cuantificar y describir mediante los patrones de fluorescencia la distribución y la frecuencia que presentan en cada una de las lectinas.
  
- Determinar la movilidad, la viabilidad y la concentración de los espermatozoides de *C. humboldtianum* por unidad de volumen, como criterio de calidad de análisis espermático.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **Ejemplares**

Las muestras evaluadas se obtuvieron de 64 machos reproductores provenientes de la población de Villa Victoria Estado de México, los cuales se encuentran en la Planta Experimental de Producción Acuícola (PEXPA) UAM Iztapalapa.

Los organismos se mantuvieron en condiciones controladas en estanques de 5 m<sup>3</sup> de capacidad, con temperatura promedio de 19.8 °C y pH promedio de 8.8, con fotoperíodo natural (12:12) y se mantuvieron con alimento balanceado para trucha (25 % proteína) y juveniles de peces y Crustáceos adultos (*Heterandría* y *artemia sp*), además de larvas de cuarto estadio de *Chironomus plumosus*.

## **Técnica obtención del semen**

Las muestras de semen se obtuvieron manualmente presionando suavemente la región ventral en dirección cráneo-caudal sin uso de anestésicos (Fig.12), y con el debido cuidado para que las muestras estuvieran libres de sangre, heces y orina. Las muestras se colectaron por medio de una micropipeta con capacidad de 10 a 100 µL. Las muestras estuvieron constituidas por el semen de 2 hasta 8 machos por muestra, al cual se le agregó agua reconstituida filtrada y esterilizada y posteriormente se le adicionó glutaraldehído al 0.2% (50 µL), agitando hasta que se homogenizó y se conservó en refrigeración.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---



**Fig. 12** Técnica de recogida del semen en *Chirotoma humboldtianum*.

## **Viabilidad**

La prueba de viabilidad se realizó con semen recién obtenido y se aplicó la técnica eosina-nigrosina. En un portaobjetos se colocó 1  $\mu$ L de semen más 1  $\mu$ L de eosina-nigrosina (a razón de 1:1), se homogenizó y se corrió la muestra con ayuda de un pincel para evitar el desprendimiento del flagelo, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se observaron al microscopio óptico a 100X. Los espermatozoides muertos o no viables se tiñieron de color rosa fuerte y los vivos tenían un color blanco. Las membranas de los espermatozoides muertos o en proceso de muerte son permeables a la eosina por tal razón se emplea esta propiedad para la determinación de los espermatozoides vivos (Palma, 2007).

## **Vigor de nado**

El vigor de nado de los espermatozoides fue evaluado por una escala arbitraria:

0 = para espermatozoides inmóviles

5 = Los espermatozoides con movimiento vigoroso y rectilíneo (Guest *et. al*; 1976)

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **Movimiento de los espermatozoides**

Para el movimiento de los espermatozoides se consideró una escala subjetiva en donde:

0 = no se observa ningún movimiento

1 = cuando el movimiento se encuentra por arriba del 25% células en movimiento

2 = cuando el movimiento se encuentra por arriba del 50% células en movimiento

3 = cuando el movimiento se encuentra por arriba del 75% células en movimiento

4 = cuando hay más del 75% en movimiento (Viveiros et al., 2003)

## **Concentración espermática**

Para cuantificar el número de espermatozoides por unidad de volumen se empleó semen recién obtenido y se realizaron diluciones 1:1000, es decir, 1  $\mu\text{L}$  de semen más 999  $\mu\text{L}$  de agua reconstituida, filtrada y esterilizada, se homogenizó y se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se colocó en una cámara de Neubauer, se observó al microscopio óptico a 40X y se realizó el conteo respectivo.

## **Preparación de las lectinas**

Las lectinas Con A, WGA, PNA y PSA se diluyeron en PBS a razón de 1:50 cada una, WGA se preparó 2 mg/mL igualmente en PBS, se procedió posteriormente a su almacenamiento a  $-4^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 10  $\mu\text{L}$ , hasta el momento de su empleo.

## **Microscopía Confocal**

### *Preparación de la muestra*

Del semen recién obtenido y fijado en glutaraldehído al 0.2% se tomaron alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una serie de 5 tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, se les adicionó a cada uno 500  $\mu\text{L}$  de agua reconstituida filtrada y esterilizada además de 10  $\mu\text{L}$  de la lectina Con A, WGA, PNA, PSA y UEA respectivamente, posteriormente los tubos se envolvieron

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

con papel aluminio y se colocaron en incubación en una cámara húmeda a 21°C (Temperatura ambiente del Laboratorio) por 30 minutos.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 6,000 RPM (R.C.F x g 2000) durante 60 a 70 segundos, hasta que se formó el botón, se desechó el sobrenadante, para lavar al botón se le agregó PBS se homogenizó y se volvió a centrifugar por el mismo tiempo, se desechó el sobrenadante, al botón se le agregó 10 µL de agua reconstituida filtrada y esterilizada, los cinco tubos se conservaron en refrigeración, cubiertos con papel aluminio para evitar que pierdan fluorescencia. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 10 µL de cada una de las muestras, se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron las orillas para evitar la entrada de aire a la muestra y ésta se secara, después se observaron en un Microscopio láser confocal–LSM 700–Carl Zeiss, con el Objetivo Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil DIC M27 (dt=0,19 mm), en un rango de 488 a 514nm (Verde). Se empleó el método de detección directa, puesto que la molécula fluorescente está unida directamente a la lectina y posteriormente se observaron al microscopio confocal (Molist, et al., 2011), en este caso la molécula fluorescente empleada fue FITC.

De cada tratamiento se llevaron a cabo 6 repeticiones con cada una de las lectinas y se contabilizaron 100 espermatozoides por muestra.

## *Preparación prueba control*

La prueba control se empleó para comprobar que las lectinas son específicas para un determinado azúcar, dicha prueba se realizó por duplicado. Se prepararon los azúcares a una concentración de 0.3 M cada uno y se dejaron incubar en refrigeración por una hora (tabla 3).

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

**Tabla 3.** Tabla que muestra las cantidades empleadas para la preparación de 100  $\mu\text{L}$  de los azúcares para la prueba control.

<b>Lectina</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Cantidad en <math>\mu\text{L}</math></b>
Con A	Glu	98.0 de Glu y 2 de Con A
WGA	GlcNAc	95.0 de WGA y 5 de GlcNAc
PSA	man	98.0 de man y 2 de PSA
UEA	fuc	98.0 fuc y 2 de UEA

# RESULTADOS

---

Se encontraron diversos patrones o concentraciones de residuos glicosídicos sobre la membrana de espermatozoides de *C. humboldtianum*, que marcaron cada una de las lectinas empleadas, (Con A, WGA, PNA, PSA y UEA) sin embargo hay cinco patrones que se repiten con mayor frecuencia y para este trabajo se les asignaron las letras del alfabeto de la A a la E, así mismo se nombró con la letra Z a un conjunto de patrones diversos, no claramente definido.

## Descripción del espermatozoide

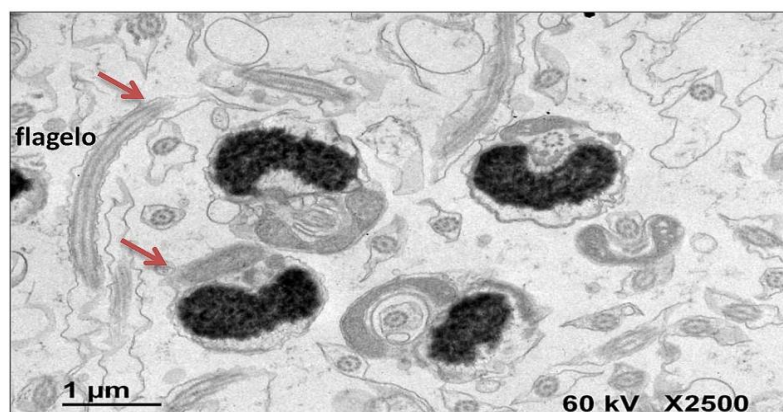
El espermatozoide de *Chirostoma humboldtianum*, carece de pieza intermedia o cuello (Figs. 13 y 14), la cabeza es esférica y carece de acrosoma. La longitud promedio del espermatozoide es de 17.7  $\mu$  desde la parte anterior de la cabeza al final del flagelo.



**Fig. 13** Muestra de espermatozoides de *C. humboldtianum* teñidos con la técnica de eosina-nigrosina, se puede apreciar que el espermatozoide carece de pieza intermedia, (flecha roja). Fotografía digital (zoom 200%).

# RESULTADOS

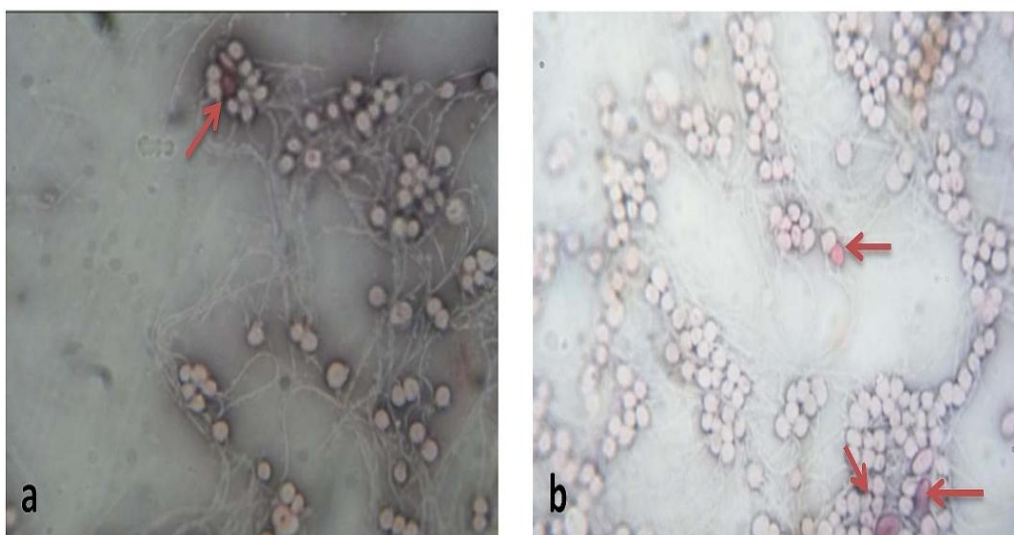
---



**Fig. 14** Imagen de un corte histológico de espermatozoides de *Chirostoma humboldtianum*, en donde a pesar de la ruptura del flagelo, se puede confirmar que este espermatozoide carece de pieza intermedia o cuello. Micrografía obtenida del microscopio electrónico a 2500X (Fotografía de la M. en B.E. Irma Urbina).

## Viabilidad

El porcentaje de viabilidad obtenido fue del 80.43 % mediante la técnica de eosina-nigrosina (Fig. 15).



**Fig. 15.** Espermatozoides de *C. humboldtianum*, teñidos con la técnica de eosina-nigrosina, las flechas de rojo señalan a espermatozoides no viables (color rosa fuerte). Los espermatozoides que se tiñeron de color rosa pálido son los viables o vivos. Como se puede observar en las fotografías **a** y **b** tomadas de dos diferentes muestras respectivamente, casi todos los espermatozoides son viables. Microscopio compuesto. Vista a 100 X.

# RESULTADOS

---

## **Vigor de nado**

Para el vigor de nado de los espermatozoides de *C. humboldtianum* se considera el valor 5, es decir, espermatozoides con movimiento vigoroso y rectilíneo.

## **Movimiento de los espermatozoides**

El movimiento de los espermatozoides de esta especie se encuentra en escala 4, arriba del 75% con movimiento.

## **Concentración espermática**

Los volúmenes de esperma de *Chirostoma humboldtianum* por organismo oscilaron entre 1 y 50  $\mu\text{L}$ . El número promedio de espermatozoides fue de  $1.82 \times 10^{10}$  espermatozoides/ $\mu\text{L}$ .

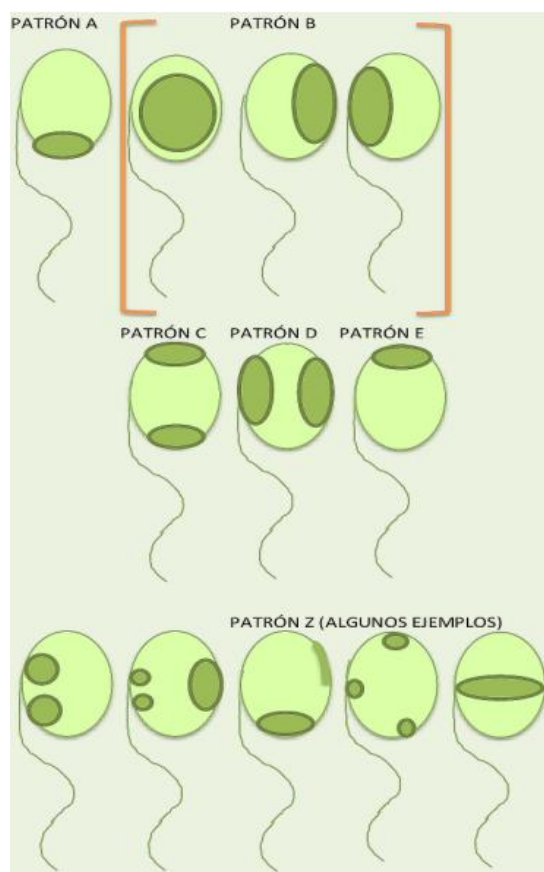
## **Representación esquemática de los patrones de distribución de los azúcares encontrados en *C. humboldtianum***

Los patrones de distribución de los azúcares se presentan de manera esquemática en la figura 16, en donde es posible observar seis diferentes agrupaciones llamados patrones y que en este trabajo se clasificaron con las letras A, B,C,D,E y Z. El patrón Z en realidad es un conjunto que presenta diversos patrones, no hay uno definido.



# RESULTADOS

---



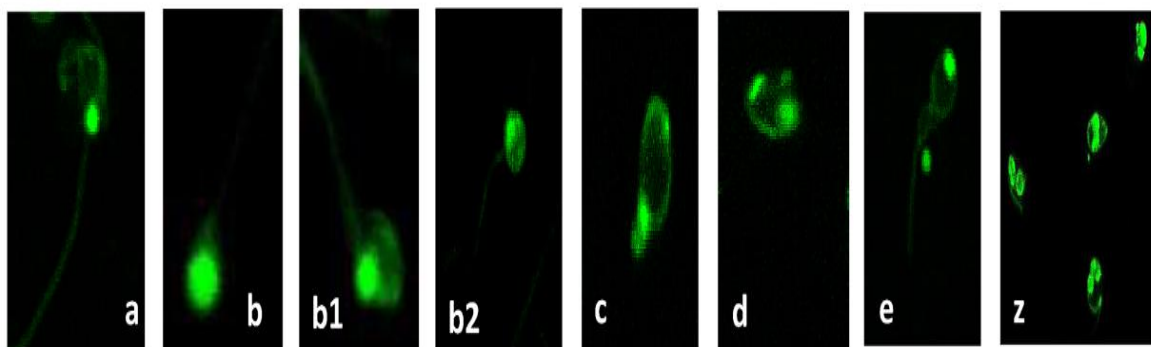
**Fig. 16** Esquema representativo de los patrones presentados con mayor frecuencia en cada una de las lectinas Con A, WGA, PNA, PSA y UEA.

Estos patrones se representan en la Fig. 17 que son fotografías tomadas con el microscopio confocal.

## Patrones de distribución de los azúcares

Las fotografías tomadas con el microscopio confocal muestran la posición de la marca para cada una de las lectinas empleadas (Con A, WGA, PNA, PSA y UEA unidas a FITC) sobre la superficie de la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum*. Se observaron seis patrones frecuentes (A-E y Z), su distribución y frecuencia.

# RESULTADOS



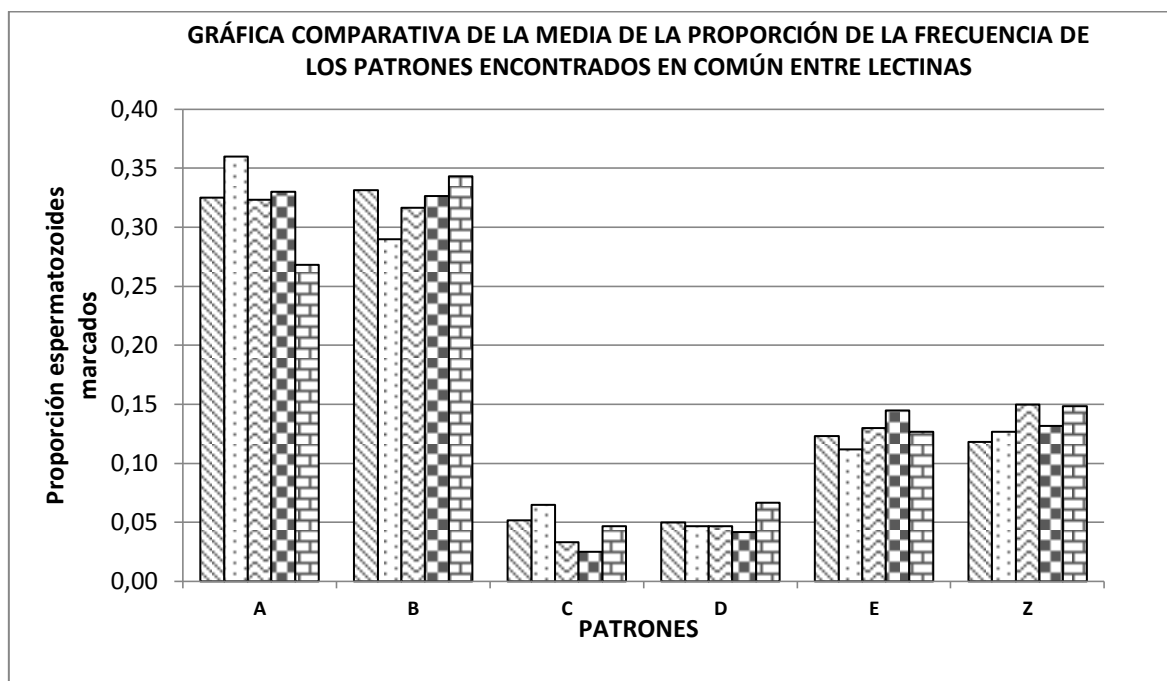
**Fig. 17** Fotografías de los patrones encontrados en común en las lectinas ConA, WGA, PNA, PSA, UEA en microscopía confocal. (a) patrón A en el límite de la cabeza y flagelo. (b) patrón B vista de frente. (b1) patrón B vista lateral der. (b2) patrón B vista lateral izq. El patrón B tiene una sola posición, depende del ángulo en que sea observado en el microscopio. (c) patrón C, en la parte apical del espermatozoide y límite entre la cabeza y el flagelo. (d) patrón D, ubicado en las partes laterales de la cabeza. (e) patrón E, ubicado en la parte apical de la cabeza del espermatozoide. (z) patrón Z, que en realidad es un conjunto de diversos patrones. Vista 63 X.

Se contabilizaron 100 espermatozoides por muestra de cada lectina empleada y se calculó el respectivo porcentaje de cada patrón encontrado y de este porcentaje se obtuvo la proporción. Las proporciones de cada una de las lectinas empleadas se presentan en la tabla 4 en donde se observa que los patrones A y B son los más frecuentes.

**Tabla 4.** Patrones de residuos de azúcares identificados en la membrana de espermatozoides de *Chirostoma humboldtianum* recién obtenidos. Se presentan los resultados de la media de la proporción del conteo.

LECTINA	Patrón (%)					
	A	B	C	D	E	Z
Con A	0,33	0,33	0,05	0,05	0,12	0,12
WGA	0,36	0,29	0,07	0,05	0,11	0,13
PNA	0,32	0,32	0,03	0,05	0,13	0,15
PSA	0,33	0,33	0,03	0,04	0,15	0,13
UEA	0,27	0,34	0,05	0,07	0,13	0,15

# RESULTADOS

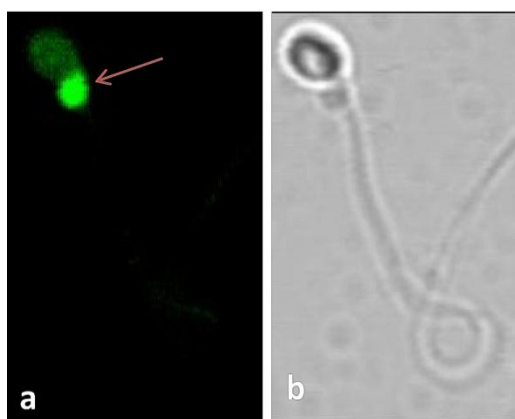


**Fig. 18** Promedios de la proporción (datos tomados de la tabla 4) de los patrones en común presentados entre las lectinas empleadas (Con A, WGA, PNA, PSA y UEA). Se puede observar que hay dos patrones que se distinguen del resto (A y B).

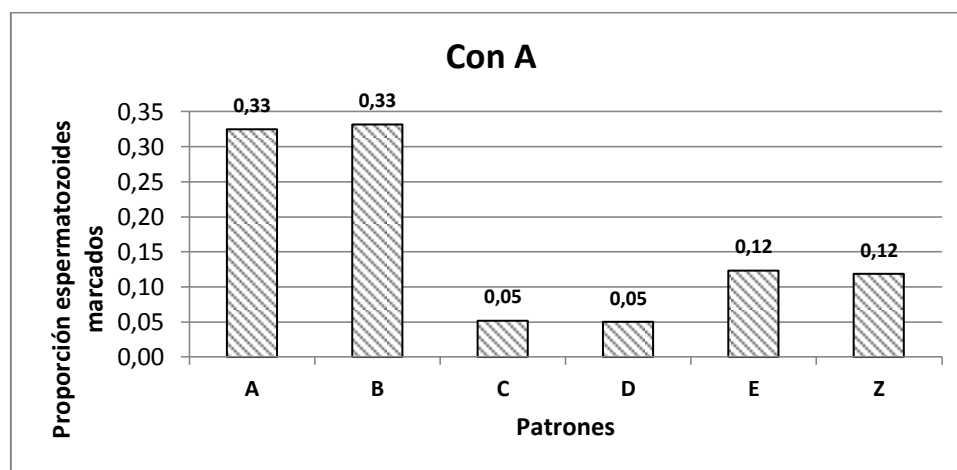
## Lectina Con A

La lectina Con A asociada a FITC (Fig. 19) presenta fluorescencia en toda la superficie de la membrana del espermatozoide, con bordes difusos, pero la intensidad de la fluorescencia en el flagelo es escasa con respecto a la intensidad de fluorescencia que se observó en la cabeza. Se presentaron seis patrones (A-E y Z) de los cuales los clasificados como A (mayor intensidad de fluorescencia entre el límite de la cabeza y el flagelo) y B (mayor intensidad en el centro de la cabeza) fueron los más frecuentes. Los azúcares que reconoce esta lectina y que están presentes en la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum* son:  $\alpha$ -manosa y  $\alpha$ -glucosa.

# RESULTADOS



**Fig. 19** Marcaje con la lectina Con A-FITC. a) campo de fluorescencia, b) campo claro. Se puede apreciar fluorescencia intensa en la cabeza sin fluorescencia en el flagelo, el cual sí está presente como se puede observar en la fotografía de campo claro (b) Los residuos de carbohidratos presentes en la membrana son:  $\alpha$ -manosa y  $\alpha$ -glucosa que reconoce Con A. En esta fotografía Se observa un patrón de fluorescencia entre el límite de la cabeza y el flagelo, y es clasificado con la letra A, (flecha roja). Vista 63 X. Fotografías tomadas con el microscopio confocal.



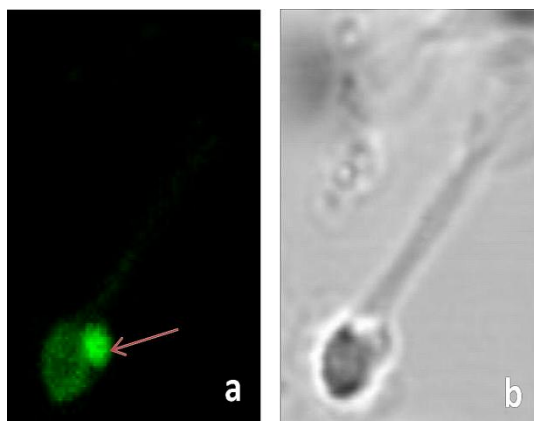
**Fig. 20** Gráfica comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-E y Z de la lectina Con A. Se aprecia que los patrones A y B se presentan con la misma frecuencia (33%) pero ambos son mayores con respecto al resto. El patrón que seguiría en orden de frecuencia sería el patrón clasificado como E (12%) mayor intensidad en la parte apical de la cabeza.

# RESULTADOS

---

## Lectina WGA

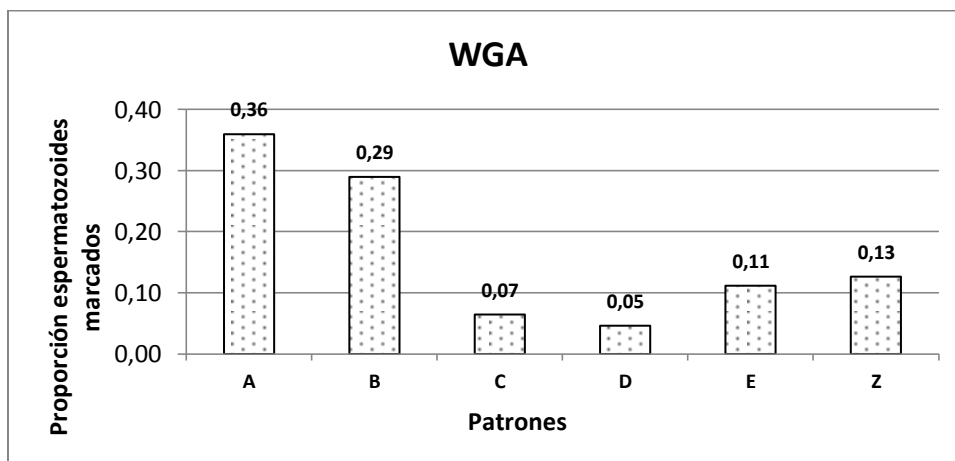
32Se encontró fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide de *C. humboldtianum* con bordes difusos y nula para el flagelo (Fig. 21), el azúcar que reconoce la lectina WGA es la N-acetilglucosamina y se determina que dicho azúcar está presente. WGA-FITC marcó seis patrones frecuentes A-E y Z, destacándose el A (fluorescencia intensa en el límite de la cabeza y el flagelo) y el B (intensidad de fluorescencia en el centro de la cabeza) del resto.



**Fig. 21** Marcaje con la lectina WGA-FITC. a) campo de fluorescencia, b) campo claro. Esta lectina tiene receptores en la cabeza pero no en el flagelo de *C.humboldtianum*, se confirma en la fotografía de fluorescencia (a). En la fotografía de campo claro (b) se observa la presencia del flagelo. El azúcar al que se une WGA es N-acetilglucosamina. Se aprecia en la fotografía una concentración ubicada en la parte posterior de la cabeza, (flecha roja). Vista 63 X. Fotografías tomadas con el microscopio confocal.

# RESULTADOS

---

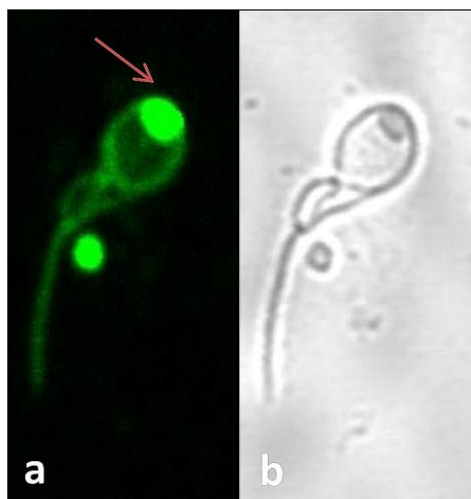


**Fig. 22** Gráfica comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-E y Z de la lectina WGA. Se aprecia que los patrones A (36%) y B (29%) se presentan con mayor frecuencia, siguiendo el patrón E (11%). Comparando los patrones A y B, resultó más frecuente el patrón A (mayor fluorescencia entre el límite de la cabeza y el flagelo).

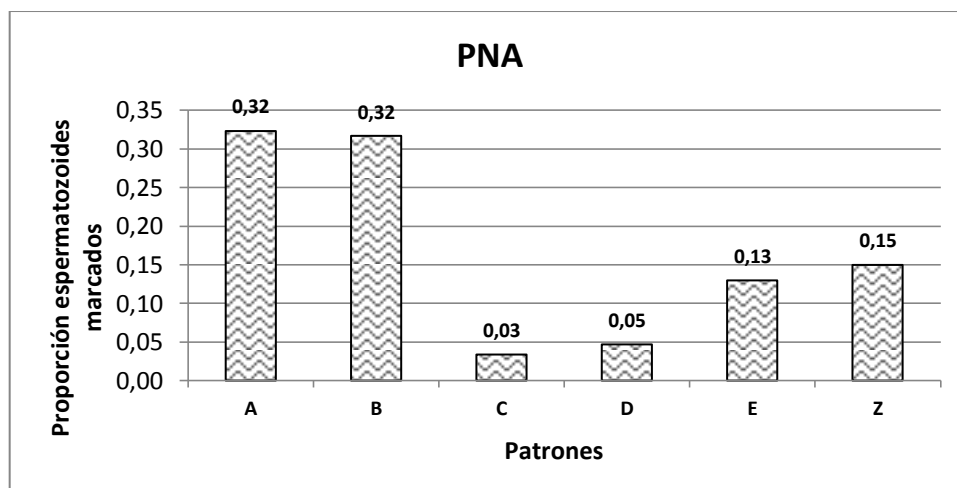
## Lectina PNA

La fluorescencia que emitió la lectina PNA asociada a FITC (Fig. 23) fue de intensidad alta en toda la periferia de la membrana del espermatozoide, con bordes bien definidos tanto en cabeza como en flagelo. Al igual que en las lectinas Con A y WGA se encontraron en esta lectina seis patrones en común A-E y Z, los patrones A y B se presentaron con mayor incidencia respecto al resto. Los residuos glicosídicos que están presentes en la membrana del espermatozoide de *C. humboldtianum* y que reconoce la lectina PNA son:  $\beta$ -galactosa y N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina.

# RESULTADOS



**Fig. 23** Marcaje con la lectina PNA-FITC. a) campo de fluorescencia, b) campo claro. Se observa mayor intensidad de fluorescencia con respecto a las lectinas Con A, WGA, PSA y UEA, dicha intensidad está delimitada en la periferia. Los azúcares a los que se une PNA son  $\beta$ -galactosa y N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina. En esta fotografía se observa un patrón bien definido en la parte apical (flecha roja) de la cabeza del espermatozoide catalogado en este trabajo con la letra E. Vista 63 X. Fotografías tomadas con el microscopio confocal



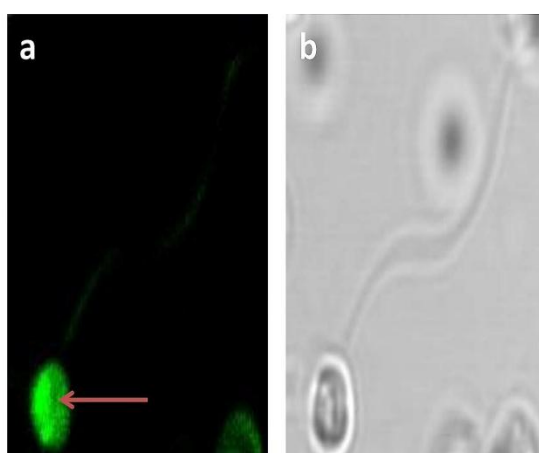
**Fig. 24** Gráfica comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-E y Z de la lectina PNA. Los patrones A y B se presentan con la misma frecuencia (32%) y la cual es mayor con respecto al resto de los patrones. El patrón que sigue es el E con un 13%.

# RESULTADOS

---

## Lectina PSA

Se encontró fluorescencia en la cabeza y el flagelo con bordes difusos, la intensidad de fluorescencia fue mayor en la cabeza con respecto al flagelo (Fig. 25). Los azúcares presentes en la membrana del espermatozoide de *C. humboldtianum* son manosas terminales y glucosa que reconoce la lectina PSA. Se encontraron seis patrones (A-E y Z) frecuentes, de este grupo los patrones clasificados con las letras A y B sobresalieron del resto.

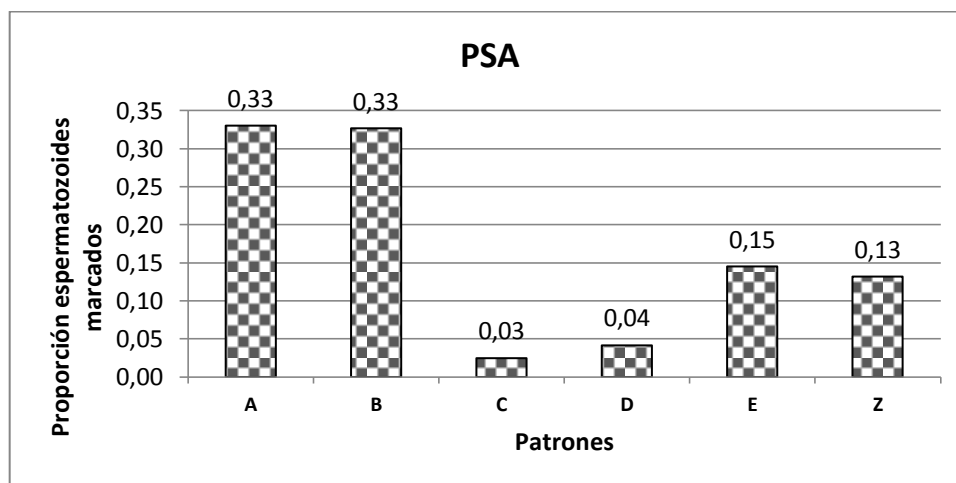


**Fig. 25** Marcaje con la lectina PSA-FITC. a) campo de fluorescencia, b) campo claro. Se puede apreciar que la lectina tiene receptores en la cabeza y el flagelo del espermatozoide de *C. humboldtianum*. Se observa mayor intensidad de fluorescencia en la cabeza que en el flagelo. PSA reconoce manosas terminales y Glu. En esta fotografía se observa una concentración en el centro (flecha roja) de la cabeza clasificado como patrón B. Vista 63 X. Fotografías tomadas con el microscopio confocal



# RESULTADOS

---

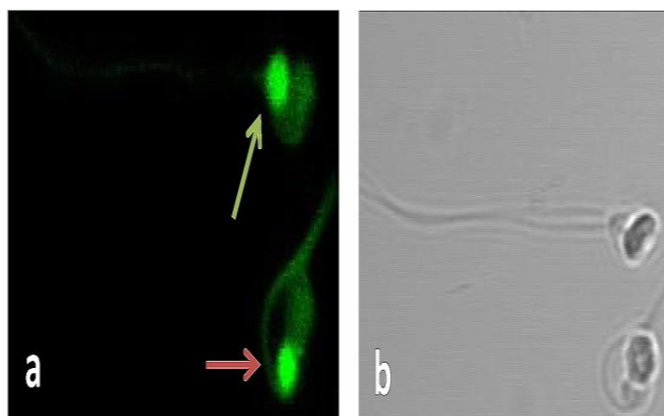


**Fig. 26** Gráfica comparativa de las medias de la proporción entre los patrones A-Z de la lectina PSA. Se aprecia que los patrones A y B se presentan con mayor frecuencia con respecto al resto de los patrones y en este caso ambos se presentan con la misma frecuencia y al igual que las lectinas Con A, WGA y PNA, el patrón que sigue en frecuencia es el E.

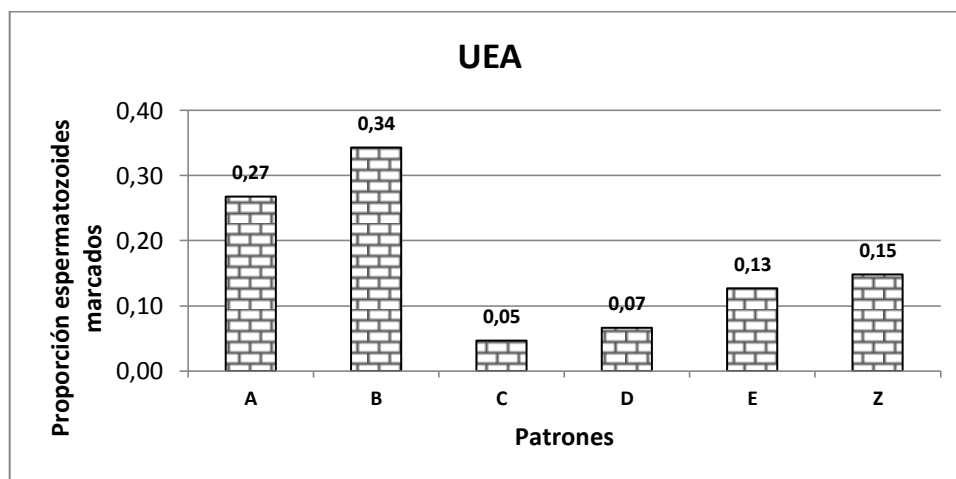
## Lectina UEA

En la lectina UEA unida a FITC (Fig. 27), se observó fluorescencia en la cabeza y el flagelo con bordes definidos, siendo mayor la intensidad de la fluorescencia en la cabeza con respecto al flagelo. Se encontraron seis patrones frecuentes (A-E y Z), pero los clasificados como A y B se presentaron con mayor incidencia que el resto. Se determinó que el azúcar que reconoce esta lectina  $\alpha$ -D-fucosa está presente en la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum*.

# RESULTADOS



**Fig. 27.** Marcaje con la lectina UEA-FITC. a) campo de fluorescencia, b) campo claro. Se observa que UEA tiene receptores en toda la superficie de la membrana del espermatozoide de *C. humboldtianum* así como en el flagelo. El azúcar que reconoce UEA es  $\alpha$ -D-fucosa. En estas fotografías se aprecia claramente que las concentraciones o patrones de los azúcares se encuentran ubicadas en un espermatozoide (flecha verde), entre el límite de la cabeza y el flagelo, (patrón A) y en el otro (flecha roja) en la parte apical (patrón E). Fotografías tomadas con el microscopio confocal Vista 63X.



**Fig. 28** Gráfica comparativa entre las medias de la proporción de los patrones A-E de la lectina UEA. Se aprecia que el patrón B (mayor fluorescencia en la parte central de la cabeza) comparándolo con el A se presenta con mayor frecuencia con respecto a éste y ambos se presentan con mayor frecuencia con respecto al resto del grupo. Igualmente que en las lectinas Con A, WGA, PNA y PSA el patrón que les sigue es el E.

# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

Los resultados del análisis con respecto a la posición de los azúcares entre cada una de las lectinas (tabla 5, anexo 1) indican que no hay diferencia en la posición o distribución que guardan los patrones encontrados en común en las cinco lectinas empleadas (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Este mismo efecto se determinó para la posición que presentaron los azúcares entre cada una de las lectinas (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

Sin embargo en lo que respecta a la frecuencia con que se presentan cada uno de los patrones es diferente en cada lectinas (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Con respecto a la interacción entre los patrones y su posición entre los espermatozoides no existe relación alguna, el tipo de lectina no influye para determinar la posición de cada patrón, es decir, se encontraron los mismos seis patrones principales (A-E y Z) en todas las lectinas analizadas.

# DISCUSIÓN

---

Este es el primer trabajo en el que se estudia la determinación de residuos glicosídicos en la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum*, su distribución, patrones presentados y frecuencia. Aunque en primera instancia sólo se trata de una caracterización, estos resultados pueden contribuir para estudios posteriores como determinar si la distribución de los azúcares tienen relación directa con el éxito de la fertilización de esta especie, también puede contribuir como base para la realización de protocolos que conlleven a desarrollar biotecnologías que permitan un manejo adecuado para su conservación o cultivo.

El empleo de las lectinas Con A, WGA, PNA, PSA y UEA para caracterizar los residuos glicosídicos presentes en la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum* ofrece resultados positivos, ya que demuestra la presencia de todos los azúcares que reconocen cada una de las lectinas. Todos los residuos glicosídicos encontrados ( $\alpha$ Man,  $\alpha$ Glc, GlcNAc(b1,4GlcNAc)1-2,  $\beta$ -galactosa, manosas terminales, glucosa, Fuc) están presentes en la cabeza, pero en el flagelo del espermatozoide es escasa o nula la presencia de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa y de N-acetilglucosamina.

Aunque estos azúcares se observaron en toda la superficie de la membrana del espermatozoide, se encontraron cinco patrones principales de fluorescencia en mayor densidad en la cabeza que en el flagelo, estudios particulares realizados con peces teleósteos sugieren un comportamiento similar a la especie de estudio ya que al caracterizar las glicoproteínas de la membrana plasmática durante la espermatogénesis en los espermatozoides de los géneros *Xiphophorus maculatus* y del chilensis *Elasmobranch Schroederichthys* (Rojas, et al. 2001), utilizando las lectinas concanavalina A (ConA) y aglutinina de germen de trigo (WGA) mediante microscopía láser confocal presentaron un

# DISCUSIÓN

---

comportamiento análogo. Por otra parte en *Xiphophorus*, una especie vivípara que presenta espermatozoides acrosomales, espermocitos primarios y espermátidas de forma redondeada, en los que se empleó como marcadores a las mismas lectinas descritas anteriormente mostró que toda la superficie de la célula se marcó por ambas lectinas. Mientras que, en los espermatozoides maduros se observó una fluorescencia discreta y no aleatoria exclusivamente en la superficie de la cabeza del espermatozoide (Tokalov y Gutzeit 2007). Esta descripción coincide con las observaciones para esta especie y aun cuando las cinco lectinas probadas están presentes en toda la cabeza del espermatozoide de *C. humboldtianum*, es posible observar dos patrones que se presentan con mayor frecuencia en comparación con el resto.

Se ha demostrado que las lectinas unidas a FITC, permiten analizar la condición de los espermatozoides a través de la movilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática y metabolismo, que determinan las principales funciones de los espermatozoides para llegar y entrar en el óvulo durante la fertilización (Cabrita, 2009). Bajo esta premisa la movilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de *C. humboldtianum* analizados presentaron buenas condiciones de acuerdo a los valores determinados para cada parámetro.

Por otro lado, un aspecto relevante es la caracterización seminal, que permite identificar parámetros de normalidad, con el fin de seleccionar e identificar posibles donantes para los bancos de germoplasma de peces (Fresneda, 2004). En ese sentido, existen daños que afectan los parámetros de calidad de los espermatozoides como: motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática, metabolismo, entre otros, que determinan las principales funciones de los espermatozoides de los peces para llegar y entrar en el óvulo

# DISCUSIÓN

---

durante la fertilización (Cabrita, 2009), para el caso de *C. humboldtianum* la presencia de estos azúcares permiten determinar no solo parámetros de normalidad sino inferir la calidad espermática, como un aspecto básico de la biología de la especie que garantice una fertilidad alta para mantener el tamaño de la población en condiciones reproductivas adecuadas o estables.

De acuerdo con los resultados del ANOVA, indican que entre las cinco lectinas empleadas, no hay diferencia significativa en cuanto a la distribución que presentan en la membrana del espermatozoide *C. humboldtianum*, ya que los cinco patrones observados, se encontraron en común en las cinco lectinas y demuestran que no hay interacción entre lectinas y patrones, es decir, que cada una de las lectinas no tiene un patrón específico que sea característico de la lectina en cuestión, aunque existe una diferencia significativa en cuanto a la frecuencia con que se presentan. En ese sentido los patrones A (mayor fluorescencia entre el límite de la cabeza y el flagelo) y B (mayor fluorescencia en el centro de la cabeza) quienes fueron los de mayor incidencia en las cinco lectinas empleadas, indicativo de que los azúcares  $\alpha$ Man,  $\alpha$ Glc, GlcNAc(b1,4GlcNAc)1-2,  $\beta$ -galactosa, manosas terminales, glucosa, y Fuc encontrados, pudieran servir como factor de iniciación para el reconocimiento de la región del micropilo del huevo (Cabrita, et. al., 2009) y pueda llevarse a cabo con éxito la fertilización y evitar una polispermia, ya que son indicadores al momento de introducción del primer espermatozoide para cerrar inmediatamente el canal del micropilo. En ese sentido es posible inferir que en los espermatozoides de peces carentes de acrosoma, como es el caso de *C. humboldtianum* los residuos glicosídicos están distribuidos en toda la superficie de la membrana y aunque no existen estudios similares a este, los patrones identificados pudieran asociarse con el estado de madurez del espermatozoide, ya que se ha demostrado que los diferentes patrones de

# DISCUSIÓN

---

tinción de las lectinas se pueden utilizar como una herramienta analítica para distinguir diferentes células de interés, lo mismo que en análisis histoquímicos de testículos las diferentes lectinas, muestran notablemente diferentes patrones de tinción asociados con etapas del desarrollo de la espermatogénesis en células de mamíferos (Tokalov & Gutzeit, 2007), lo cual plantea la posibilidad de otros estudios que conlleven a dilucidar estos aspectos.

# CONCLUSIONES

---

-Se establecieron las condiciones para el marcaje de los azúcares encontrados en la membrana de los espermatozoides de *Chirostoma humboldtianum* así como la técnica de centrifugación adecuadas para observar los flagelos completos.

-Los residuos glicosídicos presentes en la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum*, son:  $\alpha$ Man,  $\alpha$ Glc, GlcNAc(b1,4GlcNAc)1-2,  $\beta$ -galactosa, manosas terminales y glucosa, así como Fucosa.

-Es posible inferir que estos azúcares en conjunto son característicos de esta especie, ya que en estudios realizados con otros grupos de organismos (mamíferos por ejemplo), no se han reportado todos los azúcares que marcan las lectinas en la membrana de los espermatozoides en estudio.

-La microscopía confocal revela la existencia de seis patrones de fluorescencia en la superficie de la membrana de los espermatozoides de *C. humboldtianum*, dichos patrones se presentaron en las cinco lectinas empleadas.

-Existen dos grupos que destacan por su frecuencia, son los clasificados como patrón A (mayor concentración de fluorescencia entre el límite de la cabeza y el flagelo) y el patrón B (mayor intensidad de fluorescencia en el centro de la cabeza).

Respecto a la evaluación espermática, los espermatozoides de *C. humboldtianum* utilizados presentaron movimiento vigoroso y rectilíneo y se encontró más del 75% de espermatozoides en movimiento, estas características se consideran con mayor poder fecundante. La viabilidad fue del 80.43% que indica un alto porcentaje de espermatozoides vivos, los que tienden a favorecer una alta fertilización y una concentración espermática de  $1.82 \times 10^{10}$  espermatozoides/ $\mu$ l.



# CONCLUSIONES

---

## Recomendaciones

Se considera conveniente realizar análisis para cuantificar la intensidad de la fluorescencia ya que la relación que existe entre la fluorescencia y su intensidad permite estimar la concentración nominal de los residuos glicosídicos.

Estimar el potencial de fecundación para los diferentes patrones determinados.

# BIBLIOGRAFÍA

---

Arenas, C., Cambrón, R., Ambríz, D., Zuñiga, P., Rodríguez, A. y Rosado, A. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. Recuperado de: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/fisiologica.pdf>.

Barbour, C.D. (1973). The systematic and evolution of the genus *Chirostoma* Swainson (Pisces: Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany*, 18(3):97-141, Black K.D., 1998. *Biology of farmed fish*. Sheffield Academia Press. England. pp. 44-50.

Battaner- Arias. (2013). *Biomoléculas. Una introducción estructural a las biomoléculas*. 1era. Edición, Ediciones Universidad de Salamanca, España, p.p. 123-124.

Blancas-Arroyo; Barriga-Sosa; Morato-Cartagena; Romero-Ramírez y Arredondo-Figueroa. (2008). Desarrollo ovárico y su relación con las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol y  $17\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona en hembras de primera maduración de pez blanco, *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Revista veterinaria México*. versión impresa ISSN 0301-5092. *Vet. Méx* v.39 n.1 México ene./mar. 2008. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922008000100006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922008000100006).

Beirão, J. (2011). *Calidad del semen en teleósteos marinos: aplicaciones a la gestión de reproductores y al almacenamiento del semen de dos especies cultivadas Solea senegalensis y Sparus aurata*. Tesis Doctoral. Universidad de León. Recuperado de: [buleria.unileon.es/.../2010ON-BEIRAO%20SANTOS,%20JOSE.pdf?...1](http://buleria.unileon.es/.../2010ON-BEIRAO%20SANTOS,%20JOSE.pdf?...1).

Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. Ed. Reverté, Barcelona, pp. 320-323. Recuperado de: [Recuperado de: books.google.com.mx/books?isbn=8429176004](http://books.google.com.mx/books?isbn=8429176004) -.

# BIBLIOGRAFÍA

---

Cárdenas, R. y Barrera, H. (1998). Histología y ultraestructura del testículo del charal *Chirostoma jordani* (Osteichthyes:Atherinidae). *Revista de Biología Tropical*. *Rev. biol. trop* vol.46 no.4 San José dic. 1998. Recuperado de: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77441998000400007](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441998000400007).

Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P., (2009). *Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*, CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, U.S.A., pp. 319.

Carbohidratos de membrana. Recuperado de: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2013/02/carbohidratos-de-membrana.html>.

Conceptos generales de la estructura de la membrana plasmática. Capítulo 4. Recuperado de: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r99507.PDF>.

Cox, J.F., Fernández, P; Saravia, F.; y Santa Maria, A. (1998). Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*. Versión impresa ISSN 0301-732X *Arch. med. vet.* v.30 n.1 Valdivia 1998. Recuperado de: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1998000100010&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1998000100010&script=sci_arttext).

Cummings, R. y Etzler, M. (2009). *Fundamentos de Glicobiología*. Capítulo 28, segunda edición, Cold Spring Harbor, Nueva York. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>.

# BIBLIOGRAFÍA

---

Davina N.Moothoo, Booma Canan, Robert A.Field & James H.Naismith<sup>1</sup>. (1999). Man  $\alpha$ 1–2 Man  $\alpha$ -OMe–concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition Centre for Biomolecular Sciences, Purdie Building, The University, St. Andrews KY16 9ST, UK Received on August 3, 1998; revised on October 7, 1998; accepted on October 11, 1998. *Glycobiology* vol. 9 no. 6 pp. 539–545, 1999. Recuperado de: <http://glycob.oxfordjournals.org/content/9/6/539.full.pdf+html>.

Del Brío-León & Riera-Rovira. (1995). Manual de Bases Teórico Prácticas de Inmunocitoquímica. Publicaciones Oviedo, España, p. 72. Recuperado de: [books.google.com](http://books.google.com) › Science › Life Sciences › Cell Biology.

Elías-Fernández; Navarrete-Salgado; Rodríguez-Robles. (2008). Alimentación de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes); (Pisces: atherinopsidae) en el estanque JC en Soyaniquilpan, Estado de México. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*. *Rev. Chapingo* vol.14 no.2 Chapingo jul./dic. 2008. versión impresa ISSN 0186-3231 Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-32312008000200008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-32312008000200008).

Ezcurra, E. (2003). De las chinampas a la megalópolis, 3era. Edición, Ed. Fondo de Cultura Económica, México, p. 26.

Fàbrega A 1, Puigmulé M, Dacheux JL, Bonet S & E Pinart (2012). Caracterización Glycocalyx y glicoproteína expresión de las muestras del SUS domesticus epidídimo los espermatozoides de superficie. *Reprod Fertil Dev*. 2012; 24 (4):619-30. doi: 10.1071/RD11064. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541550>.

# BIBLIOGRAFÍA

---

Figuroa-Lucero; Hernández-Rubio; Ríos-Becerril; y Sevilla-Hernández. (1999). Bioensayos de alimentación en alevines de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) (Pisces:Atherinidae) bajo condiciones de laboratorio. An.Esc.Nal.Cien.Biol.Mex.

Figuroa-Lucero, G.; Paulo-Maya, J.; Hernández-Rubio, M.C. (2003). Retrospectiva y avances en el conocimiento de la biología y ecología de los charales y peces blancos del género *Chirostoma* (Atheriniformes: Atherinopsidae) en la ENCB-IPN. INAPESCA

SAGARPA. Recuperado de: [http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/LIBROS/pescado\\_blanco.pdf](http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/LIBROS/pescado_blanco.pdf).

Fresneda, Adriana, et. al. (2004). “Revista Colombiana de Ciencias Pecuarías”, Espermación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachyomus*). Rev Col Cienc Pec Vol. 17: Suplemento, 2004. [rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/185/182](http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/185/182). Recuperado de: [rccp.udea.edu.co](http://rccp.udea.edu.co) > Home > Vol 17, No 4 (2004) > Fresneda.

Ganem-Báez & Martín-González. (2000). Lectina concanavalina A: obtención y purificación. Laboratorios Beterá. Recibido:3 de mayo del 2000. Aprobado:27 de junio del 2000. Recuperado de: [http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol11\\_1\\_00/uni05100.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol11_1_00/uni05100.pdf).

García, M., Lippi, S. y Valverde, J. (2001). Frecuencia de los Grupos Sanguíneos A1, A2, aint, B y O en individuos normales. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2001;17(3):171-4. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v17n3/hih03301.pdf>.

# BIBLIOGRAFÍA

---

González E. y Díaz, J. (2001) Capítulo XI. Principios básicos de la criopreservación de esperma de peces. p.p.253-261. Recuperado de:

<http://190.60.31.203:8080/jspui/bitstream/123456789/3634/10/051.9.pdf>.

Gonzalez-León, Caso de Armas, González- Chávez. (2011). Lectina: una biomolécula que promete en las ciencias biomédicas. Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río versión On-line ISSN 1561-3194. Rev Ciencias Médicas v.15 n.2 Pinar del Río abr.-jun. 2011.

Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1561-31942011000200002&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1561-31942011000200002&script=sci_arttext).

Global invasive species database. (2010). Ulex europaeus (árboles, arbustos). Recuperado de: (<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=69&lang=EN>).

Guest,W.C., J.W. Avault, y J.D. Roussel. (1976). Preservation of channel catfish sperm. Transactions of the American Fisheries Society 3: 469-474. Información obtenida de:

Peñaloza-Camargo.2009. Evaluación de la calidad espermática de productores cultivados de Reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro Menidia estor para optimizar el proceso de fertilización. Tesis de Maestría. Recuperado de: [www.bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/.../...](http://www.bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/.../)

Hans-Joachim Gabius, Lizhong Él, Sabine André, Hans-Christian Siebert, Heike Helmholz, Bernd Niemeyer. (2003). La detección de alteraciones ligando y forma solvente inducida de la célula-reguladoras del crecimiento lectina humana galectina-1 en solución por Small Angle Neutron y X-Ray Scattering. Biophys J. julio de 2003; 85 (1): 511-524.

Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1303107/>.

# BIBLIOGRAFÍA

---

Hernández-Cruz, Pedro; et al. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Reb* 24 (1): 21-27, 2005. Recuperado de: [www.facmed.unam.mx/.../01/g\\_21\\_27\\_PEDRO\\_HERNANDEZ\[1\].pdf](http://www.facmed.unam.mx/.../01/g_21_27_PEDRO_HERNANDEZ[1].pdf).

Hernández-Díaz, Martín- González, Rodríguez de Pablos Vélez y Ganem- Báez. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* versión On-line ISSN 1561-2996. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* v.15 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago. 1999. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-02891999000200002&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-02891999000200002&script=sci_arttext).

Huan-Yao Lei, Chih-Peng Chang. (2009). Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J Biomed Sci.* 2009; 16(1): 10. Published online 2009 January 19. doi: 10.1186/1423-0127-16-10. PMID: PMC2644972 Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1303107/>.

Inseminación en piscicultura. Los espermatozoides de los peces. Recuperado de: <http://mto.humeco.net/fotos/649030398rad520FE.pdf>.

Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, JA., García, A., Betancourt, M., y Fierro, R. (2003). Los cambios en la distribución de los receptores de lectina durante la capacitación y la reacción del acrosoma en espermatozoides de cerdo. *Theriogenology.* 2003 Mar;59(5-6):1171-80. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527065>.

Knobil and Neill. (2006). *Physiology of Reproduction*. Third edition. Volumen 1 y 2. Academic Press. USA. Recuperado de: <http://elib.fk.uwks.ac.id/asset/archieve/e-book/FISIOLOGI%20-%20FAAL%20-%20PHISIOLOGY%20->

# BIBLIOGRAFÍA

---

%20PATHOFISIOLOGY/Knobil%20and%20Neill's%20Physiology%20of%20Reproducti  
on.pdf.

Lectinas de Triticum vulgare. Descriptores en Ciencias de la Salud. Biblioteca virtual en  
Salud. Recuperado de: [http://decs.bvs.br/cgi-  
bin/wxis1660.exe/decsserver/?IsisScript=../cgi-  
bin/decsserver/decsserver.xis&task=exact\\_term&previous\\_page=homepage&interface\\_lan  
guage=e&search\\_language=e&search\\_exp=Lectinas%20de%20Triticum%20vulgare](http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/?IsisScript=../cgi-bin/decsserver/decsserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepage&interface_language=e&search_language=e&search_exp=Lectinas%20de%20Triticum%20vulgare).

Martín, F., Halón, N., Bustos, M., Pavarotti, M., & Mayorga, L. (2012). Analisis De La  
Reaccion Acrosomal en Tiempo Real. Acta Microscopica, Vol. 21, Supp. A, 2012, pag. 177

Martínez-Muñoz. (2009). Estudio de las Interacciones entre la Vicilina y las Lectinas Con  
A y Cel-II de la semilla de Canavalia ensiformis. Tesis Doctoral. Universidad de  
Colombia. Colombia.

Martínez, J. y Pardo, S. (2010). Crioconservación de semen en peces: efectos sobre  
la movilidad espermática y la fertilidad. Red de Revistas Científicas de América Latina, el  
Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica. Acta biol. Colomb., Vol. 15  
N.º 2, 2010 3 – 24. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319027885001.pdf>.

Matas, C. (1997). Analisis Mediante Citometria De Flujo De La Respuesta De Los  
Espermatozoides De Verraco A Diferentes Medios De Incubación. Tesis Doctoral.  
Universidad de Murcia. Recuperado de:  
<http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/130/1/MatasParra.pdf>.



# BIBLIOGRAFÍA

---

Membrana celular. La célula eucariótica. Recuperado de:  
[http://docencia.izt.uam.mx/gra/bioquimica1pdfs/2\\_2\\_membrana.pdf](http://docencia.izt.uam.mx/gra/bioquimica1pdfs/2_2_membrana.pdf).

Molist, P., Pombal, M. y Megías, M. (2011). Atlas de Histología Vegetal y Animal. Citología. 3-Membrana Celular. Técnicas Histológicas 5-Tinción inmunocitoquímicas. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. España. Recuperado de:  
<http://webs.uvigo.es/mmegias/descargas/atlas-celula-03-membrana-celular.pdf>.

Montoya-Ureta, Ten-Morro, Mendiola-Olivares, Guerrero Villena, Bernabeu-Pérez. (2008). Revista Fertilidad. Utilidad de las lectinas en el estudio de espermatozoides. Vol. 25- n° 4 Julio-Agosto 2008. Recuperado de:  
<http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Julio-Agosto2008-TRABAJO4.pdf>.

Molecular Probes. (2003). Lectin PNA conjugates. Recuperado de:  
<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp21409.pdf>.

Padrón, R., Fernández, G., Gallardo, M. (1998). Interpretación del análisis seminal. Rev Cubana Endocrinol 1998;9(1):81-90. Recuperado de:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol9\\_1\\_98/end11198.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol9_1_98/end11198.htm).

Palma, G. (2007). Biotecnología de la Reproducción. Determinación de la vitalidad espermática. Recuperado de: [http://www.reprobiotec.com/congel\\_vivos.html](http://www.reprobiotec.com/congel_vivos.html).

Paulo-Maya, J.; Figueroa-Lucero, G.; Soria-Barreto M. (2000). Peces dulceacuícolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Zoología Informa* (43):59-74.

# BIBLIOGRAFÍA

---

Roa, I.; Araya, J.; Villaseca, M.; Roa, J. (1997). La Revista Chilena de Cirugía. Estudios complementarios al diagnóstico histológico en patología quirúrgica. ISSN: 0379-3893. Volumen 49 No. 4 agosto 1997. p. 447. Recuperado de: [http://books.google.com.mx/books?id=n9k2IeZv4LUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=n9k2IeZv4LUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

Rojas-Carrillo, P. (2005). El pescado blanco. Revista digital universitaria. 10 de agosto 2005 • Volumen 6 Número 8 • ISSN: 1067-6079. Recuperado de: [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num8/art80/ago\\_art80.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num8/art80/ago_art80.pdf).

Rojas, MV y Esponda P. (2001). Plasma membrane glycoproteins during spermatogenesis and in spermatozoa of some fishes. J Submicrosc Cytol Pathol. 2001 Jan-Apr;33(1-2):133-40. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686394>.

Sansegundo, M. (2008). Estudio de la Capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Recuperado de: [www.tdx.cat/bitstream/10803/10860/2/SansegundoGonzalez.pdf.txt](http://www.tdx.cat/bitstream/10803/10860/2/SansegundoGonzalez.pdf.txt).

Sharon, N., & Lis, H. (2007). Lectins, segunda edición, Ed. Springer, E.U. p.p. 82-89. Recuperado de: [http://books.google.com.mx/books?id=7Ffvxcwmc2QC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=7Ffvxcwmc2QC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

Sharona Elgavish & Boaz Shaanan. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: different forms, common principles. Reviews. TIBS 22 - DECEMBER 1997. Recuperado

# BIBLIOGRAFÍA

---

de: [http://ac.els-cdn.com/S0968000497011468/1-s2.0-S0968000497011468-main.pdf?\\_tid=49efec6a-2d8a-11e3-b60b-0000aab0f27&acdnat=1380955952\\_37d2061981bd23c13d839cf338af4c36](http://ac.els-cdn.com/S0968000497011468/1-s2.0-S0968000497011468-main.pdf?_tid=49efec6a-2d8a-11e3-b60b-0000aab0f27&acdnat=1380955952_37d2061981bd23c13d839cf338af4c36).

SKOOG, D.A.; Leary J.J.; Análisis Instrumental, 4° ed.; Ed. McGraw-Hill (1994), págs. 201-219. Recuperado de: </Documents%20and%20Settings/Administrador/Mis%20documentos/Downloads/lectura8.pdf>.

Szász F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marcas A, B Colenbrander, Solti y L, Gadella BM. (2000). Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev.* 032000, 55 (3):289-98. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657048>.

Tabares, C., Tarazona, A., Olivera, M., & Sci. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Rev Col Cienc Pec Vol. 18:2, 2005.* Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/2950/295022959006.pdf>.

Tokalov, S. & Gutzeit, H. (2007). Lectin-binding pattern as tool to identify and enrich specific primary testis cells of the tilapia (*Oreochromis niloticus*) and medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology Parte B: Molecular y del Desarrollo Evolution* 308B Volumen, Número 2, páginas 127 a 138, 15 de marzo 2007. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16788897>.

# BIBLIOGRAFÍA

---

Torres-Aretaga. (2010). Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis de Maestría. Centro Universitario Queretáro. Queretaro, Qro. México.

Uria, G. E., Moncayo, L. M. y Garibay, G. R. (1998). Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae), del embalse Huapango, Edo. de México. *Revista hidrobiológica* 1998, 8 (1): 9-18. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57880102>.

Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V. y Fernández, J. (2009). Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. *Arch. med. vet.* v.41 n.2 Valdivia 2009. Recuperado de: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2009000200002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2009000200002).

Van Damme, E., Peumans, W., Pusztai, A., & Bardocz, S. (1998). *Handbook of plant lectins: Properties and Biomedical Applications*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, England, p. 13. Recuperado de: <http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=qfkkXIcEO4YC&oi=fnd&pg=PR9&dq=lectin+PSA+propierties&ots=v51QjIuepn&sig=g23vSDdXa8eoMydEb0ULYj5fQk#v=onepage&q=lectin%20PSA%20propierties&f=false>

Vector Laboratories. *Table of Lectin Properties*. Recuperado de: <http://www.vectorlabs.com/data/protocols/K4-K7.pdf>.

Viveiros, A.T.M. Jatzkowski y Komen. (2003). Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias garlepinus*). *Theriogenology* 59; 1905-1917.

Información obtenida de: Peñaloza-Camargo.2009. Evaluación de la calidad espermática

# BIBLIOGRAFÍA

---

de productores cultivados de Reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro  
Menidia estor para optimizar el proceso de fertilización. Tesis de Maestría. Recuperado de:  
[www.bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/.../...](http://www.bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/.../...)[consulta:15-02-2013].

Willy J. Peumans and EIS J. M. Van Damme. (1995). *Plant Physiol.* (1995) 109: 347-352.  
Recuperado de: <http://www.plantphysiol.org/content/109/2/347.full.pdf+html>.

Yanagimachi, R., Cherr, G., Matsubara, T., Andoh, T., Harumi, T., Vines, C., Pillai, M.,  
Griffin, F., Matsubara, H., Weatherby, T., Kaneshiro, K. (2013). Sperm Attractant in the  
Micropyle Region of Fish and Insect Eggs. *Biology Of Reproduction* (2013) 88(2):47, 1–  
11.

Zanuy, S., Carrillo, M. (1987). La reproducción de los teleósteos y su aplicación en  
acuicultura. Capítulo I. Reproducción en Acuicultura. Comisión asesora de Investigación  
Científica y Técnica. Ed. J. Espinoza de los Monteros y U. Labarta. Madrid, España. p.p.  
1-3.

# ANEXO 1

**Tabla 5.** Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	patrón A	patrón B	patrón C	patrón D	patrón E	patrón Z	Total
<i>Con A</i>							
Cuenta	6	6	6	6	6	6	36
Suma	35,0591998	35,5590673	20,7276042	20,5167212	27,0966304	25,6857629	164,644986
Promedio	5,84319997	5,92651122	3,45460071	3,41945353	4,51610506	4,28096048	4,57347183
Varianza	0,39841698	0,02375778	0,53888074	0,54480507	0,07575407	0,96205287	1,41173703
<i>WGA</i>							
Cuenta	6	6	6	6	6	6	36
Suma	36,1492224	34,1962232	22,8405333	20,601155	26,1174179	26,9098314	166,814383
Promedio	6,0248704	5,69937053	3,80675555	3,43352584	4,35290299	4,48497189	4,63373286
Varianza	0,367124	0,05861072	0,11633465	0,27108037	0,26068272	0,34203255	1,11019173
<i>PNA</i>							
Cuenta	6	6	6	6	6	6	36
Suma	34,9668652	35,0209448	18,9644251	20,2289616	27,1852486	28,09833	164,464775
Promedio	5,82781087	5,83682414	3,16073751	3,3714936	4,53087477	4,68305501	4,56846598
Varianza	0,4439445	0,11378079	0,23168608	0,48563706	0,27940862	0,41879495	1,41737909
<i>PSA</i>							
Cuenta	6	6	6	6	6	6	36
Suma	35,4252421	35,0967414	17,4857881	19,5338519	28,0147188	25,2292226	160,785565
Promedio	5,90420702	5,8494569	2,91429802	3,25564198	4,6691198	4,20487043	4,46626569
Varianza	0,12840742	0,42262474	0,24824049	0,52895434	0,18718436	1,82087763	1,84196995
<i>UEA</i>							
Cuenta	6	6	6	6	6	6	36
Suma	33,4915442	35,8246867	20,5558177	22,9422662	27,1591841	27,2304172	167,203916
Promedio	5,58192404	5,97078111	3,42596961	3,82371103	4,52653069	4,53840287	4,64455323
Varianza	0,02254888	0,14372755	0,30127869	0,15308071	0,17062388	1,15547923	1,1046432
<i>Total</i>							
Cuenta	30	30	30	30	30	30	
Suma	175,092074	175,697663	100,574168	103,822956	135,5732	133,153564	
Promedio	5,83640246	5,85658878	3,35247228	3,4607652	4,51910666	4,43845214	
Varianza	0,25628243	0,14038057	0,34096169	0,38010784	0,17828447	0,84152687	

# ANEXO 1

---

**Tabla 6.** Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo de las 5 lectinas (Con A, WGA, PNA, PSA y EUA).

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra (Lectinas)	0,724643179	4	0,181160795	0,484568	0,747043873	2,431965056
Columnas (Patrones)	179,7431066	5	35,94862132	96,1551957	5,51695E-45	2,274490999
Interacción	5,185066566	20	0,259253328	0,69344953	0,828174636	1,640972244
Dentro del grupo	56,07906217	150	0,373860414			
Total	241,7318785	179				

## Hipótesis

### Hipótesis para posición de los patrones que reconoce cada lectina

Ho = No hay diferencia en la posición de los azúcares que reconocen las cinco lectinas

Ha = Al menos una posición de los azúcares que reconocen las lectinas es diferente

### Hipótesis para la frecuencia en que se presentan los patrones en cada lectina

Ho = No hay diferencia en la frecuencia en que se presentan los azúcares

Ha = Al menos hay una frecuencia diferente

**Para muestra** (lectinas) se acepta la hipótesis nula, todos los azúcares tienen la misma posición.

**Para columnas** (patrones) se acepta la hipótesis alterna, las frecuencias en que se presentan los azúcares que reconocen cada lectina son diferentes.

**Para interacción**, no hay interacción y ésta no influye para determinar la posición del patrón, es decir, una determinada lectina no determina un patrón específico.