

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnista

### **Caracterización cinemática de espermatozoides de mamíferos silvestres criopreservados en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista


**Autor:**

Jessica Anabel Chuqui Brito

Rosa Esperanza Morocho Lata

**Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

**Cuenca, Ecuador**

2023-05-31

## Resumen

La criopreservación de espermatozoides permite conservar el material genético de especies en peligro de extinción y usarlas en técnicas de reproducción asistida (TRAs). En este sentido, esta investigación caracterizó la cinemática de los espermatozoides frescos y/o criopreservados de venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), mono chorongó (*Lagothrix poeppigii*) y tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) existentes en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca. Las muestras congeladas (n=12) y vitrificadas (n=4) de cada especie fueron descongeladas y calentadas, respectivamente y evaluadas en el sistema CASA (SCA-Evolution® 2018). Además, sólo las muestras descongeladas del venado fueron seleccionadas mediante centrifugación en gradientes de densidad (BoviPure®). Los espermatozoides de venado fueron más crioresistentes a la congelación que a la vitrificación, sin disminuir ( $P>0,05$ ) su motilidad total (MT) después de la descongelación. Sin embargo, después de la selección espermática, las velocidades (curvilínea, promedio y rectilínea) post-descongelación incrementó significativamente ( $P>0,05$ ). La vitrificación, por el contrario, redujo ( $P<0,05$ ) las motilidades (total y progresiva) y velocidades de los espermatozoides del venado y del mono. Finalmente, solo se reportó muestras frescas astenospermicas ( $> 10\%$  de MT) del tapir dado que no cumplieron las condiciones mínimas de criopreservación. En conclusión, esta investigación es la primera en Ecuador en describir las características cinemáticas de los espermatozoides frescos y/o criopreservados del venado de cola blanca, mono chorongó y tapir amazónico. La congelación y vitrificación pueden ser usados para criopreservar los espermatozoides de estas especies y usarlas en TRAs. La selección espermática puede ser una herramienta para mejorar la cinemática de espermatozoides criopreservados.

*Palabras clave:* cinemática, espermatozoides, silvestres, CASA

### Abstract

Sperm cryopreservation allows the genetic material of endangered wild species to be preserved and used in assisted reproductive techniques (ARTs). In this sense, this research characterized the kinematics of fresh and cryopreserved spermatozoa from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), chorongó monkey (*Lagothrix poeppigii*), and Amazonian tapir (*Tapirus terrestris*) available in the cryogenic bank of the University of Cuenca. The frozen (n=12) and vitrified (n=4) samples of each species were thawed and heated, respectively, and assessed in the CASA system (SCA-Evolution® 2018). Furthermore, only post-thaw deer samples were selected by BoviPure® density gradient centrifugation. Deer spermatozoa were more cryo-resistant to the freezing process than the vitrification process, without decreasing ( $P>0.05$ ) its total motility (MT) after thawing. After sperm selection, however, post-thaw velocities (curvilinear, average, and straight) increased significantly ( $P>0.05$ ). Vitrification, on the contrary, provoked a reduction ( $P<0.05$ ) of motilities (total and progressive) and velocities of both deer and monkey spermatozoa. Finally, only fresh asthenospermia samples ( $> 10\%$  MT) of tapir were reported, since they did not meet the minimum cryopreservation conditions. In conclusion, this first report in Ecuador describes the kinematic characteristics of fresh and cryopreserved spermatozoa from white-tailed deer, chorongó monkeys, and Amazonian tapir. Freezing and vitrification can be used to cryopreserve sperm from these species for use in ARTs. Sperm selection can be a valuable tool to improve the kinematics of cryopreserved sperm.

*Keywords:* kinetics, spermatozoa, wild animals, CASA

**Índice de contenido**

Capítulo 1: Introducción .....	12
1.2 Objetivos .....	15
1.2.1 Objetivo general .....	15
1.2.2 Objetivos específicos .....	15
1.3 Pregunta de investigación .....	15
Capítulo 2: Revisión de literatura .....	16
2.1. Venado de cola blanca .....	16
2.2. Tapir .....	16
2.3. Mono Chorongo.....	17
2.4. Aparato reproductor del macho .....	18
2.5. Valoración de calidad espermática .....	18
2.5.1. Motilidad espermática .....	19
2.5.2. Sistema computarizado de análisis espermático (CASA) .....	19
2.5.3. Parámetros cinemáticos.....	20
2.5.4. Viabilidad espermática .....	21
2.6. Criopreservación del semen .....	22
Capítulo 3: Materiales y métodos.....	23
3.1. Materiales.....	23
3.1.1. Materiales físicos .....	23
3.1.2. Materiales biológicos.....	23
3.1.3. Materiales de laboratorio.....	23
3.1.3.1. Reactivos .....	24
3.2. Área de estudio .....	24
3.3. Elaboración de diluyente y medios .....	24
3.4. Metodología.....	25
3.4.1. Determinación de especímenes de animales silvestres .....	25
3.4.2. Evaluación de las muestras criopreservadas .....	25
3.4.3. Análisis de cinemática espermática.....	26
3.4.4. Análisis estadístico.....	27
Capítulo 4: Resultados.....	28
4.1. Venado de cola blanca .....	28
4.2. Mono chorongo.....	31

# UCUENCA

5

4.3. Tapir amazónico .....	35
Capítulo 5: Discusión .....	37
5.1. Venado de cola blanca .....	37
5.2. Mono chorongo.....	40
5.3. Tapir amazónico .....	41
Capítulo 6: Conclusiones .....	43
Referencias.....	44
Anexos.....	53

## Índice de figuras

Figura 1. Porcentajes de motilidad total (MT), progresiva (MP) y rápidos progresivos (RP) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y vitrificadas–calentados. ....	28
Figura 2. Valores de las velocidades curvilíneas (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y vitrificados–calentados. ....	29
Figura 3. ... Índice de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y calentados – vitrificados. ....	30
Figura 4. .. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y calentados–vitrificados. ....	31
Figura 5. . Porcentajes de motilidades total (MT), progresiva (MP) y rápidos progresivos (RP) de espermatozoides de mono chorongó frescos, congelados–descongelados y vitrificados–calentados. Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas a – c, $P < 0,001$ . ....	32
Figura 6. Valores de las velocidades curvilínea (VCL), promedio (VAP), y rectilínea (VSL) de espermatozoides de mono chorongó frescos, congelados-descongelados y calentados-vitrificados. Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas a – b, $P < 0,05$ . ....	33
Figura 7. ... Índice de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de mono chorongó frescos, congelados–descongelados y vitrificados–calentados. ....	34
Figura 8. ... Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de mono chorongó frescos, congelados–descongelados y calentados–vitrificados. Letras diferentes en cada barra y en cada parámetro expresan diferencias significativas a – b, $P < 0,05$ . ....	35
Figura 9. ....Parámetros cinemáticos de espermatozoides de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). MT: motilidad total, MP: motilidad progresiva, RP: motilidad rápidamente progresivos, VCL: velocidad curvilínea, VCL-RP: de rápida progresión, VSL: velocidad rectilínea, VSL-RP: de rápida progresión, VAP: velocidad promedio, VAP-RP: de rápida progresión, STR: rectitud, LIN: linealidad,	

WOB: oscilación, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batida del flagelo..... 36

## Índice de tablas

Tabla 1.....	Diluyente base TCG	24
Tabla 2.....	Diluyentes para congelación y vitrificación	24



## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia increíble, quienes me han dado su confianza, dándome un claro ejemplo de superación, humildad y esperanza, con en cada una de sus acciones. A todos ellos les dedico el presente trabajo por que han contribuido con su valioso apoyo, tanto moral y económicamente.

Dr. Andrés Galarza, sin usted y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiésemos logrado, sus consejos fueron muy útiles para no desistir. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan no solo como un buen docente, si no por ser una excelente persona, ganándose el cariño y el respeto de los estudiantes.

Dr. Mauricio Dumas y Dr. Xavier Samaniego, gracias por su paciencia y directrices para poder culminar con la parte práctica de mi tesis.

Queridos docentes de la Escuela de Medicina Veterinaria, además de compartir sus valiosos conocimientos, han dejado en mí una huella que nunca se borrara, siempre estaré agradecida por el tiempo que le brindaron a mi formación académica.

Esperanza Morocho, además de ser mi compañera de tesis, eres mi mejor amiga, me alegra que fueras tú con quien camine en este proceso, con desvelos, cansancio, pero siempre con una sonrisa.

Anabel Chuqui

En primer lugar, agradezco a mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todas mis metas. Pues con su amor me han impulsado siempre a perseguir mis metas pese a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder estudiar.

Estoy profundamente agradecida con mi tutor por su dedicación, sobre todo paciencia y por haberme guiado en este proyecto en base a su amplia experiencia y sabiduría.

A Dr. Mauricio Dumas y Dr. Xavier Samaniego quienes me han ayudado con sus directrices pudieron explicarme los detalles para culminar mi tesis

Son muchos los docentes que son parte de mi camino universitario, y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí. En especial aquellos que me han aconsejado.

Agradecerles a mis compañeros en especial a quienes se han convertido en mis amigas, cómplices y hermanas Jessica Chuqui, Grace Uzcha, Blanca Sarmiento y Marcia Velecela. Gracias por los momentos compartidos e historias vividas.

Para terminar, quiero agradecer a esta universidad que me exigió mucho, pero al mismo tiempo me dio la oportunidad de obtener tan ansiado título.

Esperanza Morocho

## Dedicatoria

La presente tesis se la quiero dedicar a Manuel Chuqui, mi padre. Aunque esté lejos siempre me brinda su apoyo para sentirme querida y superar cualquier adversidad que se presente.

Anabel Chuqui

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto a pesar de las dificultades y retos. Por haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su bondad y amor. Quien ha sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad y amor han estado conmigo hasta el día de hoy.

A mis padres

Manuel y Rosa quienes con su amor, paciencia e infinito apoyo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por el ejemplo de valentía y esfuerzo de no temer las dificultades. A toda mi familia por sus consejos y palabras de aliento que hicieron de mí una mejor versión y de alguna manera están presentes siempre.

A mis sobrinos

Sebastián y Sofía quienes son unas personitas muy fundamentales en mi vida.

A Carmen Criollo

Una gran persona que se encuentra en el cielo y siempre estuvo conmigo cuando más la necesitaba.

Finalmente

Quiero dedicar esta tesis a mis amigas, por los hermosos momentos convividos en especial por apoyarme cuando más las necesitaba las quiero un montón.

Esperanza Morocho

## Introducción

Ecuador es uno de los países con mayor diversidad en fauna silvestre en sus cuatro regiones: Sierra, Costa, Amazonía e Insular. Se han registrado 206 especies de mamíferos silvestres que representan el 51% de la mastofauna nacional (Tirira, 2011). La conservación *in situ* de estas especies silvestres ha permitido que las poblaciones de animales no se reduzcan significativamente. Sin embargo, las actividades antropogénicas tales como la caza ilegal y tráfico de animales, tala indiscriminada de bosques (hábitat natural de animales silvestres), entre otros, han provocado una reducción en un 33 % la población de mamíferos silvestres en los últimos 33 años (Cisneros et al., 2011; Holt, 1999). En consecuencia, la mayoría de especies silvestres, están categorizadas como vulnerables o en peligro de extinción constituyendo un peligro ambiental a los ecosistemas ecuatorianos. Según Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador, las especies que habitan en el Ecuador como el tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) y el mono chorongo (*Lagothrix poeppigii*) se encuentran en peligro de extinción, mientras que el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) se encuentra en amenaza latente (Tirira, 2011). De estas especies mencionadas anteriormente se desconocen las tasas reproductivas en los diferentes hábitats (natural o cautiverio), lo que les vuelve más susceptibles a una extinción (Tirira, 2011). Por lo tanto, crear estrategias de conservación de material genético mediante la criopreservación de espermatozoides, ovocitos y embriones, debe ser una prioridad en el Ecuador.

Si bien, entidades gubernamentales del Ecuador, como el Ministerio del Ambiente (MAE) e Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO) y distintas fundaciones sin fines de lucro (Ej. Oso Andino, Cóndor Andino, entre otras), son los responsables de vigilar y salvaguardar la integridad de especies silvestres amenazadas en diferentes hábitats (natural y en cautiverio), su alcance sobre la gestión de recursos genéticos para estrategias de conservación *ex situ* es relativamente limitada. La normativa que rige al Ecuador con respecto al uso de material genético de animales está preceptuada por la “Normativa Andina sobre Biotecnología” la cual es obligatoria para los países que conforman la comunidad Andina. Además, la “Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre” en sus Artículos 73 y 74, indican que el MAE es la entidad que establecerá estaciones de investigación y conservación de recursos zoogenéticos (Peña, 2005; Villacrés et al., 2004). En este mismo sentido la FAO (*Food and Agriculture Organization*) sugiere la implementación de medidas de conservación del material zoogenético, ya sea de manera *in vivo* (zoológicos, refugios, bioparques, etc) o *in vitro* mediante la conservación de biológica y/o criogénica (ej. espermatozoides, óvulos o

embriones). En el Ecuador no se disponen de protocolos de conservación del material genético como espermatozoides, óvulos y/o embriones provenientes de animales silvestres para su uso en biotecnologías reproductivas y técnicas de reproducción animal (TRA) para programas de conservación de especies.

La criopreservación de espermatozoides junto con la inseminación artificial (IA) son las TRAs más usadas en programas de conservación de especies silvestre. Por ejemplo, en el programa de conservación de venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) se ha implementado protocolos de recolección de espermatozoides (mediante vagina artificial, electroeyaculación, gonadectomía o *post-mortem*), procesamiento y congelación, para su uso en IA (Asher et al., 2000; Magyar et al., 1989).. Sin embargo, los protocolos de criopreservación deben ser optimizados para obtener la mayor supervivencia espermática. El proceso de criopreservación de espermatozoides en sí, es deletéreo, que provoca lesiones en las membranas espermáticas (plasmalema, acrosoma y mitocondria), estrés oxidativo, estrés osmótico y muerte celular en una subpoblación de espermatozoides; y en las otras que sobreviven a la criopreservación, se mantienen intactas o presentan daños (Ej. fragmentación de ADN, condensación de cromatina, daño mitocondrial, etc.), que pueden limitar su movimiento (disminución de la motilidad), producción de energía y capacidad fecundante.

Por otro lado, la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS), generados principalmente a nivel mitocondrial durante la criopreservación va a determinar la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide. Estos radicales libres van a propiciar, a su vez, el desencadenamiento de procesos apoptóticos que se reflejan alteración del potencial de membrana mitocondrial interna, fragmentación del ADN, inversión en la membrana de la fosfatidilserina y activación de caspasas (Moreno et al., 2013). Estas lesiones celulares se resumen en disminución de la motilidad a nivel espermático. Es por ello, que prioriza la necesidad de evaluar las características espermáticas de los animales silvestres antes de la implementación de un banco germoplasma y biotecnologías reproductivas. Sin embargo, para poder aplicar eficientemente las TRAs, se necesita entender la biología básica de los espermatozoides de animales silvestres y su respuesta a los procesos criogénicos, así como las criolesiones celulares provocadas por los procesos de congelación o vitrificación.

Existe un reporte previo en el cual se han congelado y vitrificado espermatozoides de especies silvestres como carnero de berbería (*Ammotragus lervia sahariensis*), cabra montés ibérico (*Capra pyrenaica*), rebeco (*Rupicapra pyrenaica*), bisonte europeo (*Bison bonasus*), muflón (*Ovis musimon*), gacela dama (*Gazella dama*), gacela dorcas saharai (*Gazella*

*dorcas negligencia*), sitatunga (*Tragelaphus speki*), ñu cola blanca (*Connochaetes gnou*), ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*), ciervo del Rey David (*Elaphurus davidianus*), gamo (*Dama dama*), muntjac (*Muntiacus muntjak*), jirafa (*Giraffa camelopardalis rothschildi*), oso pardo (*Ursus arctos*), panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*), macaco de Berbería (*Macaca sylvanus*), koala de Queensland (*Phascolarctos cinereus adustus*) y delfín mular (*Tursiops truncatus truncatus*) (O'Brien et al., 2019). Sin embargo, el índice de crioresistencia (IC, [valor post-descongelación / valor fresco]\* 100) en cuanto a su motilidad y viabilidad, así como la morfometría de la cabeza de espermatozoides, son diferentes entre especies silvestres. Por ejemplo, se ha recomendado la vitrificación de espermatozoides epididimarios de gacela dama, jirafa y oso pardo. Por otro lado, en ungulados silvestres como cabra montesa, muflón, gacela dorca, ñu y cuervo ibérico y otros mamíferos como macaco de Berbería y Koala, se ha demostrado mejores respuestas a la criopreservación basadas en la motilidad usando congelación convencional con vapores de nitrógeno líquido.

En base a lo mencionado anteriormente, se pretendió caracterizar la cinemática (motilidades, velocidades, parámetros de relación de progresión y progresividad) de muestras espermáticas congeladas y vitrificadas de animales silvestres mantenidas en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca. En base a estos resultados se podrá implementar protocolos de criopreservación de espermatozoides de especies silvestres para integrarlos en programas de conservación *ex situ*.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Caracterizar las variables cinemáticas de los espermatozoides criopreservados de las diferentes especies silvestres mantenidas en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Analizar la cinemática de muestras espermáticas frescas disponibles en la base de datos del sistema CASA del Laboratorio de Biotecnología de todas las especies silvestres registradas.
- Evaluar la cinemática post-descongelación y/o post-vitrificación de los espermatozoides de las especies silvestres almacenadas en el banco criogénico

## 1.3 Pregunta de investigación

¿Las variables cinemáticas post-descongelación de los espermatozoides de los animales silvestres criopreservados cumplen los valores mínimos de vigor cinético que son necesarios para lograr con éxito una fertilidad?

## Capítulo 2: Revisión de literatura

### 2.1. Venado de cola blanca

El venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), es un mamífero rumiante ungulado, pertenece a la familia Cervidae, se distribuye desde el sur de Canadá hasta el norte de Chile y Bolivia. En su morfología posee una coloración marrón a gris con la parte ventral blanca, sin embargo, al ser jóvenes estos presentan colores rojizos con manchas blancas a lo largo del cuerpo. Poseen grandes ojos, tienen un cuello largo y esbelto; con glándulas odoríferas en los párpados, extremidades y frente (Duque, 2017).

Su alimentación se basa en pasto, hojas, brotes de plantas y diversos arbustos, tales como: valeriana, orejas de conejo, hongos, hierbas perennes. Sin embargo, en Ecuador se ha podido observar que también se interesan por alimentos como lechuga, col, calabaza, maíz, trigo, frutas entre ellas mango, zapotes y cerezas (Guerrero, 2016).

Esta especie tiene un dimorfismo sexual marcado, puesto que los machos son más grandes que las hembras. Usualmente los machos poseen cuernos (astas), las cuales dependiendo de la edad pueden ir desde los 8 cm a los 64 cm, con una renovación por año. En su primer año alcanzan la madurez sexual, sin embargo, a partir de los 18 meses de edad ambos sexos participan en la reproducción durante el periodo de apareamiento, suelen existir peleas entre machos, donde usualmente el más fuerte y grande consigue el derecho de aparearse con la hembra (Gavilánez, 2018). Las hembras son poliéstricas estacionales y tienen un ciclo estral entre 25 a 28 días y el estro dura aproximadamente 24 horas, por otro lado, la gestación dura de 195 días a 212 días. Es común que las hembras puedan parir un solo cervato en su primer parto, después de este se genera la posibilidad de alumbrar a dos crías (Gavilánez, 2018).

### 2.2. Tapir

El tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) es una especie silvestre que pertenece al orden Perissodactyla y a la familia Tapiridae, género *Tapirus*. Hay cuatro géneros de *Tapirus* registrados: *T. indicus*, *T. bairdii*, *T. pinchaque*, y *T. terrestris*. El tapir es un animal grande y robusto, de 70 a 110 cm de altura al hombro, de 170 a 210 cm de la cola a la cabeza y con un peso aproximado de 227 a 250 kg (Cisneros et al., 2011). Al igual que los venados, el tapir posee un dimorfismo sexual ya que el macho es más grande que la hembra. Su pelaje es de color marrón claro, marrón o negro y tiene rayas diagonales blancas o amarillas a lo largo del cuerpo desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad (Payan et al., 2015).



Son ungulados, con estómagos pequeños con un ciego muy grande que contiene bacterias degradadoras de celulosa, por lo que su alimentación se basa en pequeñas porciones durante todo el día. Además, poseen una probóscide móvil que le ayuda al ramoneo de la vegetación. Su alimentación es a base semillas, arbustos, corteza de hierbas y frutos debido a que es un herbívoro-frugívoro selectivo, gracias a esta acción favorece a la dispersión de semillas y reciclaje de nutrientes enriqueciendo el suelo de su hábitat (Cisneros et al., 2011).

Las hembras alcanzan su madurez sexual a los 2 años y el macho a los 3 años, con una reproducción cada dos años (Guevara, 2018). Las hembras poseen un ciclo estral de 25 a 38 días y un estro de 1 a 4 días. La gestación dura 13 meses y suele nacer una cría de aproximadamente 3 a 6 kg, considerado lactante hasta los 8 o 9 meses, aunque desde la semana del nacimiento puede llevar una dieta mixta. Su actividad sexual está regulada por el ciclo lunar, donde un macho puede enfrentarse cara a cara con varios machos cuando la hembra es fértil (Payan et al., 2015).

### 2.3. Mono Chorongo

El mono chorongo (*Lagothrix poeppigii*) es un primate también conocido como: mono lanudo rojo, mono lanudo marrón, mono barrigudo, etc. Tiene una longitud de 1,4 m, el peso de los individuos se encuentra entre 3,5 a 10 kg. Las hembras desarrollan colmillos al igual que los machos, pero estos no son tan grandes (Ramírez, 2009). Posee un cuerpo robusto y musculoso. Su pelaje es denso y suave, se distingue por su coloración rojo anaranjado a castaño oscuro, aparentemente negro con un brillo plateado, sin embargo, el pelaje de la cabeza, abdomen y extremidades tienen una tonalidad negra incluida la piel del rostro, cola y manos (Tirira et al., 2018). En el caso del macho adulto es característico en el pecho la coloración rojiza (Jimbo, 2018). Las extremidades son largas para facilitar su movimiento por los árboles junto con su cola ya que hace las veces de una quinta extremidad, permitiéndole enrollar alrededor de las ramas (Tirira et al., 2018).

Se alimenta principalmente de frutos maduros (77% de su dieta), prefiere alimentarse de higos, hobos y guabas de monte. Además, consume artrópodos (9% por lo general insectos), flores (3,5%), hojas jóvenes (7%) otras partes de la planta (2,4%), 8 semillas (0,5%), hongos (0,15%) y pequeños vertebrados como anfibios (Ramírez, 2009).

La poligamia es el principal sistema de apareamiento donde las hembras copulan con cualquier macho de la manada, pero por lo general tienden a ofrecerse con mayor frecuencia al macho dominante. La gestación dura unos 7 meses y suele tener una sola cría cada dos años. La cría dependerá de su madre hasta los 6 meses de edad. La hembra alcanza su edad reproductiva a los 6 años de edad (Ramírez, 2009).

#### 2.4. Aparato reproductor del macho

Los órganos genitales del macho son: escroto, testículos, epidídimos, pene, prepucio, conductos deferentes, uretra y glándulas accesorias (próstata, glándulas vesiculares y glándulas bulbouretrales).

El escroto es una delgada bolsa membranosa ubicada entre el área de la ingle y el ano. Su función es sostener, proteger y regular la temperatura de los testículos y epidídimos. Está formado por piel pigmentada y cubierta por escasos pelos finos, debajo de esta piel se encuentran glándulas sebáceas bien desarrolladas y una capa de músculo liso llamado dartos. Otras de las estructuras que se encuentran dentro son: túnica vaginal que rodea a los testículos y el músculo cremáster (Stornelli & Sota, 2016).

Los testículos son estructuras ovaladas, situadas por fuera de la cavidad abdominal. Se encuentran albergados en el escroto, la cual consta de túbulos seminíferos en donde se producen los espermatozoides. Los túbulos se encuentran recubiertos por las células de Sertoli las cuales proporcionan sostén y nutrición. Además, contiene las células de Leydig encargadas de segregar hormonas como la testosterona (Porrás & Pàramo, 2009).

El epidídimo es una estructura alargada situada en la superficie dorsolateral del testículo, se puede distinguir tres partes anatómicas: cabeza, cuerpo y cola. Es el encargado de proveer el ambiente necesario para que los espermatozoides puedan madurar, otorgándoles la motilidad y potencial de fertilidad, además de servir de reservorio de los mismos (Stornelli & Sota, 2016).

El pene está compuesto de una base, cuerpo y glande. La base es la parte que se une al arco isquiático, el cuerpo forma la parte más grande del pene, en el lado ventral contiene la uretra peneana, rodeada por una capa de tejido eréctil llamada cuerpo esponjoso y otras dos partes de este tejido llamado cuerpo cavernoso (dorsal al cuerpo esponjoso). El glande es la parte terminal del pene, esta parte es rica en terminaciones nerviosas (Porrás & Pàramo, 2009; Stornelli & Sota, 2016).

El prepucio es una vaina de piel que envuelve la parte distal del pene (glande), tiene una parte interna y otra externa, así como un orificio prepucial para el pene y para la salida de la orina (Stornelli & Sota, 2016).

#### 2.5. Valoración de calidad espermática

La valoración de calidad espermática se realiza después de la colección (electroejaculación, castración o postmortem), mediante un espermiograma clásico con porcentajes de motilidad superior al 70%, normalidad acrosómica del 80%, gota citoplasmática menos del 10% y

anormalidades inferiores al 15%. Según Gregorio, (2018) la evaluación de espermatozoides nos dará información sobre la capacidad fecundante del espermatozoide, dentro de las características más importantes relacionadas con la fertilidad es el número de espermatozoides y la motilidad. Los cuales pueden ser evaluados en muestras frescas o fijadas (Cucho et al., 2021).

### **2.5.1. Motilidad espermática**

Los espermatozoides de los mamíferos constan de dos partes: cabeza y cola. En la cabeza encontramos el material genético o ADN y el acrosoma, mientras que la cola es el mecanismo cinético del espermatozoide, tiene la función de dar flexibilidad, dirección y está dividida por 3 segmentos: la parte intermedia, principal y terminal. La motilidad espermática está basada en el metabolismo energético y la capacidad de movilizar estas reservas para movimientos del flagelo, permitiendo atravesar el moco cervical para llegar la zona pelúcida del ovocito promoviendo la fecundación (Apaza et al., 2020).

### **2.5.2. Sistema computarizado de análisis espermático (CASA)**

La evaluación del seminograma se efectuaba de manera subjetiva a partir de la observación en el microscopio, obteniendo resultados que dependían de las habilidades, conocimiento y experiencia del técnico, lo que imposibilitaba comparar con resultados de otros laboratorios, por el alto porcentaje de error humano (Vallvè, 2016). Antes de los años 80 se utilizaba el método TEP (Time Exposition Photomicrography), realizando fotografías de 1 segundo, creando imágenes de la trayectoria de movimiento del espermatozoide, posteriormente se obtenían de los valores de velocidad rectilínea (VSL), midiendo la línea del primer y último punto de trayectoria de manera manual por el técnico (Cuevas, 2013).

Con el tiempo se sustituyó con el método MEP (Multi Exposure Photomicrographic), se basaba en un motor giratorio con 6 ranuras, que iluminaba la muestra con 6 ráfagas de luz. Obteniendo una técnica de contraste con intervalos 1/6 de segundo, calculando el recorrido del espermatozoide durante 1 segundo, con el registro de fotografías secuenciales se necesitaba una reconstrucción de trayectorias de manera manual para obtener un resultado de movimiento. De este sistema se continuó con cintas grabadas con videocámaras y el uso tarjetas digitalizadoras, permitiendo el análisis en tiempo real (Valverde & Madrigal, 2019).

El desarrollo de la tecnología de digitalización se integró al mercado sistemas semiautomáticos y automáticos como el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), permitiendo la evaluación de variables cinéticas y morfométricas, de manera rápida y precisa, de espermatozoides de humanos como de animales (Vallvè, 2016). El uso del sistema CASA es una herramienta con una alta precisión y reproducibilidad, de fácil manejo y mayor rapidez

de análisis, con valores numéricos y no subjetivos con el objetivo de reducir el error técnico (Cuevas, 2013). Además, con el tiempo se incrementa la capacidad de colocar las diferentes investigaciones en la nube, logrando estandarizar con resultados de otros laboratorios en todo el mundo.

Se basa en el análisis de imagen computarizada, obteniendo la información numérica a partir de imágenes, en el caso de la movilidad con una secuencia de imágenes o una fija para morfometría. El sistema está compuesto por un microscopio óptico con contraste de fases de tipo positivo o negativo, con una platina atemperada, un ordenador, una cámara de video y un software. Nos permite obtener distintos parámetros para su posterior clasificación en base a su velocidad y trayectoria (Carvajal et al., 2017).

Se debe tener en cuenta que los espermatozoides de cada especie tienen un patrón de características diferente por lo tanto se debe tener en cuenta el hardware y software empleados para la identificación de estas características, deben ser apropiadamente verificados y ajustados, para la obtención de resultados repetibles y comparables con los obtenidos por otros laboratorios. Por otra parte, la concentración espermática es un factor a estandarizar debido a las diferentes concentraciones utilizadas por los laboratorios, por eso se recomienda utilizar diluyentes que no alteren las características cinéticas del espermatozoide evitando que influya sobre los resultados obtenidos en el sistema CASA (Carvajal et al., 2017 & Valverde et al., 2020).

### **2.5.3. Parámetros cinemáticos**

Estos parámetros son calculados por el sistema CASA, representan los aspectos geométricos de la movilidad dependientes del tiempo, diferenciándose en los cálculos de masa y fuerza. Estos son indicadores que nos dan información sobre la velocidad de movimiento de los espermatozoides, así como la frecuencia, cambio de dirección y amplitud de la trayectoria que describe la cabeza del espermatozoide (Tejerina, 2007).

Sin embargo, hoy en día los sistemas de análisis de movilidad y cinemática están informatizados para calcular varios parámetros básicos obtenidos del movimiento de la cabeza y flagelo del espermatozoide. Por ejemplo, el sistema CASA (SCA-Evolution 2018<sup>®</sup>, Barcelona, España) registra los siguientes datos:

- Motilidad total (MT): registro de células espermáticas totales en movimiento
- Motilidad progresiva (MP): registro de células espermáticas motiles con movimiento de progresividad y avance.

- No progresivos: registro de células espermáticas motiles con movimiento no progresivo
- Inmóviles: registro de células espermáticas totales sin movimiento
- Espermatozoides con velocidad y progresividad rápida: total de espermatozoides móviles progresivos con velocidad rápida
- Velocidad curvilínea (VCL): distancia recorrida a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.
- Velocidad rectilínea (VSL): distancia recorrida entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.
- Velocidad media (VAP): distancia recorrida a lo largo de la trayectoria media.
- Índice de linealidad (LIN): es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea.
- Índice de rectitud (STR): es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad lineal.
- Índice de Oscilación (WOB): es la relación porcentual entre la velocidad lineal y la velocidad rectilínea.
- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH): Se define como el desplazamiento micrométrico que realiza la cabeza del espermatozoide a lo largo de su órbita curvándose de lado a lado de la línea media.
- Frecuencia de batido (BCF): es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección de movimiento por lo que es indicativo de la frecuencia del batido del flagelo (Muiño, 2006).

#### **2.5.4. Viabilidad espermática**

La viabilidad espermática refleja la integridad del acrosoma y de la membrana plasmática del espermatozoide que previamente se ha asociado con el potencial de fertilidad de una muestra de esperma (Cuevas, 2013). La estructura de la membrana plasmática es importante para mantener viable al espermatozoide, además es indispensable para el metabolismo y procesos fundamentales como la fecundación, capacitación, reacción acrosomal o la fusión con el ovocito por lo que la evaluación de la integridad de la membrana plasmática es una prueba sustancial (Cabrera & Pantoja, 2012).

En cuanto a la evaluación de la integridad del acrosoma ha sido uno de los parámetros más estudiado ya que juega un papel vital en la fecundación, debido a que solo los espermatozoides con el acrosoma intacto pueden sufrir la reacción acrosomal. Se sincroniza con la etapa de penetración del ovocito y por lo tanto se fusiona con este para formar un embrión (Cuevas, 2013).

## 2.6. Criopreservación del semen

La criopreservación de espermatozoides resulta una herramienta de gran utilidad para la reproducción aislada de los distintos individuos, además esta permite salvaguardar ciertos caracteres genéticos que mejoran las especies, una cualidad de gran relevancia es que este permite la conservación de especies y razas en amenaza. Sin embargo, se debe tener en cuenta que durante este proceso se genera una exposición de las células al estrés inducido por las bajas temperaturas y desequilibrios osmóticos (Choez et al., 2017).

Para la conservación de semen es de gran importancia la reducción o detención del metabolismo de las células del esperma, puesto que es necesario prolongar su vitalidad, sin embargo, a pesar de que el proceso se presente de manera exitosa los espermatozoides pueden tener alterada la estructura o las propiedades de la membrana (Choez et al., 2017). A lo largo del proceso de criopreservación los espermatozoides tendrán que ser sometidos a eventos estresantes debido a la temperatura, es por ello que se pueden inducir daños que comprometan la funcionalidad de los mismos. Los periodos de mayor interés usualmente se dan en la fase inicial de la congelación y en la fase de descongelación (Vallvè, 2016).

A lo largo de los años la criopreservación ha demostrado efectos positivos, ya que se ha permitido la incubación de distintas especies con éxito, en el estudio que se analizó al tapir amazónico donde se encontró que el porcentaje de vitalidad espermática y motilidad presentan una disminución significativa en comparación a otros métodos. También se comparó el efecto post-descongelación de semen después de 30 días con diluyentes comerciales en la especie de equinos, demostrando así los mejores resultados obtenidos directamente de la post-congelación en las pruebas de cinética espermática (Guevara, 2018).

## Capítulo 3: Materiales y métodos

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Materiales físicos

- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Papel secante
- Jeringas 1 mL
- Hojas de bisturí N° 15
- Equipo de disección
- Pajuelas de 0,25 MI
- Fundas Ziploc
- Caja poliestireno
- Nitrógeno Líquido (NL<sub>2</sub>)

#### 3.1.2. Materiales biológicos

- Muestras espermáticas epididimarias criopreservadas: congeladas o vitrificadas
- Testículos y epidídimos intactos de animales silvestres

#### 3.1.3. Materiales de laboratorio

- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules).
- Pipetas automáticas de 0 – 20 µL, 20 – 200 µL y de 200 – 1000 µL
- Microscopio de campo claro (CX-31, OLYMPUS®)
- Filtro de jeringa Minisart® NML 16555 (tamaño de poro 0,45 mm) (Sartorius, Alemania).
- Sistema CASA, (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Tanque de nitrógeno líquido
- Pajuelas de 0,25 MI
- Cajas cuadrículadas para búsqueda
- Refrigerador
- Porta agujas
- Cubre objetos cortos
- Cubre objetos largos
- Termómetro para pajuelas
- Baño María
- Tubos Falcón de 15 MI
- Tubos Eppendorf de 1,5 MI

### 3.1.3.1. Reactivos

- Tris (Sigma, 252859)
- Ácido cítrico (Sigma, C0759)
- Glucosa (Sigma, G5146)
- Penicillin G-sodium salt (Sigma, P3032)
- Streptomycin sulfate salt (Sigma, S9137)
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)

### 3.2. Área de estudio

El análisis de la cinemática espermática de muestras frescas y criopreservadas existentes en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca fueron evaluadas en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, ubicado en la parroquia Victoria del Portete del cantón Cuenca (3° 04' 48.1" S; 79° 04' 31.0" W). Además, en este lugar se realizó el análisis de muestras frescas y criopreservadas provenientes de animales silvestres que llegaron al laboratorio para prepararlos y almacenarlos en el banco criogénico.

### 3.3. Elaboración de diluyente y medios

El diluyente base que se utilizó para la evaluación de las características cinemáticas fue TCG (Tris, ácido cítrico y glucosa) suplementado con el 6% (v/v) de yema de huevo. Las muestras criopreservadas, congeladas o vitrificadas usaron glicerol (5%) y sacarosa (100 mM), respectivamente. Los diluyentes usados en esta investigación se detallan las siguientes tablas:

**Tabla 1.** Diluyente base TCG

Reactivo	Cantidad
Tris	11,4 g
Ácido cítrico	6,6 g
Glucosa	1,8 g
Penicilina	240 mg
Estreptomicina	300 mg
Agua ultrapura elaborada Tipo I	300 ml

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg

**Tabla 2.** Diluyentes para congelación y vitrificación

TCG-YH	
Reactivo	Cantidad
TCG	80 ó 94% (v/v)



Yema de huevo inactivada a 56° por 30 min. 20 ó 6% (v/v)

\*Centrifugar a 4000 g por 10 min y eliminar el pellet

TCG-YH-Gly

Reactivo	Cantidad
TCG-YH	95 ml
Glicerol	5 ml (al 5% v/v)

TCG-YH-Sucrosa

Reactivo	Cantidad
TCG-YH	100 ml
Sacarosa	100 mM

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg

### 3.4. Metodología

#### 3.4.1. Determinación de especímenes de animales silvestres

Para el desarrollo de esta investigación, se utilizó la base de datos del sistema CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, V6.0 software, Microptic S.I., Barcelona, Spain) del laboratorio y se verificó todas las muestras espermáticas provenientes de animales silvestres. Posteriormente, se registró todo el material espermático criopreservado de las diferentes especies silvestres que existieron en el tanque criogénico alojado en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

#### 3.4.2. Evaluación de las muestras criopreservadas

Durante los tres meses de experimento, las muestras espermáticas (de eyaculado o del epidídimo) que ingresaron al laboratorio fueron recuperadas mediante flujo retrógrado usando 1 mL de diluyente TCG-YH. Estas muestras frescas fueron analizadas su cinemática espermática según lo detallado en el punto anterior y posteriormente fueron ajustadas a una concentración final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL y congelados en vapores  $NL_2$  estático y vitrificados en pellets de 30  $\mu$ L sumergiendo directamente en  $NL_2$ . Para la congelación y vitrificación se usó los diluyentes TCG-YH + 5% Gly y TCG-YH + 100 mM de sacarosa, respectivamente, según lo detallado por (O'Brien et al., 2019).

De acuerdo al registro que existió del material espermático criopreservado de animales silvestres, se descongelaron entre 12 pajuelas por cada especie sumergiendo las pajuelas directamente en Baño María atemperado a 37 °C durante 30 segundos. Posteriormente, cada contenido de las muestras fue recogido en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y mantenidos a 37 °C hasta el análisis de cinemática espermática.

Adicionalmente, en las muestras de venado de cola blanca congeladas y descongeladas, se registró valores cinemáticos post-selección. La selección de espermatozoides de venado fue realizada mediante la centrifugación de las muestras en gradientes de densidad de BoviPure® (BP-100, Nidacon, Mölndal, Sweden). Para este propósito, dos gradientes de densidad fueron realizados mezclando BoviPure con BoviDilute®: (1) Top Layer correspondiente al 40%, y el Botton layer correspondiente al 80%. En un tubo cónico Eppendorf de 1,5 mL se colocó cuidadosamente 200 µL del gradiente de densidad de 80 en el fondo del tubo y sobre este se colocó cuidadosamente 200 µL del gradiente de 40% y finalmente 200 µL de muestra de congelada – descongelada de espermatozoides de venado de cola blanca. Todo este proceso se hizo a temperatura ambiente. Las muestras fueron sometidas a 300 gravedades durante 20 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y el pellet formado fue resuspendido en 200 µL de diluyente TCG-YH (22 °C) y mantenidos a 37 °C hasta el análisis de cinemática espermática (Galarza et al., 2022).

Las muestras vitrificadas, se calentaron los pellets en un dispositivo de calentamiento STC-3008 (no patentado) existente en el laboratorio. Las láminas de aluminio de este dispositivo fueron atemperadas entre 63-65 °C y al momento del calentamiento los pellets se dejaron caer en estas láminas y rápidamente se derritieron al contacto con el calor. Los contenidos de las muestras fueron recogidos en un vaso de precipitación 20 mL y rápidamente la muestra fue transferida a un tubo Eppendorf de 1,5 mL a temperatura ambiente (22 °C). Este contenido fue centrifugado a 300 gravedades durante 5 minutos. El sobrenadante resultante de la centrifugación fue eliminado y reemplazado por diluyente TCG-YH atemperado a 37 °C.

### **3.4.3. Análisis de cinemática espermática**

Las características cinemáticas de las muestras frescas, congeladas-descongeladas y vitrificadas-calentadas fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a (Galarza et al., 2018). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo). Para la evaluación se tomó 5 µL de la muestra (recomendable a una concentración de  $15 \times 10^6$  espermatozoides/mL usando el mismo diluyente TCG-YH) y se colocó en un porta y cubreobjetos. Las variables cinéticas evaluadas fueron: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), porcentaje de espermatozoides progresivamente rápidos (RP), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), velocidad promedio (VAP, µm/s), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación

(WOB, %), frecuencia de batido del flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu\text{m}$ ).

#### 3.4.4. Análisis estadístico

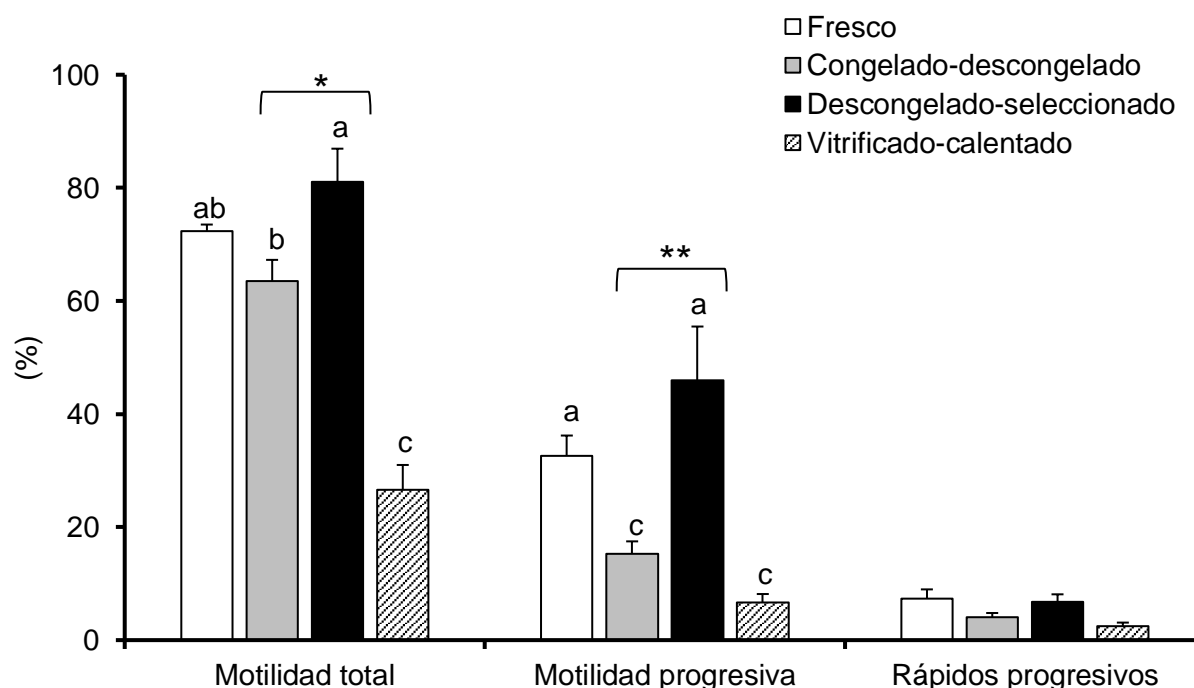
Los datos provenientes de los reportes generados del sistema CASA fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente fueron analizados estadísticamente en un software STATISTICA para Windows v.12 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Los datos fueron expresados en media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). El análisis estadístico incluyó una estadística descriptiva tabulada en una tabla de contingencia de doble entrada: tipo de espermatozoides (fresco, congelado-descongelada y vitrificado-calentado) y variables cinemáticas (Motilidad, Velocidad, Índice de rectitud, Linealidad, Oscilación, Desplazamiento lateral de la cabeza y Frecuencia de batida de flagelo) por especie (venado de la cola blanca, mono chorongo y tapir amazónico). En el caso del venado de cola blanca, a más de los datos frescos y criopreservados, se analizó las muestras “*descongelados–seleccionados*” con gradientes de densidad de BoviPure. Las diferencias que existieron entre muestras frescas y criopreservadas (incluyendo las muestras *descongeladas–seleccionadas*), fueron analizadas estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional junto con la prueba de comparación múltiple de Tukey. El nivel de significancia fue considerado cuando el valor de  $P < 0,05$ .

## Capítulo 4: Resultados

### 4.1. Venado de cola blanca

Las variables cinemáticas de las muestras espermáticas frescas, congeladas–descongeladas, descongeladas–seleccionados, y vitrificados–calentados se exponen en las Figuras 1 – 4.

El porcentaje de MT se redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) únicamente después del proceso de vitrificación en comparación con las muestras frescas. Sin embargo, la MP fue afectada tanto por el proceso de congelación como el de vitrificación, reduciendo ( $P < 0,05$ ) su porcentaje en comparación con las muestras frescas. Sorprendentemente, ambos porcentajes de MT y MP post-descongelación fueron mejorados significativamente ( $P < 0,05$ ) después de seleccionar con la centrifugación en gradientes de densidad de BoviPure. No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el porcentaje de espermatozoides progresivamente rápidos entre muestras frescas, criopreservadas o post–seleccionadas (Figura 1).

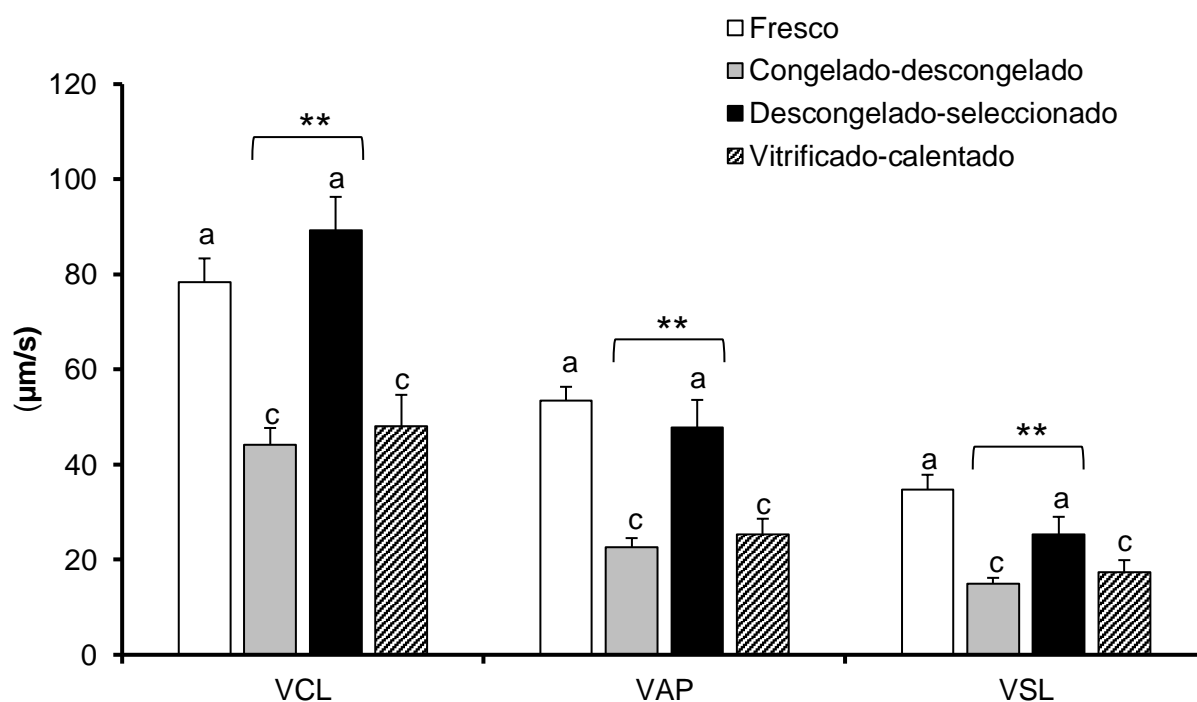


**Figura 1.** Porcentajes de motilidad total (MT), progresiva (MP) y rápidos progresivos (RP) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y vitrificadas–calentados.

Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas a – b – c,  $P < 0,05$ ; a – c,  $P < 0,001$ . Asteriscos denotan un incremento significativo de las

motilidades después de seleccionar las muestras descongeladas con gradientes de densidad de BoviPure. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ .

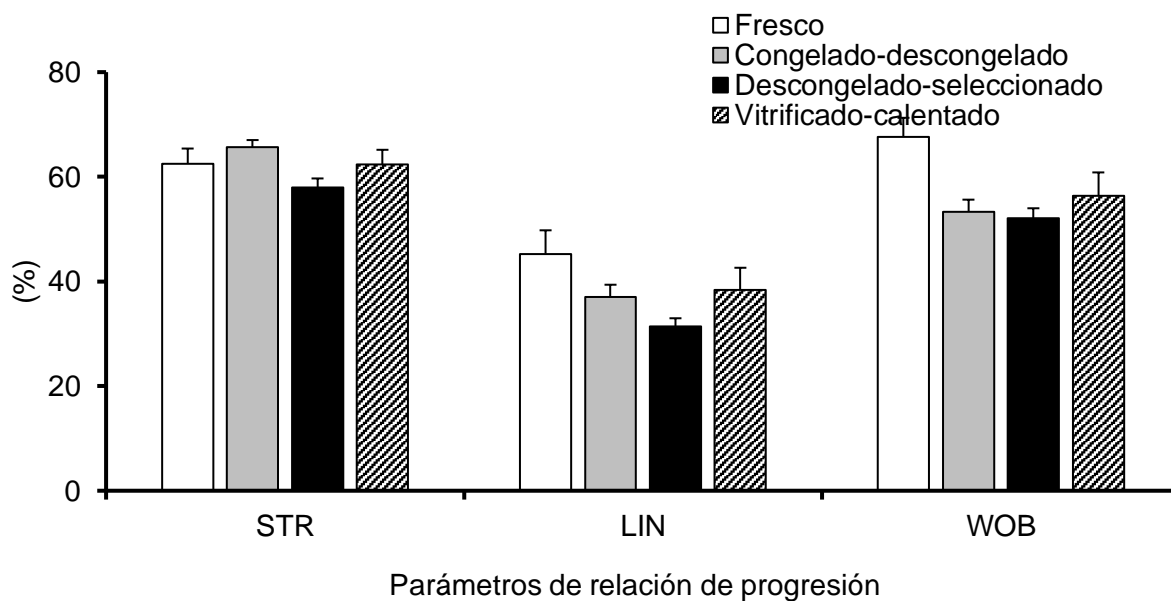
Los valores de VCL, VAP y VSL se redujeron drásticamente ( $P < 0,01$ ) después de la congelación y vitrificación, en comparación con las muestras frescas. Sin embargo, posterior a la selección espermática, las muestras congeladas–descongeladas mejoraron significativamente ( $P < 0,001$ ) los valores de todas las velocidades alcanzando valores similares a las muestras frescas (Figura 2).



**Figura 2.** Valores de las velocidades curvilíneas (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y vitrificados–calentados.

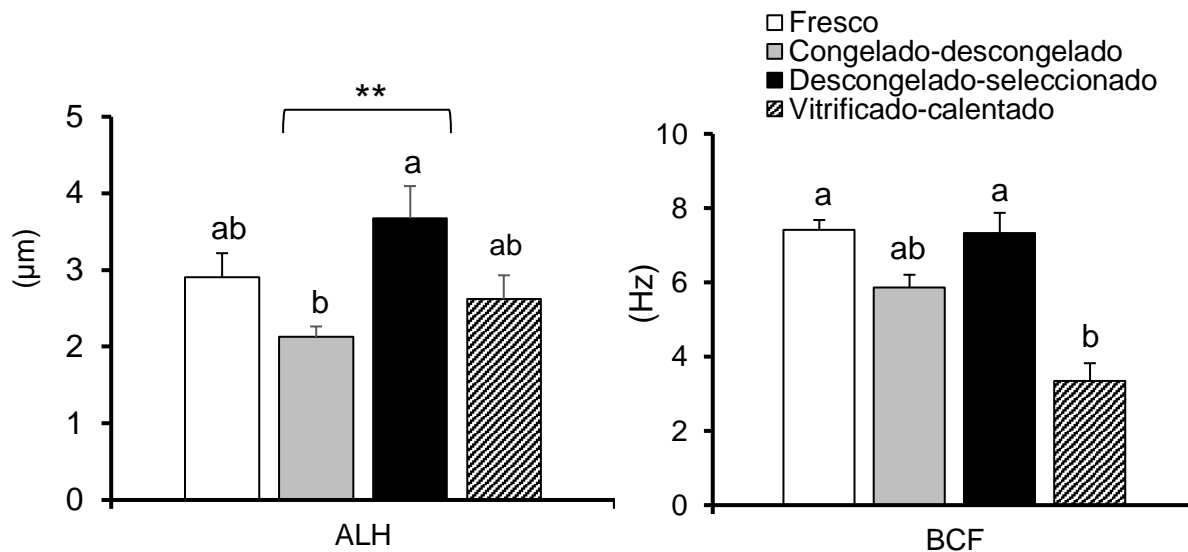
Letras diferentes en cada barra y en cada velocidad expresan diferencias significativas a – c,  $P < 0,001$ . Asteriscos denotan un incremento significativo de las velocidades después de seleccionar las muestras descongeladas con gradientes de densidad de BoviPure. \*\*  $P < 0,001$ .

No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre muestras frescas, congeladas–descongeladas, descongeladas–seleccionadas, o vitrificadas–calentadas en ningún parámetro de relación de progresión: rectitud, linealidad y oscilación (Figura 3).



**Figura 3.** Índice de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y calentados – vitrificados.

No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) de entre muestras frescas, congeladas–descongeadas o vitrificadas–calentadas en los valores de ALH. No obstante, después de la selección de las muestras congeladas, el valor de ALH post-descongelación incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ). Por otro lado, el valor de BCF se redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) únicamente después del proceso de vitrificación. La selección espermática de las muestras descongeladas no incrementó significativamente ( $P > 0,05$ ) el valor de BCF (Figura 4).



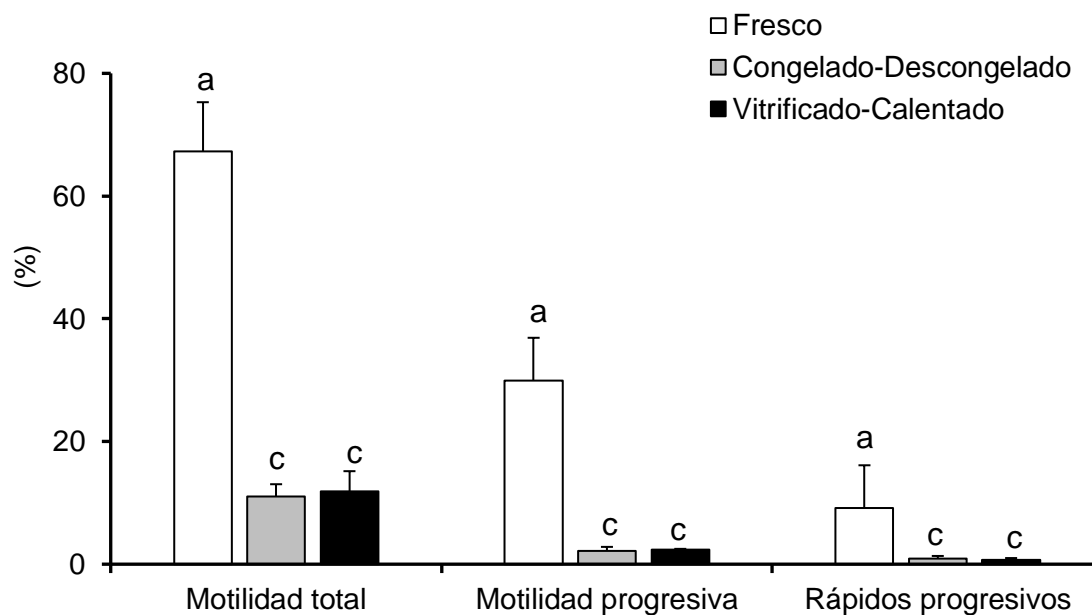
**Figura 4.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de venado de cola blanca frescos, congelados–descongelados, descongelados–seleccionados, y calentados–vitrificados.

Letras diferentes en cada barra y en cada parámetro expresan diferencias significativas a – b,  $P < 0,001$ . Asteriscos denotan un incremento significativo de la ALH después de seleccionar las muestras descongeladas con gradientes de densidad de BoviPure. \*\*  $P < 0,001$ .

#### 4.2. Mono chorongó

Las variables cinemáticas de las muestras espermáticas frescas, congeladas–descongeladas y vitrificadas–calentadas se exponen en las Figuras 5–8.

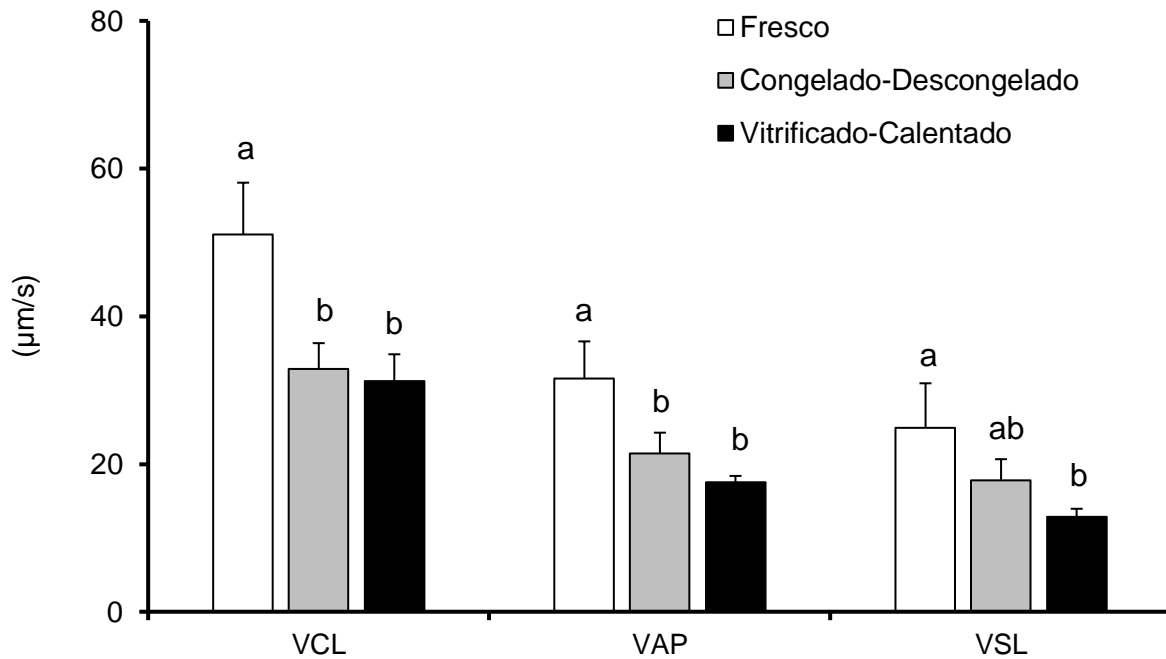
El porcentaje de MT, MP y RP se redujo drásticamente ( $P < 0,001$ ) después de ambos procesos ‘congelación y vitrificación’ en comparación con las muestras frescas. No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre muestras congeladas–descongeladas y vitrificadas–calentadas en todas las motilidades (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentajes de motilidades total (MT), progresiva (MP) y rápidos progresivos (RP) de espermatozoides de mono chorongo frescos, congelados–descongelados y vitrificados–calentados. Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas a – c,  $P < 0,001$ .

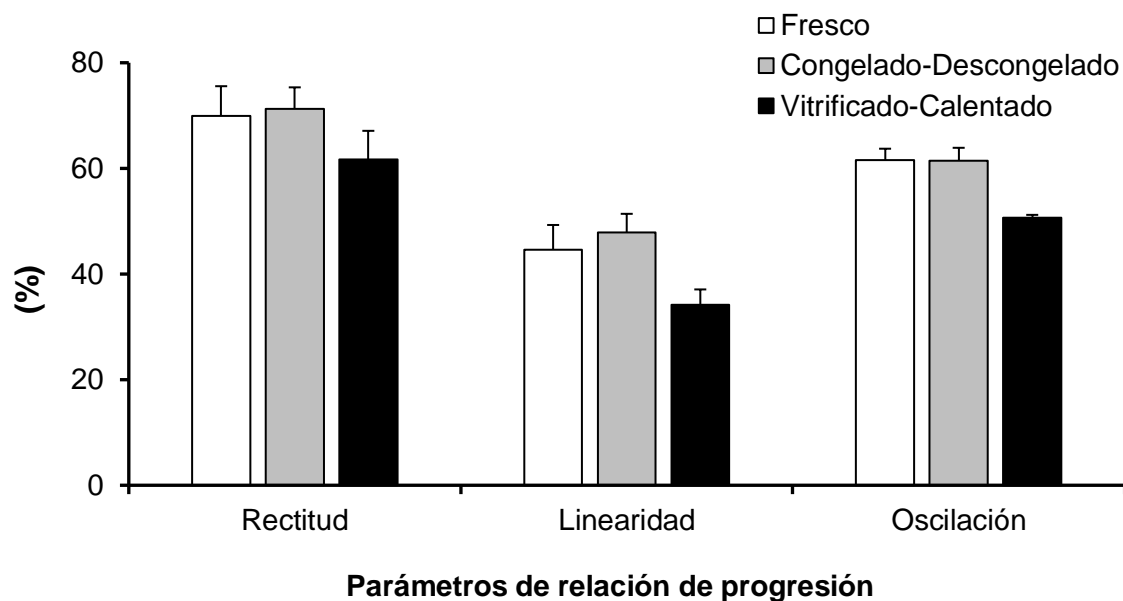
Los valores de las velocidades VCL y VAP disminuyeron significativamente ( $P < 0,05$ ) después de la congelación y vitrificación en comparación con las muestras frescas. Sin embargo, la VSL se redujo ( $P < 0,05$ ) únicamente después del proceso de vitrificación. No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre muestras congeladas–descongeladas y vitrificadas–calentadas en todas las velocidades (Figura 6).





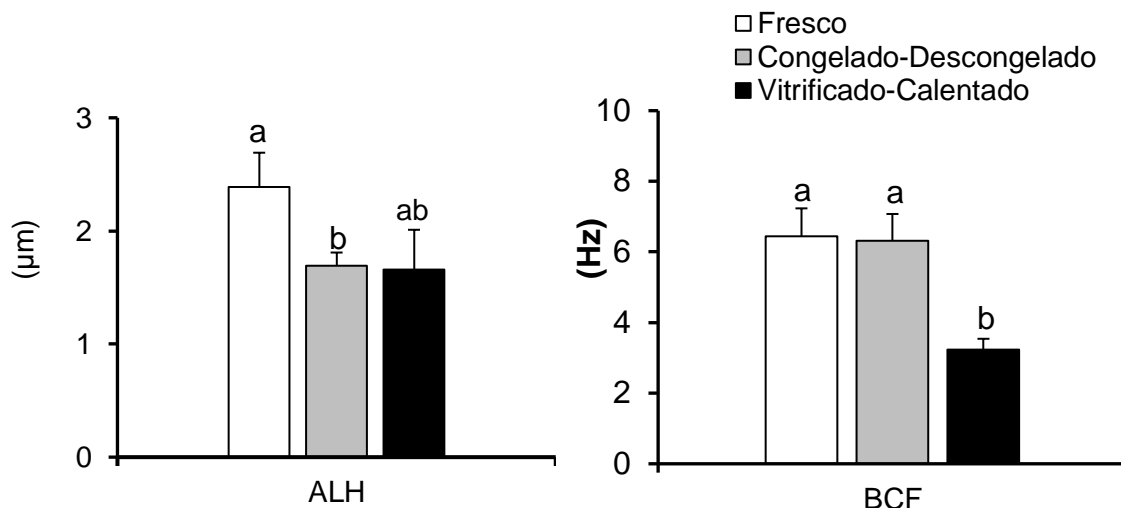
**Figura 6.** Valores de las velocidades curvilínea (VCL), promedio (VAP), y rectilínea (VSL) de espermatozoides de mono chorongo frescos, congelados-descongelados y calentados-vitrificados. Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas a – b,  $P < 0,05$ .

No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre muestras frescas, congeladas – descongeladas, o vitrificadas–calentadas en ningún parámetro de relación de progresión como la rectitud, linealidad y oscilación (Figura 7).



**Figura 7.** Índice de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de mono chorongo frescos, congelados–descongelados y vitrificados–calentados.

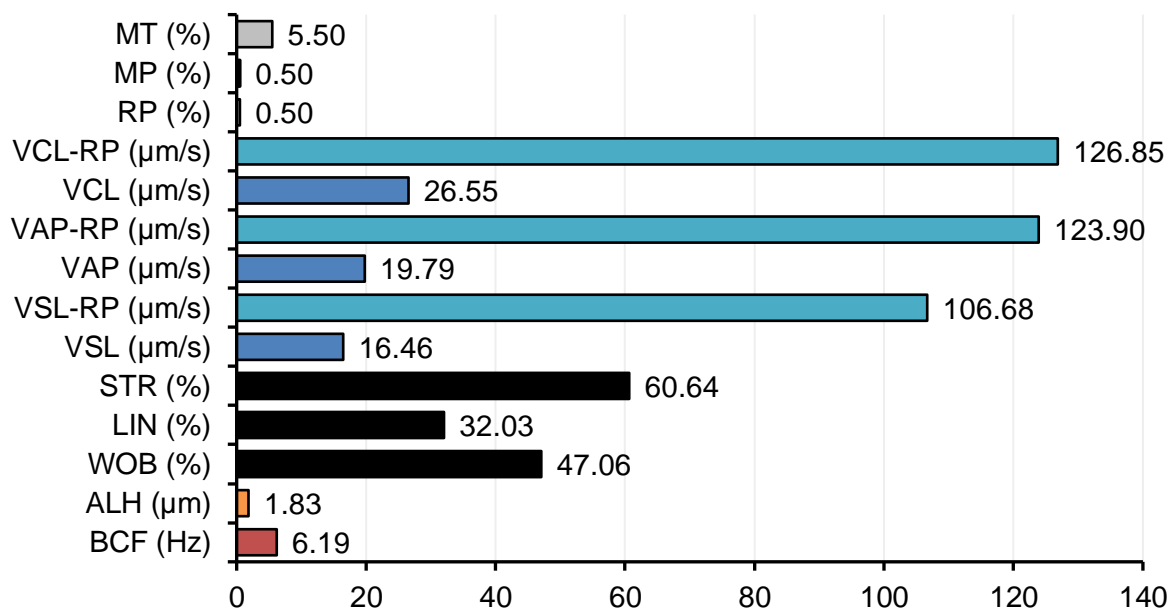
El valor de ALH únicamente se redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) después del proceso de congelación–descongelación en comparación con las muestras frescas. Por otro lado, el valor de BCF disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) solo después de la vitrificación (Figura 8).



**Figura 8.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de mono chorongo frescos, congelados–descongelados y calentados–vitrificados. Letras diferentes en cada barra y en cada parámetro expresan diferencias significativas a – b,  $P < 0,05$ .

#### 4.3. Tapir amazónico

En general, los valores de la cinemática de los espermatozoides frescos provenientes de tres eyaculados astenozoospermico no cumplieron los parámetros mínimos para criopreservar los espermatozoides. Dos eyaculados de tapir amazónico no fueron viables (motilidad y vitalidad nula). Sin embargo, el uso de técnicas de purificación (Ej. centrifugación en gradientes de densidad) podrían ser aplicadas para obtener a esa subpoblación espermática deseable y someterla a criopreservación. De hecho, una subpoblación espermática muy pequeña mostró una cinética progresivamente rápida (Ej. VCL-RP, VSL-RP y VAP-RP), con valores relativamente buenos para ser aplicados en técnicas de reproducción asistida (Figura 9). No existieron datos disponibles de muestras criopreservadas de tapir amazónico en el laboratorio de Biotecnología.



**Figura 9.** Parámetros cinemáticos de espermatozoides de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). MT: motilidad total, MP: motilidad progresiva, RP: motilidad rápidamente progresivos, VCL: velocidad curvilínea, VCL-RP: de rápida progresión, VSL: velocidad rectilínea, VSL-RP: de rápida progresión, VAP: velocidad promedio, VAP-RP: de rápida progresión, STR: rectitud, LIN: linealidad, WOB: oscilación, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batida del flagelo.

## Capítulo 5: Discusión

Los resultados de esta investigación exponen un reporte pionero en el Ecuador sobre la cinemática de los espermatozoides de venado de cola blanca, mono chorongó y tapir amazónico, antes (frescos) y después de los procesos de criopreservación, ya sea por congelación o por vitrificación.

### 5.1. Venado de cola blanca

En general, la congelación de espermatozoides de venado de cola blanca mediante vapores de nitrógeno líquido produjo una mayor motilidad total en comparación con la vitrificación; sin embargo, tanto la congelación como la vitrificación causaron una reducción de la motilidad progresiva y velocidades. Eficientemente, todos los valores cinemáticos posterior a la descongelación incrementaron después de la selección espermática mediante la centrifugación en gradientes de densidad de BoviPure (40% / 80%) alcanzando incluso sus valores frescos. Estos resultados indican que al usar el espermatozoide de venado de cola blanca fresco (MT: 72,8% y MP: 32,6%), descongelado (MT: 63,4% y MP 15,3%) y descongelado-seleccionado (MT: 81,1% y MP: 45,9%) podría ser usados para inseminación artificial vía cervical o intrauterina y lograr preñeces como se ha demostrado para predecir la capacidad fecundante de las muestras espermáticas en ungulados silvestres (Asher et al., 2000; Barratt et al., 1993; Gomendio & Roldan, 2008). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que otro factor de importancia es la hembra la cual se deben encontrar completamente capaz de producir hormonas sexuales y con esto la producción de óvulos. No obstante, el espermatozoide post-vitrificación (MT: 26,6% y MP: 6,7%) es poco probable que logre una preñez incluso después de una IA intrauterina (laparoscópica).

Durante la criopreservación, los espermatozoides sufren cambios bioquímicos, funcionales y ultraestructurales que afectan la supervivencia (Valverde et al., 2020 & Watson, 1995) produciendo una reducción de la motilidad, cinética, integridad de membranas (plasmalema, acrosoma y mitocondria), condensación de cromatina, daño de ADN y en consecuencia, disminución de la capacidad fecundante (Grötter et al., 2018). En este sentido, se ha determinado que la crioresistencia espermática es diferente entre especies silvestres, especialmente entre ungulados (O'Brien et al., 2019). A diferencia de los espermatozoides epididimarios, los espermatozoides de eyaculados interactúan con sustratos derivados de la secreción de las glándulas sexuales masculinas que pueden o no perjudicar a la criopreservación, Blash et al., (2000); Fernández et al., (2006); Martínez et al., (2008) & Moreno et al., (2020) demostraron diferencias en la cinética (VCL, VSL, LIN, ALH y BCF) entre espermatozoides del eyaculado obtenidas mediante electroeyaculación frente a

espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo. De hecho, se ha reportado que los espermatozoides de origen epididimario parecen ser más crioresistentes que los espermatozoides obtenidos por eyaculación, con diferencias en la composición de la membrana (Jones, 1998 & Varisli et al., 2009) que influyen en el tiempo de equilibrio requerido durante la crioconservación (Rath & Niemann, 1996). Otro factor de importancia puede atribuirse a la concentración de testosterona plasmática parece influir en la crioresistencia de los espermatozoides de ungulados silvestres (*Capra pyrenaica* y *Ovis musimon*). Los ciervos con mayor concentración de testosterona durante la época reproductiva tienen menor crioresistencia (congelan peor). Por lo tanto, los cambios estacionales observados en estas especies han mostrado diferencias en la capacidad de congelación de los espermatozoides, independientemente de la calidad del esperma fresco (Bóveda et al., 2020); Bajo estos fundamentos, los resultados del presente estudio demostraron sorprendentemente que no existió diferencias significativas de la MT entre las muestras frescas (pre-congelación) y las descongeladas (post-descongelación). De hecho, si se calcula el índice de crioresistencia del parámetro de MT de las muestras de venado de cola blanca, esta investigación demuestra resultados sorprendentes:  $IC \text{ (índice de crioresistencia)} = (\text{Motilidad post-descongelación} / \text{motilidad pre-congelación}) * 100 = (63,4\% / 72,4\%) * 100 = 87,56\%$ . Por lo tanto, estos resultados sugieren dos posibles razonamientos según lo detallado por Bóveda et al., (2020); Jones, (1998) & Varisli et al., (2009), 1) que los espermatozoides epididimarios de venado de cola blanca son muy crioresistentes al proceso de congelación en vapores de nitrógeno líquido; y 2) que la concentración de testosterona plasmática de esos tres venados fue baja y la recolección de testículos fue realizada fuera de temporada de apareamiento. Sin embargo para hacer esta afirmación es necesario de estudios específicos.

Varios estudios han demostrado resultados de motilidad y cinemática diferentes entre muestras frescas, congeladas–descongeladas y vitrificadas–calentadas. Malo et al., (2004) identificaron rasgos específicos del semen de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) que indican asociaciones significativas de la motilidad y cinemática frente a la tasa de preñez. Los autores asociaron altas tasas de preñez con altas velocidades post-descongelación de los espermatozoides de ciervo (VCL: 112,96  $\mu\text{m/s}$ ; y VSL: 68,95  $\mu\text{m/s}$ ). Otro estudio desarrollado por Ros et al., (2014), reportaron los siguientes parámetros cinemáticos post-descongelación de espermatozoide de ciervo rojo (*Cervus elaphus*): VAP (60,60  $\mu\text{m/s}$ ), VCL (97,58  $\mu\text{m/s}$ ), VSL (34,17  $\mu\text{m/s}$ ) y ALH (3,78  $\mu\text{m}$ ). En el mismo sentido, Ramón et al., (2013) demostraron que los machos con alta fertilidad presentaron altos valores de VCL y VSL de espermatozoides descongelados de ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Los resultados de la presente investigación fueron aparentemente menores a los reportados por

Malo et al., (2004) & Ramón et al., (2013) y la diferencia podría atribuirse a que en esos estudios las muestras fueron recogidas durante la época reproductiva.

Otros estudios realizados en venados de cola blanca demostraron una menor criosupervivencia espermática tras la descongelación de espermatozoides provenientes de eyaculados bajo estimulación eléctrica (electroeyaculación): 82% vs. 40% (Stewart et al., 2016); 72% vs. 48% (Sityà, 2014), 69% vs 49% (Beracochea, 2014) y 61,15% vs 51,32% (Peña, 2013). Asimismo, los porcentajes de motilidad post-descongelación de ungulados silvestres incluyendo al venado de cola blanca han sido aceptables, los valores varían desde 40–55% en el ciervo del padre David (*Elaphurus davidianus*) (Asher et al., 1988), 50 – 60% en el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus blancanus*) (Munguía, 2011), 55% ciervo rojo (*Cervus elaphus*) (Ros et al., 2014).

La vitrificación es otro proceso de criopreservación en el cual incluye altas concentración de disacáridos (Ej. Sacarosa o trehalosa) o trisacáridos (Ej. Rafinosa) y velocidades de enfriamiento ultra-rápidas (Katkov et al., 2012). Los resultados no han sido muy deseables debido a su baja respuesta a la supervivencia (Consuegra et al., 2018), sin embargo su fácil empleo y bajo costo hace que la vitrificación sea una biotecnología atractiva para criopreservar espermatozoides. Pradié et al., (2017) vitrificó espermatozoides de cabra montés ibérico (*Capra pyrenaica*) obtuvieron una baja motilidad total y progresiva post-calentamiento (33,9 y 7%, respectivamente), sin embargo, estos resultados fueron suficientes para lograr buenos resultados de fertilidad *in vitro* (heteróloga usando ovocitos bovinos). Los resultados de la motilidad total para nuestro estudio son inferiores (32,9 vs 28%), sin embargo, para la motilidad progresiva tienen resultados similares (8 vs. 8%). En un estudio similar realizado por Bóveda et al., (2018;2020) demostraron que la vitrificación o congelación ultrarrápida fue más dañino sobre las variables espermáticas de muflón (*Ovis musimon*) y gamo (*Dama dama*); que la congelación convencional en vapores de nitrógeno líquido, sin embargo, los autores concluyen que la congelación ultrarrápida o vitrificación puede ser una alternativa útil para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de estas especies unguladas en el campo, ya que esta técnica simple no requiere equipo ni experiencia sofisticada. Asimismo, los autores atribuyeron que la congelación ultrarrápida provoca más daño a la membrana plasmática y motilidad, quizás debido a los cristales de hielo extracelulares formados determinado por microscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM) (Bóveda et al., 2020).

La selección espermática basada en centrifugación en gradientes de densidad, los espermatozoides se seleccionan según su densidad, lo que permite aislar espermatozoides

móviles y morfológicamente normales. BoviPure® es una solución salina isoosmótica que contiene partículas de sílice coloidal recubiertas con silano que se utiliza para seleccionar espermatozoides de toro, carnero, caninos y ungulados silvestres (*Ovis montanus*), para su uso con técnicas de reproducción artificial (Galarza et al., 2018; 2022; Martínez et al., 2019; Samardzija et al., 2006). De acuerdo a los estudios realizados por García et al., (2016) en el ciervo rojo mejoraron los resultados para los parámetros evaluados VAP, LIN, utilizando BoviPure. De hecho, se recomienda el uso de BoviPure para aumentar la calidad posterior a la descongelación del espermatozoide de ovinos silvestres (Pradieé et al., 2017). Los resultados de la presente investigación son consistentes con las investigaciones mencionadas anteriormente.

## 5.2. Mono chorongo

La criopreservación de espermatozoides de mono de sus diferentes especies ha sido reportada desde hace aproximadamente cincuenta años. Denis et al., (1976) congelaron espermatozoides de dos monos ardilla (*Saimiri sciureus*) bolivianos mantenidos en cautiverio y recolectados mediante electroeyaculación y no evidenciaron diferencias significativas en la MT entre las muestras frescas y descongeladas ( $63,6 \pm 14,8\%$  vs.  $51,8 \pm 22,9\%$ ). En esta investigación, además, se evaluó los niveles séricos (mensuales) de testosterona determinando que al inicio del experimento las concentraciones fueron altas y posteriormente fueron disminuyendo progresivamente. A diferencia de nuestro experimento, la congelación de espermatozoides de mono ardilla fueron realizadas con el diluyente basado en 11% lactosa + 20% yema de huevo + 4% glicerol y congelados en pellets de 30  $\mu$ L dejando caer en hielo seco. Más adelante, Oliveira et al., (2016) también congelaron semen de mono ardilla de cabeza negra de diferentes especies mantenidas en cautiverio (*Saimiri vanzolinii*, *Saimiri cassiquiarensis* y *Saimiri macrodon*) y de vida libre (*Saimiri collinsi*) durante los meses de agosto a noviembre (41.38954, 2.11583 de latitud y época reproductiva: octubre) mediante electroeyaculación. La congelación se hizo usando un diluyente comercial ACP-118™ con o sin 40% de yema de huevo + 3% glicerol y exponiendo las muestras espermáticas cargadas en pajuelas de 0,120 mL a vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos. Los resultados mostraron una gran variación con respecto a la MT antes y después de la congelación: *S. Vanzolinii* (95,0% vs. 30%), *S. cassiquiarensis* (90,0 % vs. 6%), y *S. macrodon* (80,0 % vs. 10%). Ciertamente, el proceso de congelación afectó nocivamente la motilidad espermática y los autores atribuyen factores tales como el periodo seco (41.38954, 2.11583 de latitud) en el cual se encontraban, a la dilución con o sin plasma seminal antes de la congelación, a las citotoxinas del glicerol y alteración del equilibrio bioenergético. Otros reportes han obtenido la misma respuesta criogénica indeseable al congelar semen de macaco Rhesus (*Macaca*



*mulatta*) (Si et al., 2000), y mono ardilla (*Saimiri collinsi*) (Oliveira et al., 2015). No obstante, la motilidad espermática en el semen congelado-descongelado de *S. collinsi* fueron inferiores en comparación con los resultados informados previamente de otras especies de *Saimiri* como *S. sciureus* (MT:  $54 \pm 17\%$  [reportado por Denis et al., (1976)] y *S. boliviensis* (MT: 41% [reportado por Yeoman et al., (1998)]). Los resultados de la presente investigación son consistentes con los reportados por Oliveira et al., (2015;2016) & Si et al., (2000); y difieren a los reportados por Denis et al., (1976) & Yeoman et al., (1998), debido a que la respuesta criogénica fue muy baja con respecto a los valores de motilidad y cinemática. De hecho, si se calcula el índice de criorresistencia con respecto a la motilidad se obtiene el 44,4% ( $[(IC= 29,9 \%MT \text{ post-descongelación} / 67,3 \% \text{ MT pre-congelación}] * 100$ ).

Si bien, no se ha reportado la criopreservación de espermatozoides de mono chorongo, un reporte único sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de macaco de Berbería (*Macaca sylvanus*), un mono cercopitécido, indicaron que usando TTG + 20% yema de huevo + 6% glicerol (1245 mOsm/kg) para congelar, y TTG + 20% yema de huevo + 100 mM sacarosa (436 mOsm/kg) para vitrificar en pellets de 30  $\mu$ L se obtuvo resultados mayores de motilidad y viabilidad con la congelación convencional que con la vitrificación basado en índice de crioresistencia. De hecho, los valores del área de la cabeza disminuyeron tanto después de la congelación como de la vitrificación en relación con sus valores en fresco, Dong et al., (2009); O'Brien et al., (2019) demostraron que el esperma eyaculado y epidídimo de monos Rhesus (*Macaca mulata*) se puede criopreservar con TEST + 20% yema de huevo en ausencia de un crioprotector penetrante (Ej. glicerol) en pajuelas 0,25 ml, enfriadas rápidamente en vapor de nitrógeno líquido a 220 °C/min, constituyendo el primer éxito de la congelación sin crioprotectores permeables en primates no humanos. El presente trabajo, vitrificó las muestras en pellets de 30  $\mu$ L usando la misma metodología detallada por Dong et al., (2009); O'Brien et al., (2019), sin embargo, el diluyente usado fue TCG (tris ácido cítrico y glucosa) con las mismas concentraciones de glicerol y sacarosa para congelar y vitrificar, respectivamente. Sin embargo, los resultados no fueron deseables. Para nuestro mejor conocimiento, esta investigación constituye el primer estudio reportado sobre la congelación y vitrificación de espermatozoides de mono chorongo.

### 5.3. Tapir amazónico

La alta motilidad espermática (<70%) es un parámetro que, *a priori*, evidencia una buena calidad previo a la congelación de las muestras (Yániz et al., 2018). Desafortunadamente, de los tres eyaculados registrados en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, ninguno de ellos presentó un valor mínimo para la congelación (>50% de MT). De hecho, uno de los tres eyaculados presentó muestras astenospérmicas alcanzando apenas

un 5% de MT, lo que sugiere que la producción espermática del tapir durante las épocas de recolección estuvo fuera de época reproductiva, siendo recolectadas el 30 de noviembre del 2021 (época reproductiva del tapir diciembre – enero, con una latitud de -3.0055982 datos recogidos del Zoo refugio Yurak Allpa). Barth, (2006) indica que una de las causas de la mala calidad seminal en los animales que no desarrollan un apareamiento frecuente, acumulan espermatozoides envejecidos en las ampollas, conductos deferentes y en la cola del epidídimo. Dicho envejecimiento espermático se caracteriza por una alta proporción de espermatozoides muertos. Posiblemente, esta acumulación y la época no reproductiva de la colecta fueron los factores principales para que los eyaculados del tapir sean astenospérmicas.

Un estudio precursor desarrollado por Guevara, (2018) obtuvo una MT del 65% en muestras espermáticas frescas de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*), mientras que Piña, (2022) realizó un similar estudio en tapir Amazónico y reportó una muy baja calidad espermática. Sin embargo, al realizar una selección espermática se demostró que una subpoblación espermática mostró una cinética progresivamente rápida (VCL y VSL) que podrían ser aplicados a técnicas de reproducción asistida, luego de una selección espermática.

Por otro lado, se han desarrollado un trabajo que caracterizó el semen de ocho tapires malayos (*Tapirus indicus*) mantenidos en cautiverio y recolectados mediante electroeyaculación. Los autores obtuvieron un volumen, pH, osmolaridad, concentración espermática, motilidad espermática total y viabilidad de  $10,3 \pm 9,4$  ml;  $7,4 \pm 3,4$ ;  $278,6 \pm 13,3$  mOsm/kg;  $206,2 \pm 185,4 \times 10^6$  esperm/mL;  $24,0 \pm 15,4\%$ ; y  $35,1 \pm 6,5\%$ , respectivamente (Tipkantha et al., 2011). Más tarde otro trabajo desarrollado por Pukazhenthii et al., (2013) caracterizaron los eyaculados y evaluaron la eficacia de dos medios de congelación (Botu-Cryo® e INRA-96® +2% yema de huevo + 5% de amidas) en la criosupervivencia de los espermatozoides de tapir de Baird (*Tapirus bairdii*). En enero, abril y octubre (Panamá) fueron recolectados 23 eyaculados de 11 tapires machos mediante electroeyaculación y fueron sometidos a congelación en vapores de nitrógeno líquido. Los autores reportaron una MT pre-congelación de  $66,2 \pm 7,5\%$  y una reducción post-descongelación (35 a 40%). Sin embargo, ellos atribuyen que la criosupervivencia lograda fue al protocolo adaptado de congelación de espermatozoides de caballo.

### Conclusiones

Este trabajo de investigación es el primer reporte en Ecuador que describe las características cinemáticas de los espermatozoides frescos y criopreservados de venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y mono chorongo (*Lagothrix poeppigii*); además expone los resultados de espermatozoides frescos de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*). Los espermatozoides de venado de cola blanca presentaron una mayor respuesta criogénica a la congelación basado en motilidad y cinemática que a la vitrificación. Además de ello, los espermatozoides descongelados de venado fueron mejorados notablemente después de la selección espermática mediante la centrifugación en gradientes de densidad de BoviPure.

Los espermatozoides frescos de mono chorongo presentaron una mayor motilidad y cinemática, sin embargo, tanto la congelación como la vitrificación afectaron significativamente la supervivencia espermática reduciendo notablemente sus valores.

Finalmente, los espermatozoides frescos de tapir no cumplen con las condiciones mínimas de criopreservación, por lo que no fueron criopreservados, sin embargo, si se aplica una selección espermática, se podría recuperar una subpoblación de espermatozoides viables y usarlos en técnicas de reproducción asistida.

## Referencias

- Apaza, B., Loza, M., Quispe, C., Machicado, R., & Achu, C. (2020). Parámetros cinéticos de espermatozoides en semen fresco y crioconservado de alpaca ( *Vicugna pacos* L.). *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(1), 17–29. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2020.070100017>
- Asher, G., Adam, J., Otway, W., Bowmar, G., Van, G., Mackintosh, C., & Dratch, P. (1988). Hybridization of Pkre David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus efaphus*) by artificial insemination. *Journal of Zoology*, 215, 197–203. <https://zslpublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-7998.1988.tb04894.x>
- Asher, G., Berg, D., & Evans, G. (2000). Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 195–211. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00159-7)
- Barratt, C., Tomlinson, M., & Cooke, I. (1993). Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertility and Sterility*, 60(3), 520–525. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56171-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56171-8)
- Barth, A. (2006). Sperm accumulation in the ampullae and cauda epididymides of bulls. *Animal Reproduction Science*, 102(3–4), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.11.005>
- Beracochea, M. (2014). Caracterización y criopreservación de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) [Universidad de la República]. In *Animal Reproduction Science*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/24019>
- Blash, S., Melican, D., & Gavin, W. (2000). Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, 54(6), 899–905. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00400-3)
- Bóveda, P., Estesó, M., Castaño, C., Toledano, A., López, A., Muñiz, A., Prieto, P., Mejía, O., Ungerfeld, R., & Moreno, J. (2018). Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 192(March), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.010>
- Bóveda, P., Toledano, A., Castaño, C., Estesó, M., López, A., Rizos, D., Bielli, A., Ungerfeld, R., & Moreno, J. (2020). Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not

- induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. *PLoS ONE*, 15(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227946>
- Bóveda, Paula, Estes, M., Velázquez, R., Castaño, C., Toledano, A., López, A., Mejía, O., Millán, M. G., Ungerfeld, R., & Moreno, J. (2020). Influence of circulating testosterone concentration on sperm cryoresistance: The ibex as an experimental model. *Andrology*, 9(4), 1242–1253. <https://doi.org/10.1111/andr.12998>
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(2), 192–200. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.899>
- Carvajal, M., Cortés, H. A., Manrique, C., & Grajales, H. (2017). Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. *Revista de Medicina Veterinaria*, 36, 49–61. <https://doi.org/10.19052/mv.5171>
- Choez, K., Ruiz, L., Sandoval, R., Evangelista, S., & Santiani, A. (2017). Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(3), 619. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
- Cisneros, R., López, F., Noss, A., Sandoval, L., Zapata, G., Utreras, V., Tirira, D., Montoya, G., Albuja, L., Torres, N., & Catellanos, Armando Carracho, J. (2011). Generalidades de los tapires en el Ecuador. In *Estrategia Nacional para la Conservación de los Tapires en el Ecuador* (pp. 7–8). <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56527.pdf>
- Consuegra, C., Crespo, F., Bottrel, M., Ortiz, I., Dorado, J., Diaz, M., Pereira, B., & Hidalgo, M. (2018). Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 191, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.013>
- Cucho, H., Gallegos, M., Ccoiso, R., Meza, A., Ampuero, E., Ordóñez, C., & Valverde, A. (2021). Morphometry and subpopulation of llama (*Lama glama*) sperm using the ISAS® CASA-Morph system. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(1), 1–13. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I1.19506>
- Cuevas, A. (2013). Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. In *Universidad de Córdoba*. <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/11586/2014000000902.pdf?sequenc>

e=1

- Denis, L., Poindexter, A., Ritter, M., Seager, S., & Deter, R. (1976). Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. *Fertility and Sterility*, 27(6), 723–729. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)41905-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)41905-9)
- Dong, Q., Correa, L., & VandeVoort, C. (2009). Rhesus monkey sperm cryopreservation with Test-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 58(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.09.014>
- Duque, S. (2017). *Plan de Negocio para la creación de un zoológico de venado de cola blanca (Odocoileus virginianus), en la parroquia Tufiño, cantón Tulcán, provincia del Carchi* [Universidad central del Ecuador Facultad de Ciencias Agrícolas]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13061/1/T-UCE-0004-37-2017.pdf>
- Fernández, M., Estes, M., Montoro, V., Soler, A., & Garde, J. (2006). Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*, 66(8), 1931–1942. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.012>
- Galarza, A., López, S., Woelders, H., Blesbois, E., & Morejo, J. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Elsevier*, 192, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.022>
- Galarza, D., Jara, D., Paredes, E., Samaniego, J., Méndez, S., & Perea, F. (2022). BoviPure® density-gradient centrifugation procedure enhances the quality of fresh and cryopreserved dog epididymal spermatozoa. *Elsevier*, 242(192), 261–270. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432022000823>
- García, O., Soler, A., Maulen, Z., Maroto, A., Iniesta, M., Martín, A., Fernández, M., & Garde, J. (2016). Selection of red deer spermatozoa with different cryoresistance using density gradients. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(6), 895–900. <https://doi.org/10.1111/rda.12755>
- Gomendio, M., & Roldan, E. (2008). Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 439–447. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082595mg>
- Gregorio, N. (2018). Morfometría del Espermatozoide del venado cola blanca (*Odocoileus*

- virginianus peruvianus) [Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. In *Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco*. [https://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/4203/253T20180374\\_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/4203/253T20180374_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Grötter, L., Cattaneo, L., Marini, P., Kjelland, M., & Ferré, L. (2018). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Guerrero, E. (2016). *Estudio de prefactibilidad para la implementación de un zocriadero de venado de cola blanca (Odocoileus virginianus) con fines turísticos y de conservación en el Parque Ecológico Cachaco, Amaguaña, cantón Quito*. Universidad Central del Ecuador Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Guevara, E. (2018). Evaluación de la criopreservación de semen fresco para la conservación de germoplasma de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) [Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias]. In *Tesis de la Universidad Técnica de Ambato, Ecuador*. [https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/27295/1/Tesis\\_126\\_Medicina\\_Veterinaria\\_y\\_Zootecnia\\_-CD\\_564.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/27295/1/Tesis_126_Medicina_Veterinaria_y_Zootecnia_-CD_564.pdf)
- Holt, W. (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction*, 4(3), 143–150. <https://doi.org/10.1530/revreprod/4.3.143>
- Jimbo, M. (2018). *Estudio conductual de una manada de dos especies de primates del género lagotrix en semicautiverio del centro de rescate Yanacocha* [Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia]. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12421/1/DE00007\\_TRABAJODETITULACION.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12421/1/DE00007_TRABAJODETITULACION.pdf)
- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*, 2, 73–84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10645268/>
- Katkov, I., Bolyukh, V., Chernetsov, O., Dudin, P., Grigoriev, A., Isachenko, V., Isachenko, E., Lulat, A., Moskovtsev, S., Petrushko, M., Pinyaev, V., Sokol, K., Sokol, Y., Sushko, A., & Yakhnenko, I. (2012). Current Frontiers in Cryobiology. In *Kinetic Vitrification of Spermatozoa of Vertebrates: What Can We Learn from Nature?* (pp. 1–19).

<https://www.intechopen.com/books/1494>

- Magyar, S. J., Biediger, T., Hodges, C., Kraemer, D. C., & Seager, S. W. J. (1989). A method of artificial insemination in captive White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Theriogenology*, *31*(5), 1075–1079. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90491-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90491-3)
- Malo, A., Garde, J., Soler, A., García, A., Gomendio, M., & Roldan, E. (2004). Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *72*(4), 822–829. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036368>
- Martínez, A., Martínez, F., Álvarez, M., Fernández, M., Estesó, M., de Paz, P., Garde, J., & Anel, L. (2008). Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology*, *70*(2), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.001>
- Martínez, L., Castaño, C., Bóveda, P., Tesfaye, D., Schellander, K., Moreno, J., & García, F. (2019). Epididymal and ejaculated sperm differ on their response to the cryopreservation and capacitation processes in mouflon (*Ovis musimon*). *Scientific Reports*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52057-0>
- Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., Guerra, R., Ruiz, M. J., Mendoza, N., Luna, C., Cebrián, J. A., & Hildebrandt, T. B. (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology*, *79*(2), 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.011>
- Moreno, J., Fresneda, L., Martínez, M., Toledo, A., Castaño, C., & S, L. (2020). Fisiología del semen. In *Reproducción de Los Animales Domésticos* (pp. 63–69).
- Muiño, R. (2006). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo* [Universidad de Santiago de Compostela]. [https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/9788497509886\\_content.pdf?sequence=1](https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/9788497509886_content.pdf?sequence=1)
- Munguía, J. (2011). *Valoración espermática post-mortem obtenida de epidídimo de carnero y venado cola blanca* [Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/3410>
- O'Brien, E., Estesó, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda,



- L., López-Sebastián, A., Martínez-Nevado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R. S., Guillamón, F. G., & Santiago, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, *129*, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.024>
- Oliveira, K, Leão, D., Almeida, D., Santos, R., & Domingues, S. (2015). Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. *Theriogenology*, *84*(5), 743-749.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.031>
- Oliveira, Karol, Santos, R., Leão, D., Brito, A., Lima, J., Sampaio, W., & Domingues, S. (2016). Cooling and freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology*, *72*(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.004>
- Payan, E., Lasso, C., & Castaño, C. (2015). Una historia de dos ciudades: cacería y conservación de áreas protegidas. El caso de la danta (*Tapirus terrestris*) conservation and hunting outside Amazonian protected areas in Colombia. In *Conservación de grandes vertebrados en áreas no protegidas de Colombia, Venezuela y Brasil* (p. 302). [http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/9302/Conservación de grandes vertebrados Alta.pdf?sequence=1](http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/9302/Conservación%20de%20grandes%20vertebrados%20Alta.pdf?sequence=1)
- Peña, A. (2013). *Evaluación objetiva de la motilidad de los espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico. Relaciones con la congelabilidad y la calidad del semen* [Universidad de Castilla-La Mancha Escuel tècnica superior de ingenieros agrònomos]. <https://digital.csic.es/handle/10261/8295>
- Peña, C. (2005). Legislación ecuatoriana y biotecnología. *Revista de Derecho UASB-Ecuador*, *4*, 4. <https://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/1742/1/RF-04-AV-Peña.pdf>
- Piña, C. (2022). *Caracterización espermática de semen eyaculado por estimulación eléctrica del Tapir amazónico (Tapirus terrestris)* [Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias]. [https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/40039/1/Trabajo de Titulacion.pdf](https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/40039/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf)
- Porras, A., & Pàramo, R. (2009). Morfofisiología del aparato reproductor. In *Manual de Pràcticas de Reproducción Animal* (pp. 22–25). [https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales\\_2013/Manual de Practicas de Reproduccion Animal.pdf](https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Reproduccion%20Animal.pdf)

- Pradiéé, J., Sánchez, M., Castaño, C., O'Brien, E., Estesó, M., Beltrán-Breña, P., Maillo, V., Moreno, J., & Rizos, D. (2017). Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, *108*, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.021>
- Pukazhenthí, B., Quse, V., Hoyer, M., van Engeldorp Gastelaars, H., Sanjur, O., & Brown, J. (2013). A review of the reproductive biology and breeding management of tapirs (*Tapirus* sp.). *Integrative Zoology*, *8*(1), 18–34. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2012.12008.x>
- Ramírez, J. (2009). *Evaluación del comportamiento de un grupo bajo cautiverio de Lagothrix lagotricha en el Zoológico de Guayllabamba* [Universidad San Francisco de Quito]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/558/1/94475.pdf>
- Ramón, M., Soler, A., Ortiz, J., García, O., Maroto, A., Roldan, E., & Garde, J. (2013). Sperm population structure and male fertility: An intraspecific study of sperm design and velocity in Red Deer. *Biology of Reproduction*, *89*(5), 1–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112110>
- Rath, D., & Niemann, H. (1996). In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boards. *Elsevier Science*, *97*, 785–793. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728028/>
- Ros, J., Domínguez, Á., & Garde, J. (2014). Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa. *PLoS ONE*, *9*(11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112382>
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina, J., Grizelj, J., & Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, *91*(3–4), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.005>
- Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. (2018). *Elsevier*, *192*, 261–270. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432018301362>
- Si, W., Zheng, P., Tang, X., He, X., Wang, H., Bavister, B., & Ji, W. (2000). Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by in vitro fertilization. *Cryobiology*, *41*(3), 232–240. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2283>
- Sityà, V. (2014). *Criopreservación de semen de venado de campo (Ozotoceros bezoarticus)*:

*comparación de la efectividad de dos diluyentes comerciales a la descongelación*  
[Universidad de la República].  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10469/1/FV-31017.pdf>

Stewart, J., Shipley, C., Katich, A., Po, E., Ellerbrock, R., Lima, F., & Canisso, I. (2016). Cryopreservation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) semen using soybean-, liposome-, and egg yolk-based extenders. *Animal Reproduction Science*, 171, 7–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.05.006>

Stornelli, M., & Sota, R. (2016). Anatomía del aparato genital. In *Manual de reproducción de animales de producción y compañía* (Eduulp, Vol. 1, pp. 122–130).  
<https://core.ac.uk/download/pdf/301073785.pdf>

Tejerina, F. (2007). *Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco* [Universidad de León Facultad de Veterinaria].  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=26987>

Tipkantha, W., Pukazhenth, B., Siritronrat, B., Thongphakdee, A., Maikaew, U., Thomas, W., Tongthainan, D., Thaeonon, J., Kamolnorrath, S., Bush, M., & Thongtipsiridech, S. (2011). Ejaculate characteristics of captive Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(4), 499–508.  
<https://pure.johnshopkins.edu/en/publications/ejaculate-characteristics-of-captive-malayan-tapirs-tapirus-indic-4>

Tirira, D. (2011). Especies en amenaza. In *Libro rojo de los mamíferos del Ecuador* (pp. 2013–2015). [https://fundacion.mamiferosdeecuador.com/images/Librorojo/pdf/tirira\\_2011-libro\\_rojo\\_2a\\_edicin-5\\_especies\\_vu.pdf](https://fundacion.mamiferosdeecuador.com/images/Librorojo/pdf/tirira_2011-libro_rojo_2a_edicin-5_especies_vu.pdf)

Tirira, D., Torre, S., & Zapata, G. (2018). Familia Atelidae. In *Estado de conservación de los primates del Ecuador* (pp. 192–195).  
<https://aem.mamiferosdeecuador.com/images/pdf/Gepe/Tirira-et-al-2018-Estado-de-conservacion-primates-del-Ecuador.pdf>

Vallvé, J. (2016). CASA, análisis de semen automatizado: aplicabilidad y tendencias de futuro. *Reproducción Humana Y Laboratorio Clínico*, 32, 82–111.  
[https://www.seqc.es/download/tema/14/4437/2130938119/3122415/cms/tema-8-casa-analisis-de-semen-automatizado\\_aplicabilidad-y-tendencias-de-futuro.pdf/](https://www.seqc.es/download/tema/14/4437/2130938119/3122415/cms/tema-8-casa-analisis-de-semen-automatizado_aplicabilidad-y-tendencias-de-futuro.pdf/)

Valverde, A., Barquero, V., & Soler, C. (2020). The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal*

*and Feed Sciences*, 29(3), 189–198. <https://doi.org/10.22358/JAFS/127691/2020>

- Valverde, A., & Madrigal, M. (2019). Assessment of counting chambers on boar sperm parameters analyzed by a CASA-Mot system. *Agronomia Mesoamericana*, 30(2), 447–458. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34145>
- Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 110(3–4), 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.012>
- Villacrés, V., Suárez, M., & Tafur, V. (2004). Ley Forestal y De Conservacion De Areas Naturales y Vida Silvestre. *Journal of Ethnopharmacology*, 51, 19. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037887419501358X?via%3Dihub>
- Watson, P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Yániz, J., Palacín, I., Caycho, K., Soler, C., Silvestre, M., & Santolaria, P. (2018). Determining the relationship between bull sperm kinematic subpopulations and fluorescence groups using an integrated sperm quality analysis technique. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 919–923. <https://doi.org/10.1071/RD17441>
- Yeoman, R., Sonksen, J., Gibson, S., Rizk, B., & Abee, C. (1998). Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). *Human Reproduction*, 13(9), 2527–2531. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.9.2527>

## Anexos

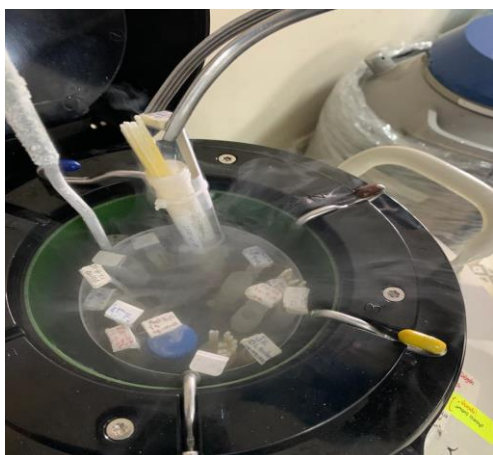
### Anexo A: Fotografías de trabajo de campo



Anexo A1. Preparación de diluyentes  
Fuente: los autores



Anexo A2. Prueba de calentamiento del dispositivo de calentamiento STC-3008  
—



Anexo A3. Reconocimiento del inventario de las pajuelas almacenada en el tanque de nitrógeno líquido  
Fuente: los autores



Anexo A4. Selección de pajuelas para descongelación  
Fuente: los autores



Anexo A5. Colocación de nitrógeno líquido para las pajuelas seleccionadas  
Fuente: los autores



Anexo A6. Recolección de muestras en el tubo Eppendorf  
Fuente: los autores



Anexo A8. Calentamiento de pellets en la máquina STC-3008  
Fuente: los autores



Anexo A9. Recolección de muestras en vasos de precipitación  
Fuente: los autores



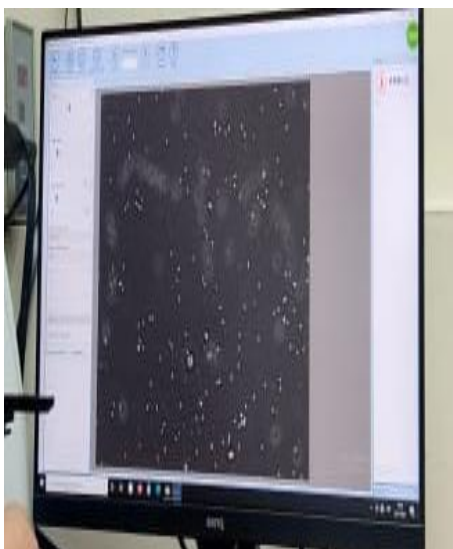
Anexo A10. Rotulación de tubos Eppendorf de cada especie

Fuente: los autores



Anexo A11. Colocación de 5 uL de la muestra en el portaobjeto

Fuente: los autores



Anexo A12. Análisis de muestra en el sistema CASA

Fuente: los autores

