

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Caracterización espermática de semen eyaculado por estimulación eléctrica del
Tapir amazónico (*Tapirus terrestris*)**

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

Autora:

Lupe Carolina Piña Valverde

CI: 0104712682

Correo electrónico: lupe_febrero_14@hotmail.com

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero Ph.D.

CI:0103912846

Cuenca – Ecuador

26/09/2022

RESUMEN

El tapir amazónico (*Tapirus terrestris*), una especie amenazada en el Ecuador, debe ser incluidos en programas de gestión de recursos genéticos mediante la implementación de bancos criogénicos. Por lo tanto, las técnicas de recolección espermática, la calidad y cinemática y su estructura celular es primordial antes de iniciar los procesos de criopreservación. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la calidad espermática del Tapir amazónico, como modelo base para implementación de un banco criogénico. Para este propósito, se recolectó el semen de 3 eyaculados de un tapir amazónico de 8 años de edad y de 250 kg de peso vivo alojado en cautiverio el Zoológico – Refugio Yurak Allpa. Primeramente, se evaluó ecográficamente los testículos y glándulas seminales accesorias para verificar su integridad previa a la eyaculación. Posteriormente, se evaluó el rango de estimulación eléctrica después de un masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas seminales accesorias (TUMASG) para provocar eyaculación. Se evaluaron la cinemática y morfometría celular, la integridad de membranas plasmática y acrosomal, y anomalías morfológicas, mediante un sistema CASA-SCA[®], prueba de doble tinción fluorescente PI/PNA-FITC y la tinción SpermBlue[®], respectivamente. Los resultados demostraron que los testículos y sus epidídimos y las glándulas bulbo uretrales y vesículas seminales mostraron normoecogenicidad a la ultrasonografía. Además, la técnica TUMASG más 14 ± 3 estímulos eléctricos (3 – 6 v) fueron necesarios para provocar un electroeyaculación, con previa anestesia. Sin embargo, la calidad espermática fue indeseable debido a que solo uno de los tres eyaculados produjo un mínimo movimiento (motilidad total: 4,06 %) e integridad de membranas plasmática y acrosomal (5 %). La integridad morfológica promedio fue de $68,1 \pm 6,23\%$ presentando $17,7 \pm 4,78\%$ de gotas citoplasmáticas distales. Las dimensiones promedio de la cabeza fueron: largo: $6,6 \pm 0,77 \mu\text{m}$, anchura: $2,7 \pm 0,27 \mu\text{m}$, área: $17,6 \pm 0,97 \mu\text{m}^2$, y perímetro: $14,4 \pm 0,70 \mu\text{m}$; y un área de la pieza intermedia de $12,7 \pm 5,34 \mu\text{m}^2$. En conclusión, la técnica TUMASG más estimulación eléctrica es adecuada para conseguir eyaculados de semen de tapir con previa anestesia, no obstante, la calidad espermática de dicho donante fue indeseable y no se recomienda para su criopreservación. Finalmente, la morfometría celular nos permitió conocer las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia que servirá como un referente para seguir con estudios de criopreservación en esta especie.

Palabras clave: Tapir amazónico. Electroeyaculación. Espermatozoides. Cinética. Morfometría.

ABSTRACT

The Amazonian Tapir (*Tapirus terrestris*), a threatened species in Ecuador, should be included in genetic resource management programs through the implementation of cryogenic banks. Hence, semen collection techniques, sperm quality and kinematics, and their cellular structure are primordial to the optimization of cryopreservation. The objective of this research was to characterize the sperm quality of the Amazonian Tapir as a base model for implementing a cryogenic bank. For this purpose, three semen ejaculates were collected from an 8-year-old Amazonian tapir of 250 kg housed in captivity conditions at the Yurak Allpa Zoo-Refuge. Firstly, the testicles and sexual glands were evaluated by ultrasound to verify their integrity before ejaculation. Subsequently, the range of electrical stimuli after transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands (TUMASG) to provoke ejaculation was evaluated. Sperm kinematics and morphometry, plasma and acrosomal membranes integrity, and morphological abnormalities were assessed using a CASA-SCA[®] system, PI/PNA-FITC double fluorescent test, and SpermBlue[®] stain, respectively. The results showed testicles and their epididymides and the bulbourethral glands and seminal vesicles showed normal echogenicity on ultrasonography. In addition, the TUMASG technique plus 14 ± 3 electrical stimuli (3 – 6 v) were necessary to provoke an electroejaculation, with previous sedation. Nevertheless, sperm quality was undesirable because only one of the three ejaculates produced minimal movement (total motility: 4.06%) and plasma and acrosomal membrane integrity (5%). The average morphological integrity was $68.1 \pm 6.23\%$, presenting $17.7 \pm 4.78\%$ of distal cytoplasmic droplets. The average dimensions of the heads were: length: $6.6 \pm 0.77 \mu\text{m}$, width: $2.7 \pm 0.27 \mu\text{m}$, area: $17.6 \pm 0.97 \mu\text{m}^2$, and perimeter: $14.4 \pm 0.70 \mu\text{m}$; and a mid-piece area of $12.7 \pm 5.34 \mu\text{m}^2$. In conclusion, the TUMASG technique plus electrical stimulation is adequate to obtain semen ejaculates of tapir with previous sedation however, the sperm quality of the donor male was undesirable and poor quality and is not recommended for cryopreservation. Finally, cell morphometry allowed us to know the dimensions of the head and mid-piece that will serve as a reference to continue with cryopreservation studies in this species.

Keywords: Amazonian tapir. Electroejaculation. Spermatozoa. Kinetics. Morphometric.

ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL

<i>RESUMEN</i>	2
<i>ABSTRACT</i>	3
<i>ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL</i>	4
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	5
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	6
<i>ÍNDICE DE ANEXOS</i>	7
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	10
<i>DEDICATORIA</i>	11
<i>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</i>	12
<i>1.1. OBJETIVOS</i>	16
1.1.1. Objetivo general	16
<i>CAPÍTULO 2: REVISIÓN LITERARIA</i>	17
2.1. Antecedentes	17
2.2. Tapir Amazónico	17
2.2.1. Morfología.....	17
2.2.2. Alimentación	18
2.2.3. Reproducción	18
2.3. Protocolos anestésicos del tapir.....	18
2.4. Criopreservación	19
2.4.1. Avances de criopreservación en animales silvestres.....	19
2.4.2. Diluyentes	19
2.4.3. Aditivos	20
2.5. Estrategias de conservación de espermatozoides mediante bancos criogénicos.....	21
2.5.1. Entidades gubernamentales que vigilan y salvaguardan la conservación de animales silvestres.....	21

2.6. Características del espermatozoide	22
2.6.1. Cabeza	22
2.6.2. Cuello	22
2.6.3. Cola	23
2.6. Sistema de análisis de semen asistido por computador (CASA).....	23
<i>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	25
3.1. Materiales.....	25
3.1.1. Materiales físicos	25
3.1.2. Materiales biológicos	25
3.1.3. Materiales de laboratorio.....	25
3.1.4. Materiales de campo.....	26
3.1.5. Reactivos	26
3.2. Área de estudio	26
3.3. Elaboración de los diluyentes y medios	27
3.4. Diseño experimental.....	27
3.5. Metodología	28
3.5.1. Reproductor y recolección de semen	28
3.5.2. Evaluación de calidad espermática	30
3.6. Análisis estadístico	33
<i>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</i>	34
<i>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....</i>	41
<i>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....</i>	45
<i>CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES.....</i>	46
<i>CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA.....</i>	47
<i>CAPÍTULO 9: ANEXOS</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anatomía del espermatozoide	23
--	-----------

Figura 2: Tapir amazónico macho del Zoo – Refugio Yurak Allpa	29
Figura 3: Ecografía del testículo Izquierdo (A-B) y derecho (C-D). Medición de los testículos: largo (línea verde) y anchura (línea roja). Profundidad: 100 mm; Enfoque: 30 mm Frecuencia: 7,5 Mhz.....	34
Figura 4: Ecografía y dimensiones (largo: línea verde; y anchura: línea roja) de la cola del epidídimo izquierdo (A) y derecho (B). Profundidad: 100 mm; Enfoque: 35 mm Frecuencia: 9 Mhz.....	35
Figura 5: Ecografía y dimensiones de glándulas sexuales. (A) Glándula bulbo uretral derecha (A): Largo: línea verde, anchura: línea roja, y grosor de contenido: línea naranja. (B) Vesícula seminal derecha: Largo: línea roja, anchura: línea naranja, y grosor de contenido: línea verde. Profundidad: 100mm; Enfoque: 30mm; Frecuencia: 7,5 Mhz ..	36
Figura 6: Categorías de fluorescencia mediante la prueba simultánea de doble tinción fluorescente IP + PNA-FICT	38
Figura 7: A. Espermatozoide teñido con SpermBlue observado en el microscopio. B) Espermatozoide analizadoparcialmente en el sistema CASA-SCA. C. Espermatozoide completamente analizado en el sistema CASA- SCA.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: HEPES por fluorescencia.....	27
Tabla 2: Yoduro de propidio	27
Tabla 3: Aglutina	27
Tabla 4: Volumen, concentración y parámetros cinemáticos de los tres eyaculados de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). El valor promedio está expresado en media \pm EEM (error estándar de la media)	37
Tabla 5: Estado simultáneo de las membranas plasmática y acrosómica de los espermatozoides provenientes de los tres eyaculados de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). El valor promedio está expresado en media \pm EEM (error estándar de la media)	38
Tabla 6: Integridad y anomalías morfológicas de espermatozoides provenientes de los tres eyaculados de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). El valor promedio está expresado en media \pm EEM (error estándar de la media).....	39

Tabla 7: Valores promedio \pm EEM (error estándar de la media) de la Morfometría de espermatozoides de los 3 eyaculados de tapir.....	40
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Hoja de restricción química y evaluación clínica	51
Anexo 2: Acercamiento al tapir donante (Julito).....	52
Anexo 3: Sedación del tapir donante mediante dardo y evaluación clínica	52
Anexo 4: Ecografía de las glándulas accesorias y testículos	52
Anexo 5: Técnica TUMASG y electroeyaculación.....	53
Anexo 6: Recolección de la muestra seminal	53
Anexo 7: Recuperación pos-sedación.....	53
Anexo 8: Evaluación microscópica de las muestras recolectadas	54
Anexo 9: Evaluación de los espermatozoides en el sistema CASA - SCA	54

Cláusula de Propiedad Intelectual

Lupe Carolina Piña Valverde, autora del trabajo de titulación "Caracterización espermática de semen eyaculado por estimulación eléctrica del Tapir amazónico (*Tapirus terrestris*)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 26 de septiembre del 2022



Lupe Carolina Piña Valverde

C.I: 0104712682

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Lupe Carolina Piña Valverde en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Caracterización espermática de semen eyaculado por estimulación eléctrica del Tapir amazónico (*Tapirus terrestris*)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 26 de septiembre del 2022



Lupe Carolina Piña Valverde

C.I: 0104712682

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por darme la vida, por guiarme en cada paso que he dado, por permitirme compartir uno de los momentos más importantes en mi vida con mis seres queridos, por ser esa luz en mi caminar para llegar a mi objetivo.

A mis padres Manuel y Rosa, mi esposo Andrés, mi hijo Sebastián y a mis hermanos que me han apoyado y guiado en mi vida.

A mi director de tesis Dr. Andrés Galarza por haber dirigido esta tesis, apoyarme y corregirme para lograr culminar este trabajo.

A los doctores Xavier Samaniego y Mauricio Dumas, técnicos docentes de la Universidad de Cuenca que me han ayudado en la parte experimental de este trabajo.

Al Zoo-Regfugio Yurak Allpa por habernos abierto las puertas para realizar estas investigaciones en pro de la criopreservación.

Finalmente a todos los docentes de la carrera de medicina veterinaria por los conocimientos que me han brindado durante mis años de estudio.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Manuel y Rosa por siempre haber estado ahí apoyándome y guiándome en cada paso que he dado en mi vida, en haber trabajado duro para convertirme en la persona que soy ahora, por todo el amor, cariño que me han brindado.

A mi esposo Andrés que me ha apoyado todo este tiempo para que logre cumplir mi más grande anhelo que es el de convertirme en profesional.

A mi hijo Sebastián por ser mi principal motor y razón de levantarme cada día y luchar para conseguir mis sueños.

A mis hermanos Carlos, José y Verónica que me han enseñado que con trabajo, dedicación y sobre todo amor se puede llegar a cumplir los sueños.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La extinción de una especie representa la pérdida de un recurso que evolucionó a través de una era de mutaciones y selección natural (Prieto et al., 2014). La FAO indica que en Latinoamérica y el Caribe, el 68% de mamíferos se encuentran en peligro de extinción, por lo cual se sugiere la implementación de medidas de conservación del material zoogenético ya sea de manera *in vivo* (Ej. bosques protegidos, refugios o zoológicos) o *in vitro* mediante la conservación biológica y/o criogénica (Ej. espermatozoides, óvulos o embriones) en nitrógeno líquido (NL₂) (FAO, 2007). Desafortunadamente, varios países, incluyendo Ecuador, no disponen de protocolos o estrategias de conservación, ya sea *in vivo* o *in vitro*, de material genético (espermatozoides, óvulos o embriones) para su gestión contra la inminente amenaza de extinción. Si bien, entidades gubernamentales como el Ministerio del Ambiente (MAE) e Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO) son los responsables de vigilar y salvaguardar la integridad de especies 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.

El tapir amazónico (*Tapirus terrestris*), conocido también como “Danta” o “Gran bestia”, es un mamífero que habita el este de los Andes Ecuatorianos, en terrenos que van desde los 200 hasta los 1500 metros sobre el nivel del mar (msnm). Se ha reportado que esta especie está distribuida en zonas Ecuatorianas como la cordillera del Cóndor y las provincias de Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Tirira et al., 2019). Su hábitat corresponde a bosques húmedos tropicales y subtropicales en donde se alimenta de hojas, brotes tiernos, cortezas y frutos. La función más importante de tapir dentro del ecosistema es dispersar semillas (Cuenca, 2019). Actualmente en el Ecuador, el tapir amazónico está categorizado “*en Peligro*” dentro del Libro Rojo de Mamíferos del Ecuador. Esto se debe principalmente a las actividades antropogénicas como la cacería furtiva, tala ilegal de bosques, destrucción de su hábitat, la expansión de actividades agrícolas, entre otras (Santacruz, 2012).

El primer interés de la criopreservación puede ir dirigido a la gestión de programas de conservación *in situ* o *ex situ* que permitan recuperar y conservar el material genético de especies en peligro de extinción. Junto a estos programas, se debería priorizar el

estudio de las características biológicas y celulares de los gametos (espermatozoides y óvulos) del tapir para posteriormente poder ser usadas para implementar protocolos de criopreservación. Las tecnologías reproductivas, incluida la criopreservación de espermatozoides y la inseminación artificial (IA), fecundación *in vitro* (FIV), la transferencia de embriones, la micromanipulación de gametos y embriones, el sexado de semen y el banco de recursos del genoma (GRB) se han desarrollado con el objetivo de resolver los problemas existentes y preservar el material genético con fines de conservación en especies silvestres. La criopreservación de espermatozoides tiene un interés tanto desde el punto de vista de la conservación de especies y razas amenazadas, como para uso del material criopreservado en programas de mejora genética en razas productivas (Santiago-Moreno y Galarza, 2019). Aunque los protocolos de criopreservación espermática de especies domésticas se han extrapolado a especies silvestres y en peligro de extinción, por lo general estas tecnologías reproductivas son específicas de cada especie y son ineficientes en muchas especies no domésticas debido al conocimiento insuficiente sobre su biología básica de reproducción y la necesidad de una personalización específica de la especie. La importancia de optimizar la criopreservación espermática del tapir radica en el conocimiento celular antes de la criopreservación. De esta manera, estos programas de conservación junto con la aplicación de biotecnologías reproductivas ayudarían a mantener y/o incrementar las poblaciones de tapir amazónico en ambientes naturales, reservas o en cautiverio (refugios) en el trópico ecuatoriano.

Existen varios métodos para obtener semen eyaculado de especies silvestres tales como la electroeyaculación, colección post-coito, masaje transrectal, cateterización uretral (previa administración de Medetomidina), estimulación del pene (primates), eyaculación inducida por fármacos (Ej. Imipramina oral + Xilazina) entre otras (Prieto et al., 2014). Otro método de recuperación espermática en animales silvestres es a través de la cola del epidídimo, ya sea por orquiectomía o por recuperación *post-mortem* (Santiago-Moreno et al., 2009).

La electroeyaculación se ha realizado en un gran número de especies silvestres, entre ellas: rinocerontes (Hermes et al., 2005), ungulados (Santiago-Moreno et al., 2009), osos negros asiáticos (Okano et al., 2006), elefantes (Howard et al., 1986), especies de

felinos salvajes como guepardo sudafricano (*Acinonyx jubatus jubatus*), leopardo nublado (*Neofelis nebulosa*), leopardo de las nieves (*Panthera uncia*), leopardo (*Panthera pardus*) y puma (*Puma concolor*)] (Wild et al., 1988; Roth et al. 1994; Howard et al., 1997) entre otros.

Un mejoramiento de la técnica de electroeyaculación fue reportado por Abril-Sánchez et al., (2017; 2019) quienes usaron el masaje guiado por ultrasonido transrectal de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) en animales silvestres y determinaron esta técnica es menos estresante y más seguro que la electroeyaculación (Santiago-Moreno et al., 2013). Hasta donde se conoce, se ha usado la electroeyaculación para recolectar semen eyaculado de tapir bajo condiciones de anestesia (Guevara, 2018), sin embargo, no existe evidencia del uso del método TUMASG para recuperar espermatozoides en tapir.

La optimización de la criopreservación supone varias metodologías y procedimientos *in vitro* que determinan la criosupervivencia espermática. La cinemática, integridad de membranas plasmáticas, integridad estructural y anormalidades morfológicas, así como sus dimensiones de la cabeza y pieza intermedia, son características primordiales que se debe conocer antes de la criopreservación, teniendo en cuenta que todos estos parámetros son afectados por los efectos deletéreos propios de la criopreservación. En general, la motilidad y viabilidad espermática son reducidas entre un 40 a 50% de los valores en fresco debido a los efectos deletéreos propios de la criopreservación (Watson, 2000), incluso en animales menores, los valores pueden ser más bajos a los reportados por animales domésticos (Prieto et al., 2014). Durante la congelación, los espermatozoides se exponen a la formación de cristales de hielo, deshidratación celular y estrés osmótico y oxidativo que reduce la criosupervivencia espermática (Mazur, 1984; Grötter et al., 2019; Galarza et al., 2019a). Estos daños han sido previamente demostrados en rumiantes domésticos (Grötter et al., 2019) y silvestres como muflón (*Ovis aries musimon*) y cabra montés ibérica (*Capra pyrenaica*) (Esteso et al., 2018). De hecho, se ha demostrado que, a más de la reducción de la motilidad y viabilidad, las dimensiones de la cabeza, ADN y cromatina son afectadas por la congelación y descongelación, como ha sido demostrado en espermatozoides de animales domésticos (Ej. caballo, cabra, carnero) (Marco-Jiménez et al., 2006; Ramón et al., 2013;

Teodora et al., 2006) y silvestres (Ej. ciervo [*Cervus elaphus*], oso pardo [*Ursus arctos*] y rumiantes silvestres) Estes et al., 2003; Álvarez et al., 2008; O'brien et al., 2019).

Un reporte reciente realizado por Guevara, (2018) indicó que fue útil la electroeyaculación para recuperar semen de tapir amazónico, sin embargo; ellos obtuvieron una baja criosupervivencia espermática basado en dos pruebas básicas subjetivas de motilidad y viabilidad. En este primer reporte de criopreservación de esta especie no se evidenció un estudio sistemático de la biología celular, integridad y funcionalidad de los espermatozoides antes de la congelación. Probablemente, los valores de motilidad y viabilidad espermática pudieron ser afectados por el proceso de congelación y descongelación.

En base a todos estos antecedentes, esta investigación pretendió demostrar que la técnica simultánea TUMASG + electroeyaculación, puede ser un procedimiento útil y eficiente para obtener segregados de semen de tapir, siempre y cuando sea con sedación previa. Además, este trabajo pretendió caracterizar los eyaculados y calidad espermática inicial basado en cinemática, integridad de membranas espermáticas, integridad morfológica y anormalidades, y morfometría de la cabeza. Todos estos aspectos podrán constituir una base de sustento para iniciar con protocolos de congelación y optimización de la criopreservación de esperma de tapir amazónico.

1.1.OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Caracterizar la calidad espermática del tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) como modelo base para implementación de un banco criogénico

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar el rango de estimulación eléctrica más idónea para provocar la electroeyaculación de semen en el tapir amazónico.
- Evaluación ecográfica de los testículos y glándulas sexuales (vesículas seminales y ampolla de Henle)
- Evaluar las características cinéticas, integridad morfológica y morfometría de la cabeza de los espermatozoides de tapir obtenido por electroeyaculación.

1.1.3. Pregunta de investigación.

- ¿Es posible obtener un semen eyaculado por estimulación eléctrica?

CAPÍTULO 2: REVISIÓN LITERARIA

2.1. Antecedentes

En el estudio realizado por Guevara en el 2018, con el título de “Evaluación de la criopreservación de semen fresco para la conservación de germoplasma de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*)” se investigó la eficacia de dos criopreservantes espermáticos del tapir amazónico en el zoológico de Tarqui en la provincia de Pastaza, el eyaculado se obtuvo mediante electroeyaculación, con anestesia previa del animal analizando en semen fresco características como: volumen seminal, concentración espermática, motilidad total e individual y el porcentaje de células anormales (Guevara, 2018).

Según la publicación del diario El Comercio en el 2018, se menciona que el Ecuador podría ser el último refugio del tapir andino (*Tapirus pinchague*), ya que su población a nivel mundial oscila en 2000 ejemplares, los cuales están dentro del libro rojo de mamíferos del Ecuador en estado de peligro crítico en extinción causado por la caza y la destrucción de su hábitat; viven en estado silvestre ya que no se ha conseguido que lo hagan en estado de cautiverio (Alarcón, 2018).

2.2. Tapir Amazónico

Esta especie pertenece al orden de Perissodactyla y a la familia Tapiridae, género *Tapirus*. En la actualidad se encuentran cuatro especies de tapires: *T. indicus*, *T. bairdii*, *T. pinchaque* y *T. terrestres*. Son animales ungulados que poseen un estómago pequeño con un ciego muy voluminoso que tiene bacterias celulolíticas, por lo tanto los tapires deben alimentarse varias veces al día en pequeñas cantidades (Chalukian et al., 2009).

2.2.1. Morfología

Es un animal grande y robusto, su tamaño oscila entre los 70 a 110 cm de altura de la cruz, y desde la cola a la cabeza mide desde 170 hasta los 210 cm. Tiene un peso aproximado de 227 a 250 kg considerando que los machos son más grandes que las hembras (dimorfismo sexual). Otro aspecto a considerar es el pelaje, el cual es un color

café claro, marrón o negro y desde su nacimiento hasta los 6 meses de edad presenta líneas transversales blancas o amarillas a lo largo del cuerpo.

2.2.2. Alimentación

El tapir es un animal herbívoro-frugívoro selectivo y oportunista debido a que se alimenta exclusivamente de hojas, brotes tiernos, cortezas y frutos, gracias a su alimentación cumple la función de dispersor de semillas dentro de los diferentes ecosistemas en los que habitan (Cuenca, 2019).

2.2.3. Reproducción

En estado silvestre los tapires jóvenes alcanzan la madurez sexual entre los 3 a 5 años de edad, reproduciéndose cada dos años (Cuenca, 2019). Las hembras son poliéstricas, la duración del ciclo estral oscila entre 25 a 38 días, el estro dura entre 1 a 4 días (Chalukian et al., 2009). Su actividad sexual está regida por el ciclo lunar, en donde el macho puede confrontar a varios machos cuando la hembra se encuentra receptiva para poder llegar a fecundarla (Santacruz, 2012). Su gestación dura 13 meses y generalmente tienen una cría por parto, en donde la cría nace con un peso aproximado de 3 a 6 kg alimentándose de leche hasta los 8 a 9 meses, aunque desde la semana de nacido ya incorpora una dieta mixta (Chalukian et al., 2009).

2.3. Protocolos anestésicos del tapir

Existen varios protocolos anestésicos para tapires que han sido estudiados por veterinarios y biólogos de animales en cautiverio. Entre varios protocolos se recomienda el uso de la Medetomidina más el Butorfanol. El protocolo consiste en Tartarato de Butorfanol 0,15 mg/Kg mezclado con Medetomidina 0,03 mg/Kg más Atropina (0,025-0,04 mg/Kg), IM, en el mismo dardo. Para la reversión se utiliza Antipamezole 0,06 mg/Kg vía EV, la cual debe ser aplicada lentamente. Este protocolo es adecuado para restricción química en tapires en procedimientos como colocación de collares y muestreos biológicos (Hernández et al., 2007).

2.4. Criopreservación

La criopreservación de semen es una biotecnología reproductiva que permite la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado y la cual está ligada a la inseminación artificial promoviendo la difusión de material genético de excelente calidad (Ribeiro-Peres et al., 2014).

2.4.1. Avances de criopreservación en animales silvestres

Debido a la extinción de animales silvestres, autóctonos y domésticos, en la actualidad se ha incrementado el estudio científico de métodos de crioconservación de material genético para ser conservados en bancos de germoplasma, esto enfocando la atención de los investigadores en la recuperación, evaluación y criopreservación de material espermático post-mortem, por electroeyaculación o usando vagina artificial (Villaverde, 2017).

En el Ecuador, las políticas gubernamentales han considerado la creación de programadas de conservación de material genético autóctono para la implementación de bancos de germoplasma (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

2.4.2. Diluyentes

Los diluyentes y los crioprotectores dentro del proceso de criopreservación tienen como principal función la de mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado, además incrementar el volumen del eyaculado, protege a los espermatozoides de la acción tóxica de productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura (Medina et al., 2005).

Los diluyentes espermáticos deben tener las características adecuadas de pH (neutro) y osmolaridad. Los diluyentes en su mayoría suelen ser hipertónicos en relación al plasma seminal, produciendo menos lesiones que los diluyentes isotónicos. Los hipertónicos producen una mayor deshidratación celular y por lo tanto reducen la formación de cristales durante el proceso de congelación. Los diluyentes deben estar compuestos de sustancias orgánicas que actúen como crioprotectores, fuente de energía, componentes buffer y antibiótico (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

2.4.2.1. Diluyente natural

La leche de vaca ha sido utilizada como un diluyente natural en proceso de criopreservación de diferentes especies animales. Las proteínas que posee la leche actúan como agentes amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes ante cualquier metal pesado. La principal proteína de la leche es la caseína, esta tiene un efecto antioxidante lo que protege al espermatozoide durante el proceso de reducción de temperatura.

2.4.2.2. Diluyente sintético

Los diluyentes sintéticos contienen agentes amortiguadores, fuentes de energía, protectores contra el shock por frío y antibióticos.

Como tampón orgánico se utiliza el TRIS ya que tiene mejor capacidad amortiguadora, no es tóxico y penetra a la membrana plasmática de los espermatozoides donde cumple la función de amortiguador intracelular contra los cambios de pH. La sacarosa es el principal componente dentro de los diluyentes sintéticos porque protege la integridad del acrosoma de mejor manera que la glucosa, fructosa o lactosa (Pérez, 2020).

2.4.3. Aditivos

Como se mencionó anteriormente, los agentes crioprotectores tienen en su composición aditivos, entre los cuales se encuentran la yema de huevo como el principal aditivo.

2.4.3.1. Yema de huevo

La yema de huevo es el principal componente que se encuentra en casi todos los diluyentes utilizados para refrigeración y congelación ya que tiene características protectoras contra el frío por lo que ha sido utilizado con los diluyentes de congelación de semen de muchas animales domésticos y salvajes. La yema de huevo es una mezcla de lipoproteínas de baja densidad (68%) (LDLs), lipoproteínas de alta densidad (16%), levetelinas (10%) y fosfivitinas (4%).

Se ha intentado utilizar otras fuentes de LDLs como aditivos, pero han sido un fracaso, esto es debido a que los LDLs de la yema de huevo contiene componentes, proteínas que trabajan en conjunto para proporcionar protección a los espermatozoides. La yema de huevo que más se ha utilizado en medios de criopreservación de semen es la de gallina ya que es muy fácil de adquirir.

2.5. Estrategias de conservación de espermatozoides mediante bancos criogénicos.

Los bancos de germoplasma tienen como función la de conservar la biodiversidad de especies en peligro de extinción o de especies autóctonas de flora y fauna fuera de su ambiente natural (Cerna et al., 2014).

En Chile se creó el primer banco de recursos genéticos criopreservados en donde se permitirá dotar al país de líneas celulares cultivadas *in vitro* de especies de animales silvestres nativas y endémicas que se encuentran en peligro de extinción, de esa manera se usarán en programas de rescate de especies y de conservación (FIA, 2011).

En Ecuador existen bancos de germoplasma de plantas endémicas del país, sin embargo no existe registros de bancos criogénicos en especies animales en peligro de extinción o autóctonas, (Moncayo, 2016) y (Mejía, 2017) recomiendan la creación de bancos de germoplasma debido a que permite la reserva genética, conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción.

La creación de bancos de recursos genéticos no podrán abarcar las estrategias de conservación y reproducción en su totalidad, sin embargo, son de mucha ayuda ya que en la actualidad no existen muchos datos sobre los aspectos fisiológicos y reproductivos de especies salvajes, no obstante la investigación científica de la crioconservación celular de especies salvajes en peligro de extinción será de mucha ayuda para la conservación de estas especies y la creación de bancos criogénicos (Medina et al., 2006).

2.5.1. Entidades gubernamentales que vigilan y salvaguardan la conservación de animales silvestres.

En el Ecuador cada 3 de marzo se celebra la aprobación de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) en el cual el MAE es el principal ente regulador. Las principales acciones del MAE para la conservación y protección de la biodiversidad y la vida silvestre son:

- Estrategias de conservación del patrimonio natural entre las que destacan el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, el Programa Socio Bosque, los Bosques Protectores y las Concesiones de Manglar.
- Monitoreo y Seguimiento de especies amenazadas el cual se realiza a través del Instituto Nacional de Biodiversidad, de los Proyectos de la Subsecretaría de

Patrimonio Natural, guardabosques que han permitido establecer diferentes acciones para actualizar la información sobre el estado actual de la vida silvestre a nivel nacional, destacándose los censos poblacionales del cóndor andino, bandurria, paiche, manatí, entre otros, lo que ha permitido determinar la funcionalidad de las áreas de conservación del Estado.

- Cuentan con estrategias y planes de acción de especies amenazadas que, mediante líneas de acción, evitan la extinción de especies animales tales como: cóndor andino, oso andino, jaguar, murciélagos, mamíferos acuáticos, cocodrilo de la Costa, palma de ramos, albatros, pingüinos, tortugas marinas, entre otras.
- Sanidad y Bienestar de la Fauna Silvestre a través de esto el MAE ha logrado atender mediante veterinarios de vida silvestre y biólogos a 800 especímenes de fauna silvestre tanto *in situ* como *ex situ*.

(MAE, 2017).

2.6. Características del espermatozoide

El gameto masculino más comúnmente llamado espermatozoide es una célula haploide diferenciada que tiene como su principal función la de transportar el genoma masculino y fusionarlo con el ovocito (gameto femenino) para formar un nuevo individuo diploide y de esta manera propagar la especie (Ortega, 2011)

El espermatozoide de los mamíferos está formado por 5 partes o regiones: cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza final (Reyes, 2019).

2.6.1. Cabeza

Está conformada por el acrosoma que cubre los dos primeros tercios y la lámina postacrosomal que cubre el tercio restante (Peláez & Palacios, 2021) En el acrosoma se encuentra las enzimas hidrolíticas necesarias para la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito en la fecundación (Reyes, 2019).

2.6.2. Cuello

Es un corto segmento que une la cabeza del espermatozoide con la cola. Está formado por el capitulum, mitocondrias, un centriolo proximal y columnas laminadas que

van a proporcionar flexibilidad al espermatozoide durante la batida del flagelo (Reyes, 2019).

2.6.3. Cola

Esta estructura se encuentra dividida en cuatro partes: la pieza conectora, pieza intermedia, pieza principal y la pieza terminal. La pieza conectora como su nombre lo indica une la cabeza con la cola, la pieza intermedia (PI) contiene en su estructura mitocondrias y la pieza terminal contiene el axonema que está rodeado por su membrana plasmática (Peláez & Palacios, 2021).

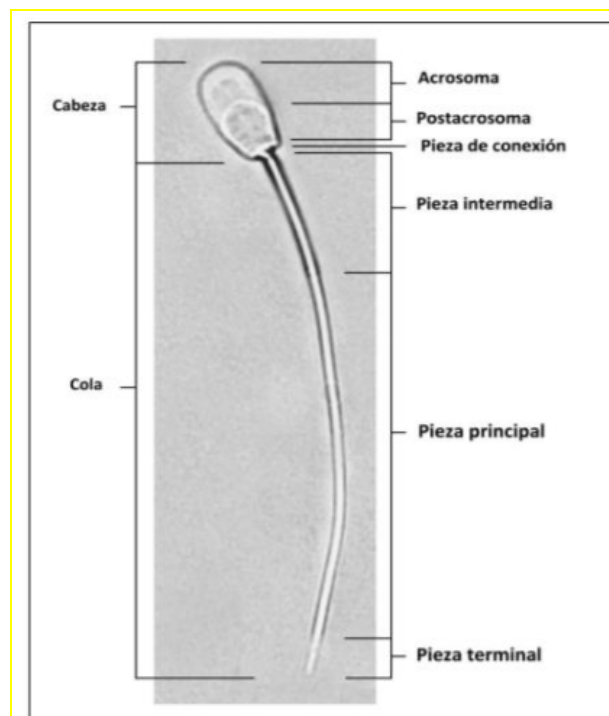


Figura 1: Anatomía del espermatozoide

Fuente: (Reyes, 2019)

2.6. Sistema de análisis de semen asistido por computador (CASA)

El uso de esta tecnología ha permitido la medición de varios parámetros de motilidad seminal de diferentes especies animales, así como de analizar la morfología y concentración espermática con los sistemas más actualizados (Peláez & Palacios, 2021). Este sistema necesita una cámara de video que se encuentra conectada a un microscopio de interfase y a un computador que va a digitalizar las imágenes del tamaño y

UCUENCA

movimientos de los espermatozoides. Estas imágenes permiten analizar la velocidad de las células, su movimiento ya sea rectilíneo, circular o lateral (Ortega, 2011).

Se ha venido mejorando este sistema gracias al avance tecnológico por lo que se dispone de un nuevo sistema SCA (*Sperm Class Analyzer, Microptic S.L.*), el cual ha sido utilizado para analizar semen de equino y utilizando diferentes tinciones llegando a la conclusión que la de Hematoxilina es la más eficiente (Restrepo et al., 2013).

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales físicos

- Mascarillas
- Tubos eppendorf de 1,5mL
- Tubos falcon de 50mL
- Algodón
- Gel para ecografías
- Campo quirúrgico
- Papel aluminio
- Electroeyaculador Bailey® (MOD2) para ovejas y cabras (Western Instrument Company Co, USA)
- Ecógrafo Draminski
- Termómetro para pajuelas

3.1.2. Materiales biológicos

- Un tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) del Zoológico Yurak Allpa
- Eyaculados de semen.

3.1.3. Materiales de laboratorio

- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Pipetas automáticas de 0 – 20 μ L, 20 – 200 μ L y de 200 – 1000 μ L
- Microscopio de campo claro (CX-31, OLYMPUS®)
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio para fluorescencia (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast)
- Refrigerador
- Portaagujas
- Cubreobjetos cortos
- Cubreobjetos largos
- Pinzas
- Guantes de nitrilo

UCUENCA

- Tubos falcón de 15 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL

3.1.4. Materiales de campo

- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Jeringas
- Agujas
- Guantes
- Termómetro digital
- Transporting de 37°C (Caja de poliestireno)

3.1.5. Reactivos

- Diluyente INRA-96[®] (IMV, Francia)
- Butorfanol
- Xilacina
- Ketamina 10%
- Yohimbina
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)
- Yoduro de propidio (PI, Sigma P-4170)
- Aglutinina (PNA-FITC, Sigma L7381)
- Tinción Sperm-Blue[®] (SB-250-N)

3.2. Área de estudio

Las muestras de eyaculados de tapir amazónico fueron recogidas del Zoo–Refugio Yurak Allpa (3°00'20,5'' S y 79°01'29,1'' O) ubicado en la parroquia Tarqui, cantón Cuenca, provincia del Azuay. Actualmente, la Facultad de Ciencias Agropecuarias a través de la Dirección de Vinculación con la colectividad, cuenta con un convenio de participación mutua entre la Universidad de Cuenca y el Zoo – Refugio Yurak Allpa. Mediante este convenio se permite realizar trabajos de investigación en animales silvestres en dicho refugio, bajo condiciones muy especiales y controladas según lo recomendado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). El material biológico obtenido por electroeyaculación fue procesado en el laboratorio de

Biotecnología de la Universidad de Cuenca, ubicado en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca (3°04'48,1" S y 79°04' 31,0' 'O).

3.3. Elaboración de los diluyentes y medios

Tabla 1: HEPES por fluorescencia

Reactivo	Cantidad
Hepes salt	476,62 mg
NaCl	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua destilada	100 ml

Alicuotar en dosis 200 μ L en tubos eppendorf y congelar a -20 °C hasta su uso

Tabla 2: Yoduro de propidio

Reactivo	Cantidad
Propidium iodide (PI, Sigma P-4170)	1 mg
PBS	1 mL

Alicuotar en dosis de 100 μ L y congelar a -20°C

Tabla 3: Aglutina

Reactivo	Cantidad
PNA-FITC, Sigma L7381	0,2 mg
BSA	5 mg
PBS	1 mL

Alicuotar en dosis de 100 μ L y congelar a -20°C

3.4. Diseño experimental

El experimento incluyó 3 eyaculados de semen de un tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) obtenidos por la técnica TUMASG + electroeyaculación con evaluación clínica previo a la anestesia. Inmediatamente de cada eyaculación, una parte del semen fue diluido inicialmente 1:1 con INRA-96®; y la otra parte de semen se mantuvo sin diluir (crudo). El semen diluido fue evaluado su calidad inicial y entonces fue centrifugado a 300 gravedades, y el pellet obtenido fue resuspendido en el mismo diluyente INRA-96® a una concentración final de 100 x 10⁶ espermatozoides/mL para los análisis subsiguientes. La caracterización de la calidad espermática consistió en evaluar el

volumen (mL) del eyaculado, concentración ($\times 10^6$ espermatozoides/mL), motilidad total y cinética en el sistema CASA, integridad de la membrana plasmática y acrosomal (fluorescencia), y morfometría de la cabeza y pieza intermedia (Tinción SpermBlue + módulo ASMA-CASA).

3.5. Metodología

3.5.1. Reproductor y recolección de semen

El proceso de recolección de semen eyaculado se realizó en un tapir amazónico de 8 años de edad, de aproximadamente 250 kg de peso vivo, alojado en cautiverio en el Zoo – Refugio Yurak Allpa (Figura 2). El tapir donante estuvo alojado y confinado en un parque de 50 m² aproximadamente. En el interior del parque existe un cobertizo de 9 m² donde duerme temporalmente. La mayor parte del tiempo pasa al aire libre. La dieta basal del tapir consiste en frutas, plátano y grano administrado dos veces por día.

La técnica empleada para la recolección de eyaculados de semen fue a través de masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG) + estimulaciones eléctricas, según lo descrito por Santiago-Moreno et al. (2003) con algunas modificaciones. Para este proceso, el tapir tuvo un ayuno estricto de 8 horas previo a la anestesia para evitar el vómito o reflujo del contenido gástrico. Previo a la electroeyaculación, se aplicó un plan general de evaluación clínica basada en temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, tiempo de llenado capilar y estado físico, clasificando al tapir como ASA I, es decir, un paciente de riesgo quirúrgico leve.



Figura 2: Tapir amazónico macho del Zoo – Refugio Yurak Allpa

Fuente: Autor

La restricción química se desarrolló siguiendo los protocolos anestésicos descritos y sugeridos por Hernández-Divers et al. (2007) en el “*Manual Veterinario de campo para tapires*”. El protocolo de anestesia fue basado en la combinación de 0,15 mg/kg de Tartrato de Butorfanol + 0,02 mg/kg de Xilacina + 0,5 mg/kg de /Ketamina. Esta medicación anestésica fue cargada a dardos tranquilizantes de 10 mL y administrada al tapir por vía parenteral intramuscular profunda mediante un rifle de aire comprimido. En cada sesión anestésica se monitoreó constantemente la frecuencia cardiaca y respiratoria mediante el uso de un estetoscopio. Durante la manipulación anestésica, el tapir fue vendado y aplicados tapones en las orejas para aislarlo de estímulo visual y auditivo. De esta manera, se disminuyó el estrés proporcionado al animal durante este protocolo de recolección. La anestesia general del tapir duró aproximadamente 40 minutos.

Antes de iniciar el procedimiento de recolección seminal, se evaluó la circunferencia escrotal y el estado del parénquima testicular por ultrasonografía para detectar normalidad o inconsistencia (ej. calcificaciones) en el parénquima testicular (túbulos seminíferos). Este procedimiento se hizo con un ecógrafo iScan® (Draminski, Olsztyn, Poland) con sonda lineal configurado a una frecuencia de 7,5 MHz y una profundidad hasta de 10 cm.

La técnica TUMASG + estimulación eléctrica fue realizada a los 17 minutos de iniciar el protocolo anestésico ya que el animal a ese tiempo presentó una sedación profunda. La sonda lineal del ecógrafo iScan® fue acoplada a un dispositivo rígido de 30 cm de longitud fue usado para evaluar ecográficamente las glándulas sexuales masculinas y los masajes. Previo a la introducción de la sonda rígida, el contenido rectal del tapir fue evacuado mediante un enema. La sonda lineal rígida fue introducida suavemente por el recto con lubricación previa (carboxi-metilcelulosa). El estado de las glándulas bulbo uretral, próstata, vesícula seminales y ampollas de conducto deferente fueron registradas ecográficamente y luego estimuladas con deslizamientos cráneo-caudal simultáneos. Como respuesta positiva, el tapir presentó erección. Luego de este proceso, se introdujo suavemente por vía rectal el electroeyaculador Bailey rígido de 25 cm de longitud y 3 cm de diámetro con previa lubricación.

Los estímulos eléctricos fueron de 2 a 6 voltios y aplicados progresivamente con intervalos de 5 segundos de descarga y 5 segundos de descanso. Un promedio de 14 ± 3 pulsos fueron aplicadas para lograr la eyaculación. El semen eyaculado se recogió en un tubo falcón de 50 mL previamente atemperado a 37°C y la mitad del volumen se diluyó inicialmente 1:1 con el diluyente INRA-96 también atemperado a 37°C. Inmediatamente, la muestra seminal se transportó al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal y su calidad seminal se evaluó en un tiempo inferior a 30 minutos posterior a la recolección. La frecuencia de recolección entre eyaculados (1, 2 y 3) fue aproximadamente de 30 días.

3.5.2. Evaluación de calidad espermática

3.5.2.1. Volumen y concentración

El volumen del eyaculado fue evaluado inmediatamente después del proceso de eyaculación en un tubo colector graduado en mililitros. Para recoger el volumen se utilizó un tubo colector para semen equino (Ref: 11231/0200, Minitube®, Alemania) y filtro en su interior (Ref: 11231/0400, Minitube®, Alemania). La concentración espermática fue evaluada inicialmente usando la fracción del semen crudo. Para este propósito, se usó una dilución 1:200 entre semen crudo y solución salina + 5% de formol (3 µL semen crudo en 600µL de solución salina formolada). De esa mezcla se tomó 10 µL y se colocó en la

cámara de Neubauer recubierta por un cubreobjetos y se contó los 5 cuadrantes observados en un microscopio bajo un aumento de 40X (Galarza et al., 2018).

3.5.2.2. Variables cinemáticas

Las características cinemáticas de las muestras frescas de tapir amazónico fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v6.0 software, Microptic S.l., Barcelona, España) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a Galarza et al. (2018). Se evaluaron 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 fresca – diluida 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 o progresivo (No-MP), porcentaje de espermatozoides inmóviles (INV), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) y de rápida progresión (VCL-RP), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) y de rápida progresión (VSL-RP), velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$) y de rápida progresión (VAP-RP), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm).

3.5.2.3. Integridad de la membrana espermática

Para la evaluación de las membranas, se descongeló la dosis del medio Hepes (250 μL). Se preparó la tinción de fluorescencia mezclando una dosis (50 μL) de yoduro de propidio (PI) más una dosis de PNA-FITC aglutinina (*fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut [Arachis hypogaea]*) (50 μL) y se cubrió de la luz con papel aluminio hasta su uso. Al medio Hepes descongelado atemperado a temperatura de cuarto se adicionó la muestra de espermatozoides a analizar alcanzando una concentración de 10×10^6 espermatozoides/mL.

Sin luz, se agregó 5 μL de la mezcla de fluorescencia (PI+PNA-FITC) a dicha mezcla, y entonces, se tomó 5 μL de esa muestra y se colocó en un porta y cubreobjetos para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia (Galarza et al., 2018). La viabilidad de los espermatozoides y el estado de la membrana acrosómica se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (contando 200 células), utilizando un microscopio de

epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.). La prueba de fluorescencia PI / FITC-PNA proporcionó cuatro subcategorías: porcentajes de esperma con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA, %), con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA, %); con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA, %); y con membrana plasmática y acrosoma dañados (DPDA, %). Además, el porcentaje total de células con membrana plasmática intacta (IMP= IPIA + IPDA), y una membrana acrosomal intacta (IMA= IPIA + DPIA) serán calculadas. La viabilidad espermática (vivos) será el equivalente al valor de IMP.

3.5.2.4. Análisis morfométrico

La morfometría de la cabeza espermática que incluye largo (μm), ancho (μm), perímetro (μm) y área (μm^2); y de la pieza intermedia que incluye únicamente el área (μm^2), fueron evaluados usando el módulo ASMA del sistema CASA (SCA). Para esta medición, se hizo un frotis de cada muestra usando un portaobjetos y colocando 10 μL de la muestra a analizar y realizar un frotis usando otro cubreobjetos deslizando a un ángulo de 45°. Se dejó secar el frotis en la placa térmica a 37°C. Sumergimos los frotis en SpermBlue® stain durante 15 minutos. Secamos y escurrimos por 1 minuto, y luego lavamos sumergiendo 1 sola vez por 3 segundos en agua destilada. Dejamos secar y sellar con mounting médium y un cubreobjetos largo. Evaluamos en el sistema CASA usando la luz azul, contraste de fases A y seleccionar al menos 100 espermatozoides por muestra (Galarza et al., 2021, 2022)

3.5.2.5. Integridad estructural y anormalidades morfológicas

La integridad estructural y anormalidades morfológicas se realizó según lo detallado por Galarza et al. (2018). Se tomó 5 μL de la muestra fresca de semen diluido y se colocó en 100 μL de Glutaraldehído al 2% (en PBS). En un microscopio de contraste de fases se contó un total de 200 espermatozoides y se categorizó en íntegros estructuralmente y con anormalidades morfológicas de cabeza (cabezas anormales y decapitados), pieza intermedia (cuello roto y tracto doble), cola (anormalidades de cola y colas látigo) y gotas citoplasmáticas (proximales y distales). Los resultados de cada categoría fueron expresados en porcentajes.

3.6. Análisis estadístico

Los datos recogidos en el laboratorio se tabularon en una base en Excel y posteriormente se analizaron estadísticamente en un software STATISTICA *versión 12.0*. Los datos se expresan en media \pm EEM (error estándar de la media). El análisis estadístico se limita a presentar los estadígrafos principales mediante una tabla de frecuencias de los tres eyaculados; considerando un valor total de cada variable medida para establecer un valor referencia en esta especie.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1. Electroeyaculación

Los resultados de esta investigación demostraron que fue efectiva la recuperación de semen eyaculado mediante la técnica de TUMASG + EE. Los estímulos eléctricos aplicados (2 a 6 voltios) progresivamente, con intervalos de 5 segundos de descarga y 5 segundos de descanso (5 x 5), provocaron una segregación de eyaculado después de 14 ± 3 pulsos eléctricos sucesivos en los tres eyaculados.

4.2. Evaluación ecográfica de testículos y glándulas sexuales masculinas

La evaluación ecográfica de los testículos, epidídimos y glándula bulbo uretrales se muestran en las figuras 3 – 5. La evaluación ecográfica de los testículos mostró una ecogenicidad simultánea en todo el contenido testicular y sus bordes, sin la presencia de calcificaciones (focos hiperecoicos) o de sacos líquidos (anecoicos). Los túbulos seminíferos fueron homogéneos sin defectos visuales a la ecografía. En general, el tamaño de los testículos se registró en 12×8 cm (izquierdo) y $14 \times 8,5$ cm (derecho) de longitud y anchura, respectivamente (Figura 3).

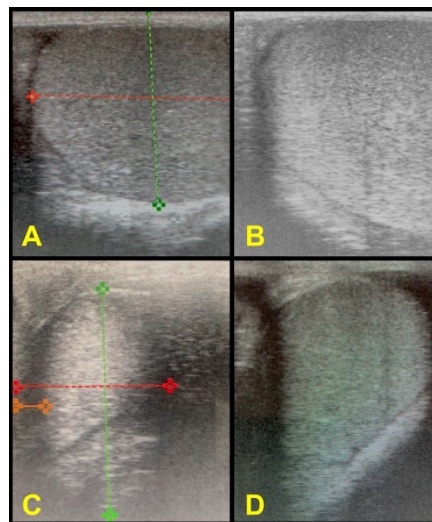


Figura 3: Ecografía del testículo Izquierdo (A-B) y derecho (C-D). Medición de los testículos: largo (línea verde) y anchura (línea roja). Profundidad: 100 mm; Enfoque: 30 mm Frecuencia: 7,5 Mhz

De la misma manera, se evaluó la ecogenicidad de la cola de los epidídimos de ambos testículos y se determinó que no existió ninguna anomalía ni bordes irregulares.

Se valoró el tamaño (longitud y anchura) de la cola del epidídimo izquierdo ($54 \times 30 \text{ mm}$) y derecho ($45 \times 25 \text{ mm}$) (Figura 4).

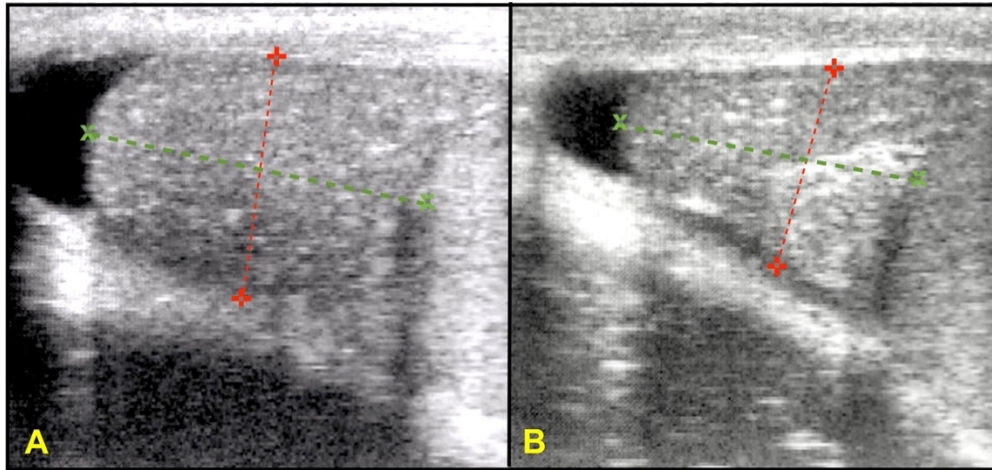


Figura 4: Ecografía y dimensiones (largo: línea verde; y anchura: línea roja) de la cola del epidídimo izquierdo (A) y derecho (B). Profundidad: 100 mm; Enfoque: 35 mm Frecuencia: 9 Mhz.

Finalmente, se evaluó la ecogenicidad de las glándulas sexuales masculinas y se logró valorar únicamente la glándula bulbo uretral y vesícula seminal. En primer lugar, se determinó que ambas glándulas contenían líquido antes de la estimulación eléctrica, lo cual fue importante para contribuir al segregado de semen como parte del plasma seminal. Los valores registrados fueron los siguientes

- Glándula bulbo uretral derecha (Figura 5A): Largo: línea verde = 40 mm; anchura: línea roja = 51 mm; y grosor de contenido: línea naranja = 10 mm.
- Vesícula seminal derecha (Figura 5B): Largo: línea roja = 39 mm; anchura: línea naranja = 55 mm; y grosor de contenido: línea verde = 7 mm.

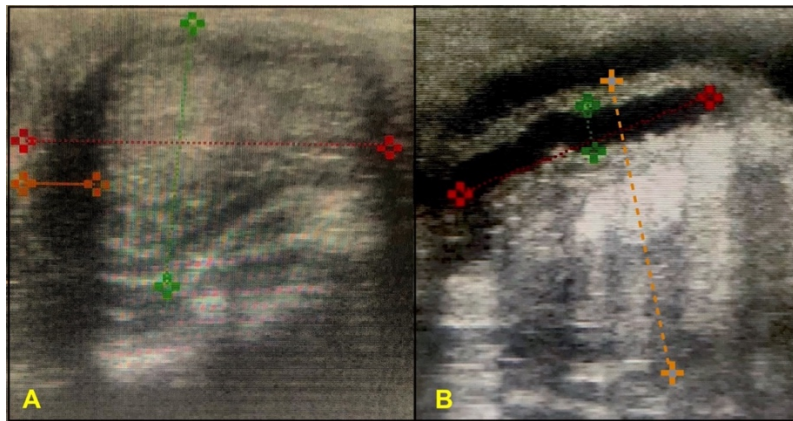


Figura 5: Ecografía y dimensiones de glándulas sexuales. (A) Glándula bulbo uretral derecha (A): Largo: línea verde, anchura: línea roja, y grosor de contenido: línea naranja. (B) Vesícula seminal derecha: Largo: línea roja, anchura: línea naranja, y grosor de contenido: línea verde. Profundidad: 100mm; Enfoque: 30mm; Frecuencia: 7,5 Mhz

4.3. Calidad espermática del semen eyaculado

4.3.1 Volumen, concentración y cinemática espermática

Después de la obtención de eyaculados de semen, se realizó la valoración del volumen y concentración espermática (ver tabla 4). Un promedio de volumen de $7,7 \pm 3,71$ mL y una concentración de $113,7 \pm 3,18 \times 10^6$ espermatozoides/mL fueron registrados en los tres eyaculados.

De inmediato, fue objetivamente evaluado la cinemática de los espermatozoides de los tres eyaculados y se determinó en principio que, tanto el primer como el tercer eyaculado no hubo movimiento de los espermatozoides. Sin embargo; en el segundo eyaculado, aunque los valores fueron indeseables, se apreció una leve motilidad espermática. 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. En general, los valores de la cinemática de los espermatozoides del segundo eyaculado no cumplieron los parámetros mínimos para ser criopreservados, sin embargo, el uso de técnicas de purificación (Ej. centrifugación en gradientes de densidad, swim-up o filtración), podrían ser aplicadas para obtener a esa subpoblación espermática deseable y someterla a criopreservación (tabla 4).

Tabla 4: Volumen, concentración y parámetros cinemáticos de los tres eyaculados de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). El valor promedio está expresado en media \pm EEM (error estándar de la media)

Parámetros cinemáticos	Eyaculado 1	Eyaculado 2	Eyaculado 3	Promedio
Volumen (mL)	5 mL	15 mL	3 mL	7,7 \pm 3,71
Concentración ($\times 10^6$ esp/mL)	120	110,98	110	113,7 \pm 3,18
Parámetros cinemáticos				
MT (%)	0,00	4,06	0,00	1,4 \pm 1,35
MP (%)	0,00	0,28	0,00	0,1 \pm 0,09
No-MP (%)	0,00	3,78	0,00	1,3 \pm 1,26
IM (%)	0,00	95,94	0,00	32,0 \pm 31,98
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,00	22,79	0,00	7,6 \pm 7,60
VCL-RP ($\mu\text{m/s}$)	0,00	126,85	0,00	42,3 \pm 42,28
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0,00	15,01	0,00	5,0 \pm 5,00
VAP-RP ($\mu\text{m/s}$)	0,00	123,90	0,00	41,3 \pm 41,30
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0,00	10,40	0,00	3,5 \pm 3,47
VSL-RP ($\mu\text{m/s}$)	0,00	106,68	0,00	35,6 \pm 35,56
STR (%)	0,00	44,69	0,00	14,90 \pm 14,90
LIN (%)	0,00	24,30	0,00	8,1 \pm 8,10
WOB (%)	0,00	44,99	0,00	15,0 \pm 15,00
ALH-RP (μm)	0,00	1,83	0,00	0,06 \pm 0,61
BCF-RP (Hz)	0,00	6,19	0,00	2,1 \pm 2,06

MT: motilidad total, **MP:** motilidad progresiva, **No-MP:** porcentaje de espermatozoides o progresivos, **IM:** porcentaje de espermatozoides inmóviles, **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-RP:** amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, **BCF-RP:** frecuencia de batida del flagelo.

4.3.2 Estado de membranas espermáticas

La prueba fluorescente de doble tinción simultánea “PI+PNA-FITC” determinó que solamente en el segundo eyaculado mostró una integridad de la membrana plasmática y acrosomal (IPIA) del 5%. El resto de categorías de fluorescencia indeseables fueron altas, lo que evidenció degeneración en la membrana plasmática y acrosomal: DPIA = 54,3 \pm 1,76%, y DPDA = 45,3 \pm 1,45. De esta manera, también se determinó que estos

parámetros que muestran una gran degeneración de membranas no permitirían la criopreservación (Ver tabla 5 y figura 6)

Tabla 5: Estado simultáneo de las membranas plasmática y acrosómica de los espermatozoides provenientes de los tres eyaculados de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). El valor promedio está expresado en media \pm EEM (error estándar de la media)

Categoría fluorescencia	Eyaculado 1	Eyaculado 2	Eyaculado 3	Promedio
IPIA (%)	0,00	5,00	0,00	1,7 \pm 1,67
IPDA (%)	0,00	2,00	0,00	0,7 \pm 0,67
DPIA (%)	57,00	51,00	55,00	54,3 \pm 1,76
DPDA (%)	43,00	48,00	45,00	45,3 \pm 1,45
IMP-equivalente a vivos (%)	0,00	7,00	0,00	2,3 \pm 2,33
IMA (%)	57,00	56,00	55,00	56,0 \pm 0,58

IPIA: porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto, **IPDA:** porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañadas, **DPIA:** porcentaje de espermatozoide con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto, **DPDA:** porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática y acrosoma dañados.

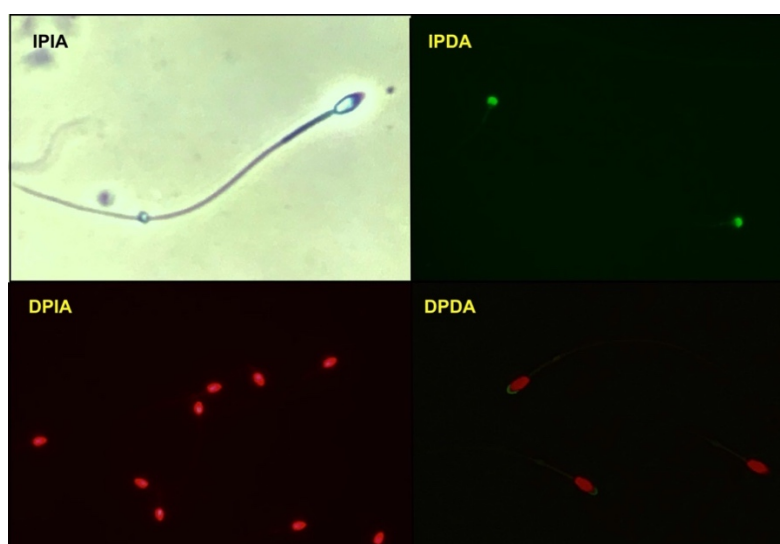


Figura 6: Categorías de fluorescencia mediante la prueba simultánea de doble tinción fluorescente IP + PNA-FICT

4.3.3. Integridad espermática y anomalías morfológicas

Un promedio de $68,1 \pm 6,23\%$ de espermatozoides íntegros fueron registrados en los tres eyaculados; sin embargo, la diferencia porcentual indicó las anomalías morfológicas subdivididas en anomalías de cabeza, pieza intermedia y cola (tabla 6). Las anomalías de cabeza ($< 4\%$) (equivalentes a anomalías primarias) y cola ($< 8\%$) fueron relativamente bajas. Sin embargo, en la pieza intermedia mostró un porcentaje alto ($> 17\%$) de gotas citoplasmáticas distales (GCD). Este alto porcentaje de GCD evidencia una inmadurez en las células espermáticas mientras hacen su tránsito por el epidídimo.

Tabla 6: Integridad y anomalías morfológicas de espermatozoides provenientes de los tres eyaculados de tapir amazónico recolectados mediante la técnica de TUMASG + EE (electroeyaculación). El valor promedio está expresado en media \pm EEM (error estándar de la media)

Categoría	Eyaculado 1	Eyaculado 2	Eyaculado 3	Promedio
Normales – íntegros (%)	62,44	60,00	80,37	$68,1 \pm 6,23$
<i>Anormalidades de cabeza</i>				
Deformidades (%)	3,28	1,00	0,00	$1,4 \pm 0,97$
Decapitados (%)	3,76	5,00	0,00	$2,9 \pm 1,50$
<i>Anormalidades de pieza intermedia</i>				
Cuello roto (%)	0,93	3,50	0,00	$1,5 \pm 1,05$
GCD (%)	27,23	12,00	14,01	$17,7 \pm 4,78$
<i>Anormalidades de cola</i>				
Deformidades (%)	0,00	1,00	0,93	$0,6 \pm 0,32$
Látigo (%)	1,40	10,00	0,93	$4,1 \pm 2,95$
Sueltas (%)	0,93	3,50	3,73	$2,7 \pm 0,90$

GCD: gota citoplasmática distal

4.4. Morfometría de cabeza y pieza intermedia

En la tabla 7 podemos apreciar los valores promedios de los parámetros morfométricos de los espermatozoides obtenidos en los 3 eyaculados de tapir amazónico. Las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides del tapir son relativamente pequeñas y similares a los del caballo. Un área de la cabeza y pieza intermedia de $17,6 \pm 0,97 \mu\text{m}^2$ y de $12,7 \pm 5,34 \mu\text{m}^2$ fueron registrados por sistema CASA. Además, una

integridad acrosomal del $56,0 \pm 5,15\%$ fue determinado. Este valor es consistente al determinado por fluorescencia ($56,0 \pm 0,58\%$)

Tabla 7: Valores promedio \pm EEM (error estándar de la media) de la Morfometría de espermatozoides de los 3 eyaculados de tapir.

Parámetros morfométricos	Eyaculado 1	Eyaculado 2	Eyaculado 3	Promedio
<i>Dimensiones de cabeza</i>				
Longitud (μm)	$7,7 \pm 0,56$	$5,1 \pm 0,50$	$6,9 \pm 1,48$	$6,6 \pm 0,77$
Ancho (μm)	$2,8 \pm 0,67$	$2,2 \pm 0,14$	$3,1 \pm 0,33$	$2,7 \pm 0,27$
Área (μm^2)	$19,9 \pm 0,29$	$11,7 \pm 01,32$	$21,2 \pm 4,03$	$17,6 \pm 0,97$
Perímetro (μm)	$16,7 \pm 1,95$	$11,1 \pm 0,89$	$15,5 \pm 3,21$	$14,4 \pm 0,70$
Elipticidad	$3,0 \pm 1,65$	$2,3 \pm 0,21$	$2,2 \pm 0,258$	$2,5 \pm 0,25$
Elongación	$0,4 \pm 0,15$	$0,4 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,09$	$0,4 \pm 0,04$
Rugosidad	$1,0 \pm 0,38$	$1,2 \pm 0,14$	$1,2 \pm 0,32$	$1,1 \pm 0,07$
Regularidad	$0,9 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,06$	$0,8 \pm 0,11$	$0,8 \pm 0,03$
<i>Dimensiones de pieza intermedia</i>				
Ancho PI (μm)	$1,2 \pm 1,03$	$0,6 \pm 0,11$	$0,6 \pm 0,11$	$1,0 \pm 0,21$
Área (μm^2)	$12,4 \pm 3,02$	$4,1 \pm 1,48$	$4,1 \pm 1,48$	$12,7 \pm 5,34$
<i>Acrosoma</i>				
Integridad de acrosoma	$57,7 \pm 6,13$	$54,9 \pm 2,00$	$55,4 \pm 7,31$	$56,0 \pm 5,15$

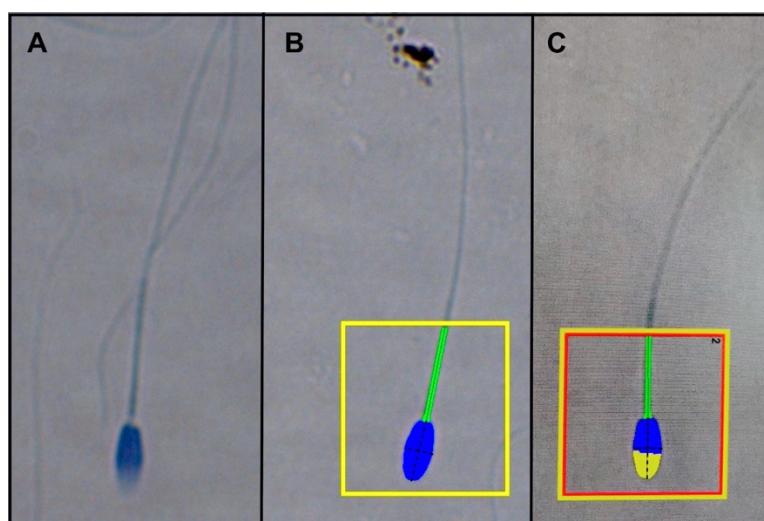


Figura 7: A. Espermatozoide teñido con SpermBlue observado en el microscopio. B) Espermatozoide analizado parcialmente en el sistema CASA-SCA. C. Espermatozoide completamente analizado en el sistema CASA-SCA

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación demostraron que, la aplicación de la técnica de TUMASG más 14 estimulaciones eléctricas de 2 – 6 voltios, fueron suficientes para provocar eyaculaciones del tapir. La valoración ecográfica de los testículos y glándulas sexuales masculinas, previo a la recolección, permitió denotar la integridad de estos tejidos. La calidad espermática, desafortunadamente no fue la más idónea mostrando en dos eyaculados una calidad nula (sin movimiento espermático), lo que dificultaría la aplicación de TRA. Solo el segundo eyaculado mostró valores mínimos de motilidad e integridad de membranas plasmática y acrosomal (< al 7%). Finalmente, la evaluación de las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia nos permitió conocer el tamaño de estas células que seguramente servirán de base para comparaciones posteriores después de la criopreservación.

La criopreservación de material genético de especies que se encuentran en peligro de extinción se ha convertido en una herramienta importante de la biotecnología para la implementación de bancos criogénicos de muchas especies en peligro crítico de extinción, como es el caso del tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) (Guevara, 2018). Sin embargo; el estudio de la integridad estructural y funcional de los espermatozoides, antes de someterlos a la criogenización, deben ser condicionante para suponer los resultados de criosupervivencia.

La electroeyaculación bajo anestesia quirúrgica se ha convertido en la técnica de recolección estándar en la gran mayoría de las especies de mamíferos silvestres debido al daño mecánico (irritabilidad) que causan en la mucosa rectal. La técnica se utilizó con éxito en una amplia gama de especies. Aun así, la técnica de electroeyaculación presenta algunas cuestiones que conviene tener en cuenta. Por su naturaleza, los animales silvestres son muy buenos para ocultar cualquier problema de salud interna que puedan tener hasta que ya no puedan ocultarlo más. Por lo tanto, la anestesia provoca resultados variables cuando se trata de animales silvestres y, como tal, los veterinarios de los zoológicos se esfuerzan por evitarlo siempre que sea posible. Además, la anestesia puede tener efectos prolongados en los animales silvestres como en cualquier otro animal, por lo que no se recomiendan las recolecciones frecuentes, incluso en animales sanos. También se debe recordar que la anestesia puede afectar la calidad del eyaculado (Giulini et al. 2004; Durrant 2009; Santiago-Moreno et al. 2010b) y el procedimiento de recolección (Campion et al. 2012).

Para evitar los efectos negativos sobre bienestar animal cuando se aplica la electroeyaculación, se ha propuesto otras técnicas como el masaje transrectal guiado por ultrasonido de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG). En ungulados no domésticos, se informó que la técnica TUMASG, con o sin un pequeño número de estimulaciones eléctricas, fue efectiva para obtener eyaculados de semen (Santiago-Moreno et al. 2013). También su efectividad del TUMASG fue validado en el arruí, otro ungulado silvestre (*Ammotragus lervia*) (Santiago-Moreno et al., 2013). El uso de TUMASG requiere pocos o ningún pulso eléctrico para lograr la eyaculación en cabras montesas anestesiadas, lo que provoca aumentos levemente menores del ritmo cardiaco y pulso, y de las concentraciones de cortisol y creatina quinasa (CK) que la electroeyaculación (Ungerfeld et al., 2015). La anestesia reduce la respuesta a estos indicadores de estrés, es posible que las diferencias a favor del uso de TUMASG se reduzcan en esos animales y, por lo tanto, sean aún mayores en animales conscientes. Los resultados de esta investigación, aunque son consistentes con los estudios anteriormente mencionados, se necesitó alrededor de 14 estímulos eléctricos para provocar una eyaculación en el tapir amazónico. Quizás esto se deba a la fortaleza de esta especie debido a que luego de 17 minutos de aplicarle la anestesia completa, el animal alcanzó la anestesia profunda para poder realizar la técnica de recolección seminal.

Se ha demostrado que al usar la técnica TUMASG se recolecta un menor volumen de semen con menor motilidad que con electroeyaculación sola en muflones anestesiados, y se eyacula semen con menor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en cabras montesas anestesiadas, (Ungerfeld et al., 2015). Los resultados del presente estudio son consistentes con el estudio realizado en muflones debido a que obtuvimos un volumen bajo (aproximadamente de 7 mL) y en un solo eyaculado la motilidad fue muy baja (< 5%). Santiago-Moreno et al. (2013) sugiere además que la sensibilidad del procedimiento TUMASG con o sin estímulos eléctricos es diferente en cada especie e individuo. Probablemente, la respuesta de esta técnica no sea la mejor en esta especie silvestre de tapir amazónico, sin embargo, el factor individual puede ser importante al momento de valorar este procedimiento. Si bien se logró conseguir eyaculados de tapir mediante la técnica de TUMASG más estimulación eléctrica (constatando la efectividad de este método de recolección de semen en esta especie), la mala calidad espermática puede deberse a varios factores intrínsecos propios del animal.

La falta de experiencia sexual, la baja o nula eyaculación, la falta de libido y la frecuencia de colección de semen en especies silvestres mantenidos en cautiverio pueden ser factores principales para una baja calidad espermática e infertilidad, como ha sido demostrado en elefantes Asiáticos (*Elephas maximus*) en cautiverio, (Imrat et al., 2014). El tapir donante de esta investigación fue un animal de más de 8 años de edad sin experiencia sexual lo que posiblemente fue un factor determinante para producir una mala calidad espermática a pesar de que sus testículos y glándulas sexuales estuvieron intactas. De hecho, en caballos, la especie más cercana al tapir se ha determinado que la degeneración testicular en machos que no han eyaculado o que eyaculan muy poco (baja frecuencia) es la causa más común de infertilidad (y degeneración espermática) (Turner, 2007). La ecografía testicular y epididimaria realizada al tapir donante de esta investigación demostró una integridad en su estructura y parénquima testicular, lo que descartaría posibles degeneraciones. Además, las anormalidades morfológicas de los eyaculados de tapir demostraron un bajo porcentaje de anormalidades de origen primario (Ej. cabezas sueltas) lo que argumentaría esta hipótesis.

Otro factor importante que determina la calidad espermática es la alimentación. (Valverde et al., 2021) indican que la astenospermia observada en semen de verracos se debe a la falta de minerales necesarios dentro de la alimentación, además factores como la época del año, temperatura, actividad sexual y edad. En este caso, el tapir donante alojado en condiciones de cautiverio recibe una dieta basada en frutas y hortalizas. Probablemente, este factor influyó en la calidad seminal indeseable, sin embargo, esta hipótesis debería ser contrastada.

La integridad morfológica es un factor que determina la integridad y funcionalidad de los testículos y epidídimos así como la espermatogénesis (Pukazhenthí et al., 2011). Guevara, (2018) al evaluar el semen fresco del tapir amazónico obtenido mediante electroeyaculación se pudo observar en el microscopio un porcentaje del 72% de espermatozoides normales y un 28% con anormalidades, pudiendo corroborar con nuestro espécimen ya que tuvo un promedio de un $68,1 \pm 6,23$ % de espermatozoides normales y un total de 31,9% de espermatozoides con anormalidades. Según López et al. (2011) indican que las anormalidades morfológicas observadas como gota citoplasmática distal en carneros se debe a factores como nutrición y época del año. En los eyaculados del tapir amazónico se encontró un porcentaje considerable de GCD (gota citoplasmática distal) siendo consistente con el estudio anteriormente citado. Otros autores indican que el tapir

amazónico no presenta época reproductiva, sin embargo en Bolivia se ha evidenciado parejas en el mes de octubre y noviembre pudiendo determinar su época reproductiva (Chalukian et al., 2009).

Las dimensiones de la cabeza del espermatozoide del tapir amazónico tienen como promedio de $6,6 \pm 0,77 \mu\text{m}$ y ancho de $2,7 \pm 0,27 \mu\text{m}$ similar a las dimensiones del espermatozoide equino que tiene 6-7 μm de longitud y 3-4 μm de ancho como lo describió (Pelález & Palacios, 2021). Otro trabajo realizado por (Casey et al., 1997) demuestran las dimensiones similares del espermatozoide del caballo con los del tapir; argumentando el parentesco evolutivo entre estas dos especies. Sin embargo, Casey et al. (1997) sugieren que pueden existir diferencias en las dimensiones de las cabezas de los espermatozoides entre caballos fértiles y subfértiles. Esto nos conduce a más trabajos en otros tapires donantes para evaluar tanto su calidad como morfometría espermática previo a la criopreservación.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Al final de esta investigación se concluye que:

- El registro ecográfico previo a la recolección de semen denotó la integridad del tejido testicular y epidídimos, así como de las glándulas sexuales masculinas.
- La técnica de TUMASG más 14 – 18 estimulaciones eléctrica sucesivas son adecuadas para conseguir eyaculados de semen de tapir amazónico con previa sedación.
- La calidad espermática de un Tapir Amazónico fue mala basada tanto en una baja o nula motilidad y viabilidad como en un alto porcentaje de anormalidades morfológicas, lo que sugiere que este material espermático no fue idóneo para la implementación de un banco criogénico
- La morfometría espermática equivalente a las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia constituyen, por primera vez, datos referenciales de esta especie.

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar más trabajos de recolección de semen mediante la técnica de TUMASG más estimulación eléctrica en otros individuos donantes de Tapir.

CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, I. (2018). Ecuador es uno de los refugios del tapir. Diario El Comercio. <https://www.elcomercio.com/tendencias/ambiente/tapir-andes-peligrodeextincion-conservacion-planetaeideas.html>
- Casey, P. ., Gravance, C. ., Davis, R. ., Chabot, D. ., & Liu, I. . (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, 47(2), 575–582.
- Cerna, M., Cardenas, S., Cruz, A., & Jácome, I. (2014). Colección de germoplasma de especies de la familia orchidaceae del cantón santiago de méndez - morona santiago, ecuador Compilation of orchidaceae family species germplasm in santiago de mendez, morona santiago, ecuador. *La Granja*, 20(2), 5–19.
- Chalukian, S. C., Bustos, S. De, Lizarraga, L., Varela, D., Paviolo, A., & Quse, V. (2009). Plan de acción para la conservación del tapir (*Tapirus terrestris*) en Argentina. January, 72. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22271.66721>
- Cuenca, K. (2019). “Aplicación de un programa de enriquecimiento ambiental y evaluación de la respuesta conductual del tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) cautivo en el bioparque orillas del zamora.” In Universidad Nacional De Loja.
- FAO. (2007). La situación de los recursos zoogeneticos mundiales para la alimentacion y la agricultura - Resumen. <http://www.fao.org/3/a-a1260s.pdf>
- FIA. (2011). Creación de un Banco de Recursos Genéticos Criopreservados. Ministerio de Agricultura. http://bibliotecadigital.fia.cl/bitstream/handle/20.500.11944/1970/78_Ficha_Banco_Genetico.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Galarza, D. A., Jara, D., Paredes, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., Perea, F., Muñoz-León, E., & Santiago-Moreno, J. (2022). BoviPure® density-gradient centrifugation procedure enhances the quality of fresh and cryopreserved dog epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 242, 107003.
- Galarza, D. A., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., Taboada, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2021). Cryobiology 103 (2021) 15–21 Available online 29 October 2021 0011-2240/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. Cryopreservation of dog epididymal spermatozoa by conventional freezing or ultra-rapid freezing with nonpermeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 103, 15–21.

- Galarza, López, S., Woelders, H., Blesbois, E., & Moreno. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Elsevier*, 192, 261–270.
- Guevara, E. S. (2018). Evaluación de la criopreservación de semen fresco para la conservación de germoplasma de Tapir Amazónico (*Tapirus terrestris*). In Tesis de la Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Hernández, S., Quse, V., Joares, A., Thoisy, B., Thijil, R., Blanco, P., & Lira, I. (2007). *Manual Veterinario De Campo Para Tapires*. Tapir Specialist Group.
- Imrat, P., Mahasawangkul, S., Thitaram, C., Suthanmapinanth, P., Kornkaewrat, K., Sombutputorn, P., Jansittiwate, S., Thongtip, N., Pinyopummin, A., Colebrander, B., Holt, W. ., & Stout, T. A. . (2014). Effect of alternate day collection on semen quality of Asian elephants (*Elephas maximus*) with poor initial fresh semen quality. *Animal Reproduction Science*, 147, 154–160.
- López, A., Regueiro, M., Castrillejo, A., & Pérez-Clariget, R. (2011). La época del año y el plano nutricional y su influencia sobre la morfología espermática en carneros Corriedale en pastoreo *. *Veterinaria*, 47(182), 15–21.
- MAE. (2017). Conservación de la Vida Silvestre. <https://www.ambiente.gob.ec/ministerio-del-ambiente-reconoce-a-personas-e-instituciones-que-trabajan-a-favor-de-la-conservacion-de-la-vida-silvestre/>
- Medina, V. M., Velasco, Y. M., & Cruz, P. E. (2006). Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad Genetic resource banks and their role in biodiversity conservation. *Revista ORINOQUIA*, 10(1), 71–77.
- Medina, Víctor M, Velasco, Y. M., & Cruz, P. E. (2005). Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18, 34–48. [file:///C:/Users/Cris/Desktop/REFER?NCIAS/Robles, Santamar?a, Casallas - Aspectos generales de la criopreservaci?n esperm?tica en peces tele?steos - 2005.pdf](file:///C:/Users/Cris/Desktop/REFER?NCIAS/Robles,Santamar?a,Casallas-Aspectos%20generales%20de%20la%20criopreservaci?n%20esperm?tica%20en%20peces%20tele?steos%20-2005.pdf)
- Mejía Gutierrez, J. E. (2017). Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo.
- Moncayo Picerno, S. A. (2016). Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación. In Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Moreno, J., & Galarza, D. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies

- domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos (Sperm cryopreservation in domestic and wild species: a review of recent advances). *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3, 18–38.
- Ortega, C. (2011). Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. In *Universidad de Extremadura* (Vol. 21).
- Peláez, G., & Palacios, P. (2021). Facultad de Ciencias Agropecuarias Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia “ Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos ” Tesis. Universidad de Cuenca.
- Pérez, L. (2020). Evaluación de dos curvas de congelación programables en la criopreservación de semen de ovino en el Centro Experimental Uyumbicho.
- Pukazhenthii, B. S., Togna, G. Della, Padilla, L., Smith, D., Sanchez, C., Pelican, K., & Sanjurjo, O. I. (2011). Ejaculate Traits and Sperm Cryopreservation in the Endangered Baird's Tapir (*Tapirus bairdii*). *Journal of Andrology*, 32(3), 260–270. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011833>
- Restrepo, G., Úsuga, A., & Rojano, B. (2013). Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen □ Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino Key words Resumen Palavras chave. 8(1), 115–127.
- Reyes, L. (2019). Características espermáticas del semen equino descongelado usando dos crioprotectores y su efecto según época del año en Baja California. *Universidad Autónoma de Baja California*.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Santacruz, L. J. (2012). Patrón de actividad de *Tapirus pinchaque* en distintos hábitats y fases lunares, en la hacienda San Antonio, flanco oriental del volcán Tungurahua, noviembre 2010 - mayo 2011. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/593/1/T-UCE-0010-122.pdf>
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M., López-Sebastián, A., Guerra, A., Ruiz, M., Mendoza, N., Luna, C., Cebrián-Pérez, J., & Hildebrandt,

- T. . (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology*, 79, 383–391.
- Tirira, D., Urgilés- Verdugo, C., Tapia, A., Cajas-Bermeo, C., Izurieta, X., & Zapata-Ríos, G. (2019). Brocket deer. In *Ecology and Conservation of Tropical Ungulates in Latin America* (pp. 217–271). https://doi.org/10.1007/978-3-030-28868-6_16
- Turner, R. M. . (2007). Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 278–284.
- Ungerfeld, R., López-Sebastián, A., Estes, M., Pradiee, J., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Labrador, B., & Santiago-Moreno, J. (2015). Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands in anesthetized mouflons (*Ovis musimon*) and Iberian ibexes (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 84, 1067–1074.
- Valverde, A., Barquero, V., & Carvajal, V. (2021). Applied biotechnology to the study of the boar semen motility. *Agronomy Mesoamerican*, 32(2), 662–680. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.40628>
- Villaverde, S. (2017). Obtención, almacenamiento y morfometría de espermatozoides aviares: aplicación para la caracterización y criopreservación de espermatozoides de especies silvestres. Universidad Complutense de Madrid.

UCUENCA

Anexo 2: Acercamiento al tapir donante (Julito)



Anexo 3: Sedación del tapir donante mediante dardo y evaluación clínica



Anexo 4: Ecografía de las glándulas accesorias y testículos



Anexo 5: Técnica TUMASG y electroyacuación



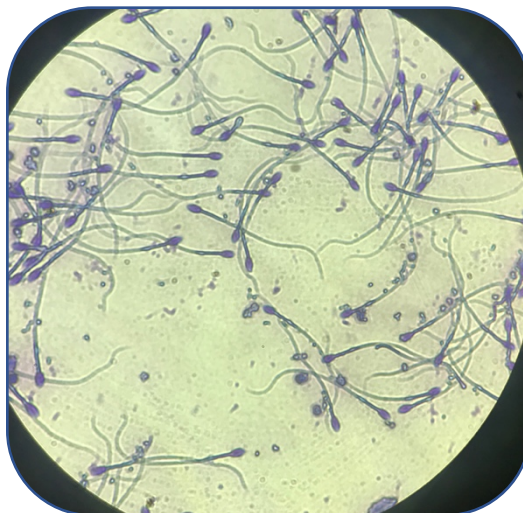
Anexo 6: Recolección de la muestra seminal



Anexo 7: Recuperación pos-sedación



Anexo 8: Evaluación microscópica de las muestras recolectadas



Anexo 9: Evaluación de los espermatozoides en el sistema CASA - SCA

