

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación morfométrica 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:

Álvaro David Vázquez Machado

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

Cuenca, Ecuador

2023-06-28

Resumen

Cierta evidencia sugiere que las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides podrían indicar su criosupervivencia. Los daños causados por los protocolos de criopreservación podrían ser evaluados según la variación de las dimensiones morfométricas de los espermatozoides de animales silvestres. Por ello, se evaluó las características morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides frescos y criopreservados de venado de cola blanca, mono chorongo y tapir amazónico almacenados en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca. Para este propósito las muestras espermáticas frescas, congeladas–descongeladas y vitrificadas–calentadas fueron fijadas, teñidas, montadas y evaluadas en el sistema ASMA-CASA. Se evaluó la longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad, elongación rugosidad y regularidad de la cabeza, así como la anchura y área de la pieza intermedia. La congelación no alteró ($P>0,05$) las dimensiones morfométricas de los espermatozoides de venado y del mono. Sin embargo, las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de venado se redujeron ($P<0,05$) y contrariamente, las dimensiones de cabeza de espermatozoides de mono incrementaron ($P<0,05$) post vitrificación con respecto a sus valores en fresco. El área de la cabeza de los espermatozoides de los animales silvestres fue: (en μm^2) venado ($29,8\pm0,77$ vs. $29,7\pm0,29$ y $20,7\pm0,17$ respectivamente), mono ($14,3\pm0,33$ vs. $14,8\pm0,25$ y $16,3\pm0,28$), y tapir ($17,7\pm0,25$). Concluyendo, el proceso de congelación no alteró las dimensiones de los espermatozoides de venado y mono, sin embargo, la vitrificación redujo la morfometría de la cabeza espermática de venado, e incrementó las dimensiones de la de los espermatozoides del mono chorongo.

Palabras clave: *Tapirus terrestris*, *Odocoileus virginianus*, *Lagothrix poeppiggi*, morfometría, espermatozoides



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Certain evidence suggests that the dimensions of sperm head could indicate their cryosurvival. Damage caused by cryopreservation protocols could be evaluated based on the variation in morphometric dimensions of sperm from wild animals. Therefore, we evaluated the morphometric characteristics of fresh and cryopreserved sperm, specifically the head and midpiece, from white-tailed deer, spider monkeys, and Amazonian tapirs stored in the cryogenic bank at the University of Cuenca. For this purpose, fresh, frozen-thawed, and vitrified-warmed sperm samples were fixed, stained, mounted, and evaluated using the ASMA-CASA system. We assessed the length, width, area, perimeter, ellipticity, elongation, roughness, and regularity of the sperm head, as well as the width and area of the midpiece. Freezing did not alter ($P>0.05$) the morphometric dimensions of deer and monkey sperm. However, the dimensions of deer sperm head decreased ($P<0.05$), while the dimensions of monkey sperm head increased ($P<0.05$) after vitrification compared to their fresh values. The head area of sperm from wild animals was as follows (in μm^2): deer (29.8 ± 0.77 vs. 29.7 ± 0.29 and 20.7 ± 0.17 , respectively), monkey (14.3 ± 0.33 vs. 14.8 ± 0.25 and 16.3 ± 0.28), and tapir (17.7 ± 0.25). In conclusion, the freezing process did not alter the dimensions of deer and monkey sperm, but vitrification reduced the morphometry of deer sperm head and increased the dimensions of spider monkey sperm head.

Keywords: *Tapirus terrestris*, *Odocoileus virginianus*, *Lagothrix poeppiggi*, morphometry, spermatozoa



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Capítulo 1: Introducción.....	10
1.2 Objetivos	14
1.2.1 Objetivo general	14
1.2.2 Objetivos específicos.....	14
1.3 Pregunta de investigación.....	14
Capítulo 2: Revisión de literatura	15
2.1 Antecedentes	15
2.2 Morfología del venado de cola blanca	15
2.2.1 Nutrición.....	16
2.2.2 Reproducción	16
2.2.3 Características del esperma de venado de cola blanca	16
2.3 Morfología del tapir amazónico	16
2.3.1 Alimentación.....	17
2.3.2 Reproducción	17
2.3.3 Características de los espermatozoides del tapir	17
2.4. Morfología del mono chorongo.....	17
2.4.1 Alimentación.....	18
2.4.2 Reproducción	18
2.5 Criopreservación espermática	18
2.5.1 Agentes crioprotectores	18
2.5.1.1 Tipos de Crioprotectores.....	19
2.5.1.1.1 Glicerol	19
2.5.1.1.2 Sacarosa	20
2.6. Sistema CASA	20
2.7. Morfometría de los espermatozoides	20
2.7.1 Efectos de la criopreservación sobre la morfometría de los espermatozoides	20

2.8 Anormalidades morfológicas	21
Capítulo 3: Materiales y métodos	22
3.1 Materiales	22
3.2 Área de estudio	23
3.3 Elaboración de diluyente y medios	23
3.4 Metodología	25
3.4.1 Determinación de especímenes de animales silvestres	25
3.4.2 Descongelamiento y/o calentamiento de muestras espermáticas	25
3.5 Análisis estadísticos	26
Capítulo 4: Resultados	27
Capítulo 5: Discusión	32
Conclusiones	36
Referencias	37
Anexos	42

Índice de figuras

Figura 1 Registro de los espermatozoides de venado de cola blanca teñidos con SpermBlue en el sistema CASA. A, espermatozoide teñido; B, medición de largo y ancho de la cabeza y largo de pieza intermedia; C, medición del área y perímetro de cabeza (azul) y área de pieza intermedia (verde); y D, marcaje de acrosoma.	27
Figura 2 Registro de espermatozoides de mono chorongo teñidos con SpermBlue en el sistema CASA. A, espermatozoide teñido; B, medición de largo y ancho de la cabeza y largo de pieza intermedia; C, medición del área y perímetro de cabeza (azul) y área de pieza intermedia (verde); y D, marcaje de acrosoma.	29
Figura 3 Registro de los espermatozoides de tapir teñidos con SpermBlue en el sistema CASA. A, espermatozoide teñido; B, medición de largo y ancho de la cabeza y largo de pieza intermedia; C, medición del área y perímetro de cabeza (azul) y área de pieza intermedia (verde); y D, marcaje de acrosoma.	31

Índice de tablas

Tabla 1 Diluyente base TCG-YH.....	24
Tabla 2 Diluyentes para congelación y vitrificación.....	24
Tabla 3 Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides de venado de cola blanca frescos y criopreservados.....	28
Tabla 4 Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides de mono chorongo frescos y criopreservados.....	30
Tabla 5 Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides frescos de tapir	31

Agradecimientos

"Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis familiares, quienes han sido mi pilar durante todo el proceso de elaboración de esta tesis. Su apoyo y sus palabras de aliento han sido fundamentales para llegar hasta este punto. Gracias por creer en mí y por brindarme su amor y comprensión en todo momento. También deseo agradecer a mis profesores, quienes me han guiado y orientado en el camino hacia la excelencia académica. Gracias por sus enseñanzas, por sus críticas constructivas y por su dedicación en la formación de nuevos profesionales. De manera especial al Dr. Andrés Galarza por su incondicional apoyo en la elaboración de esta tesis, sin él no habría sido posible. Al Dr. Gustavo Mora por su apoyo, su enseñanza y su guía en este camino que ahora compartimos. A todo el personal técnico docente del laboratorio de Biotecnología de Irquis por sus valiosas enseñanzas, su paciencia para enseñar y el tiempo que se tomaron para ayudarme en este proceso. Al zoológico Yurak-Allpa por permitirnos obtener las muestras sin las cuales no sería posible esta tesis. Por último, quiero agradecer a mis amigos, quienes han estado a mi lado en los momentos buenos y en los difíciles, a Jessica y Esperanza quienes fueron un apoyo sin parangón en la parte práctica de este proyecto. Gracias por su amistad, por su compañía y por sus risas, que me han ayudado a mantener el equilibrio y la motivación en todo momento. Sin su apoyo, esta tesis no habría sido posible. ¡Gracias a todos!"

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis padres Nicandro y Martha quienes supieron formarme con rectitud y me enseñaron el valor del esfuerzo y la perseverancia brindándome todo su apoyo en este largo viaje.

A todos aquellos que son el motivo de mi vocación y que estuvieron presentes a lo largo de mi trayectoria estudiantil.

A Sofia, quien supo acompañarme en la mayor parte de este proceso, te extraño.

Al Dr. Jordan Peterson quien fue una luz para el proceder ético de mi vida.

Capítulo 1: Introducción

Las estrategias de conservación de animales silvestres en el Ecuador han sido desarrolladas *in situ* en diferentes parques nacionales (Parque Nacional Galápagos, Parque Nacional Yasuní, Parque Nacional Cajas), zonas protegidas y en cautiverio ya sea en refugios y/o zoológicos (Reserva ecológica Antisana, Centro de rescate amazónico AmaZOOnico, Zoológico Centro de Rescate Yanacocha, Fundación Zoológica del Ecuador, Zoorefugio Chimborazo, Refugio de Vida Silvestre Paschoa, Zoológico Yurak Allpa, Zoológico Amaru). 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 silvestres amenazadas en diferentes hábitats, ya sea natural o en cautiverio, su alcance sobre la gestión de recursos genéticos para estrategias de conservación *ex situ* es relativamente limitada (Tirira et al., 2018). Además, las subpoblaciones de mamíferos silvestres en el Ecuador se han reducido notablemente (hasta un 33%) debido a actividades antropogénicas como la destrucción del hábitat, la caza excesiva o la competencia con los herbívoros introducidos (Cisneros & Andreuw, 2011; Holt, 1999). Entre las especies en peligro están el tapir amazónico (*Tapirus terrestris*), venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y el mono chorongo (*Lagothrix poeppigii*); estas especies son vulnerables por la pérdida de su hábitat, debido a la tala de árboles y el tráfico ilegal de animales, entre otras (Álvarez et al., 2018). Además, el desconocimiento de la tasa reproductiva y su largo periodo de gestación, los vuelve susceptibles a una vía de extinción. De hecho, según el “Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador” (Tirira, 2011b; Vallejo & Burneo, 2020), el tapir amazónico y el mono chorongo se encuentran en peligro de extinción, mientras que el venado de cola blanca se encuentra en amenaza latente categorizada como “Casi Amenazada”. Por otro lado, el venado de cola blanca Peruano si está categorizado como “En peligro” (Tirira, 2011; Vallejo & Burneo, 2020).

La preservación de material genético junto con la aplicación de biotecnologías reproductivas resulta ser muy útil para conservar especies silvestres categorizadas en amenaza latente de extinción. Se han desarrollado nuevas estrategias de conservación *ex situ*, destinadas a establecer una población viable mediante la criopreservación de recursos genéticos animales (Ej. gametos, embriones y otras muestras de células-tejidos o ADN) (Andrabi & Maxwell, 2007). En el Ecuador, no se dispone de protocolos o estrategias de conservación del material genético como espermatozoides, óvulos y/o embriones, para su gestión de especies silvestres amenazadas en vías de extinción.

La normativa que rige en el Ecuador con respecto al uso de material genético de animales (silvestres) está preceptuada por la “*Normativa Andina sobre Biotecnología*” la cual es obligatoria para los países que conforman la comunidad Andina. En el Ecuador existe la “*Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre*” que según los *Artículos 73 y 74* indican que el Ministerio del Ambiente (MAE) es la entidad que establecerá estaciones de investigación y conservación de recursos zoogenéticos (Asamblea Nacional del Ecuador, 2004; Peña, 2005). 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* mediante refugios o zoológicos, o *in vitro* mediante la conservación biológica y/o criogénica (Ej. banco criogénicos de espermatozoides, óvulos o embriones) (FAO, 2007). Por ejemplo, en Chile se implementó un programa de biotecnología mediante la creación de un banco de recursos genéticos criopreservado que permite la conservación gametas (espermatozoides) de especies silvestres consideradas como “bajo amenaza”, incluyendo rumiantes silvestres (Huemul, *Hippocamelus bisulcus*) (FIA, 2011)

Los programas de conservación *in situ* y *ex situ* para algunas especies de mamíferos en peligro de extinción pueden beneficiarse de las biotecnologías reproductivas modernas o de las técnicas de reproducción asistida (TRA) que incluyen la inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (ET), fecundación *in vitro* (FIV), micromanipulación de gametos-embiones, y banco de recursos genéticos. La criopreservación de espermatozoides junto con la IA son las TRAs que más se usan en programas de conservación de venado de cola blanca, según lo reportado por Asher et al. (2000) y Magyar et al. (1989). 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 de biotecnologías reproductivas. Sin embargo, para poder aplicar eficientemente las TRAs, se necesita entender la biología básica de los espermatozoides y su respuesta a los procesos criogénicos, así como las criolesiones celulares provocadas por los procesos de congelación y/o vitrificación (Comizzoli, 2015).

A más de las características cinéticas, biológicas y funcionales de los espermatozoides, es necesario valorar otros parámetros que influyen directamente en la eficacia de los protocolos de criopreservación. La evaluación de las dimensiones morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides es una valoración importante para evaluar la eficacia de los protocolos de criopreservación (coloca una cita que respalde este párrafo). La reducción o aumento de las medidas (área) de la cabeza después de la criopreservación sugiere que el protocolo afecta notablemente a las células causando un estrés osmótico, deshidratación-rehidratación extrema, condensación de la cromatina y daño de ADN (O’Brien et al., 2019;

Watson, 2000). El protocolo de criopreservación óptimo es aquel que después de la criopreservación mantienen las medidas morfométricas de la cabeza dentro de las medidas de estos antes de la criopreservación (Esteso et al., 2006).

Existen investigaciones precursoras en otras especies de mamíferos silvestres como aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*), cabra montés ibérico (*Capra pyrenaica*), rebeco (*Rupicapra pyrenaica*), bisonte europeo (*Bison bonasus*), muflón (*Ovis musimon*), gacela dama (*Gazella dama*), gacela dorcas saharaui (*Gazella dorcas negligencia*), sitatunga (*Tragelaphus spekii*), 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*); todas ellas incluidas en “categoría de especies en lista Roja” (O'brien et al., 2019). En este reporte se detalla la morfometría de la cabeza de espermatozoides de estas especies silvestres sometidas a la congelación convencional y ultrarrápida (o vitrificación) usando de 100 a 250 mM de sacarosa. Allí se evidencia la diferencia del tamaño (largo, ancho, área y longitud) de la cabeza de los espermatozoides antes y después de la criopreservación en cada método.

En cuanto al Tapir amazónico, conocido también como Danta, existe dos reportes precursores realizados en Ecuador. En el primero, Guevara, (2018) reportó resultados de motilidad y viabilidad espermática después del proceso de congelación convencional usando vapores de nitrógeno líquido (NL_2); los resultados fueron poco alentadores. En segundo reporte realizado por la Universidad de Cuenca, Piña (2022) obtuvo tres eyaculados de semen de un Tapir amazónico de 10 años de edad, sin embargo, no se logró congelar debido a que las muestras fueron asthenozoopérmicas. En este constituyó se evaluó las dimensiones morfométricas de la cabeza y constituyó el primer reporte en el tapir. Por otro lado, hasta donde se conoce, no existen evidencia sobre la cinética, morfometría o criopreservación espermática de mono chorongo.

Esta investigación constituye un punto inicial en la criopreservación de espermatozoides de venado de cola blanca, tapir amazónico y mono chorongo mediante la implementación un banco germoplasma. Además, proporciona datos biológicos de las medidas de la cabeza de los espermatozoides que demuestran los efectos de la criopreservación. Finalmente, esta investigación aporta información base para la aplicación de biotecnologías reproductivas con la finalidad de aportar en la conservación *ex situ* de especies silvestres mantenidas de

cautiverio, como ya ha sido desarrollado en otros lugares (Estrella et al., 2005; Beracochea, 2014).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar las características morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides criopreservados de las diferentes especies silvestres almacenados en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides de muestras frescas disponibles en el laboratorio de Biotecnología de todas las especies silvestres registradas
- Evaluar las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides post-descongelación y/o post-vitrificación de todas las especies silvestres almacenadas en el banco criogénico.

1.3 Pregunta de investigación

¿Las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de los animales silvestres descongelados en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca varían según las muestras frescas, congeladas – descongeladas y vitrificadas – calentadas?

Capítulo 2: Revisión de literatura

2.1 Antecedentes

El estudio del esperma del venado de cola blanca a nivel internacional determina que las muestras tomadas de la cola del epidídimo, los resultados fueron bajos en términos de motilidad, volumen y concentración de espermatozoides (Velazquéz, 2011). Sin embargo, estos resultados son suficientes en calidad para preservar los espermatozoides y usarlos en una IA. Gregorio, (2018) evaluó directamente la morfometría del *O. virginianus peruvianus* y reportó las siguientes dimensiones morfométricas de la cabeza espermática, largo $7,7 \pm 0,50$ μm ; área: $25,5 \pm 2,05 \mu\text{m}^2$; ancho: $3,9 \pm 0,21 \mu\text{m}$; y perímetro: $22,0 \pm 1,60 \mu\text{m}$.

Asimismo, otras características morfométricas que determinan la forma de la cabeza de los espermatozoides fueron evaluadas: elipticidad $2,0 \pm 0,14$; rugosidad $0,7 \pm 0,07$; elongación $0,3 \pm 0,03$ y regularidad $0,9 \pm 0,04$ (Gregorio, 2018). Las características macroscópicas y microscópicas del volumen seminal fueron de color rosa pálido, con un volumen seminal de $2,5\text{ml}$ y un pH de $5,85$ además tuvo un 1.65% de espermatozoides motiles, a una concentración espermática de $54,3 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

Acerca del tapir amazónico no existen estudios que concluyan específicamente la morfología de los espermatozoides, sin embargo Tipkantha et al., (2011) al evaluar los eyaculados del tapir malayo (*Tapirus Indicus*) obtienen como resultado que en la mayoría de estos existía un alto porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales (92%) y solo un $6,7 \pm 2,6\%$ morfológicamente normales. El porcentaje de membrana acrosomal intacta fue del $39,2 \pm 8,5\%$. La media de defectos morfológicos primarios y secundarios en semen fresco fue del 42 % al 52 %, respectivamente. El eyaculado también contenía una gran cantidad de acrosomas anormales ($51,7 \pm 22,5\%$).

2.2 Morfología del venado de cola blanca

El venado de cola blanca es un ciervo de tamaño mediano que se caracteriza por un cuello largo y relativamente grueso, patas largas, hocico largo y orejas grandes. La parte superior es de color marrón claro a marrón grisáceo en verano y grisácea o pardusca en invierno. El pelaje es blanco en el vientre, parte inferior de la cola y en el cuello, y tiene rayas alrededor de la nariz y los ojos. El pelaje de invierno se caracteriza por un pelaje más tosco, tubular y rígido. Los jóvenes tienen manchas blancas (moteadas). Cuernos en la coronilla, a la altura de las orejas, con la rama principal curvándose hacia adelante y encerrando cinco puntas longitudinales. Existe una gran variación entre las diferentes subespecies de este ciervo, especialmente en cuanto al tamaño (Álvares & Medellín, 2005).

2.2.1 Nutrición

La dieta del venado de cola blanca depende, en gran medida, de su distribución, por lo que puede adaptarse fácilmente a los diversos recursos que dispone. Se alimentan principalmente de pastos los cuales consumen por su alto contenido de fibra útil para la rumia, verduras, hierbas, enredaderas, suculentas, plantas acuáticas, hongos, nueces, líquenes, y roen las hojas y ramas delicadas de los arbustos (Rojo et al., 2014).

2.2.2 Reproducción

En algunas partes de América del Sur, la reproducción puede tener lugar durante todo el año, con picos de apareamiento entre febrero a mayo y julio a noviembre. En Canadá y Estados Unidos, el apareamiento ocurre de octubre a enero y los nacimientos de abril a septiembre. Las hembras se caracterizan por ser poliestrictas estacionales, el ciclo estral dura unos 28 días y el período estral dura 24 horas. Tienen un periodo de gestación de 195 a 212 días y tendrán de manera general una cría en la primera camada y dos las próximas con un máximo de hasta cuatro crías por camada (Álvarez-Romero et al., 2008).

2.2.3 Características del esperma de venado de cola blanca

Los espermatozoides tendrán diferencias entre si dependiendo del lugar donde se encuentren, ya sea en la cola del epidídimo o en el eyaculado (Velazquéz, 2011). Así, los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo son más lentos y con una baja cinética, y tienen una baja tensión de oxígeno y una osmolaridad de 286-290 a 300 mmol/kg (Velazquéz, 2011).

Cuando los espermatozoides salen de la cola del epidídimo, están morfológicamente completo, aunque algunos poseen gotas citoplasmáticas, sin embargo, no son capaces de fecundar ovocitos debido a su baja motilidad. Además, estos espermatozoides sufren cambios entre los cuales los más significativos son la condensación de la cromatina y la absorción de proteínas en la zona de unión entre el espermatozoide y la superficie de estabilización de los factores (Holt, 2000).

2.3 Morfología del tapir amazónico

Los taurinos son grandes y fuertes, con un peso de hasta 250 kg. La longitud del cuerpo desde la cabeza hasta la cola varía de 200 a 220 cm, y la altura a la cruz de 70 a 110 cm. Su piel es muy gruesa y resistente. Su pelaje es corto y de color pardo, aunque con mucha variabilidad, que va desde bayos a casi negros; incluso se conocen casos de individuos albinos. La espalda, cabeza y extremidades suelen ser más oscuras, con pelo blanco en las mandíbulas,

como "pelo plateado". Los lóbulos de las orejas también tienen manchas blancas (Chalukian et al., 2009).

2.3.1 Alimentación

La investigación en Ecuador muestra que los taurinos comen una variedad de plantas, incluidos pastos, hojas, ramitas, brotes, semillas y frutos caídos. Los registros de la cría en semicáutiverio en bosques secundarios registran el consumo de más de 100 especies de plantas de más de 20 familias además las sales minerales son un componente importante de la dieta del tapir, pues contribuyen a la compensación bioquímica de este mamífero que, por su carácter monogástrico, se ve privado con frecuencia de la energía que debe ser compensada con alimentos y sales minerales (Tirira et al., 2019).

2.3.2 Reproducción

No tienen una época reproductiva específica, sin embargo, los datos indican que la época de apareamiento sucede entre los meses de diciembre a enero. Las hembras tienen un ciclo estral de 50 a 80 días. Durante el celo, machos y hembras no pasan demasiado tiempo juntos. El apareamiento tiene lugar dentro o fuera del agua, precedido de un ruidoso cortejo, el macho se coloca al lado de la hembra para que cada uno pueda oler los genitales del otro, y en esta posición comienza a darse la vuelta, tratando de morder la extremidad trasera. La gestación dura de 13 a 14 meses. Suelen tener una cría, aunque a veces salen dos o más crías. (Jerez, 2002).

2.3.3 Características de los espermatozoides del tapir

Se constituye eyaculados de mala calidad a menudo cuando el volumen es pequeño y con baja concentración de espermatozoides y de baja motilidad. Su eyaculación es de color blanco lechoso. La osmolaridad del semen oscila entre 203 y 413 mOsm/kg, con una media de unos 284 mOsm/kg, y un pH ligeramente básico ($7,4 \pm 0,1$; rango 6,5-8,5). Eyaculan un volumen de 20,4 ml a una concentración de $101,2 \times 10^6$ espermatozoides/ml, el porcentaje de motilidad de 46,1 % con un grado de progresión 2,9 (de la escala de 1 – 5), y normalidad morfológica de 6,9 % (Tipkantha et al., 2011).

2.4. Morfología del mono chorongo

El mono chorongo (*Lagothrix lagotricha*) o mono lanudo, pertenece a la familia de los Atelíidos, su tamaño puede alcanzar 46 a 65 cm y su cola mide 53-80 cm su peso puede ir de 3,5 a 10 kg, ambos sexos poseen colmillos, siendo los machos quienes tienen los colmillos más grandes su cola es considerada como una quinta extremidad, debido a que es muy fuerte y les ayuda a sujetarse de las ramas, su pelaje suele ser marrón rojizo o gris (Chiriboga, 2009).

2.4.1 Alimentación

Se alimenta principalmente de frutos maduros y frescos (alrededor del 79 %), especialmente de pulpa y frutos de palma, que se comen enteros, también complementa su dieta con hojas tiernas, algunos artrópodos, semillas, corteza y flores (Tirira et al., 2018).

2.4.2 Reproducción

El principal sistema de apareamiento que se observa en esta especie es la poligamia, en la que las hembras se aparean con cualquier macho de la manada, aunque a menudo se ofrecen al macho dominante el cual mantiene su dominio mediante frecuentes demostraciones de fuerza. Las hembras alcanzan la edad reproductiva a los 6 años de edad (Chiriboga, 2009).

2.5 Criopreservación espermática

La criopreservación espermática es una técnica de preservación que usa temperaturas extremadamente bajas durante el almacenamiento a corto o a largo plazo. Para lograr una criopreservación exitosa se debe tener en cuenta varios aspectos condicionantes de una muestra espermática tales como buena calidad espermática inicial, buena motilidad y vitalidad. Por otro lado, el mismo proceso de criopreservación es deletéreo para los espermatozoides y provoca criolesiones celulares que suponen una reducción de su calidad espermática y capacidad fecundante. Es por ello, que en los medios de congelación se usan agentes crioprotectores (penetrantes y no penetrantes) y aditivos que protegen a la célula durante el rango de temperatura crítico (-5°C a -50°C) (Watson, 2000). Los diluyentes de congelación criogénicos están diseñados para proteger los espermatozoides del daño causado por el enfriamiento, la congelación y descongelación (Yoshida, 2000).

2.5.1 Agentes crioprotectores

Los agentes crioprotectores tienen la finalidad de proteger las propiedades de la membrana celular y equilibrar la fase acuosa intracelular disminuyendo el estrés osmótico. La presencia de crioprotectores penetrantes (Ej. glicerol) pueden regular la deshidratación espermática que puede ser moderada o excesiva, dependiendo de otros factores como la osmolaridad del medio, temperatura, exposición y velocidades de enfriamiento. Finalmente, los crioprotectores previenen el colapso de la membrana celular previniendo la formación de cristales de hielo intracelular letales para la célula (Saragusty et al., 2006).

2.5.1.1 Tipos de Crioprotectores

Se los divide en agentes crioprotectores permeables (ACP) y no permeables (ACNP). Los ACP son generalmente pequeñas moléculas no iónicas permeables a la membrana celular. Los ACP más utilizados son el glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO), aunque existen otros como el etilenglicol y las amidas (dimetilformamida o dimetilacetamida). Los ACNP se pueden dividir en moléculas osmóticamente activas como disacáridos (sacarosa, trehalosa), trisacáridos (rafinosa) y compuestos osmóticamente inactivos que incluyen polisacáridos (hidroxil etileno almidón, maltodextrina) y proteínas (albúmina, polivinilpirrolidona) (Sieme et al., 2016).

Los crioprotectores no permeables son compuestos de elevado peso molecular que demuestran su eficacia cuando se lleva a cabo una congelación a alta velocidad. Se destacan por su capacidad de protección al facilitar una deshidratación celular rápida. Es común emplearlos en conjunto con agentes permeables para lograr su acción protectora de manera óptima (Rivero Gonzalez, 2016).

2.5.1.1.1 Glicerol

El glicerol se considera el crioprotector más efectivo para los espermatozoides de la gran mayoría de las especies de mamíferos. Sin embargo, la sensibilidad a este crioprotector varía mucho entre especies. El glicerol penetra en el citoplasma, donde probablemente afecta su viscosidad se sabe que esta viscosidad citoplasmática difiere de una manera específica de especie, lo que quizás explique las diferencias observadas en la tolerancia al glicerol (O'Brien et al., 2019; Prieto et al., 2014).

El glicerol (GLY) es el principal agente crioprotector penetrante utilizado para congelar esperma de diferentes mamíferos, pero muchos de sus efectos aún no están claros. Los primeros estudios informaron que el glicerol reduce la calidad del semen fresco y congelado en algunas especies. También se ha informado que es nocivo cuando se agrega a diluyentes a más de 30 °C, así como en concentraciones superiores al 6% o inferiores al 2% (no brinda crioprotección) (Colas, 1975). Ciertamente, las altas concentraciones de glicerol tienen un efecto negativo sobre la integridad de la membrana espermática (Yotov, 2015). Además, GLY es osmóticamente activo, cambiando el contenido de agua de los espermatozoides (Sztein et al., 2001); cualquier estrés osmótico inducido podría reducir la longevidad de los espermatozoides y acelerar su capacitación. La mayoría de trabajos en criopreservación de espermatozoides de mamíferos incluyen al glicerol al medio de congelación al 5% (vol/vol).

2.5.1.1.2 Sacarosa

La sacarosa actúa como un crioprotector no penetrante al promover la deshidratación celular durante el proceso de congelación. Al reducir la formación de cristales de hielo y mantener la integridad estructural de las células, la sacarosa ayuda a preservar la viabilidad y la funcionalidad de los tejidos biológicos durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Rumsey et al., 1992).

2.6. Sistema CASA

El sistema CASA (*Computer Asisted Sperm Analysis*) es un sistema automático, objetivo y estandarizado, para la evaluación de los parámetros seminales más importantes a saber: concentración, motilidad, morfología y vitalidad espermática dentro de la evaluación morfometría permite la evaluación exhaustiva de la morfología y las dimensiones de los espermatozoides usa criterios muy estrictos diferenciando dentro de las anomalías, las de cabeza, cuello y cola respectivamente, permitiéndonos tener datos muy precisos para tener en cuenta a la hora de la evaluación del semen (Monserrat, 2016).

2.7. Morfometría de los espermatozoides

Los animales silvestres tienen muchas características de esperma específicas de la especie. Por ejemplo, el volumen y la concentración del eyaculado varían mucho entre especies, además, dependiendo de la especie, el tamaño y la forma de los espermatozoides varían, posiblemente en respuesta a la competencia entre espermatozoides a factores ambientales (Prieto et al., 2014).

Un espermatozoide normal en diferentes especies animales suele tener una apariencia simétrica con una cabeza oval de contorno regular y que al teñirlo se observan zonas bien definidas las cuales son: zona acrosómica que cubre más de la tercera parte de la cabeza y la sub acrosómica que cubre el resto de la cabeza, le sigue la pieza intermedia que es recta y de contorno regular. Se halla alineada con el eje longitudinal de la cabeza y finalmente la cola que es única, delgada, no enrollada y de contorno irregular (Avalos Rodriguez et al., 2013).

2.7.1 Efectos de la criopreservación sobre la morfometría de los espermatozoides

Se ha demostrado que una disminución del número de espermatozoides morfológicamente normales en los eyaculados, conduce a una disminución de la fertilidad, entre estos cambios, el procedimiento de congelación y descongelación provocó una reducción en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de las muestras criopreservadas, esto probablemente debido a la condensación excesiva de la cromatina espermática. La motilidad, la morfología

y el acrosoma de los espermatozoides también disminuyeron después de la criopreservación (Hidalgo et al., 2007).

2.8 Anormalidades morfológicas

Para realizar la evaluación de la morfología espermática, Avalos Rodriguez et al., (2013) proponen el siguiente criterio: clasificándolas en dos: las primarias cuando son anomalías producidas en el testículo, y secundarias cuando se dan durante el tránsito a través del sistema ductal o cuando se producen como consecuencia de errores de manejo del semen a partir del momento de obtenerlo.

Anormalidades primarias

Acrosoma: desprendido, rugoso, pequeño.

Tamaño de cabeza: microcefalia, macrocefalia.

Cabeza desprendida.

Doble cabeza.

Anormalidades secundarias

Espermatozoides con gota citoplasmática proximal.

Espermatozoides con gota citoplasmática distal.

Espermatozoide con cola enrollada.

Capítulo 3: Materiales y métodos

3.1 Materiales

Materiales físicos

- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Jeringuillas de 1 mL
- Hojas de bisturí N° 15
- Equipo de disección
- Pajuelas de 0,25 mL
- Fundas Ziploc
- Caja poliestireno

Materiales biológicos

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

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®)
- Microcentrífuga para tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Incubadora Memmert
- Filtro de jeringa de 0,45 μ m (Minisart® NML 16555, Sartorius, Alemania).
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast)
- Tanque criogénico
- Refrigerador
- Porta objetos y cubre objetos (cortos y largos)
- Baño María
- Guantes de nitrilo
- Tubos falcón de 15 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL

Reactivos

- Tris (Sigma, 252859)

- Ácido cítrico (Sigma, C0759)
- Glucosa (Sigma, G5146)
- Penicilina G-sodium salt (Sigma, P3032)
- Streptomycin sulfate salt (Sigma, S9137)
- Glicerol (Sigma G9012),
- Sacarosa (Sigma, S1888)
- SpermBlue stain (Microptic S.L., Barcelona, España)

3.2 Área de estudio

El análisis de la morfometría espermática de muestras frescas y criopreservadas existentes en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, ubicado en la parroquia Victoria del Portete del cantón Cuenca ($3^{\circ} 04' 48.1''$ S; $79^{\circ} 04' 31.0''$ W). Además, en este lugar se realizó el análisis de muestras frescas y criopreservadas provenientes de animales silvestres que llegaron al laboratorio durante el período de la investigación (Desde septiembre hasta noviembre) para preservarlos y almacenarlos en el banco criogénico.

3.3 Elaboración de diluyente y medios

El diluyente base que se usó para la evaluación de las características cinemáticas fue TCG-YH (Tris, ácido cítrico y glucosa suplementado con el 6% de yema de huevo [vol/vol]). Las muestras criopreservadas mediante congelación se usó el glicerol al 5% (vol/vol) como agente crioprotector penetrante; mientras que las muestras criopreservadas por vitrificación se usó 100 mM de sacarosa (p/vol) como agente crioprotector no penetrante. Los diluyentes usados en esta investigación se detallan las siguientes tablas:

Tabla 1 Diluyente base TCG-YH

Reactivos	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
Yema de huevo inactivada a 56º por 30 min.	19,14 ml

pH: 6,8. Osmolaridad: 345 mOsmol/kg

Tabla 2 Diluyentes para congelación y vitrificación**TCG-YH-Gly (para congelación)**

Reactivos	Cantidad
TCG-YH	95 ml
Glicerol 5%	5 ml

TCG-YH-Sucrosa (para vitrificación)

Reactivos	Cantidad
TCG-YH	100 ml
Sacarosa	100 mM

3.4 Metodología

3.4.1 Determinación de especímenes de animales silvestres

La evaluación de las dimensiones morfométricas de la cabeza fue realizada en el Módulo ASMA (*Automated Sperm Morphometry Analysis*) del sistema CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, V6.0 software, Microptic S.I., Barcelona, Spain). Se evaluó la morfometría espermática de las muestras frescas registradas en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal y las muestras criopreservadas de las diferentes especies silvestres existentes en el tanque criogénico.

3.4.2 Descongelamiento y/o calentamiento de muestras espermáticas

Las muestras espermáticas epididimarias de animales silvestres fueron recuperadas mediante flujo retrógrado usando 1 mL de diluyente TCG-YH. Estas muestras frescas fueron previamente fijadas, teñidas, montadas y selladas para su análisis posterior de la morfometría. La criopreservación de muestras se hizo ajustando a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL. La congelación se realizó en vapores de nitrógeno líquido (NL₂) estático diluyendo las muestras con TCG-YH + 5% de glicerol (Galarza et al., 2019). La vitrificación se realizó en pellets de 30 µL sumergiendo directamente en NL₂ usando el diluyente TCG-YH + 100 mM de sacarosa. Estos dos procedimientos de criopreservación fueron realizados según lo detallado por O'Brien et al. (2019).

Las pajuelas congeladas de las diferentes especies silvestres se realizaron sumergiendo las pajuelas directamente en Baño María a 37 °C durante 30 segundos. Posteriormente, el contenido de las muestras fue recogido en un tubo eppendorf de 1,5 mL y mantenido a 37° C hasta el análisis de la morfometría espermática.

Las muestras vitrificadas en pellets de 30 µL fueron calentadas en un dispositivo de calentamiento STC-3008 (dispositivo no patentado) existente en el laboratorio. Este dispositivo atempera sus láminas de aluminio entre 63 a 65° C y al momento del calentamiento los pellets se dejaron caer en estas láminas y rápidamente se derritieron al contacto con el calor. El contenido de las muestras fue recogido en un vaso de precipitación 20 mL y, rápidamente, la muestra fue transferida a un tubo eppendorf de 1,5 mL atemperado a 22° C y centrifugado a 300 gravedades durante 5 minutos. El sobrenadante resultante de la centrifugación fue eliminado y remplazado por diluyente TCG-YH atemperado a 37° C hasta el análisis de su morfometría espermática.

3.4.3 Análisis de la morfometría espermática

La morfometría de la cabeza espermática que incluye largo, ancho, perímetro, área, elongación, elipticidad, rugosidad y regularidad; y de la pieza intermedia que incluye la longitud y el área, fueron evaluadas mediante el módulo ASMA del sistema CASA. Para este propósito se realizó un frotis de cada muestra fresca o criopreservada usando un portaobjetos y colocando 10 μ L de la muestra a analizar y realizar un frotis usando otro cubre objetos deslizando a un ángulo de 45°. Se dejó secar el frotis en la placa térmica a 37 °C. Se sumergió los frotis en la tinción SpermBlue® durante 15 minutos. Se secó durante 1 minuto, y luego se lavó sumergiendo 1 sola vez por 1 segundo en agua destilada. Se dejó secar nuevamente, y selló con medio de montaje y un cubreobjetos largo. Después de 1 día de secado, las muestras fueron evaluadas en el sistema CASA usando la luz azul, 40 X de magnificación y la fase A. Se analizó al menos 100 espermatozoides por muestra siguiendo los procedimientos detallados por Galarza et al. (2021).

3.5 Análisis estadísticos

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 están expresados en media \pm SEM (error estándar de la media). Los datos fueron analizados para la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, los datos que no cumplieron la normalidad fueron transformados a Arcoseno (porcentajes) o Log-10 (numéricos). El análisis estadístico incluyó una estadística descriptiva básica tabulada en una tabla de contingencia de doble entrada: tipo de espermatozoides (fresco, congelado-descongelada y vitrificado-calentado) y variables de morfometría (largo, anchura, área, perímetro, elongación, elipticidad, rugosidad y regularidad) y área de pieza intermedia por especie (Tapir amazónico, mono chorongo y venado de cola blanca). Las diferencias que existían entre muestras en el caso del tapir fueron muestras frescas, del venado fueron entre frescas, congeladas-descongeladas y vitrificadas-calentadas y del mono chorongo entre frescas, congeladas-descongeladas y vitrificadas-calentadas, fueron analizadas estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional junto con la prueba de comparación múltiple de Tukey. El nivel de significancia fue considerado usando el valor de $P < 0,05$.

Capítulo 4: Resultados

4.1. Venado de cola blanca

Un total de 12 muestras frescas (provenientes de 6 testículos, 3 pares), 12 muestras congeladas – descongeladas y 12 muestras vitrificadas - calentadas fueron usadas para evaluar las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de venado de cola blanca. Las variables morfométricas de espermatozoides teñidos con SpermBlue fueron registradas exitosamente por el módulo ASMA del sistema CASA. En la Figura 1 se muestran los espermatozoides teñidos y marcados por el sistema CASA; en la Tabla 3 se exponen las dimensiones morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de venado de cola blanca.

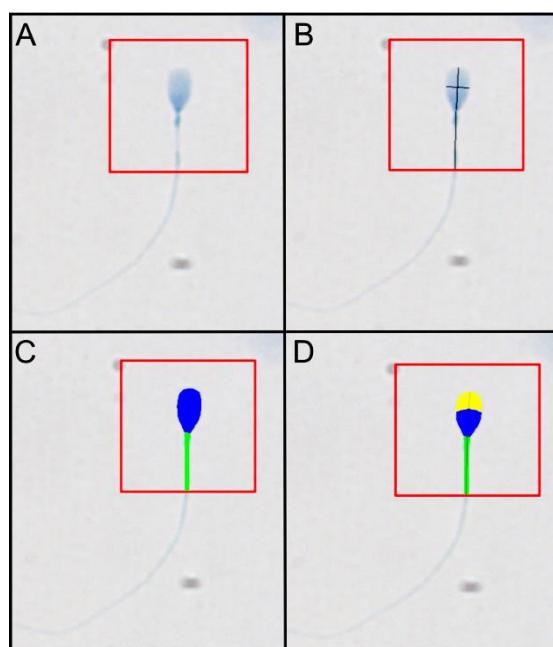


Figura 1 Registro de los espermatozoides de venado de cola blanca teñidos con SpermBlue en el sistema CASA. A, espermatozoide teñido; B, medición de largo y ancho de la cabeza y largo de pieza intermedia; C, medición del área y perímetro de cabeza (azul) y área de pieza intermedia (verde); y D, marcaje de acrosoma.

Fuente: El autor

Los resultados evidenciaron que después del proceso de vitrificación, la longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) en comparación con los valores de las muestras frescas y congeladas – descongeladas. No se evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) de la longitud, anchura y área de la cabeza entre muestras frescas y congeladas – descongeladas. Sin embargo, el perímetro incrementó significativamente ($P < 0,05$) después del proceso de congelación – descongelación.

La elipticidad y elongación fueron mayores ($P < 0,05$) en las muestras vitrificadas – calentadas que en muestras congeladas – descongeladas. La rugosidad disminuyó significativamente ($P < 0,05$) después de los procesos de congelación y vitrificación comparado con las muestras frescas. Finalmente, se evidenció un incremento significativo ($P < 0,05$) de la regularidad de la cabeza de espermatozoides después de un proceso de congelación – descongelación comparada con los valores frescos y vitrificados – calentados (Tabla 3).

Tabla 3 Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides de venado de cola blanca frescos y criopreservados.

Variable	Fresco (n = 12)	Congelado-descongelado (n = 12)	Vitrificado-calentado (n = 12)
Longitud (μm)	$7,26 \pm 0,10^{\text{a}}$	$7,35 \pm 0,04^{\text{a}}$	$6,24 \pm 0,05^{\text{b}}$
Anchura (μm)	$4,28 \pm 0,06^{\text{a}}$	$4,47 \pm 0,04^{\text{a}}$	$3,72 \pm 0,15^{\text{b}}$
Área (μm^2)	$29,75 \pm 0,77^{\text{a}}$	$29,65 \pm 0,29^{\text{a}}$	$20,74 \pm 0,17^{\text{b}}$
Perímetro (μm)	$16,63 \pm 0,20^{\text{b}}$	$17,73 \pm 0,13^{\text{a}}$	$14,72 \pm 0,13^{\text{c}}$
Elipticidad	$1,75 \pm 0,04^{\text{ab}}$	$1,66 \pm 0,02^{\text{b}}$	$1,82 \pm 0,02^{\text{a}}$
Elongación	$0,26 \pm 0,01^{\text{ab}}$	$0,24 \pm 0,00^{\text{b}}$	$0,28 \pm 0,01^{\text{a}}$
Rugosidad	$1,35 \pm 0,0^{\text{a}}$	$1,19 \pm 0,01^{\text{b}}$	$1,21 \pm 0,01^{\text{b}}$
Regularidad	$0,83 \pm 0,01^{\text{b}}$	$0,88 \pm 0,00^{\text{a}}$	$0,84 \pm 0,00^{\text{b}}$
Ancho PI	$0,93 \pm 0,04^{\text{b}}$	$1,03 \pm 0,03^{\text{a}}$	$1,02 \pm 0,03^{\text{a}}$
Área de PI	$10,95 \pm 1,28$	$8,03 \pm 0,85$	$9,92 \pm 1,27$

PI, pieza intermedia. Diferentes superíndices en cada fila y cada variable expresan diferencias significativas ^{a – b – c} $P < 0,05$; ^{a – c} $P < 0,01$.

4.2. Mono chorongo

Un total de 4 muestras frescas (provenientes de un par de testículos), 12 muestras congeladas – descongeladas y 12 muestras vitrificadas - calentadas fueron usadas para medir las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de mono chorongo. Las variables morfométricas de espermatozoides teñidos con SpermBlue fueron registradas exitosamente por el módulo ASMA del sistema CASA. En la Figura 2 se muestran los espermatozoides teñidos y marcados por el sistema CASA; en la Tabla 4 se exponen las dimensiones morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de mono.

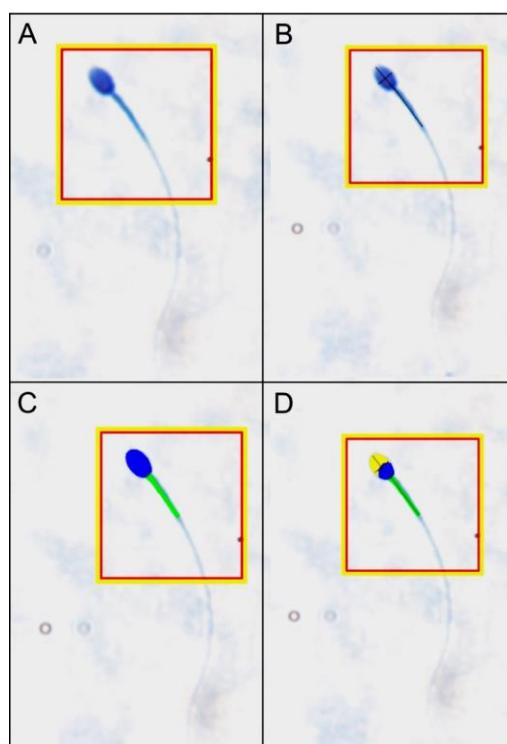


Figura 2 Registro de espermatozoides de mono chorongo teñidos con SpermBlue en el sistema CASA. A, espermatozoide teñido; B, medición de largo y ancho de la cabeza y largo de pieza intermedia; C, medición del área y perímetro de cabeza (azul) y área de pieza intermedia (verde); y D, marcaje de acrosoma.

Fuente: El autor.

Los resultados evidenciaron después del proceso de vitrificación, la longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza aumentaron significativamente ($P < 0,05$) en comparación con sus valores de las muestras frescas y congeladas – descongeladas. No se evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) de la longitud, anchura y área de la cabeza entre muestras frescas y congeladas – descongeladas.

La rugosidad de la cabeza fue menor ($P < 0,05$) en las muestras vitrificadas – calentadas que en muestras frescas y congeladas – descongeladas. Por otro lado, después de los procesos de vitrificación, la regularidad aumentó ($P < 0,05$) en comparación con las muestras frescas y congeladas – descongeladas (Tabla 3).

Tabla 4 Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides de mono chorongo frescos y criopreservados.

Variable	Fresco (n = 4)	Congelado-descongelado (n = 12)	Vitrificado-calentado (n = 12)
Longitud (μm)	4,98 ± 0,04 ^b	4,78 ± 0,05 ^b	5,14 ± 0,05 ^a
Anchura (μm)	2,87 ± 0,03 ^b	2,81 ± 0,03 ^b	2,98 ± 0,02 ^a
Área (μm ²)	14,32 ± 0,33 ^b	14,81 ± 0,25 ^b	16,3 ± 0,28 ^a
Perímetro (μm)	10,95 ± 0,13 ^b	10,99 ± 0,12 ^b	11,85 ± 0,12 ^a
Elipticidad	1,70 ± 0,01	1,71 ± 0,01	1,73 ± 0,01
Elongación	0,25 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,27 ± 0,00
Rugosidad	1,58 ± 0,01 ^a	1,55 ± 0,01 ^a	1,47 ± 0,01 ^b
Regularidad	0,74 ± 0,00 ^b	0,73 ± 0,00 ^b	0,76 ± 0,01 ^a
Ancho PI	1,1 ± 0,04	1,2 ± 0,04	1,09 ± 0,05
Área PI	5,94 ± 0,04	5,85 ± 0,30	6,96 ± 0,37

PI, pieza intermedia. Diferentes superíndices en cada fila y cada variable expresan diferencias significativas ^{a – b} $P < 0,05$.

4.3. Tapir

Un total de 12 muestras frescas provenientes de 3 eyaculados de semen de un tapir fueron usados para medir las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides y pieza intermedia. Las variables morfométricas de espermatozoides teñidos con SpermBlue fueron registradas exitosamente por el módulo ASMA del sistema CASA. En la Figura 3 se muestran los

espermatozoides teñidos y marcados por el sistema CASA; en la Tabla 3 se exponen las dimensiones morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides frescos de tapir. No se registró muestras valores morfométricos de muestras criopreservadas.

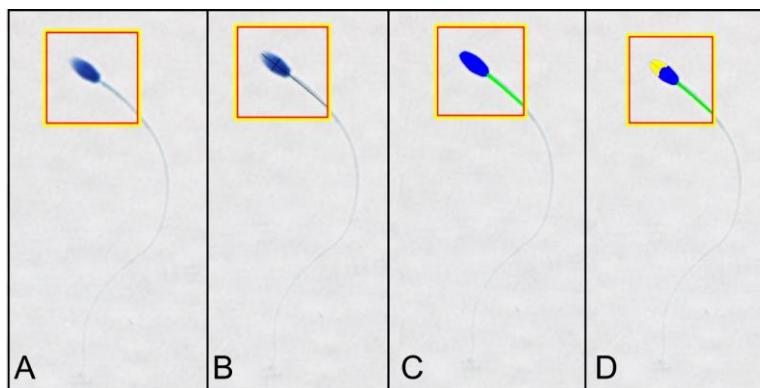


Figura 3 Registro de los espermatozoides de tapir teñidos con SpermBlue en el sistema CASA. A, espermatozoide teñido; B, medición de largo y ancho de la cabeza y largo de pieza intermedia; C, medición del área y perímetro de cabeza (azul) y área de pieza intermedia (verde); y D, marcaje de acrosoma.

Fuente: El autor

Tabla 5 Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides frescos de tapir

Variable	Fresco (n = 12)
Longitud (μm)	5,88 ± 0,05
Anchura (μm)	2,60 ± 0,03
Área (μm ²)	17,71 ± 0,25
Perímetro (μm)	12,66 ± 0,15
Elipticidad	2,32 ± 0,02
Elongación	0,39 ± 0,00
Rugosidad	1,43 ± 0,03
Regularidad	5,88 ± 0,01
Ancho PI	1,00 ± 0,02
Área PI	6,42 ± 0,41

Capítulo 5: Discusión

Los resultados de la presente investigación indican, *a priori*, que la tinción con SpermBlue® y la evaluación morfométrica con el módulo ASMA del sistema CASA fue exitosa al momento de valorar las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de venado de cola blanca, mono chorongo y tapir amazónico. Además, las dimensiones obtenidas de las muestras criopreservadas variaron de tamaño de acuerdo con el tipo de criopreservación comparado con las muestras frescas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el proceso de criopreservación (congelación o vitrificación) alteró las dimensiones del espermatozoide. De hecho, el proceso de vitrificación afectó significativamente la morfometría de los espermatozoides, reduciendo las dimensiones en los espermatozoides del venado de cola blanca, y aumentando en los espermatozoides del mono chorongo. Por el contrario, el método de congelación afectó mínimamente las dimensiones y la forma de la cabeza de los espermatozoides de estas dos especies (perímetro, rugosidad y regularidad). Cierta evidencia sugiere que las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides pueden ser un indicador de la criosupervivencia de los espermatozoides (Gravance et al., 1998). Estos resultados constituyen el primer reporte de morfometría espermática realizado en estas especies silvestres del Ecuador y servirá de base para optimizar los protocolos de congelación en la implementación de bancos criogénicos.

Se conoce que los procesos de congelación – descongelación y vitrificación – calentamiento provocan la ruptura de las membranas espermáticas y los microtúbulos influenciados por el estrés osmótico. El estrés osmótico determina cambios en las dimensiones morfométricas de la cabeza (O'brien et al., 2019). Además, se conoce que el tamaño y forma de la cabeza del espermatozoide pueden influir en su susceptibilidad al daño osmótico durante el proceso de congelación-descongelación (Watson, 2000), especialmente en poblaciones de espermatozoides más heterogéneas (Esteso et al., 2006).

Estudios previos han determinado que los espermatozoides criopreservados de ungulados domésticos y silvestres (Ej. chivo, muflón [*Ovis musimon*], gamo [*Dama dama*]; ciervo ibérico [*Cervus elaphus hispanicus*]) sufren una reducción del tamaño de la cabeza en comparación con los valores previos a la criopreservación (Bóveda et al., 2018; Esteso et al., 2006; Hidalgo et al., 2007). Se ha sugerido que la condensación excesiva de la cromatina, los espermatozoides con membrana plasmática y acrosoma dañados, así como la pérdida del acrosoma y el daño en el citoesqueleto celular podrían causar una reducción en el tamaño de la cabeza (Arruda et al., 2002; Gao et al., 2012; Santiago-Moreno et al., 2016). De hecho, recientemente se determinó mediante microscopía electrónica de barrido “Cryo-SEM” que las

variaciones en el área de la cabeza de los espermatozoides caninos dependían del procedimiento de criopreservación (congelación convencional o congelación ultrarrápida - vitrificación) (Cerdeira et al., 2020). Reportes previos realizados en espermatozoides de *Odocoileus virginianus* y *Cervus elaphus hispanicus* demostraron que las dimensiones de la cabeza varían o disminuyen después del proceso de la congelación – descongelación en comparación con las muestras frescas (Hernández-Corredor et al., 2018; Soler et al., 2005; Esteso et al., 2006). Hay que tener en cuenta que el tamaño de la cabeza de los espermatozoides juega un papel importante en la competencia espermáticas y su longitud está relacionada con la velocidad de los espermatozoides según lo demostrado por Tourmente et al. (2011). La cola del espermatozoide produce una mayor velocidad y proporciona un impulso de energía para llegar al oviducto, por lo tanto, hay una correlación entre la morfometría y la velocidad (Hafez & Hafez, 2004).

Los resultados de la presente investigación son矛盾oriantemente a los trabajos antes mencionados, y eficazmente no redujeron las dimensiones de la cabeza después del proceso de congelación (a excepción del perímetro, rugosidad y regularidad). Por lo tanto, el medio de congelación más el 5% de glicerol mantiene las dimensiones (área) de la cabeza del espermatozoide. En el rebeco (*Rupicapra pyrenaica*), ciervo ibérico (*Capra pyrenaica*), sitatunga (*Tragelaphus spekii*) y gacela dorcas (*Gazella dorcas neglecta*) las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides no variaron después del proceso de congelación – descongelación usando TCG-YH más 5% de glicerol y tiñendo con Hemacolor (O'brien et al., 2019). Existen factores extrínsecos como la influencia del medio ambiente, la nutrición, el manejo y el método de tinción espermática e iluminación de la lámpara que pueden afectar al tamaño de los espermatozoides (Yániz et al., 2015).

Por otro lado, los resultados obtenidos después del proceso de vitrificación – calentamiento de espermatozoides de venado de cola blanca son consistentes con los reportados anteriormente en los cuales disminuyen sus dimensiones. En la cabra montés ibérica (*Capra pyrenaica*), muflón (*moeflon ovis*), sitatunga (*Tragelaphus spekii*) y oso pardo (*Ursus arctos*), el área de la cabeza del espermatozoide obtenido del epidídimo disminuyó significativamente de tamaño después de la congelación ultrarrápida o vitrificación (O'brien et al., 2019). Estos trabajos fueron desarrollados con 100 mM de sacarosa, diluyentes a base de TCG-YH y evaluados en el mismo software ASMA-CASA (SCA). En virtud de ello, este estudio sugiere que la presencia de sacarosa 100 mM, probablemente, induce a la disminución las dimensiones morfométricas de la cabeza después del proceso vitrificación.

Otros estudios reportaron valores morfométricos del área de la cabeza ($28,1 \mu\text{m}^2$), longitud (7,6 μm) y perímetro (21,9 μm), y valores similares de rugosidad (0,7), elongación (0,3) y regularidad (0,9) (Beracochea et al., 2014) de espermatozoides frescos del venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*). Asimismo, Cucho et al. (2022) reportaron dimensiones de la cabeza de espermatozoides frescos de venado de cola blanca peruano (*Odocoileus virginianus peruvianus*): área ($25,43 \pm 1,89 \mu\text{m}^2$), longitud ($7,63 \pm 0,45 \mu\text{m}$), anchura ($3,87 \pm 0,18 \mu\text{m}$) y perímetro ($22,19 \pm 1,49 \mu\text{m}$). Estos resultados del área y perímetro difieren de los obtenidos en el presente estudio. Probablemente, esta diferencia pueda atribuirse a que, en dichos estudios, a pesar de ser evaluados en un sistema CASA diferente (ISAS® v1 CASA-Morph), también fueron teñidos con otras sustancias (Hemacolor Merck, Darmstadt, Alemania y Diff-quick). Sin embargo, a pesar de que este estudio no comparó las dimensiones espermáticas entre muestras frescas de un mismo individuo, esta investigación expuso las diferencias obtenidas después de los procesos de congelación y vitrificación. O'brien et al. (2019) sugieren que, aunque las especies pueden tener áreas de cabeza de esperma similares, las longitudes de cabeza pueden ser bastante diferentes. Por ejemplo, las áreas de la cabeza de los espermatozoides del bisonte europeo y el muflón son similares, pero los espermatozoides del bisonte son bastante más largos.

Después del proceso de vitrificación – calentamiento usando TCG-YH y 100 mM de sacarosa se evidenció que las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de mono chorongo incrementaron significativamente en comparación con los valores frescos incluso los congelados – descongelados. En un trabajo reportado por O'Brien et al. (2019) se determinó que los espermatozoides epididimarios de macaco de barbería (*Macaca sylvanus*) disminuyeron su área de la cabeza de los espermatozoides después de una congelación convencional o vitrificación usando TCG-YH con 5% de glicerol o 100 mM de sacarosa, respectivamente ($13,584 \pm 0,071 \mu\text{m}^2$ frente a $13,049 \pm 0,054 \mu\text{m}^2$ y $13,033 \pm 0,063 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Los resultados obtenidos en esta investigación, contrariamente evidenciaron un aumento del tamaño del área después de la vitrificación comparado con los valores frescos y congelados ($14,32 \pm 0,33 \mu\text{m}^2$ frente a $14,81 \pm 0,25 \mu\text{m}^2$ y $16,3 \pm 0,28 \mu\text{m}^2$, respectivamente).

Durante la descongelación, las células se exponen a un entorno extracelular hipotónico y pueden hincharse a través de la difusión pasiva de agua (Meyers, 2005; Sieme et al., 2015); la cantidad de hinchamiento que se produce puede depender de las tolerancias osmóticas específicas de cada individuo o especie (Benson et al., 2012). La vacuolización nuclear inducida por la congelación o la descondensación de la cromatina (Boitrelle et al., 2012)

también podrían explicar este aumento de tamaño. Se ha reportado en otras especies silvestres como en delfines (*Tursiops truncatus truncatus*) y jirafas (*Giraffa camelopardalis rothschildi*), Koala de Queensland (*Phascolarctos cinereus adustus*), bisonte europeo (*Bison bonasus*) y oso pardo (*Ursus arctos*) que el área de la cabeza de los espermatozoides obtenidos del epidídimos aumenta después de la congelación ultrarrápida o vitrificación. El aumento de las dimensiones de la cabeza se debió posiblemente a la descondensación de la cromatina y la formación de ampollas en la membrana plasmática en la región de la cabeza (Cerdeira et al., 2020). En otras investigaciones realizadas en monos del neotrópico se ha determinado que el tamaño de la cabeza del espermatozoide es consistente a los reportados por este estudio (Steinberg et al., 2019; Swanson et al., 2016). Sin embargo, la morfología de la cabeza del mono chorongo *Lagothrix lagotricha* más parecida al mono aullador (*Alouatta caraya*) (Valle et al., 2013) determina una diferencia significativa en el tamaño de los espermatozoides entre diferentes individuos debido al pleomorfismo existente por su propia especie, así como por otros factores como la época del año o incluso el hábitat (cautiverio).

Las muestras espermáticas del tapir obtenidos mediante electro eyaculación no pudieron ser criopreservadas debido a la baja calidad inicial (astenozoospermia). A pesar de ello, las dimensiones de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de los eyaculados (frescas) fueron evaluadas exitosamente usando la tinción SpermBlue y registradas por el módulo ASMA-CASA (SCA). Un estudio precursor realizado por Piña, (2022) evidencio por primera vez las dimensiones morfométricas de espermatozoides frescos de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) provenientes de eyaculados obtenidos mediante la técnica TUMAS-G. Los resultados son consistentes a los reportados en este presente estudio. Este reporte, junto con el precursor (Piña, 2022) constituyen los únicos trabajos de morfometría de los espermatozoides de tapir que servirán de base para futuros trabajos de criopreservación y biología celular en esta especie.

Conclusiones

Esta investigación evaluó exitosamente las dimensiones morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides frescos de tapir, venado de cola blanca y mono chorongo. Además, el proceso de congelación y descongelación no alteró las dimensiones de los espermatozoides de venado y mono, sin embargo, después del proceso de vitrificación y calentamiento alteró el tamaño de los espermatozoides, reduciendo los valores morfométricos de la cabeza de espermatozoides de venado de cola blanca, e incrementando las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides del mono chorongo.

Referencias

- Álvares, J., & Medellín, R. A. (2005). *Odocoileus virginianus. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales*. *Mammalian Species*, 388, 1.
- Álvarez-Romero, J. G., Medellin, R. A., Oliveras de Ita, A., Gomez de Silva, H., & Sanchez, O. (2008). *Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad* (Issue August).
- Álvarez, S., Link, A., Di Fiore, A., de la Torre, S., Rivera, W., & Tirira, D. (2018). ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LOS PRIMATES DEL ECUADOR ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LOS. In *Estado de conservación de los primates del Ecuador*.
- Andrabi, S. M. H., & Maxwell, W. M. C. (2007). A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, 99(3–4), 223–243. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.07.002>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2004). *Ley Forestal Y De Conservacion De Areas Naturales y Vida Silvestre*. 19. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/06/Ley-Forestal-y-de-Conservacion-de-Areas-Naturales-y-Vida-Silvestre.pdf>
- Asher, G. W., Berg, D. K., & 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)
- Avalos Rodriguez, A., Gonzales Santos, J. A., Vargas Ibarra, A. K., & Herrera Barragan, J. A. (2013). Recolección y manipulación seminal in vitro. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://www.medigraphic.com/pdfs/reproduccion/mr-2009/mr094b.pdf>
- Beracochea, M. (2014). CARACTERIZACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE VENADO DE CAMPO (Ozotoceros bezoarticus). *Animal Reproduction Science*. <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2635/FV-31467.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 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*. August 2018, 72. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22271.66721>
- Chiriboga, J. I. (2009). *Evaluación del comportamiento de un grupo bajo cautiverio de*

Lagothrix lagotricha en el Zoológico de Guayllabamba. 1–25.

Cisneros, L., & Andreuw, S. (2011). Estrategia Nacional para la Conservación de los Tapires en el Ecuador (*Tapirus terrestris*, *Tapirus pinchaque*, *Tapirus bairdii*). *Flacsoandes*, 81.

Comizzoli, P. (2015). Biotechnologies for wildlife fertility preservation. *Animal Frontiers*, 5(1), 73–78. <https://doi.org/10.2527/af.2015-0011>

Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., & Ribadeneira, M. (2005). *Biodiversidad y recursos genéticos* (1ra Edicio). Abya Yala. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56358.pdf>

FAO. (2007). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación 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., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., Taboada, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2021). Cryopreservation of dog epididymal spermatozoa by conventional freezing or ultra-rapid freezing with nonpermeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 103, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.10.002>

Gregorio, N. (2018). *Morfometría del Espermatozoide del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus peruvianus*)* [UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO]. <http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/2874/253T20171097.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hernández, L., Silva-Torres, A., Celis-Alba, D., & Landaeta-Hernández, A. Rubio-Parada, J. (2018). Evaluación de la motilidad y morfometría en espermatozoides descongelados de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*). *Sennova, December*, 52–58.

Hidalgo, M., Rodríguez, I., & Dorado, J. M. (2007). The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, 100(1–2), 61–72. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2006.07.003>

- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- 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>
- Jerez, Z. (2002). *TAPIR AMAZÓNICO (Tapirus terrestris)*. <https://www.zoobotanicojerez.com/coleccion-zoologica/relacion-de-especies/tapir-amazonico-tapirus-terrestris>
- 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)
- Monserrat, 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/
- O'Brien, E., Esteso, 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-Moreno, 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>
- Peña, C. (2005). Legislación ecuatoriana y biotecnología. *Revista de Derecho UASB*, 4, 205–230.
- Piña, L. (2022). *Caracterización espermática de semen eyaculado por estimulación eléctrica del Tapir amazónico (Tapirus terrestris)*. Universidad de Cuenca.
- Prieto, M. T., Sanchez-Calabuig, M. J., Hildebrandt, T. B., Santiago-Moreno, J., & Saragusty, J. (2014). Sperm cryopreservation in wild animals. *European Journal of Wildlife Research* 2014 60:6, 851–864. <https://doi.org/10.1007/S10344-014-0858-4>
- Rivero Gonzalez, J. (2016). *Capítulo I, Generalidades de la criopreservación*. 1. <http://bibing.us.es/proyectos/abreproj/12044/fichero/VOLUMEN+I%252F01+-+CAPITULO+I.pdf?fbclid=IwAR2wO867eBdoHFceLJyHsCSbBuQxfzurQbsYla88Lvvwa eOJ9HUJ06X3XH0>

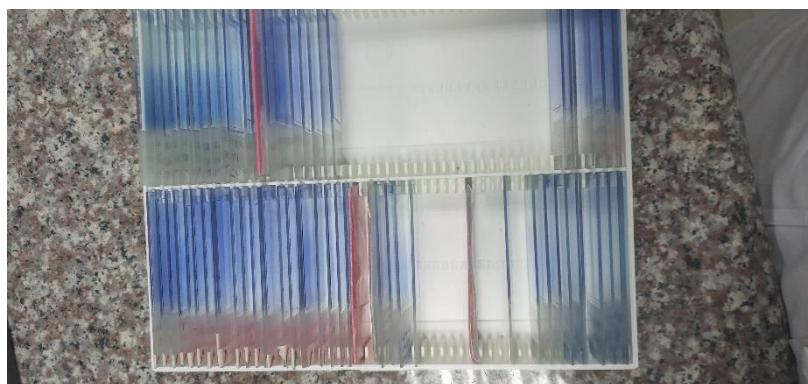
- Rojo, A., Lizardo, J., Solano, G., & Hernández, R. (2014). *Plan de Manejo Tipo de Venado Cola Blanca en Zonas Templadas y Tropicales*. 71. <http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/temas/gestionambiental/vidasilvestre/DOcuments/Planes de Manejo/Plan de Manejo Tipo de Venado Cola Blanca en Zonas Templadas y Tropicales.pdf>
- Rumsey, S. C., Galeano, N. F., Arad, Y., & Deckelbaum, R. J. (1992). Cryopreservation with sucrose maintains normal physical and biological properties of human plasma low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 33(10), 1551–1561. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)41409-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)41409-9)
- Saragusty, J., Gacitua, H., King, R., & Arav, A. (2006). Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology*, 66(4), 775–784. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.01.055>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169, 2–5. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.02.004>
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., Esteso, M. C., Núñez, J., Moreira, P. N., Núñez, M., Gutiérrez, R., Sancho, M., & Garde, J. J. (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS®. *Theriogenology*, 64(5), 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.018>
- Steinberg, E. R., Sestelo, A. J., Ceballos, M. B., Wagner, V., Palermo, A. M., & Mudry, M. D. (2019). Sperm morphology in neotropical primates. *Animals*, 9(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani9100839>
- Swanson, W. F., Valle, R. R., Carvalho, F. M., Arakaki, P. R., Rodas-Martínez, A. Z., Muniz, J., & García-Herreros, M. (2016). Sperm Morphology Assessment in Captive Neotropical Primates. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51(4), 623–627. <https://doi.org/10.1111/rda.12711>
- Tipkantha, W., Pukazhenth, B., Siriaroonrat, B., & Thongphakdee, A. (2011). Ejaculate Characteristics of Captive Malayan Tapirs (*Tapirus indicus*). *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(4), 499–508. <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/TJVM/10889455.pdf>

- Tirira, D. (2011). Venado de cola blanca de páramo (*Odocoileus virginianus ustus*). In *Libro Rojo de Mamíferos del Ecuador* (2nd ed., p. 273). Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- Tirira, D., De la Torre, S., & Zapata Ríos, G. (2018). *Plan de acción para la conservación de los primates del Ecuador*. <http://aem.mamiferosdecuador.com/images/pdf/Gepe/Tirira-et-al-2018-Marco-normativo-Plan-de-accion-primates-del-Ecuador.pdf>
- 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
- Valle, R. R., Carvalho, F. M., Muniz, J. A. P. C., Leal, C. L. V., & García-Herreros, M. (2013). Differential distribution of sperm subpopulations and incidence of pleiomorphisms in ejaculates of captive howling monkeys (*Alouatta caraya*). *Naturwissenschaften*, 100(10), 923–933. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1092-8>
- Vallejo, A., & Burneo, S. (2020). *Odocoileus virginianus Odocoileus*. *Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica Del Ecuador*. <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=1327>
- Velazquéz, J. (2011). Valoración espermática post-mortem obtenida de epidídimo de carnero y venado de cola blanca. In *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/3410>
- Yoshida, M. (2000). Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 349–355. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00125-1)

Anexos



Anexo A. Proceso de calentamiento de pellets vitrificados



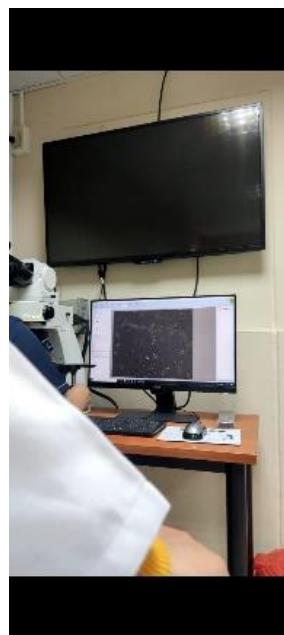
Anexo B. Frotis teñidos con Sperm-blue



Anexo C. Extracción de muestras congeladas



Anexo D. Tubos preparados para las muestras descongeladas



Anexo E. Sistema casa modulo asma



Anexo F. Medición para preparar reactivos



Anexo G. Banco de germoplasma