



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**COMPARACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES EN LA  
CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE JAMBATO  
DEL AZUAY**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

**AUTOR: GEOVANNY SEBASTIÁN LUDIZACA GUARTAN**

**DIRECTOR: MVZ. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MSc**

**CUENCA – ECUADOR**

**2024**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**COMPARACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES EN LA  
CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE JAMBATO  
DEL AZUAY**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

**AUTOR: GEOVANNY SEBASTIÁN LUDIZACA GUARTAN**

**DIRECTOR: MVZ. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MSc**

**CUENCA – ECUADOR**

**2024**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**

**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Geovanny Sebastián Ludizaca Guartan** portador de la cédula de ciudadanía N° **0302319629**. Declaro ser el autor de la obra: “**Comparación de dos crioprotectores en la congelación de espermatozoides de Jambato del Azuay**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **24 de julio de 2024**



F: .....

**Geovanny Sebastián Ludizaca Guartan**

**C.I. 0302319629**

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo de investigación fue desarrollado por **Geovanny Sebastián Ludizaca Guartan** con número de cédula **0302319629** con el tema “**COMPARACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES EN LA CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE JAMBATO DEL AZUAY**”, bajo mi supervisión.



---

MVZ. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MSc

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

**DOCENTE DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de titulación se lo dedico a mis padres Marco Ludizaca y Clara Guartan, que me han estado apoyando siempre y confiaron en mí en todo momento. A mi abuelita Marianita de Jesús Urgilés que siempre estuvo pendiente de mi bienestar. Todos han sabido guiarme por un buen camino y ayudarme a ser una mejor persona.

Dedico también este trabajo a Janina, una persona muy especial la que ha estado a mi lado aconsejándome, brindándome su tiempo y atención el cual lo valoro mucho. La mejor persona que me pude haber encontrado en la universidad.

Finalmente dedico este trabajo a mi persona en los momentos que me sentía perdido y dudaba de mis capacidades, y así mismo a mis compañeros por los buenos y graciosos momentos que pasamos juntos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad católica de Cuenca por brindarnos el acceso a los distintos laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria, pudiendo así realizar la tesis de la mejor manera. Así mismo agradezco a la Universidad Católica de Cuenca el haberme dado la oportunidad de formar parte del proyecto denominado “Implementación de técnicas de reproducción asistida en tres especies de anuros de la provincia del Azuay”

Agradezco también a los biólogos Jacky Arpi y Fausto Siavichay por darnos entrada al Centro de Conservación de Anfibios y a su vez por la paciencia y carisma que tienen para instruirnos sobre el manejo y cuidado de los anfibios.

Un agradecimiento al ingeniero Juan Alvarado por el tiempo que brindo para ayudar a realizar el proyecto de investigación y la atención que nos dio en todo momento, también agradezco a nuestro tutor Daniel Argudo que nos ha estado apoyando siempre para poder presentar un buen trabajo y también por los consejos para ser un buen profesional.

Conflicto de Intereses: NO

## ÍNDICE

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD .....	III
CERTIFICACIÓN .....	IV
DEDICATORIA .....	V
AGRADECIMIENTOS .....	VI
RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
FUNDAMENTO TEÓRICO .....	13
<i>Atelopus bomolochos</i> .....	13
Distribución.....	13
Descripción General.....	13
Alimentación .....	14
Amenazas y Conservación .....	14
Sistema Reproductor.....	14
Criopreservación .....	15
Crioprotectores.....	16
Agentes crioprotectores penetrantes .....	17
Agentes crioprotectores no penetrantes .....	17
Análisis de la Orina Espermática .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
Selección de las especies y consideraciones a tomar.....	18
Tratamiento Hormonal.....	19
Colecta de la orina espermática .....	19
Análisis y evaluación de las muestras.....	20
Criopreservación de la Orina Espermática ( <i>Atelopus bomolochos</i> ).....	20

Estadísticas.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
Peso de los animales usados en el experimento y proporción de colectas efectivas.....	22
Evaluación espermática precongelación de las muestras colectadas .....	23
Comparación de la recuperación de espermatozoides luego de la criopreservación con cada crioprotector.....	24
Evaluación post congelación de los espermatozoides criopreservados con DMSO y DMA de <i>Atelopus bomolochos</i> .....	26
CONCLUSIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA .....	28
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	33

## RESUMEN

La disminución de la población de anfibios cada vez toma más relevancia, ya que el 44.8% de sus especies (164) de anfibios ecuatorianos están amenazados con extinguirse, por lo que se debería hacer un enfoque en la criopreservación de anfibios para contrarrestar la pérdida de su genética utilizando las técnicas de reproducción asistida. En el presente trabajo se muestra los resultados de la comparación de dos crioprotectores (Dimetilsulfóxido y Dimetilacetamida) en la congelación de espermatozoides de *Atelopus bomolochos*. Para la congelación se utilizó una concentración del 10% en ambos tratamientos. En la primera variable evaluada sobre las anormalidades se observó resultados bajos para ambos tratamientos siendo 47,5% para el DMSO y 31,5% para DMA demostrando una ineficacia en la protección de la calidad espermática. En la integridad de la membrana plasmática el DMSO obtuvo un porcentaje de 76,25% frente al 100% de DMA. En la funcionalidad mitocondrial tanto el DMSO y DMA obtuvieron resultados negativos con un 100% de espermatozoides no funcionales para ambos tratamientos.

**Palabras clave:** Dimetilsulfóxido, Dimetilacetamida, Funcionalidad de la mitocondria, Morfología, Integridad de la membrana plasmática, Anuros, Atelopus.

## ABSTRACT

The decline of the amphibian population is becoming increasingly relevant since 44.8% of Ecuadorian amphibian species (164) are in danger of extinction. Therefore, a focus should be made on the cryopreservation of amphibians to counteract the loss of their genetics using assisted reproductive techniques. The current research shows the results of comparing two cryoprotectants, Dimethyl sulfoxide (DMSO) and Dimethylacetamide (DMA), in the freezing of spermatozoa of *Atelopus bomolochos*. A concentration of 10% was used for freezing in both treatments. The results for the first variable assessing abnormalities showed ineffectiveness in protecting sperm quality for both treatments. Specifically, DMSO had a 47.5% ineffectiveness rate, while DMA had a 31.5%. Regarding plasma membrane integrity, DMSO obtained a percentage of 76.25% versus 100% for DMA. Both DMSO and DMA showed negative results regarding mitochondrial functionality, with 100% of the spermatozoa being non-functional for both treatments.

**Keywords:** Dimethyl sulfoxide, Dimethylacetamide, Mitochondrial functionality, Morphology, Plasma membrane integrity, Anuros, *Atelopus*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La disminución de la población de anfibios empezó hace algunas décadas cuando científicos observaron que muchas especies de anfibios que antes eran comunes, fáciles de hallar o abundantes de la zona de pronto habían desaparecido sin alguna razón aparente, incluso los que se encontraban en zonas protegidas (Blaustein y Wake, 1990). Ron et al. (2000), mencionan que el hongo quitrido (*Batrachochytrium dendrobatidis*) es el causante de la quitridiomycosis, mismo que afecta a tres órdenes de anfibios (anura, urodela y gymnophiona), mismo que produjo una significativa mortandad masiva en América del sur a mediados de la década de los 2000 este evento afecto profundamente a Ecuador representando un total de 44,8% de anfibios amenazados por extinguirse, lo que llevó a reconocer al hongo quitrido como una gran amenaza para las poblaciones de anfibios locales, siendo los *Atelopus* unas de las especies más afectadas por este patógeno.

La especie *Atelopus bomolochos* se lo registró por última vez el 29 de abril de 1990, lo que indica que su población cada vez es menor y continuamente va disminuyendo debido a diversos factores y su principal amenaza es la quitridiomycosis, pero también la degradación de su hábitat debido a los cambios climáticos, la agricultura, ganadería, desarrollo urbano y especies introducidas como es la trucha, eucalipto y pino juegan un papel importante en la amenaza de extinción de la especie (Ron et al., 2000).

Por ende, las técnicas de reproducción asistida tienen un gran potencial para mejorar la propagación y el manejo de especies amenazadas, se ha visto esto ya en mamíferos y hace poco tiempo ha tomado importancia en anfibios, hasta el momento en varias especies se han desarrollado técnicas de estimulación hormonal para la recuperación de gametos, criopreservación espermática y fertilización in vitro (Silla et al., 2021).

La criopreservación de esperma en anfibios todavía está por detrás de la de otras clases de vertebrados (Clulow et al., 2014), aunque existen varias publicaciones con Pipidae (Sargent y Mohun, 2005), Bufonidae (Browne et al., 1998), Ranidae (Mugnano et al., 1998), Eleuthero-dactyliade (Michael y Jones, 2004), Hylidae y Myo-batrachidae (Browne et al., 2002), miembros de la familia. Los espermatozoides mantenidos en almacenamiento criogénico pueden permanecer congelados durante varios años y posteriormente pueden descongelarse para usarse en la generación de poblaciones futuras, así como para recuperar linajes genéticos perdidos, sin embargo, durante la congelación, los espermatozoides experimentan estrés osmótico, nucleación de hielo, efectos de la solución y toxicidad

crioprotectora, todos ellos factores estresantes físicos que resultan en la degradación y muerte celular (Yáñez et al., 2021).

Los crioprotectores utilizados en la criopreservación se clasifican en permeables y no permeables, los cuales han demostrado que aumentan la fluidez de la membrana y reducen la retención de agua dentro de la célula, minimizando la formación de cristales de hielo y su daño posterior (Kouba et al., 2003).

Según Proaño Olmos (2013), en un estudio realizado sobre la criopreservación de espermatozoides en la especie *Rhinella marina*, utilizando como crioprotector el DMSO al 5%, 10% y 15%, menciona que el 10% protegió un mayor porcentaje de espermatozoides de la lisis celular. Y los embriones con anomalías se pudieron evidenciar en cada uno de los tratamientos, pese a lo cual, en la solución de DMSO del 15% produjo un 2,33% más de individuos con anomalías que el control.

Como menciona Rivera Pacheco et al. (2021) en su trabajo, el dimetilacetamida al 6% utilizado como crioprotector para la criopreservación de espermatozoides de la especie *Ambystoma mexicanum*, demostró ser eficiente manteniendo parámetros de viabilidad e integridad membranal.

En el presente proyecto, se utilizó como experimento de laboratorio a la especie *Atelopus bomolochos*, para realizar la criopreservación de sus espermatozoides utilizando dos crioprotectores (DMA, DMSO) en la que se cree que el uso del dimetilsulfóxido en comparación con dimetilacetamida actúan de igual forma como crioprotectores favoreciendo la conservación de las características cinéticas y morfológicas post congelación de espermatozoides de *Atelopus bomolochos*. Por lo cual, para evaluar la eficacia de los crioprotectores se analizó en el espermatozoides fresco, la motilidad, motilidad progresiva, volumen, concentración, pH, y, en el espermatozoides congelado – descongelado se evaluó la morfología (anomalías), integridad de la membrana plasmática y funcionalidad mitocondrial, con el fin de evaluar la eficacia de cada crioprotector en la conservación de las características cinéticas y cualitativas de los espermatozoides.

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. *Atelopus bomolochos*



**Figura 1.** *Atelopus bomolochos*

**Fuente:** (Ron et al., 2000)

#### 2.1.1. *Distribución*

El *Atelopus bomolochos* es endémico de Ecuador y su hábitat natural incluye montanos secos, praderas tropicales o subtropicales a gran altitud, ríos, y tierras de pastos y paramos del sur del Ecuador (Cañar, Azuay y Loja) entre los 2.500 y 2.800 m s. n. m. en la localidad de Cuenca y estos anfibios tienen actividad diurna (Siavichay et al., 2016).

#### 2.1.2. *Descripción General*

Es una rana mediana de color amarillo, amarillo con café o verde amarillento, generalmente con puntos negros en el dorso y vientre amarillo o naranja. Presenta verrugas en los flancos, patas cortas y el primer dedo de la mano no tiene membrana. (Ron et al., 2000). El vientre puede ser amarillo entero con manchas más oscuras en el pecho y cloaca. Su cabeza es pequeña, plana y lisa, característico del grupo de los jambatos o ranas arlequines de alta montaña. Sus extremidades son cortas y gruesas, con las delanteras más cortas que las traseras y el macho posee el antebrazo más ancho que la hembra, el iris es completamente negro (Siavichay et al., 2016).



**Figura 2.** Características fenotípicas de *Atelopus bomolochos*

**Fuente:** (Ron et al., 2000)

### **2.1.3. Alimentación**

Se basa en insectos pequeños, hormigas, grillos y artrópodos.

### **2.1.4. Amenazas y Conservación**

Siavichay Pesantez (2018) menciona que esta especie se encuentra en peligro crítico, pudo haber sido afectada por patógenos como el hongo quítrido y el cambio climático, entre otras amenazas están: degradación de su hábitat, agricultura, ganadería, desarrollo urbano, minería, especies introducidas como trucha, pino, eucalipto, en 2015 apareció una población nueva en los páramos del cantón Sígsig en la provincia del Azuay (Ecuador), después de no ser visto ningún individuo desde 1990. Esta rana se maneja *ex situ* en el Zoológico Amaru. Las poblaciones están siendo estudiadas para evaluar su estado de conservación y planificar estrategias para garantizar su supervivencia.

## **2.2.Sistema Reproductor**

El macho posee dos testículos, los machos tienen el conducto de Wolff que permite que el esperma viaje desde los testículos hasta la cloaca (Wright K, 2001). Los bufónidos presentan una característica especial al tener el órgano de Bidder. Es un tejido ovárico que se localiza en los testículos, sin embargo, esto no es un indicador de hermafroditismo (Green D, 2001). El tamaño y la actividad de las gónadas varían con el estado reproductor. Factores como la temperatura, la lluvia o los cambios en la duración del día pueden influir la estación reproductora del anuro y otro punto importante es la vocalización de otros individuos que también puede contribuir a la sincronización reproductora entre los anuros. (Stebbins y Cohen,

1995). Los machos carecen de órgano penetrador y depositan paquetes de espermatozoides, o espermatóforos, sobre el sustrato. La hembra recoge estos espermatóforos por la abertura cloacal y los almacena en la cloaca hasta que pone los huevos. (Wright K, 2001).

El número y tamaño de los huevos varía enormemente en las distintas especies. Los huevos suelen estar rodeados por una envoltura traslúcida gelatinosa y se depositan en grupos en agua dulce o en hábitats terrestres húmedos, además, se cree que la pigmentación melánica de los huevos los protege de la radiación UV y ayuda a concentrar el calor para calentarlos (Stebbins y Cohen, 1995). La incubación se prolonga por espacio de horas (24 horas en los sapitos arlequines (*Atelopus spp.*) o durante varios meses). En el momento de la eclosión, las glándulas del hocico de las larvas producen enzimas que disuelven la cápsula del huevo, La duración de la etapa larvaria depende de la especie y de la temperatura (Wright K, 2001).



**Figura 3.** Vista dorsal de larva de *Dendropsophus labialis*

**Fuente:** (Sarria, 2010)

### **2.3. Criopreservación**

Existen cientos de especies anfibios amenazados cuya supervivencia depende de los programas de cría de conservación (CBP) (Burger et al., 2023). Pero desafortunadamente muchos programas de cría de conservación están experimentando una baja producción reproductiva después de los intentos de cría natural, en parte debido a la falta de señales ambientales que son difíciles de replicar en cautiverio; para evitar este desafío, se han desarrollado y aplicado tecnologías de reproducción asistida (ART) a las colonias de anfibios en cautividad para gestionar el número de poblaciones y la variación genética (Burger et al., 2021; Kouba y Vance, 2009).

El reporte más antiguo de criopreservación, de espermatozoides de rana fue en 1938 (Arav et al., 2002), actualmente la criopreservación es una técnica para mantener productos biológicos a temperaturas extremadamente bajas, por lo general a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o menos, durante períodos prolongados (de días a años), empezando con una exposición hipotérmica, ya que normalmente se agrega una solución de criopreservación fría y se equilibra con el sistema celular para posteriormente, enfriar el sistema a través del continuo hipotérmico hacia su temperatura de punto final y finalmente, alcanzar el equilibrio cuando el sistema alcanza un estado vítreo o vitrificado, luego, el sistema experimenta una reversión del proceso a medida que se descongela después de su intervalo de almacenamiento, es importante mencionar que incluso con la formación de hielo extracelular, las células sobrevivientes están siendo expuestas a un estado de hipotermia cada vez más profundo hasta que el sistema alcanza el estado de transición vítrea del medio de conservación (Moo Young, 2019).

#### **2.4. Crioprotectores**

Desde los primeros estudios sobre el uso del glicerol como crioprotector (CPA) efectivo tanto en espermatozoides aviares como en eritrocitos humanos, se han identificado numerosos agentes para su uso como CPA. En la actualidad, los CPA empleados incluyen una diversidad de compuestos penetrantes (permeables a la membrana) y no penetrantes utilizados en un medio electrolítico tamponado (Baust, 2005).

Bioquímicamente se puede caracterizar tres tipos de crioprotectores, los azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa), alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol) y el dimetilsulfóxido; además pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular ya mencionado anteriormente (García, 1984; Porcu, 2001).

Una alternativa para la preservación de estos anfibios que están amenazados por extinguirse es hacer uso de las técnicas de reproducción asistida para así intentar es su genética. Un estudio realizado en la especie *Rhinella marina* hizo uso del Dimetil sulfóxido como crioprotector en concentraciones del 5%, 10% y 15%, siendo la concentración del 10% la que protegió un mayor porcentaje de espermatozoides de la lisis celular. Los embriones con malformaciones se pudieron evidenciar en cada uno de los tratamientos, sin embargo, en la solución de DMSO del 15% produjo un 2.33% más de individuos malformados que el control (Proaño Olmos, 2013).

El dimetilacetamida ha sido utilizada como crioprotector en la especie *Ambystoma mexicanum* haciendo uso de una concentración del 6%, utilizando su respectivo protocolo de congelación para posteriormente ser descongelado y evaluado, demostrando ser eficiente manteniendo parámetros de viabilidad e integridad membranal, por lo cual este estudio aporta herramientas y conocimientos para la reproducción asistida en cautiverio del *Ambystoma mexicanum* (Rivera et al., 2021).

#### **2.4.1. Agentes crioprotectores penetrantes**

Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Los más utilizados son: el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propanediol (PROH).

El dimetilsulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959, el DMSO se ha utilizado como CPA. Su acción crioprotectora se atribuye sobre todo a su habilidad de prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la creación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular (García, 1984), modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. El 1-2 propanediol ha sido utilizado principalmente para la congelación de blastocistos y embriones en estado preimplantación de humanos y otras especies (Porcu, 2001).

#### **2.4.2. Agentes crioprotectores no penetrantes**

A diferencia de los CPA penetrantes, estos son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por realizar su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más usados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos por lo general son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad del agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (no obedecen a la ley de Raoult) (Ávila Portillo et al., 2006).

### **2.5. Análisis de la Orina Espermática**

A diferencia de otras especies en los anuros se obtienen espermatozoides en conjunto con la orina mismos que utilizan la micción espontánea como un mecanismo de defensa frente a los depredadores. El volumen de muestra se mide con un instrumento de 100 µL micropipeta.

La concentración de espermatozoides se evalúa mediante hemocitometría con 10  $\mu$ L de orina espermática siendo añadido a la cámara de Neubauer. El valor de pH se obtiene utilizando tiras indicadoras de pH 5.0-10.0. El porcentaje de motilidad de los espermatozoides es determinado contando todas las células como movimiento flagelar. El porcentaje de motilidad progresiva hacia adelante (fpm) se obtiene contando todas las células con motilidad hacia adelante en relación con 100 células que fueron expresando cualquier movimiento flagelar (Della Togna et al., 2017).

Para la evaluación de la integridad de las membranas se utiliza dos tinciones. Se añade 1 microlitro de tinte Propidium Iodide a los 50  $\mu$ l de solución de espermatozoide durante 15 minutos, para el tinte Rodamina se realiza el mismo procedimiento y se deja reposar a temperatura ambiente hasta lograr una adecuada incubación, para posteriormente ser llevado a un microscopio de fluorescencia. El PI tiene la capacidad de ingresar a las células muertas debido a su impermeabilidad a la membrana atravesando así solo las membranas que presenten daños (Proaño Olmos, 2013). La Rodamina ingresa en las mitocondrias con actividad respiratoria acumulándose dentro de la misma, al colocar la luz laser sobre los espermatozoides teñidos con Rodamina provocara que la pieza intermedia con mitocondrias activas emita una fuerte fluorescencia verde (Ericsson et al., 1993).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Selección de las especies y consideraciones a tomar

El presente trabajo se realizó en la provincia del Azuay en el Centro de Conservación de Anfibios que forma parte del Zoológico de Cuenca y Bioparque Amaru, dedicada al monitoreo y manejo in situ y ex situ de anfibios del Ecuador. Ubicada en la Autopista Cuenca – Azogues Km 10  $\frac{1}{2}$  (sector hospital del río).



#### **Figura 4.** Mapa topográfica cuenca

**Fuente:** (topographic-map,2024)

Los anuros y las instalaciones donde estuvieron alojados fueron provistos por el Centro de Conservación de Anfibios CCA-AMARU, lugar en el que se realizó el trabajo con una temperatura de alrededor de 15 °C. En la que se escogió 4 individuos de la especie *Atelopus bomolochos* aptos para realizar el tratamiento hormonal para la obtención de espermatozoides se colectó 3 muestras de cada individuo con un descanso de al menos 15 días entre colecta, para su posterior evaluación pre y post congelación utilizando como crioprotectores el dimetilsulfóxido (DMSO) 10% y el dimetilacetamida (DMA) 10%, siendo los 4 individuos la unidad experimental.

#### **3.2. Tratamiento Hormonal**

Previo al al tratamiento hormonal los 4 anuros fueron pesados en una balanza tomando en cuenta las técnicas de manejo, posterior a esto se calculó la dosis a administrar (5 UI/G de peso) para cada uno de ellos.

La hormona hCG (gonadotropina coriónica humana) se administró por la vía intraperitoneal utilizando una jeringuilla BD Ultra Fine 0.5 ml 31 g x 6 mm. Una vez aplicada la hormona los individuos se colocaron en recipientes de plástico individuales con 0,5 cm de agua en el fondo para asegurar la hidratación.

#### **3.3. Colecta de la orina espermática**

En los intervalos de recolección (2 h 30 min y 3h 30 min) después de la inyección, se usó una punta plástica delgada como catéter para recolectar la muestra de orina espermática, la punta plástica se colocó entre 3 y 5 mm en la cloaca y se movió suavemente hacia adentro y hacia afuera para facilitar la recolección de orina. La muestra se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se mantuvo en hielo de forma indirecta hasta que se pudo determinar el volumen, motilidad, y la concentración del esperma. Los análisis de motilidad se realizaron inmediatamente después de la recolección para reducir los posibles efectos del tiempo posterior a la recolección.

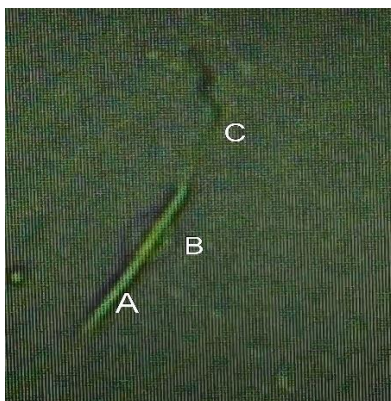
### 3.4. Análisis y evaluación de las muestras

La concentración (células/mL) de espermatozoides en muestras de orina se evaluó con una Cámara de recuento celular, Hemocitómetro Neubauer en cada intervalo de recolección. Se pipetearon 10 microlitros en una de las cámaras, y se contó y utilizó el número de espermatozoides en al menos 5 cuadrantes secundarios para calcular el total de espermatozoides por mililitro. Debido a los pequeños volúmenes de muestra solo se pudo realizar un recuento repetido por muestra.

### 3.5. Criopreservación de la Orina Espermática (*Atelopus bomolochos*)

Se diluyó la orina espermática 1:1 con Amphibian Ringer's solution (ARS) para posteriormente diluir en 1:1 con el crioprotector apropiado utilizando una concentración del 10 % de (DMA) y 10% de (DMSO) y posteriormente cargarlo en pajuelas de Cassow de 0,25 ml en un volumen de entre 115  $\mu$ L a 240  $\mu$ L por pajuela. Se produjeron 3 réplicas de pajuela por tratamiento. Las pajuelas se congelaron en un termo con nitrógeno líquido.

Las pajuelas fueron descongeladas en agua a 5 °C para su posterior evaluación. Brevemente, la motilidad se evaluó colocando 5  $\mu$ L de la muestra en un portaobjetos en el microscopio con el lente de 40x.



**Figura 5.** Espermatozoide de *Atelopus bomolochos*. Cabeza(A), Vesícula mitocondrial(B), cola(C)

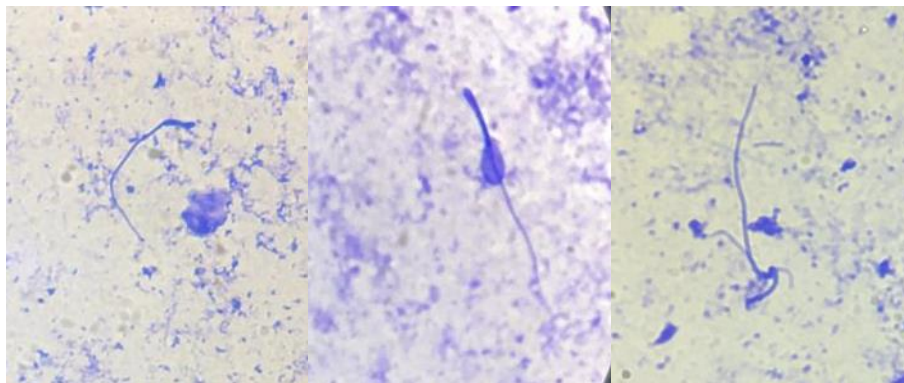
**Fuente:** Del autor

La integridad de la membrana plasmática se evaluó con un ensayo de exclusión del colorante Ioduro de Propidio, se utilizó 50  $\mu$ L de muestra para mezclar con 1  $\mu$ L del colorante, una vez mezclado se tomó solo 15  $\mu$ L que se colocó entre cubre y porta objetos para evaluar bajo el microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides con citoplasma claro (excluyendo

el tinte) se calificaron como vivos y los espermatozoides teñidos de rosa se calificaron como muertos (membrana permeable al tinte).

Para evaluar la funcionalidad mitocondrial en anfibios se utilizó el medio de tinción fluorescente rodamina 123, así mismo mezclando 50  $\mu\text{L}$  de muestra con 1  $\mu\text{L}$  de la tinción, utilizando de igual manera 15  $\mu\text{L}$  para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides con citoplasma claro (excluyendo la fluorescencia) se calificaron como no funcionales y los espermatozoides con tinción positiva se calificaron como funcionales (membrana permeable a la fluorescencia).

Para la evaluación de la morfología del espermatozoide se utilizó la tinción azul commasie en la que se analizó el acrosoma, cabeza, pieza intermedia y cola (figura 6). Todas las recolecciones de esperma para este experimento se realizaron en diferentes fechas: 11/12/23; 22/01/24; 19/02/24, fechas en las que se realizó una evaluación previa a la congelación, y posteriormente a los 4 meses de crio almacenamiento se realizó una evaluación posterior a la descongelación en los meses de marzo y abril del 2024.



**Figura 6.** Evaluación de la Morfología del Espermatozoide

**Fuente:** Del autor

### ***3.6. Estadísticas***

Se utilizó ANOVA para pruebas de diferencias estadísticas en el peso de los cuatro individuos usados en el experimento, en la evaluación espermática pre congelación de las muestras colectadas y la evaluación post congelación de los espermatozoides criopreservados con DMSO y DMA de *Atelopus bomolochos*.

Se realizaron pruebas de chi-cuadrado para determinar si existe diferencia estadística entre los resultados del número de colectas efectivas y en la comparación de la recuperación de espermatozoides luego de la criopreservación con cada crioprotector.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cuatro individuos de la especie *Atelopus bomolochos* usados en el experimento de criopreservación de espermatozoides, tienen una edad de entre cuatro a cinco años. Desde el punto de vista de Bernardo (1993), argumenta que el alcanzar la madurez sexual en una especie se controla genéticamente, no obstante, los factores ambientales también influyen en su maduración debido a los cambios climáticos y gradientes de contaminación, mismos factores que han sido controlados en el centro de conservación de anfibios, creando así un ambiente apto para su desarrollo y reproducción, teniendo ejemplares con una madurez sexual óptima para la criopreservación.

**Tabla 1.-** Peso de los animales usados en el experimento y proporción de colectas efectivas

Individuo	N	Peso (gramos)	Colectas efectivas % (n)
1	3	3,35 ± 0,18 <sup>c</sup>	33,3 (1/3)
2	3	4,01 ± 0,14 <sup>b</sup>	33,3 (1/3)
3	3	4,35 ± 0,09 <sup>ab</sup>	33,3 (1/3)
4	3	4,73 ± 0,10 <sup>a</sup>	66,7 (2/3)
Total	12	4,34 ± 1,22	41,7 (5/12)

N= número de repeticiones. Los datos mostrados son  $\bar{X} \pm EE$ . Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias estadísticas significativas  $p < 0,05$  (a, b, c).

En la Tabla 1. se muestran diferencias significativas entre los pesos, evidenciando que el individuo cuatro es el que mayor peso tiene a diferencia del individuo uno, teniendo una diferencia numérica de 1,38 g. En cambio, los individuos dos y tres no muestran una diferencia significativa al igual que entre el individuo cuatro y tres.

En la variable número de colectas efectivas se observa que solo el 41,7% (5/12) es el total de orina espermática que se pudo coleccionar, siendo esto no tan favorable. Además, se muestra que los individuos uno, dos y tres solo dieron una colecta efectiva que representan el 33,3% (1/3). Por lo tanto, el individuo número cuatro que es el que mayor peso tiene fue al que mejor se le pudo coleccionar orina espermática con un resultado de 66,7% (2/3).

Debido a la falta de información y estudios relacionados sobre la orina espermática de anfibios se tomó en cuenta un estudio acerca de la caracterización de semen de trucha arcoíris de diferentes edades que se realizó a lo largo de un año reproductivo, evaluando a los mismos ejemplares, mostró que los machos con la edad más alta y así mismo con un mayor peso, dieron un volumen total anual de 113,10 mL siendo significativamente más alto que los machos con edades más bajas, observándose una relación entre el peso y edad del individuo con el volumen de muestra (Bastardo et al., 2004). Como lo hace notar Bastardo (1992), planteando que los machos jóvenes presentan un volumen de semen más bajo que los machos que alcanzaron una madurez sexual óptima.

Para evaluar la orina espermática, se administró previamente la hormona hCG, en la que se esperó 2 h 30 min y 3 h 30 min para realizar la colecta, tomando en cuenta que el esperma colectado de los cuatro individuos fue mezclado en un solo tubo eppendorf de las tres repeticiones que se realizó en total.

En la presente tabla se puede observar los promedios de las diferentes variables evaluadas, siendo la primera la motilidad total la cual presentó un porcentaje menor al 50% siendo su promedio de  $38,75 \pm 2,22$ , en segundo lugar, está la motilidad progresiva con un porcentaje de  $40,83 \pm 0,86$  manteniéndose de igual manera con valores por debajo del 50%, continuando con el volumen, que se mide en  $\mu\text{L}$ , se pudo obtener como máx., 67,20  $\mu\text{L}$  y un mín., 04,57  $\mu\text{L}$ , teniendo un promedio de  $35,88 \pm 13,24$ , en penúltimo lugar está la concentración (spz/ mL) con un promedio de  $23666,67 \pm 18162,79$ . Finalmente para el valor del pH, utilizando las tiras indicadoras nos proporcionó un resultado de 7 en todos los individuos.

**Tabla 2.-** Evaluación espermática pre congelación de las muestras colectadas

Variable	N	X $\pm$ DE	Min	Max
Motilidad Total (%)	4	$38,75 \pm 2,22$	33,51	43,99
Motilidad Progresiva (%)	4	$40,83 \pm 0,86$	38,79	42,87
Volumen (microlitros)	4	$35,88 \pm 13,24$	04,57	67,20
Concentración (spz/ mL)	4	$23666,67 \pm 18162,79$	19281,51	66614,84
pH	4	$07,00 \pm 0,00$	07,00	07,00

N= número de repeticiones.

Se debe tomar en consideración que existen causas que perjudican la motilidad de los espermatozoides, entre ellos está la osmolalidad del medio, la composición iónica, el pH y la

temperatura (Vieira Browne et al., 2015). Como menciona Alavi y Cosson (2006), la concentración extracelular de electrolitos influye en la motilidad de los espermatozoides de algunos peces. Además, la motilidad de los espermatozoides se activa cuando los mismos experimentan un cambio, es decir, que pasen de la alta osmolalidad de los testículos a la baja osmolalidad del ambiente de agua dulce (Clark, 1997).

Se ha demostrado que el uso de tratamientos hormonales para inducir la producción de gametos ha dado resultados muy eficaces, como es el uso de la hormona hCG en la especie *Rhaebo guttatus*. Como base en el estudio realizado por Hinkson et al., (2019) sobre la criopreservación e inducción hormonal de orina espermática, ellos evidenciaron que las comparaciones por pares revelaron diferencias estadísticas significativas entre los tres tratamientos en las variables de motilidad total y movimiento progresivo hacia adelante, con 10 UI/gdp de hCG superando las 7,5 UI/gdp de hCG y GnRH, y 7,5 UI/gdp de hCG que exceden la GnRH. Además 10 UI/gdp de hCG provocó la liberación de esperma significativamente más concentrado que 7,5 UI/gdp de hCG y GnRH, pero no existieron diferencias entre estos últimos tratamientos. Aunque estos resultados en conjunto muestran que de los tres tratamientos, la administración de 10 UI/gdp de hCG es el método más eficaz para recolectar esperma de buena calidad de *R. guttatus*.

En otro estudio de la especie *Litoria booroolongensis* realizado por Hobbs et al. (2023), muestran que el pH de la orina espermática se mantiene en un rango de 7.3 – 7.4 después de haberse administrado la hormona de hCG. Además, evaluó la calidad espermática de un grupo de individuos machos, teniendo como resultados del cuarto grupo conformado por tres individuos, arrojó en las variables de concentración  $17.9 \times 10^6/\text{mL}$ , motilidad progresiva 80% y, motilidad total 84%.

**Tabla 3.-** Comparación de la recuperación de espermatozoides luego de la criopreservación con cada crioprotector

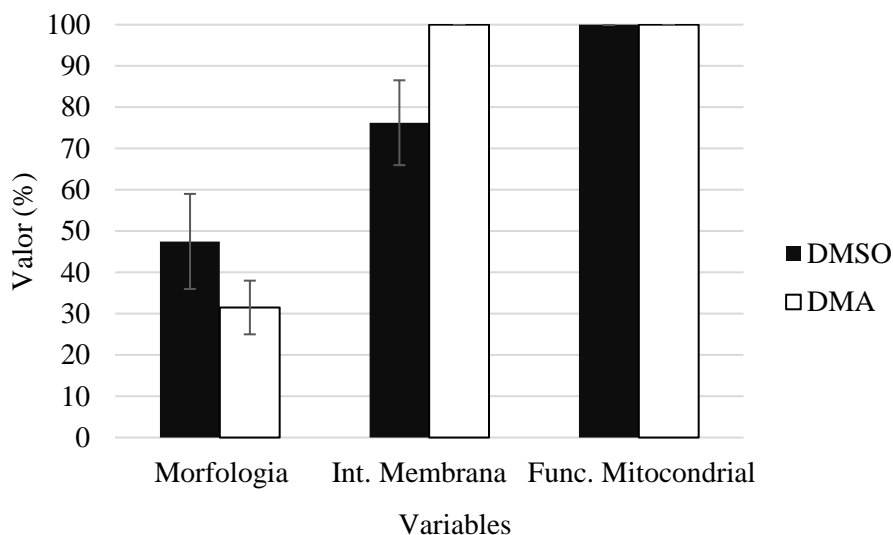
Tratamiento	Pajuelas	N	%
DMSO	9	4	44,4
DMA	9	2	22,2
Total	18	6	33,3

Pajuelas = Número de pajuelas que fueron congeladas/descongeladas.

El número total de pajuelas congeladas son dieciocho, en la que posterior a su descongelación se procedió a centrifugar las muestras de orina espermática con el objeto de

que los espermatozoides se precipiten, y faciliten una mejor evaluación en la calidad espermática post descongelación. Como señalan Proaño y Pérez (2017), la centrifugación es empleada para concentrar los espermatozoides de la orina espermática, para eliminar los componentes proteicos y lipídicos de las suspensiones de espermatozoides frescos. En cuanto la centrifugación después de la descongelación según Upton et al. (2018) mencionan que sirve para eliminar los criodiluyentes.

Una vez analizadas se determinó que seis de las dieciocho pajuelas contenían espermatozoides para poder realizar su respectiva evaluación, siendo cuatro pajuelas del tratamiento con DMSO representando el mayor porcentaje de 44,4% y dos pajuelas del tratamiento con DMA expresando un menor porcentaje de 22,2%, dejando de lado al 77,7% del total de pajuelas que no se pudo analizar debido a la ausencia de espermatozoides en las muestras. Corroborando el por qué no hubo presencia de espermatozoides, según Bailey et al. (2003); Vajta y Kuwayama (2006), indican que los procesos de congelación y descongelación efectuados durante la criopreservación pueden provocar daños funcionales y morfológicos al espermatozoide, perjudicando así, la supervivencia post descongelación y la posterior fertilización. Además, en el daño celular, implica incluso la degradación de la membrana, el desprendimiento o deterioro de la cabeza y/o la cola y la fragmentación del ADN, hecho que puede ser causado por factores estresantes físicos de la formación de cristales de hielo y shock osmótico, o factores estresantes químicos de la apoptosis inducida por el shock frío y generación de especies reactivas de oxígeno (Fitzsimmons et al., 2009; Kopeika et al., 2015; Vajta y Kuwayama, 2006). Para esto, el uso de agentes crioprotectores penetrantes como es el DMSO y DMA es fundamental para viabilidad post descongelamiento de los espermatozoides, dado que disminuye la generación de hielo intracelular, no obstante, la introducción y sustracción de estos agentes crioprotectores pueden afectar a la célula (Canorio et al., 2015).



**Figura 1.-** Evaluación post congelación de los espermatozoides criopreservados con DMSO y DMA de *Atelopus bomolochos*

En la figura 1. se distingue los efectos de los tratamientos con DMSO Y DMA en los espermatozoides como es la morfología, en la que el DMA presento menor porcentaje de anomalías con un valor de 31,5 % a diferencia del DMSO que tiene un valor de 47,5%, lo que se manifiesta como una diferencia numérica, sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa. En el experimento realizado por Shishova et al. (2011) en la especie *Fowler* de nombre científico *Anaxyrus fowleri*, indica en sus resultados que en comparación de las muestras de semen fresco con las muestras con tratamiento de esperma con DMSO Y DMFA en cuanto a la morfología, las muestras con tratamiento congeladas-descongeladas arrojaron un numero significativamente mayor de espermatozoides con anomalías en las cabezas ( $df = 9, t = 3,7, P = 0,005$ ), colas ( $df = 9, d = 3,4, P = 0,002$ ) o en ambas ( $df = 9, t = 7,2, P < 0,001$ ) en comparación con muestras frescas de esperma ( $23 \pm 1 \%$ ,  $37 \pm 2 \%$  y  $27 \pm 2 \%$  frente a  $14 \pm 2 \%$ ,  $11 \pm 3 \%$  y  $10 \pm 2 \%$ , respectivamente).

En la integridad de la membrana plasmática los resultados muestran que el tratamiento con DMA conservo el 100 % de su membrana plasmática a diferencia del tratamiento con DMSO que presento una cifra de 76,25 %, esto a su vez expone una diferencia numérica 23,75% pero no se halla diferencia estadística significativa. Es importante mencionar que la evaluación de la membrana plasmática es fundamental para determinar la viabilidad del espermatozoide. Dicho esto, comparando los resultados del presente experimento con el estudio desarrollado por Mugnano et al. (1998) en la rana madreña norteamericana *Lithobates sylvaticus* se evaluó el uso del DMSO y el Glicerol en los espermatozoides de testículos

congelados-descongelados, mostrando que los testículos que fueron tratados con DMSO, produce recuentos de espermatozoides intactos significativamente superiores que los órganos tratados con glicerol, conteniendo más espermatozoides viables.

Finalmente se observa en la funcionalidad mitocondrial que ambos tratamientos no mantuvieron la viabilidad dando un valor del 100 % de espermatozoides no funcionales, además de que no existe diferencia estadística significativa. En el trabajo efectuado por Varela Junior et al. (2012), mencionan que los porcentajes más bajos de funcionalidad mitocondrial (P 0.001) se presentaron en muestras congeladas con glicerol, DMSO, MF 8%, DMA 11%, y con todos los 3 amidas probados al 2%.

## 5. CONCLUSIONES

El DMSO y DMA al 10% no protege a los espermatozoides de los daños estructurales al momento de la congelación ya que en ambos tratamientos se observó que los espermatozoides que presentaron anomalías abarcan valores superiores al 50% del total de muestras evaluadas, por lo que se sugiere realizar más investigaciones en la crio preservación de anfibios utilizando concentraciones diferentes, debido a que la eficacia del crioprotector varía según la especie tratada y su concentración. Sin embargo, en cuanto a la integridad de la membrana plasmática ambos crioprotectores actuaron eficazmente protegiendo a los espermatozoides del daño celular con una ligera diferencia en el DMSO pero que a su vez no presenta una relevancia importante, pudiendo decir que el DMSO Y DMA son aptos para proteger la membrana plasmática. En comparación, con la funcionalidad mitocondrial, estos crioprotectores no ayudaron a evitar la lisis celular de los espermatozoides de *Atelopus bomolochos*.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alavi, S. M., & Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30(1), 1-14.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., & Gacitua, H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187, 77-81.
- Ávila Portillo, L. M., Madero, J., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. (2006). Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci*, 83, 393-401.
- Bastardo, H., Guedez, C., & León, M. (1992). Semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Concentración y volumen durante un período reproductivo en Mérida, Venezuela. *Veterinaria Tropical*, 17, 53-66.
- Bastardo, H., Guedez, C., & León, M. (2004). Características del semen de trucha arcoiris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 22(3).
- Baust, J. (2005). Advances in Media for Cryopreservation and Hypothermic Storage. *BioProcess International Supplement*, 46-56.
- Bernardo, J. (1993). Determinants of maturation in animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 8, 166-173. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90142-C](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90142-C).
- Blaustein, A. R., & Wake, D. B. (1990). Declining amphibian populations: A global phenomenon? *Trends in Ecology & Evolution*, 5(7), 203-204.
- Browne, R. K., Clulow, J., & Mahony, M. (2002). The short-term storage and cryopreservation of spermatozoa from hylid and myobatrachid frogs. *CryoLetters*, 23(2), 129-136.
- Browne, R., Culow, J., Mahony, M., & Clark, A. (1998). Successful recovery of motility and fertility of cryopre-served cane toad (*Bufo marinus*) sperm. *Cryobiology*, 37(4), 339-445.

- Burger, I., Julien, A., Kouba, A., Barber, D., Counsell, K., Pacheco, C., . . . Kouba, C. (2021). Linking in-situ and ex-situ populations of threatened amphibians through genome banking. *Wiley Periodicals LLC*, 3(11).
- Burger, I., Li Dunn, C., Lampert, S., Kouba, C., Barber, D., Smith, D., . . . Kouba, A. (2023). Applying sperm collection and cryopreservation protocols developed in a model amphibian to three threatened anuran species targeted for biobanking management. *Elsevier*, 277.
- Canorio, N., Paredes, F., & Valdivia, M. (2015). Alternative cryoprotectants suitable for an slow freezing method of epididymal spermatozoa of alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 434-443.
- Clark, A. (1997). *The effects of ionicity in diluents on the motility of cane toad (Bufo marinus) sperm*. thesis, University of Newcastle, Australia.
- Clulow, J., Vance, L., & Kouba, A. (2014). Amphibian declines in the twenty-first century: Why we need assisted reproductive technologies. *Reproductive Science in Animal Conservation: Progress and Prospects.*, 275-316.
- Della Togna, G., L, V., Gratwicke, B., Evans, M., Augustine, L., Chia, H., . . . Comizzoli, P. (2017). Effects of hormonal stimulation on the concentration and quality of excreted spermatozoa in the critically endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). *Theriogenology*, 91, 27-35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.033>.
- Ericsson, S. A., Garner, D. L., Thomas, C. A., Downing, T. W., & Marshall, C. E. (1993). Interrelationships among fluorometric analyser of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 33, 1211-1220.
- Fitzsimmons, C., Mahony, M. J., & Clulow, J. (2009). 502. Cold shock during rapid cooling of sperm from a tropical anuran, the cane toad, *Bufo Marinus*. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(9), 103-103.
- García, J. V. (1984). Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol*, 6(219).

- Green, D. E. (2001). Pathology of amphibia. En K. M. Wright, & B. R. Whitaker, *Amphibian medicine and captive husbandry* (págs. 401-485). Malabar, Florida: Krieger Publishing.
- Hinkson, K. M., Poo, S., & Baecher, J. A. (2019). Article Title: Cryopreservation and hormonal induction of spermic urine in a novel species: The smooth-sided toad (Rhaebo guttatus). *Cryobiology*, 89, 109-111. doi:<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224019300288>
- Hobbs, R., Upton, R., Calatayud, N. E., Silla, A. J., Daly, J., McFadden, M. S., & O'Brien, J. K. (2023). Cryopreservation Cooling Rate Impacts Post-Thaw Sperm Motility and Survival in *Litoria booroolongensis*. *Animals*, 13, 3014. doi:<https://doi.org/10.3390/ani13193014>
- Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos : principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update*, 21, 209–227.
- Kouba, A. J., Vance, C. K., Frommeyer, M. A., & Roth, T. L. (2003). Structural and Functional Aspects of *Bufo Americanus* Spermatozoa: Effects of Inactivation and Reactivation. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol*, 295, 172–182.
- Kouba, A., & Vance, C. (2009). Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(6), 719-737.
- Michael, S. F., & Jones, S. C. (2004). Cryopreservation of spermatozoa of the terrestrial Puerto Rican frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Cryobiology*, 48(1), 90-94.
- Moo Young, M. (2019). *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier.
- Mugnano, J. A., Costanzo, J. P., Beesley, S. G., & Lee, R. E. (1998). Evaluation of glycerol and dimethyl sulfoxide for the cryopreservation of spermatozoa from the wood frog (*Rana sylvatica*). *Cryo-Letters*, 19, 249-254.
- Porcu, E. (2001). Oocyte Cryopreservation. En D. Gardner, A. Weissman, C. Howles, & Z. Shoham, *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. London, UK: Martin Dunitz Limited.

- Proaño Olmos, B. E. (2013). *Fertilización in-vitro con espermatozoides criopreservados de la especie Rhinella marina e identificación de malformaciones en los embriones obtenidos*. Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador.
- Proaño, B., & Pérez, O. (2017). In vitro fertilizations with cryopreserved sperm of *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) in Ecuador. *Amphibian & Reptile Conservation*, 11(2), 1-6.
- Rivera Pacheco, J., Herrera Barragán, J., León Galván, M., Ocampo Cervantes, J., Pérez Rivero, J., & Gual Sill, F. (2021). Criopreservación espermática de *Ambystoma mexicanum*. *Abanico Veterinario*, 11.
- Ron, S. R., Merino Viteri, A., & Ortiz, D. (2000). Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog*, 42, 2-3. Recuperado el marzo de 2023, de Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/>
- Sargent, M. G., & Mohun, T. J. (2005). Cryopreservation of sperm of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Genesis*, 41(1), 41-46.
- Sarria, F. A. (2010). *Tabla de desarrollo embrionario de la rana sabanera Dendropsophus labialis : Hylidae en cautiverio (Laboratorio Biología de Desarrollo PUJ)*. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10554/8671>.
- Shishova, N. R., Uteshev, V. K., Kaurova, S. A., Browne, R. K., & Gakhova, E. N. (2011). Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology*, 75(2), 220-232. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.008>.
- Siavichay Pesantez, F. R. (2018). *Diagnostico de la comunidad de anfibios para el manejo y gestión del área de conservación municipal y uso sustentable cordillera oriental, del cantón Sígsig, Azuay*. Cuenca.
- Siavichay Pesántez, F., Maldonado Cedeño, G., & Mejía Coronel, D. (2016). *Anfibios urbanos de cuenca*. Cuenca: Don Bosco.
- Silla, A., Calatayud, N., & Trudeau, V. (2021). Amphibian reproductive technologies: approaches and welfare considerations. *Conservation Physiology*, 9(1).

- Stebbins, R. C., & Cohen, N. (1995). *A natural history of amphibians*. Princeton, New Jersey: Princeton University press.
- Upton, R., Clulow, S., Mahony, M., & Clulow, J. (2018). Generation of a sexually mature individual of the Eastern dwarf tree frog, *Litoria fallax*, from cryopreserved testicular macerates: proof of capacity of cryopreserved sperm derived offspring to complete development. *Conserv Physiol*, 6(1).
- Vajta G, & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65, 236–244.
- Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Gheller, S. M., Jardim, R. D., Lucia, T., Streit, D. P., & Figueiredo, M. R. (2012). Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*, 78, 244-251. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.029>.
- Vieira Browne, R., Magalhães Sales, M., da Costa Sotero, R., Yukio Asano, R., Vila Nova de Moraes, J. F., de França Barros, J., . . . Simões, H. (2015). Critical velocity estimates lactate minimum velocity in youth runners. *Motriz*, 21(1), 1-7.
- Wright, K. M. (2001). Anatomy for the clinician. En K. M. Wright, & B. R. Whitaker, *Amphibian medicine and captive husbandry* (págs. 15-30). Malabar, Florida: Krieger Publishing.
- Yáñez Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2021). Advances in Sperm Cryopreservation in Farm Animals: Cattle, Horse, Pig and Sheep. *Anim. Reprod. Sci*, 246.

**Geovanny Sebastián Ludizaca Guartan** portador de la cédula de ciudadanía N° **0302319629**. En calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Comparación de dos crioprotectores en la congelación de espermatozoides de Jambato del Azuay**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **24 de julio de 2024**



F: .....

**Geovanny Sebastián Ludizaca Guartan**

**C.I. 0302319629**