

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
DE LAS TRES CRUCES DEL AZUAY**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA**

AUTORA: MARJORIE JANINA ALVARADO LUCERO

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
DE LAS TRES CRUCES DEL AZUAY**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA**

AUTORA: MARJORIE JANINA ALVARADO LUCERO

DIRECTOR: MVZ. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MSc

CUENCA – ECUADOR

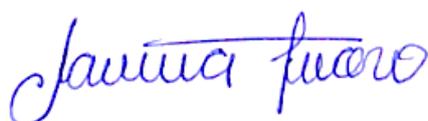
2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Marjorie Janina Alvarado Lucero portadora de la cédula de ciudadanía N° **0704642818**. Declaro ser la autora de la obra: “**Comparación de dos crioprotectores en la congelación de espermatozoides de Jambato de las Tres Cruces 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**



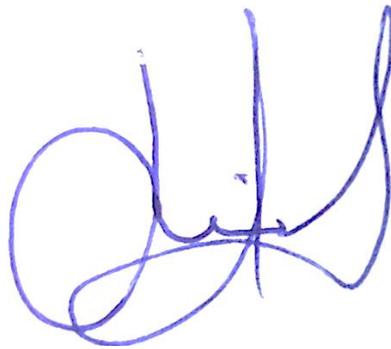
F:

Marjorie Janina Alvarado Lucero

C.I. 0704642818

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo de investigación fue desarrollado por **Marjorie Janina Alvarado Lucero** con número de cédula **0704642818** con el tema “**COMPARACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES EN LA CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE JAMBATO DE LAS TRES CRUCES DEL AZUAY**”, bajo mi supervisión.



MVZ. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN MSc

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DOCENTE DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

DEDICATORIA

Se la dedico esta tesis con mucho amor y cariño a mi madre, Zoila Victoria Lucero Marca, quien me ha acompañado en este arduo camino a pesar de la distancia. Quiero agradecerle infinitamente por siempre apoyarme en cada paso que he dado, por aconsejarme y consolarme en los momentos más duros durante la carrera, sin sus enseñanzas hoy no sería la persona que soy actualmente, con valores y principios. Gracias por todo mami, te amo mucho.

A mi hermana Paola y a mis sobrinos, Kevin y Madisson, quienes también han estado a mi lado dándome ánimos para seguir adelante.

También, quiero dedicarle este trabajo a mi pareja, mejor amigo y compañero de clase, Geovanny. Gracias por tu paciencia, comprensión y ayuda al momento de realizar esta tesis.

Finalmente, a todas aquellas personas, colegas y amigos que me brindaron su apoyo, para lograr este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte del proyecto denominado “Implementación de Técnicas de Reproducción Asistida en 3 especies de anuros de la provincia del Azuay” de la Universidad Católica de Cuenca. Agradezco a Jacky Arpi y a Fausto Siavichay pertenecientes al Centro de Conservación de Anfibios – AMARU por asesorarnos en el manejo de la especie *Atelopus nanay*. Finalmente, agradezco al Ing. Juan Alvarado y a mi tutor de tesis MVZ, MSc. Daniel Argudo Garzón por la colaboración y predisposición en la realización del proyecto.

Conflicto de Intereses: NO

ÍNDICE

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD	III
CERTIFICACIÓN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN	10
FUNDAMENTO TEÓRICO	11
Sistema Reprodutor Masculino en Ranas.....	11
<i>Atelopus nanay</i>	12
Hábitat y Biología	12
Distribución.....	13
Criopreservación de esperma.....	13
Crioprotectores.....	14
Análisis de la Orina Espermática.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Tratamiento Hormonal y Colecta de la Orina Espermática	16
Criopreservación de Orina Espermática de <i>Atelopus nanay</i>	17
Análisis Estadístico.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Peso de los animales usados en el experimento y proporción de colectas efectivas.....	19
Evaluación espermática pre congelación de las muestras colectadas	20
Comparación de la recuperación de espermatozoides luego de la criopreservación con cada crioprotector.....	22
Evaluación post congelación de los espermatozoides criopreservados con DMSO y DMA de <i>Atelopus nanay</i>	23
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	26
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	32

RESUMEN

La criopreservación es una de las técnicas más efectivas para el almacenamiento a largo plazo de muestras genéticas (gametos), en la que se puede utilizar crioprotectores para 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. El objetivo de este estudio fue analizar dos crioprotectores (DMSO y DMA) al 10% en la congelación de espermatozoides de la especie *Atelopus nanay* del Azuay. Se administró la hormona gonadotropina coriónica humana hCG, para la producción de espermatozoides en cuatro individuos. Los espermatozoides recolectados de forma no letal se criopreservaron y descongelaron para posteriormente ser evaluados. La utilización de los crioprotectores: 10% DMSO y 10% DMA, no mostraron diferencia estadística en la morfología. En el tratamiento con 10% DMSO en la integridad de la membrana plasmática tuvo $25,00 \pm 50,00\%$, y en la funcionalidad mitocondrial $37,50 \pm 47,87\%$. Por ende, el uso de ambos crioprotectores a una concentración del 10% no favoreció a la conservación de las características cinéticas y cualitativas.

Palabras clave: Criopreservación; Anfibios; Esperma; DMSO; DMA.

ABSTRACT

Cryopreservation is one of the most effective techniques for the long-term storage of genetic samples (gametes), in which cryoprotectants can be used to prevent the excessive accumulation of electrolytes and other substances during the freezing process and the creation of ice crystals that break the membrane structure. The objective of this study was to analyze two cryoprotectants, Dimethyl sulfoxide (DMSO) and Dimethylacetamide (DMA), at 10% in the freezing of spermatozoa from the species *Atelopus Nanay* of Azuay. The human chorionic gonadotropin hormone (hCG) was administered for sperm production in four individuals. The non-lethally collected spermatozoa were cryopreserved and unfrozen for subsequent evaluation. The use of cryoprotectants (10% DMSO and 10% DMA) showed no statistical difference in morphology. The 10% DMSO treatment showed $25.00 \pm 50.00\%$ in plasma membrane integrity and $37.50 \pm 47.87\%$ in mitochondrial functionality. Therefore, using both cryoprotectants at a concentration of 10% did not favor the preservation of the kinetic and qualitative characteristics.

Keywords: Cryopreservation; Amphibians; Sperm; DMSO; DMA.

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad de anfibios en el mundo, puesto que alberga a la tercera anfibiofauna más numerosa a nivel mundial con un total de 676 especies (hasta junio del 2023) (Ron et al., 2022). Sin embargo, un alto porcentaje de las especies están amenazadas por extinguirse debido a la intervención del hombre en la naturaleza, al expandir la frontera, realizar actividades mineras y petroleras, asentamientos humanos, lo que provoca la pérdida de hábitat de los anfibios (Ortega Andrade et al., 2021). Entre la lista de peligro crítico de extinción se encuentra la especie *Atelopus nanay* perteneciente a la familia Bufonidae, debido a que su rango de distribución es restringido y existe evidencia que sugiere la ocurrencia de disminuciones poblacionales significativas, la cual pudo haber sido afectado por patrones climáticos anormales y enfermedades como la quitridiomycosis, entre otras amenazas a esta especie son la degradación de su hábitat, el cual está afectado por la introducción de truchas (Ron et al., 2022).

Por ende, las técnicas de reproducción asistida (ART) desempeñan un papel fundamental en la lucha contra la pérdida de biodiversidad, como tal, el uso de ART (por ejemplo, estimulaciones hormonales exógenas) para recolectar gametos para fertilización in vitro y criopreservación representan una opción de suma importancia para ayudar a mantener poblaciones cautivas sanas a perpetuidad (Ortega Andrade et al., 2021).

La criopreservación es una de las técnicas más efectivas para la estabilización a largo plazo de muestras genéticas (gametos) (Zimkus et al., 2018). La criopreservación consiste en la recuperación de la motilidad y la capacidad de fertilización después de la descongelación (Browne et al., 1998), y depende del tipo y la concentración de la solución criodiluyente (Browne et al., 2002; Della Togna, 2015). Un criodiluyente está compuesto por crioprotectores penetrantes y no penetrantes, que permiten la supervivencia de espermatozoides a temperaturas ultrabajas (Clulow & Clulow, 2016). Informes anteriores mencionan el uso de dimetilsulfóxido, dimetilformamida, glicerol como crioprotectores penetrantes en velocidades de enfriamiento lenta (Hopkins & Herr, 2007). Los crioprotectores no penetrantes son los azúcares y las soluciones iónicas (Browne & Zippel, 2007). Los azúcares como la sacarosa, la glucosa o la trehalosa deshidratan los espermatozoides durante la congelación y el descongelamiento, y protegen la membrana del espermatozoide (De León et al., 2019).

Estudio realizado en la especie *Rhinella marina* por Proaño Olmos (2013), menciona que el uso de crioprotectores como es el DMSO a concentraciones de 5%, 10% y 15%, siendo la concentración del 10% la que protegió un mayor porcentaje de espermatozoides de la lisis celular, donde 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.

La criopreservación utilizando como crioprotector DMA al 6% en el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) desarrollado por Rivera Pacheco et al. (2021), indica ser eficiente manteniendo parámetros de viabilidad e integridad de la membrana plasmática.

En el presente estudio se utilizó a *Atelopus nanay* para la criopreservación de sus espermatozoides, en la que creemos que el uso de crioprotectores como es el dimetilsulfóxido (DMSO) en comparación con dimetilacetamida (DMA) cumplen la misma función como crioprotectores en el mismo, favoreciendo la conservación de las características cinéticas y morfológicas post congelación de espermatozoides. Por lo cual, el objetivo del presente estudio es analizar ambos crioprotectores en la congelación de espermatozoides de la especie *Atelopus nanay* del Azuay. Donde se evaluó la motilidad total, motilidad progresiva, concentración, volumen y pH del esperma fresco, y en el esperma congelado – descongelado, se evaluó anomalías, integridad de la membrana plasmática y por último la funcionalidad mitocondrial.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Sistema Reproductor Masculino en Ranas

En los anfibios, el sistema urogenital está conformado por los testículos unidos a los cuerpos grasos y los conductos accesorios (Wake, 1968). Los testículos están situados en la región ventral del riñón en la cavidad abdominal y los riñones están estrechamente unidos a los testículos por el mesenterio (Rastogi et al., 1988). Estas gónadas se clasifican en compartimento germinal y compartimento intersticial, el compartimento germinal engloba los túbulos seminíferos, la espermatogonia, los espermatoцитos, las espermátidas, los espermatozoides y las células de Sertoli, en cambio, el compartimento intersticial está conformado por fibras de colágeno, vasos sanguíneos, células de Leydig y tejido conectivo (de Oliveira et al., 2002; O’Connell, 2020). Los testículos de los anfibios suelen tener forma lobular, sin embargo, la forma de los testículos varía entre especies de ranas, por ejemplo, en

la rana de hoja mexicana son alargados y translúcidos durante la mayor parte del año, pero se vuelven gruesos y de color amarillo lechoso durante el verano (Rastogi et al., 1988).

El peso corporal graso, la testosterona plasmática y la espermatogénesis varían con la estacionalidad en *Pelophylax perezii* (Delgado et al., 1989). Se ha establecido que los cuerpos grasos representan una estructura anatómica importante para el transporte de lípidos hepáticos al testículo, puesto que la sangre es el canal principal entre el hígado y el cuerpo graso (Milone et al., 1989).

2.2. *Atelopus nanay*

Es un sapo pequeño de color negro y vientre crema con café perteneciente a la familia Bufonidae, presenta un cuerpo robusto, patas cortas y glándulas grandes en el dorso. Las especies más similares son *Atelopus ignescens*, *Atelopus bomolochos*, y *Atelopus boulengeri* (Coloma et al., 2000). Tiene un tamaño similar a *Atelopus exiguus*, de los Andes del sur ecuatoriano, en la provincia del Azuay pero difiere en coloración puesto que *Atelopus exiguus* tiene el dorso verde (en algunos individuos mezclado con negro), espículas amarillas en los flancos y vientre amarillo (Coloma et al., 2000; Coloma, 2002). La utilidad de la coloración para diferenciar ambas especies es dudosa puesto que se ha registrado individuos de *Atelopus nanay* de color negro y verde (Coloma et al., 2000).

Figura 1

Atelopus nanay



Nota. Imagen tomada de Ron et al. (2022)

2.2.1. Hábitat y Biología

Coloma (2002) menciona que la especie habita en páramos herbáceos, en la que algunos individuos fueron encontrados activos durante el día junto a riachuelos y vertientes, en un área con muchas pozas interconectadas, mientras que otros individuos estuvieron bajo piedras, además en Patúl (Provincia del Azuay) se observó a machos activos durante días lluviosos

junto a arroyos. Al igual que *Atelopus exiguus*, también se encuentran en acumulaciones de hojarasca en la base de matas herbáceas o bajo piedras cercanas.

2.2.2. Distribución

Atelopus nanay se distribuye en las estribaciones suroccidentales de la Cordillera de los Andes de Ecuador, se lo ha registrado únicamente en el Parque Nacional Cajas, en la laguna Toreadora y sus alrededores, en la provincia del Azuay a una altura de aproximada de 4000 m s. n. m. (Rueda Almonacid et al., 2005).

2.3. Criopreservación de esperma

Las técnicas de reproducción asistida (ART) con anfibios han sido el foco de investigación durante más de dos décadas desde el surgimiento de la crisis mundial de anfibios en los años 1970 y 1980 (Clulow et al., 2014). Algún tiempo después de que la disminución de los anfibios se hiciera evidente, comenzaron a surgir propuestas para el uso de tecnologías de reproducción asistida y criopreservación como herramientas de conservación de las especies (Clulow et al., 1999). La variedad de tecnologías incluye la inducción de gametos utilizando hormonas, fertilización in vitro (FIV), criopreservación celular y criopreservación de esperma e incluso el uso de procedimientos no convencionales para la manipulación de la reproducción como la transferencia nuclear (clonación) y la androgénesis (Clulow et al., 2014). De todas estas tecnologías, los avances más eficaces se han producido en las áreas de recolección no invasiva (no letal) de gametos y criopreservación de esperma (Clulow et al., 1999).

Actualmente la criopreservación es una técnica que consiste en mantener productos de material biológico a temperaturas extremadamente bajas, comúnmente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o incluso menos, ya sea durante días o años (Arav et al., 2002). El proceso comienza con una exposición hipotérmica, ya que normalmente se agrega una solución de crioconservación fría y se equilibra con el sistema celular, posteriormente, el sistema se enfría a través del continuo hipotérmico hacia su temperatura de punto final, donde finalmente, se alcanza el equilibrio cuando el sistema llega a un estado vítreo o vitrificado, luego, el sistema experimenta una reversión del proceso a medida que se descongela después de su intervalo de almacenamiento, además, es necesario 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).

En términos generales, la mayoría de protocolos de criopreservación de espermatozoides de anfibios han implicado la criopreservación de espermatozoides inactivados en criodiluyentes que contienen osmóticos no penetrantes de altas osmolalidad (medios isotónicos a hipertónicos); altas concentraciones de crioprotectores penetrantes como es el dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMFA); y velocidades de enfriamiento lentas, inferiores a $5 - 10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Clulow et al., 2014). Aunque se han desarrollado protocolos de criopreservación en anfibios a gran medida empíricamente por lo tanto las razones de las respuestas generalmente favorables a la criopreservación en condiciones de alta osmolalidad y enfriamiento lento no se han estudiado a detalle (Kouba et al., 2003).

2.4. Crioprotectores

Baust (2005) menciona que desde los primeros estudios sobre el uso del glicerol como crioprotector (CPA) en el proceso de la criopreservación ha sido efectivo tanto en espermatozoides aviares como en eritrocitos humanos, en la cual se han encontrado numerosos agentes para su uso como CPA; actualmente, los crioprotectores utilizados abarcan una diversidad de compuestos penetrantes (permeables a la membrana) y no penetrantes usados en un medio electrolítico tamponado.

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

Proaño Olmos (2013) en su estudio realizado de la especie *Rhinella marina*, en la que utilizó el crioprotector dimetilsulfóxido a concentraciones del 5%, 10% y 15%, para la criopreservación del esperma, menciona que la concentración del DMSO al 10% fue el que evitó un mayor porcentaje de lisis celular en espermatozoides y en la que los embriones con malformaciones se pudieron evidenciar en cada uno de los tres tratamientos, no obstante, la solución de DMSO al 15% produjo un 2.33% más de individuos malformados que el de control.

El dimetilacetamida (DMA) es utilizado comúnmente como crioprotector en la especie *Ambystoma mexicanum*, en la que Rivera Pacheco et al. (2021), en su proyecto usó una concentración del 6%, evidenciando ser eficiente en mantener los parámetros de viabilidad e integridad de la membrana plasmática.

2.5. Análisis de la Orina Espermática

Para la evaluación de la orina espermática (orina con presencia de espermatozoides) el volumen de esperma recuperado se mide con la micropipeta, donde la concentración de espermatozoides se evalúa mediante hemocitometría utilizando 10 μL de orina espermática siendo añadido a la cámara de Neubauer; el valor del pH se obtiene usando tiras indicadoras de pH 5.0 – 10.0; el porcentaje de motilidad total de espermatozoides es establecido enumerando todas las células con movimiento flagelar de un total de 100 células bajo un microscopio con un aumento de 40x; la motilidad progresiva hacia adelante (FPM) se calcula contando todas las células con motilidad progresiva hacia adelante en relación con 100 células que fueron expresando cualquier movimiento flagelar (Della Togna et al., 2017).

En la evaluación de la integridad de la membrana plasmática se utiliza la tinciones fluorescentes como es el Ioduro de Propidio, en la que se toma 50 μL de solución de espermatozoides y se coloca 1 μL de la tinción, en la que posteriormente se deja incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente para finalmente ser evaluado bajo un microscopio de fluorescencia, en la evaluación estos son considerados como vivos a los espermatozoides teñidos y como muertos a espermatozoides sin tinción (Proaño Olmos, 2013).

El fluorocromo Rodamina 123 es empleado para evaluar la funcionalidad mitocondrial en espermatozoides humanos y de animales domésticos (Anger et al., 1989; Evenson et al., 1982; Graham, 2001). Se toma 50 μL de esperma y se coloca 1 μL de tinción, en la que se deja incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente para luego ser evaluado bajo un microscopio de fluorescencia, esta tinción atraviesa en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior, al caer la luz láser sobre espermatozoides pigmentados con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia de color verde (Ericsson et al., 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se efectuó en el Centro de Conservación de Anfibios, la cual es una fundación parte del Zoológico de Cuenca y Bioparque Amaru, dedicada al monitoreo y manejo *in situ* y *ex situ* de anfibios del Ecuador, misma ubicada en la Autopista Cuenca – Azogues Km 10 ½ (sector hospital del río).

Los anfibios y las instalaciones donde éstos estuvieron alojados fueron provistos por el Centro de Conservación de Anfibios CCA-AMARU. En la que se escogió 4 individuos de la especie *Atelopus nanay* con el fin de realizar el tratamiento hormonal para la obtención de los espermatozoides donde en cada individuo se hizo 3 colectas con un descanso de al menos de 15 días entre colecta, para su posterior evaluación pre y post congelación utilizando como crioprotectores el dimetilsulfóxido (DMSO) y el dimetilacetamida (DMA) al 10%, siendo los 4 individuos la unidad experimental.

3.1. Tratamiento Hormonal y Colecta de la Orina Espermática

Previo al tratamiento hormonal, los cuatro individuos 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 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.

Figura 1

Administración de la hormona hCG por vía intraperitoneal en la especie *Atelopus nanay*



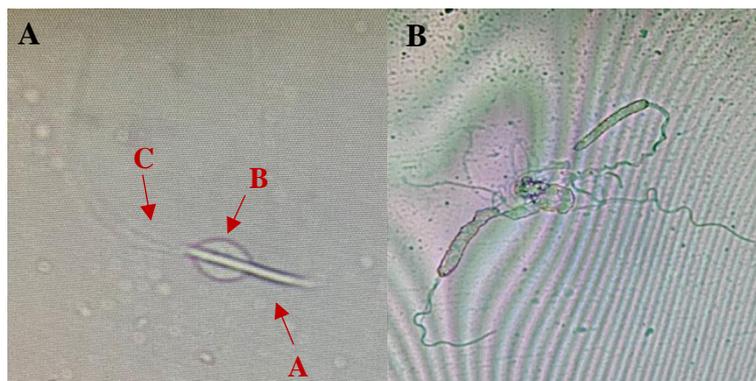
Nota. Fotografía tomada por el autor

En los intervalos de recolección (2 h 30 min y 3 h 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 suavemente 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 espermatozoide. Los análisis de motilidad se realizaron inmediatamente después de la recolección para reducir los posibles efectos del tiempo posterior a la recolección.

Figura 2

Espermatozoide de *Atelopus nanay*



Nota. Fotografía tomada por el autor. (A, B) Esperma fresco. Cabeza (A), vesícula mitocondrial (B) y cola (C).

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 diez 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.

3.2. Criopreservación de Orina Espermática de *Atelopus nanay*

A los machos se les administró por vía intraperitoneal 5 UI/g de peso corporal de hCG y se recogieron muestras a las 2 h 30 min y 3 h 30 min. Se diluyó la orina espermática en proporción 1:1 con Amphibian Ringer's solution (ARS), para posteriormente diluir en 1:1 con el crioprotector apropiado según el tratamiento (10% DMSO y 10% DMA) y cargado en pajuelas de Cassou de 0,25 ml con un volumen de entre 180 μ L a 210 μ L por pajuela. Se produjeron tres réplicas de pajuelas por tratamiento. Las pajuelas se congelaron en un termo con nitrógeno líquido. Cabe recalcar que las tres recolectas de espermatozoide de este experimento se

realizaron en diferentes fechas: 18/12/23; 26/2/24; 18/3/24, y la fecha de descongelación fue en abril del presente año.

Las pajuelas fueron descongeladas en agua a 5 °C para su posterior evaluación. Brevemente, la motilidad fue evaluada bajo el microscopio utilizando el lente de 40x, en el que se colocó 5 µL de la muestra en un portaobjetos.

La integridad de la membrana plasmática se evaluó con un ensayo de exclusión del colorante Ioduro de Propidio, la cual se utilizó 50 µL de muestra para mezclar con 1 µL del colorante, de esta solución se usó 15 µL entre cubre y portaobjetos para ser evaluado bajo un 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, la cual se siguió el mismo método utilizado con el colorante Ioduro de Propidio ya previamente mencionado. Se consideró que los espermatozoides con tinción positiva tenían mitocondrias funcionales (fluorescencia verde). Por el contrario, las mitocondrias no funcionales fueron caracterizados por tinción negativa de rodamina (sin fluorescencia).

En 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 3

Evaluación de la morfología del espermatozoide posterior a la descongelación-
Espermatozoides sin cabeza



Nota. Fotografía tomada por el autor

3.3. Análisis Estadístico

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

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1

Peso de los animales usados en el experimento y proporción de colectas efectivas

Individuo	N	Peso (gramos)	Colectas efectivas % (n)
1	3	3,16 ± 0,17 ^c	33,3 (1/3)
2	3	3,79 ± 0,12 ^b	66,7 (2/3)
3	3	4,17 ± 0,20 ^b	0,0 (0/3)
4	3	6,25 ± 0,29 ^a	33,3 (1/3)
Total	12	4,34 ± 1,22	33,3 (4/12)

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

Se utilizó cuatro individuos de la especie *Atelopus nanay*, en la que éstos tienen una edad de entre cinco a ocho años; de acuerdo con Attademo et al. (2014) sostiene que la edad de madurez sexual en *Leptodactylus mystacinus* fue de entre tres a cuatro años y en la especie *L. latinasus* indicaron una madurez sexual alcanzada a los tres años, los anuros usados en este experimento estaban en este rango de edad, por lo que fueron considerados aptos para realizar la criopreservación de sus espermatozoides.

En la tabla 1. muestra que el individuo cuatro fue el que mayor peso representó a diferencia del individuo uno, teniendo una diferencia numérica de 3,09 gramos entre ellos. En cambio los individuos que mostraron menor diferencia numérica en sus pesos fue entre el individuo uno y dos con 0,57 gramos de diferencia.

En la variable número de colectas efectivas se observa que solo un 33,3% se pudo coleccionar de entre todos los individuos, siendo el individuo número tres, el que no se logró coleccionar orina espermática, en comparación del individuo dos, el cual representa el 66,7% de las tres repeticiones que se realizó.

Comparando el peso con el número de colectas efectivas se observa que el individuo uno teniendo un peso promedio de 3,16gr y el individuo cuatro con 6,25gr, son los que representan un 33,3% de colectas efectivas. A comparación del individuo dos, que teniendo un peso promedio de 3,79gr representó el 66,7% del número de colectas efectivas, dando a entender que el individuo dos es el mejor de los tres individuos sin importar su peso.

No se ha documentado la relación entre peso y número de colectas efectivas en anfibios, por esta razón nos permitimos citar a Bastardo et al. (2004) los cuales realizaron su estudio en truchas de entre tres a cuatro años, en la que se presentaron espermatozoides con un mayor movimiento progresivo lineal (MPL) (superior de 80%) que la de dos y cinco años en las que el MPL está por debajo del 50%. Estos resultados señalan que los espermatozoides de los machos más jóvenes y los más viejos disminuyen el MPL, además mencionan que el volumen del semen de las truchas de dos años de edad fue significativamente menor que el volumen del semen de los machos de tres, cuatro y cinco años ($P < 0,05$), mientras que entre estas últimas edades no se encontraron diferencias. Como afirma Bastardo (1992) encontró que los machos jóvenes de la especie *Oncorhynchus mykiss* (dos y tres años) presentaron un volumen de semen significativamente más bajo que los de cinco años, esa investigación se desarrolló a lo largo de un ciclo reproductivo anual, evaluando los mismos reproductores.

Tabla 2

Evaluación espermática pre congelación de las muestras coleccionadas

Variable	N	X ± DE	Min	Max
Motilidad Total (%)	4	100 ± 0,00	100,00	100,00
Motilidad Progresiva (%)	4	87,5 ± 15,00	70,00	100,00
Volumen (microlitros)	4	55,5 ± 16,78	34,00	75,00
Concentración (spz/ mL)	4	52250 ± 16938	34000,00	75000,00
pH	4	7,00 ± 0,00	7,00	7,00

N=Número de repeticiones.

Después de haber pasado las 2 h 30 min de haber aplicado la hormona hCG con una dosis de 5 UI/g de peso, se procedió a evaluar la orina espermática antes de la congelación de los mismos. En la Tabla 2 se observa que el % de motilidad es de 100 %, lo cual representa un valor sumamente bueno.

En la motilidad progresiva demuestra que un promedio de 87,5% en los cuatro individuos. El volumen es representado por microlitros, la cual tuvo un min. de 34,0 y un máx. de 75,0 teniendo un promedio de 55,5. El pH arrojó un valor de 7 en todos los individuos.

La concentración de la orina espermática tuvo un promedio de 52250 spz/mL, teniendo un máximo de 75000,00 y un mínimo de 34000,00 espermatozoides por mililitro de semen.

De acuerdo con Hinkson et al. (2019) en la especie *Rhaebo guttatus*, se observó diferencias significativas entre los tres tratamientos en términos de motilidad total y movimiento progresivo, con 10 UI/g de peso de hCG superando las 7,5 UI/g de peso de hCG ($p = 0,015$ y $p = 0,016$, respectivamente) y GnRH ($p < 0,001$, ambas métricas) y 7,5 UI/g de peso de hCG que exceden la GnRH ($p = 0,006$ y $p = 0,002$, respectivamente). 10 UI/g de peso de hCG provocaron la liberación de espermatozoides significativamente más concentrados que 7,5 UI/g de peso de hCG ($p = 0,018$) y GnRH ($p < 0,001$), pero no existieron diferencias entre estos últimos tratamientos ($p = 0,12$), en conjunto, estos resultados muestran que, de los tres tratamientos, la administración de 10 UI/g de peso de hCG es el método más eficaz para recolectar espermatozoides de alta calidad de *R. guttatus*, además cuando se utiliza este método, entre dos y cinco horas después de la inyección parece ser cualitativamente el mejor momento para recolectar espermatozoides altamente concentrados y que se mueven hacia adelante; curiosamente, se descubrió que algunos individuos todavía producían espermatozoides hasta 24 h después de la inyección.

Estudios en anuros muestran un pH más alto (7.1 – 7.8) en la orina espermática que el de la orina (pH 6.7 – 6.8) (Browne et al., 2019).

Hobbs et al., (2023) realizó un estudio en la especie *Litoria booroolongensis* en la que se evaluó orina espermática combinada de varios machos, teniendo como resultado en la motilidad total 87%, motilidad progresiva 82%, concentración de espermatozoides 15.2×10^6 spz/mL, en un grupo de tres.

Es importante mencionar que existe factores que afectan 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). La motilidad de los espermatozoides de algunos peces de agua dulce se encuentra influenciada por la concentración extracelular de electrolitos (Alavi & Cosson, 2006). La motilidad de los espermatozoides se va a activar cuando los mismos pasen de la alta osmolalidad de los testículos a la baja osmolalidad del ambiente de agua dulce (Clark, 1997).

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	3	33,3
Total	18	7	38,9

Pajuelas= número de pajuelas que fueron congeladas/descongeladas.

En el tratamiento uno, con dimetilsulfóxido (DMSO), el número total de pajuelas fue de nueve en la que solo se recuperaron espermatozoides de cuatro pajuelas lo que representa el 44,4%, esto fue debido a que en las cinco restantes pajuelas no se encontró presencia de espermatozoides aún cuando se centrifugó; según Proaño & Pérez (2017) la centrifugación se utiliza para concentrar los espermatozoides de la orina espermática, para eliminar los componentes proteicos y lipídicos de las suspensiones de espermatozoides frescos y después de la descongelación de acuerdo con Upton et al. (2018) mencionan que es para eliminar los criodiluyentes.

En cuanto al tratamiento dos, con dimetilacetamida (DMA), solo el 33,3% de pajuelas se pudo recuperar, ya que por la misma razón del DMSO, no se encontró espermatozoides en las sies restantes pajuelas. Por lo tanto, en el tratamiento con DMSO, fue el que mayor número de pajuelas se pudo recuperar, numéricamente tienen una diferencia del 11,1% con DMA, sin embargo, no existió una diferencia estadística significativa.

Por otra parte los procesos de congelación y descongelación aplicados durante la criopreservación pueden causar daños funcionales y morfológicos al espermatozoide, perjudicando la supervivencia post-descongelación y la posterior fertilización (Bailey et al.,

2003; Vajta G & Kuwayama, 2006). En el daño celular se incluye la degradación de la membrana, el desprendimiento o deterioro de la cabeza y/o la cola y la fragmentación del ADN, todo lo cual 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 G & Kuwayama, 2006). Para moderar los efectos nocivos de la criopreservación sobre los espermatozoides, se pueden agregar agentes crioprotectores (CPA) para compensar la formación de cristales de hielo aumentando la concentración de solutos del ambiente extracelular, aumentando así la tasa de deshidratación celular (Kopeika et al., 2015; Mazur, 1970; Pegg, 2015).

Tabla 4

Evaluación post congelación de los espermatozoides criopreservados con DMSO y DMA de *Atelopus nanay*

Tratamiento	N	Anormalidades	Int. Membrana	Func. Mitocondrial
DMSO	4	42,75 ± 17,05	25,00 ± 50,00	37,50 ± 47,87
DMA	3	56,33 ± 11,50	00,00 ± 00,00	00,00 ± 00,00

N=Número de pajuelas que fueron descongeladas.

En la tabla 4. la variable de anomalidades no mostró diferencia estadística entre tratamientos. Además se debe tener en cuenta, las variables integridad de la membrana plasmática y funcionalidad mitocondrial solo se pudo evaluar en pajuelas con tratamiento DMSO, ya que en con DMA, no se encontró presencia de espermatozoides, razones ya explicadas anteriormente de acuerdo a (Bailey et al., 2003; Vajta G & Kuwayama, 2006).

Un estudio de criopreservación usando CPA como DMSO y DMF en sapos de Fowler (*Anaxyrus fowleri*) por Burger et al. (2022), obtuvieron resultados en muestras de esperma congeladas-descongeladas en la variable de morfología, teniendo un número significativamente mayor de espermatozoides con cabezas anormales (df = 9, t = 3,7, P = 0,005), colas (df = 9, d = 3,4, P = 0,002) o ambas (df = 9, t = 7,2, P < 0,001) en comparación con muestras frescas de esperma (23 ± 1 %, 37 ± 2 % y 27 ± 2 % frente a 14 ± 2 %, 11 ± 3 % y 10 ± 2 %, respectivamente).

En la criopreservación utilizando como crioprotector DMA en el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) desarrollado por Rivera Pacheco et al. (2021), indica que la morfología espermática normal mostró una disminución ($P < 0.05$) de aproximadamente el 15%, encontrando porcentajes del 98% en morfología normal de espermatozoides frescos y del 83% post descongelación.

Fitzsimmons et al. (2007), realizaron un estudio de la especie *Bufo marinus*, en la que se evaluó la integridad de la membrana plasmática, probando tres tinciones, a saber, Hoechst 33258 (H58), yoduro de propidio (PI) y azul tripán (TB), como indicadores de la integridad de la membrana plasmática después de haber realizado la criopreservación, donde los espermatozoides fueron sometidos a diferentes protocolos de crioconservación que involucraban una variedad de crioprotectores, como DMSO, glicerol, etilenglicol y propilenglicol, en un rango de concentraciones del 10% al 20%, y criodiluyentes (SAR; sacarosa, sacarosa con yema de huevo y glucosa; sacarosa y glucosa), es importante mencionar que antes de evaluar la integridad de la membrana plasmática, como control positivo, los espermatozoides en SAR fueron matados con calor antes de ser analizados con cada tinción, posteriormente, el análisis de los datos mostró que TB, el marcador no fluorescente, tiñó menos espermatozoides que los dos marcadores fluorescentes ($P < 0,05$), y no hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con tinción positiva entre los dos marcadores fluorescentes pero hubo fuertes correlaciones en el número de espermatozoides teñidos entre todos los pares de tinciones (H58:TB, $r^2 = 0,993$; PI: H58, $r^2 = 0,980$; TB: PI, $r^2 = 0,993$).

El estudio realizado por Varela et al. (2012), en la especie *Colossoma macropomum*, detalla los porcentajes más bajos de funcionalidad mitocondrial ($P < 0,001$) se dieron en muestras congeladas con glicerol, DMSO, 8% MF, 11% DMA y con las tres amidas probadas al 2%.

5. CONCLUSIONES

El uso de crioprotectores como es el dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA) a una concentración del 10% en la especie *Atelopus nanay*, no cumplió su función de evitar la formación de cristales durante la congelación para posteriormente producir un daño celular en el esperma, sugiriendo realizar estudios con diferentes concentraciones a las utilizadas en el presente estudio, ya que, con esta concentración no se obtuvo buenos resultados. Es importante recalcar que además de esto, no se pudo tener una evaluación completa de todas

las pajuelas, ya que no hubo presencia de espermatozoides al momento de descongelar, esto puede ser debido a que, durante los procesos de congelación y descongelación aplicados durante la criopreservación, estos causan daños funcionales y morfológicos al espermatozoide, perjudicando la supervivencia post descongelación y la posterior fertilización.

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.
- Anger, J., Ronot, X., & Dadoune, J. (1989). Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J. Androl*, 10, 439-448.
- 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.
- Attademo, A. M., Bionda, C., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Seib, S. N., Basso, A., & Junges, C. M. (2014). Edad, tamaño corporal en la madurez sexual, longevidad y potencial reproductivo de *Leptodactylus latinasus* y *Leptodactylus mystacinus* en un cultivo de soja y un bosque nativo del centro este de Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 315-317.
- Bastardo, H. (1992). Semen de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Concentración y volumen durante un período reproductivo en Mérida, Venezuela. *Veterinaria Trop*, 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), 277-288.
- Baust, J. (2005). Advances in Media for Cryopreservation and Hypothermic Storage. *BioProcess International Supplement*, 46-56.
- Browne, R. K., & Zippel, K. (2007). Reproduction and Larval Rearing of Amphibians. *ILAR Journal*, 48(3), 214-234.
- Browne, R. K., Clulow, J., Mahony, M., & Clark, A. (1998). Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm. *Cryobiology*, 37(4), 339-345.
- Browne, R. K., Davis, J., Clulow, J., & Pomeroy, M. (2002). Storage of cane toad (*Bufo marinus*) sperm for 6 days at 0°C with subsequent cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(5), 267-273.

- Browne, R., Silla, A., Upton, R., Della Togna, G., Marcec Greaves, R., Shishova, N., . . . McGin. (2019). Sperm collection and storage for the sustainable management of amphibian biodiversity. *Theriogenology*, *133*, 187-200.
- Burger, I., Lampert, S., Kouba, C., Morin, D., & Kouba, A. (2022). Development of an amphibian sperm biobanking protocol for genetic management and population sustainability. *Conservation Physiology*, *10*(1).
- 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., & Clulow, S. (2016). Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles: bringing the ARTs up to speed. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(8), 1116-1132.
- Clulow, J., Mahony, M., Browne, R., Pomeroy, M., & Clark, A. (1999). Applications of assisted reproductive technologies (ART) to endangered anuran amphibians. En *Declines and disappearances of Australian frogs* (págs. 219-25). Canberra: Environment Australia.
- Clulow, J., Trudeau, V. L., & Kouba, A. (2014). Amphibian declines in the twenty-first century: why we need assisted reproductive technologies. En *Reproductive Sciences in Animal Conservation* (págs. 275–316). New York: Springer.
- Coloma, L. (2002). Two species of *Atelopus* (Anura: Bufonidae) from Ecuador. *Herpetologica*, *58*(2), 229–252.
- Coloma, L., Lötters, S., & Salas, A. (2000). Taxonomy of the *Atelopus ignescens* complex (Anura: Bufonidae): designation of a neotype of *Atelopus ignescens* and recognition of *Atelopus exiguus*. *Herpetologica*, *56*(3), 303-324.
- De León, M., Zumbado Ulate, H., García Rodríguez, A., Alvarado, G., Sulaeman, H., Bolaños, F., & Vredenburg, V. (2019). Batrachochytrium dendrobatidis infection in amphibians predates first known epizootic in Costa Rica. *PLoS ONE*, *14*(12), e0208969.
- de Oliveira, C., Zanetoni, C., & Zieri, R. (2002). Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia Anura). *Revista chilena de anatomía*, *20*(3), 263–8.

- Delgado, M. J., Gutiérrez, P., & Alonso Bedate, M. (1989). Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. *General and Comparative Endocrinology*, 73(1), 1-11.
- Della Togna, G. (2015). *Structural and Functional Characterization of the Panamanian Golden Frog (Atelopus Zeteki) Spermatozoa - Impact of Medium Osmolality and Cryopreservation on Motility and Cell Viability*. University of Maryland.
- Della Togna, G., Trudeau, V. L., 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.
- Ericsson, S. A., Garner, D. L., Thomas, C. A., Downing, T. W., & Marshall, C. E. (1993). Interrelationships among fluorometric analysis of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 33, 1211-1220.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. R. (1982). Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem*, 30(3), 279-80.
- Fitzsimmons, C., Mahony, M. J., & Clulow, J. (2009). 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).
- Graham, J. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci*, 47(2), 407-408.
- Hinkson, K. M., Baecher, J. A., & Poo, S. (2019). Cryopreservation and hormonal induction of spermic urine in a novel species: The smooth-sided toad (*Rhaebo guttatus*). *Cryobiology*, 89, 109-111.
- Hobbs, R., Upton, R., Calatayud, N., Silla, A., Daly, J., McFadden, M., & O'Brien, J. (2023). Cryopreservation Cooling Rate Impacts Post-Thaw Sperm Motility and Survival in *Litoria booroolongensis*. *Animals*, 13(19), 3014.

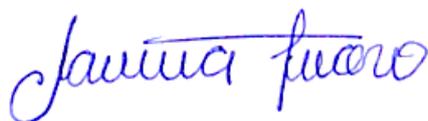
- Hopkins, B. K., & Herr, C. (2007). 78 Cryopreservation of frog (*Rana pipiens*) sperm cells collected by non-lethal methods. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 120.
- Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos : 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. *Journal of Experimental Zoology*, 295A(2), 172-182.
- Mazur, P. (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 168, 939–949.
- Milone, M., Filomena Caliendo, M., Rastogi, R. K., Varriale, B., Pierantoni, R., & Chieffi, G. (1989). Temporal pattern of labeling of liver, blood, fat body and testis lipids in *Rana esculenta*. *Bollettino di zoologia*, 57(2), 125-130.
- Moo Young, M. (2019). *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier.
- O’Connell, L. A. (2020). Frank Beach Award Winner: Lessons from poison frogs on ecological drivers of behavioral diversification. *Hormones and Behavior*, 126, 104869.
- Ortega Andrade, M., Rodes Blanco, M., Cisneros Heredia, D., Guerra Arévalo, N., López de Vargas Machuca, K., Sánchez Nivicela, J., . . . Székely. (2021). Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PLoS ONE*, 16(5).
- Pegg, D. (2015). Principles of Conservation. In WF Wolker, H Olden- hoff, eds, Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Humana Press, Third Edition*, 3-19.
- Porcu, E. (2001). Oocyte Criopreservation. 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.
- R. Ron, S., Merino Viteri, A., & Ortiz, D. (2022). *Anfibios del Ecuador. Version 2022.0*. Recuperado el marzo de 2023, de Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/>
- Rastogi, R. K., Bagnara, J. T., Iela, L., & Krasovich, M. A. (1988). Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: A light and ultrasonic study. *Journal of morphology*, 197(3), 277–302.
- 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.
- Rueda Almonacid, J. V., Rodríguez Mahecha, J. V., Lötters, S., Kahn, T., Angulo, A., & La Marca, E. (2005). *Ranas Arlequines*. Bogotá, Colombia: Conservación Internacional. Panamericana Formas e Impresos S. A.
- 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, A. S., Corcini, C., Gheller, S., Jardim, R., Lucia, T., Streit, D., & Figueiredo, M. (2012). Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*, 78(2), 244-251.
- 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.
- Wake, M. (1968). Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonads and the fat bodies. *Journal of morphology*, 126(3), 291–331.

Zimkus, B., Hassapakis, C., & Houck, M. (2018). Integrating current methods for the preservation of amphibian genetic resources and viable tissues to achieve best practices for species conservation. *Amphibian and Reptile Conservation*, 12(2), 1-27.

Marjorie Janina Alvarado Lucero portadora de la cédula de ciudadanía N° **0704642818**. En calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Comparación de dos crioprotectores en la congelación de espermatozoides de Jambato de las Tres Cruces 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:

Marjorie Janina Alvarado Lucero

C.I. 0704642818