

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“EVALUACIÓN DE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN FRESCO PARA
LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE TAPIR AMAZONICO
(*Tapirus terrestris*)”**

“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista”

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTOR: ESTEBAN SANTIAGO GUEVARA MIÑACA

TUTOR: DR. ROBERTO ALMEIDA

CEVALLOS– ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El suscrito, ESTEBAN SANTIAGO GUEVARA MIÑACA, portador de cédula identidad número: 060431747-9 libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EVALUACIÓN DE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN FRESCO PARA LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE TAPIR AMAZONICO (*Tapirus terrestris*)” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

.....
ESTEBAN SANTIAGO GUEVARA MIÑACA

C.I. 060431747-9

DERECHO DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EVALUACIÓN DE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN FRESCO PARA LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE TAPIR AMAZONICO (*Tapirus terrestris*)” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

.....
ESTEBAN SANTIAGO GUEVARA MIÑACA

C.I. 060431747-9

**“EVALUACIÓN DE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN FRESCO PARA LA
CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE TAPIR AMAZONICO (*Tapirus terrestris*)”
REVISADO POR:**

.....
DR. ROBERTO ALMEIDA
TUTOR

.....
ING. LUCIANO VALLE
ASESOR DE BIOMETRÍA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

FECHA

.....
Ing. Mg. Hernán Zurita
PRESIDENTE TRIBUNAL

.....

.....
Méd. Mg. Gerardo Kelly
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

.....
Dr. Mg. Darwin Villamarín
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

ÍNDICE

Contenido

CAPÍTULO I.....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
CAPÍTULO II	13
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO	13
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	13
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL	21
CAPÍTULO III	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
3.1. HIPÓTESIS.....	32
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	32
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
CAPÍTULO IV	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	33
4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	33
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES	34
4.4. FACTORES EN ESTUDIO.....	35
4.5. TRATAMIENTOS	36
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	36
4.7. VARIABLE RESPUESTA.....	36
4.8. Metodología	38
CAPÍTULO V	42
RESULTADOS Y DISCUSION	42
CAPÍTULO VI.....	45
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	45
6.1. CONCLUSIONES	45

6.2. BIBLIOGRAFÍA	46
6.3. ANEXOS	56
CAPÍTULO VII.....	60
7. PROPUESTA	63
7.1. DATOS INFORMATIVOS	63
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	63
7.3. JUSTIFICACIÓN	63
7.4. OBJETIVOS	64
7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	64
7.6. FUNDAMENTACIÓN.....	64
7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	65
7.8. ADMINISTRACIÓN.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes Botu-crio®	22
Tabla 2. Componentes EquiPlus Freeze®.....	23
Tabla 3. Condiciones meteorológicas	33
Tabla 4. Criopreservantes congelación	36
Tabla 5. Evaluación espermática motilidad masal	37
Tabla 6. Análisis espermático de motilidad individual	38
Tabla 7. Analisis de las características seminales de semen fresco.	42
Tabla 8. Análisis de T de Student de la calidad seminal post descongelación utilizando diferentes diluyentes equinos	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Toma de datos: post descongelación.....	56
Anexo 2. Motilidad espermática Total (%).....	57
Anexo 3. Motilidad espermática individual (%).....	57
Anexo 4. Vitalidad: espermatozoides vivos (%).....	58
Anexo 5. Vitalidad: espermatozoides muertos (%).....	58
Anexo 6. Alteraciones morfológicas: normales (%).....	59
Anexo 7. Alteraciones morfológicas: anormales (%).....	59
Anexo 8. Gráficos.....	60

RESUMEN

La presente investigación evaluó la eficiencia de dos criopreservantes espermáticos del Tapir amazónico (*Tapirus terrestris*), en el Zoológico de Tarquí, provincia de Pastaza. Para la toma de muestra el paciente fue anestesiado utilizando una combinación de medetomidina 0,03 mg/kg, butorfanol 0,15 mg/kg, atropina 0,03 mg/kg y ketamina 0,5 mg/kg, administrados por vía intramuscular. El eyaculado se obtuvo mediante electroeyaculación liberando cargas que aumentaron gradualmente de 2 a 6 V. En semen fresco se determinó el volumen seminal de 13 ml, pH de 7, concentración espermática de $141 \times 10^6/\text{ml}$, motilidad total de 65%, motilidad individual de 60% y porcentaje de células morfológicamente anormales del 28%. En la crioconservación se utilizó un esquema de investigación T-TEST para muestras emparejadas con dos tratamientos y nueve repeticiones para cada uno, se centrifugó la muestra formando un pellet que se diluyó con Botu-Crio® y EquiPlus Freeze®, se congeló a vapores de nitrógeno líquido. Se obtuvo eyaculado de un macho Tapir amazónico con los siguientes resultados: criopreservación con Botu-Crio® tuvo mejores resultados que EquiPlus Freeze®, observando diferencias significativas ($p < 0,05$) en las variables de motilidad espermática y vitalidad post descongelación. Estos resultados son importantes para la reproducción de estos animales en cautiverio y su introducción a la vida silvestre, debido a que este mamífero se encuentra en vías de extinción y así poder conservar el esperma como un recurso genético.

Palabras clave: Congelación, electroeyaculación, criopreservación, características seminales.

ABSTRACT

The present investigation evaluated the efficiency of two sperm cryopreservants of the Amazon Tapir (*Tapirus terrestris*), in the Zoo Tarqui, province of Pastaza. For sampling, the patient was anesthetized using a combination of medetomidine 0.03 mg / kg, butorphanol 0.15 mg / kg, atropine 0.03 mg / kg and ketamine 0.5 mg / kg administered intramuscularly. The ejaculate was obtained by electroejaculation releasing loads that gradually increased from 2 to 6 V. In fresh semen the seminal volume of 13 ml, pH of 7, sperm concentration of 141×10^6 / ml, total motility of 65%, individual motility was determined of 60% and percentage of morphologically abnormal cells of 28%. In the cryopreservation, a T-TEST research scheme was used for paired samples with two treatments and nine repetitions for each, the sample was centrifuged to form a pellet that was diluted with Botu-Crio® and EquiPlus Freeze®, frozen to vapors of liquid nitrogen. The ejaculate of an Amazon Tapir male was obtained with the following results: cryopreservation with Botu-Crio® had better results than EquiPlus Freeze®, observing significant differences ($p < 0.05$) in the variables of sperm motility and post-thaw vitality. These results are important for the reproduction of these animals in captivity and their introduction to wildlife, because this mammal is in danger of extinction and thus be able to preserve sperm as a genetic resource.

Keywords: Freezing, electroejaculation, cryopreservation, seminal characteristics.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país pequeño en superficie, pero con una biodiversidad biológica de las más ricas del planeta, favorecido por factores como la variedad de regiones climáticas que lo convierte en uno de los países con más ecosistemas en el mundo, y diferentes ambientes naturales. En el caso específico de los mamíferos, Ecuador ocupa el noveno puesto en el mundo, detrás de países como Brasil, China, México, Indonesia, Perú y Colombia. Por esta razón Ecuador es considerado como uno de los 17 países biológicamente megadiversos del planeta (Mittermeier, Robles, & Goetsch-Mittermeier, 1997).

El área con mayor diversidad de mamíferos en el Ecuador es el Trópico Amazónico, con 206 especies que representan el 51% de la mastofauna nacional. La disminución y fragmentación de hábitats, la inserción de especies exóticas y la cacería indiscriminada son actividades humanas con mayor incidencia en la disminución de las especies de mamíferos silvestres y por esta razón su extinción (Tirira, Burneo, & Montoya, 2011).

El tapir, así como otras variedades de fauna han estado muy relacionadas con las comunidades nativas, identificando la importancia del consumo de esta especie silvestre en la dieta de varias etnias (puede llegar al 20% de aporte proteico diario), así como también con fines curativos, prácticas ancestrales y cacería para demostrar jerarquías. Por estas razones esta especie tiene una alta importancia social y cultural en estas regiones (CONANP, 2009).

Sin embargo estas actividades no han sido controladas eficazmente y han vulnerado las poblaciones de esta especie produciendo un descenso del 30% en los últimos 33 años (Bennett & Saunders, 2010). Por este motivo, el libro rojo de los mamíferos del Ecuador, manifiesta que en nuestro país es una especie catalogada en peligro de extinción, por lo que podría desaparecer en los próximos 25 años (Nogales et al., 2011).

Bajo este escenario de riesgo el *Tapirus terrestris*, ha sido estudiado ampliamente en el medio silvestre (Fontana et al., (2017), Noss et al., (2003), Richard & Juliá (2000)), sin embargo el conocimiento sobre su biología reproductiva aún es escasa (Pukazhenthí et al., (2011), Tipkantha et al., (2011)), tomando en cuenta que esta información es fundamental para desarrollar programas de conservación genética para obtener poblaciones autosostenibles en cautividad con fines de reinsertar a esta especie a la vida silvestre (Castellano & Brito, 2017).

En consecuencia, el objetivo de este estudio es determinar el efecto de la criopreservación de semen fresco de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) para la conservación de su germoplasma.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En el estudio “Características eyaculantes del tapir malayo (*Tapirus indicus*)”, el objetivo fue optimizar la recolección de semen con ayuda de la electroeyaculación y evaluar las características del eyaculado en el tapir malayo. Se anestesiaron 8 machos adultos (4-20 años de edad) utilizando una combinación de medetomidina, butorfanol tartrato y Ketamina HCl, administrado intramuscularmente. Los valores promedios obtenidos de los rasgos seminales (volumen, pH, osmolalidad, concentración espermática, motilidad espermática total y viabilidad) fueron $10,3 \pm 9,4$ ml, $7,4 \pm 3,4$, $278,6 \pm 13,3$ mOsm, $206,2 \pm 185,4 \times 10^6$ espermatozoides/ml, $24 \pm 15,4\%$, y $35,1 \pm 6,5\%$, respectivamente. El análisis morfológico mostró un bajo porcentaje de espermatozoides normales $6,7 \pm 2,6\%$ con $39,2 \pm 8,5\%$ de acrosomas intactos. Los resultados proporcionaron información fundamental para el desarrollo de tecnologías de reproducción asistida en esta especie (Tipkantha W et al., 2011).

En un estudio realizado sobre la biología reproductiva del tapir centroamericano (*Tapirus bairdii*), se evaluaron las características seminales en semen fresco y post-descongelación y la eficacia de 2 criodiluyentes en las características espermáticas. Para la criopreservación, se evaluaron los eyaculados con una movilidad total de esperma $> 50\%$ y se suspendieron los sedimentos de esperma en Botu-Crio e INRA 96, fueron criopreservados en vapor de nitrógeno líquido. La criopreservación en Botu-Crio resultó en un descenso ($P < 0,05$) en el porcentaje de motilidad espermática e integridad acrosoma. La progresión hacia adelante del esperma no se afectó inmediatamente después del descongelamiento en el INRA 96, pero siguió disminuyendo con el tiempo. Esta información fue fundamental para el desarrollo de tecnologías de reproducción asistida para el tapir de Bairdii (Pukazhenthii et al., 2011).

El estudio titulado “Una revisión de la biología reproductiva y manejo de la cría de tapires”, se obtuvieron eyaculados de buena calidad a través de electroeyaculación en el tapir centroamericano y malayo, el esperma del tapir centroamericano criopreservado usaron criodiluyentes estándar, obteniendo resultados poco satisfactorios necesitando optimizar estos protocolos. La optimización de las tecnologías de reproducción asistida, incluida la criopreservación de espermatozoides y la inseminación artificial, podría beneficiar la gestión genética de los tapires (Pukazhenthil B et al., 2013).

El objetivo del estudio “Una técnica simple y amigable para la crioconservación de semen de elefantes asiáticos (*Elephas maximus*)”, fue investigar los efectos *in vitro*, de tasas de congelación y descongelación, así como el almacenamiento durante 24 h a 4 ° C antes de la crioconservación en la calidad del esperma post descongelación en elefantes asiáticos. La temperatura de descongelación no tuvo ningún efecto sobre la calidad del semen post descongelación, sin embargo lo que resultó en una calidad superior del semen post-descongelamiento fueron las pajuelas congeladas a velocidades rápidas. Los resultados obtenidos indican que enfriar semen extendido en un equitainer y crioconservados en pajillas directamente es una técnica simple para criopreservar semen de elefante en el campo o el zoológico (Danielle, Gray, Roth, Mitchell, & Graham, 2017).

El estudio realizado por Castelo et al., (2010) tiene como objetivo evaluar el efecto de la centrifugación para la eliminación del plasma seminal y la suplementación de fructosa o glucosa al extensor basado en Tris en los patrones cinemáticos de los parámetros de motilidad del semen congelado-descongelado obtenido de los pecaríes cautivados (*Tayassu tajacu*). Recogiendo 14 muestras de 10 pecaríes machos sexualmente maduros mediante la electroeyaculación. El resultado obtenido fueron poco satisfactorio, no se recomienda centrifugar los eyaculados de los pecaríes con cuello antes de realizar los procedimientos de crioconservación utilizando un extensor basado en Tris suplementado con fructosa o glucosa.

El estudio “Criopreservación de semen y capacidad de reducción radical del líquido seminal en el león africano cautivo (*Panthera leo*)”, se investigó la optimización de los protocolos de

criopreservación para felinos salvajes. En el estudio se describe diferentes técnicas de crioconservación simple para los eyaculados de león, que se probó con diferentes opciones de envasado y diferentes números de espermatozoides por dosis, con ayuda para la extracción de semen por electroeyaculación. Se congelaron alícuotas de 300 μ L que contenían 20×10^6 espermatozoides en crioviales y en pajuelas de 0,5 mL. Se observaron diferencias en la motilidad total después de la descongelación entre el vial ($31.5 \pm 14.1\%$) y la congelación de paja ($20.1 \pm 8.6\%$). Los resultados post-descongelamiento fueron altamente variables (2,2% y 56,5% de motilidad total). Para caracterizar aún más la calidad del semen, se evaluó el potencial protector del fluido seminal contra el estrés oxidativo, que podría ser cuestionado post descongelación. Esta fue la primera evaluación de líquido seminal que puede afectar el potencial de congelación de los eyaculados leones africanos (Luther et al., 2016).

El objetivo del estudio “Criopreservación de semen de pecarí de collar (*Pecari tajacu*) usando diferentes curvas de congelación, tamaños de pajuelas y tasas de descongelación”, fue verificar el efecto de diferentes curvas de congelación, volumen de envasado en pajuelas y tasas de descongelación en la crioconservación de semen de pecarí. Se obtuvieron doce eyaculados de machos adultos cautivos por electroeyaculación y se evaluó las características seminales. Los eyaculados se diluyeron en agua de coco (ACP-116c) con yema de huevo y glicerol, envasados en 0,25 ml o pajuelas de plástico de 0,50 ml y crioconservados en nitrógeno líquido. Los resultados obtenidos de los valores de las características de los espermatozoides encontrados después de la descongelación a 37 °C fueron mejor conservados que a 70 °C ($P < 0,05$), tanto en el uso de pajillas de 0,25 ml como de 0,50 ml, que fueron similares para el envasado de semen ($P > 0,05$). El investigador recomienda el uso de una curva de congelación rápida que reduce el tiempo empleado en la crioconservación de semen de pecarí, pero la descongelación debe realizarse a 37 °C / 1 Min (Silva et al., 2013).

En la investigación sobre “Interacción de la composición de diluyentes y el método de congelación para una crioconservación efectiva de semen en la nutria de río de América del Norte (*Lontra canadensis*)” Se realizó una investigación evaluando la criopreservación y almacenamiento de

semen en los bancos de recursos del genoma, en combinación con la inseminación artificial (IA) de en especies de nutria que son amenazadas. El objetivo fue desarrollar un método eficaz de crioconservación de semen para la nutria, evaluando el efecto de la composición del extensor Equex STM y el protocolo de congelación (tiempo de adición de glicerol, velocidad de enfriamiento, método de congelación / envasado). Los resultados de este estudio indican que la crioconservación de espermatozoides de la nutria usando un extensor basado en TEST de yema de huevo que contiene 4% de glicerol y Equex al 1%, con el método de congelación de pellets, proporcionó una motilidad, longevidad e integridad del acrosoma superior en comparación con otras combinaciones post-descongelación. Estos hallazgos representan la primera evaluación de la criopreservación del semen en cualquier especie de la nutria y pueden ser de valor como modelo para el desarrollo de estrategias de criopreservación del semen en otras especies de nutria en peligro de extinción (Helen & William, 2017).

Los objetivos del estudio realizado por Dietrich et al., (2016), fue determinar las características seminales específicas, la motilidad y las tasas de fertilización del pescado blanco (*Coregoninae Salmonidae*) y pica norte (*Esocidae, Esociformes*) en respuesta a la crioconservación utilizando un extensor de glucosa-metanol. Los resultados obtenidos en motilidad media de espermatozoides post-descongelación fue de 69% para el lucio norte y 53% para el pescado blanco; en el caso de la fertilización con esperma criopreservado produjeron tasas de incubación muy elevadas para el lucio norte (79-89%) y para el pescado blanco (54-56%). El investigador menciona que se deberían hacerse estudios adicionales sobre la optimización de los procedimientos de crioconservación con el fin de lograr una fertilización a gran escala y deben tener como objetivo definir la relación mínima esperada esperma: huevo para el esperma criopreservado.

En el estudio realizado “La motilidad espermática del tapir brasileño (*Tapirus terrestris*) pre y post descongelación”, los objetivos planteados fueron describir los parámetros andrológicos en las especies información importante en el manejo reproductivo y mantener la máxima diversidad genética, así como colaborar con el desarrollo de técnicas de reproducción asistida, lo que podría contribuir a su conservación. El semen recogido se dividió en dos muestras idénticas, y una

dilución posterior en una proporción 1: 1 utilizando los diluyentes siguientes: Botusemen TM e INRA96. La descongelación y evaluación de las características seminales post- descongelación fueron mediante un sistema CASA, obteniendo los resultados pre-descongelación de motilidad total: BB-23,75 ± 7,46; BI-47,5 ± 11,27; IB- 53,75 ± 11,27; II- 62,5 ± 11,08; por otro lado, los resultados post-descongelación fueron: BB-12,5 ± 4,27; BI-9,75 ± 4,0; IB-11,25 ± 5,46; II-12,5 ± 4,19. Se observó que los protocolos mostraron resultados similares considerando la motilidad espermática después de la crioconservación, haciéndolos viables para la crioconservación del semen de tapir (Fontana et al., 2017).

El objetivo del estudio “Inseminación artificial en camélidos sudamericanos y équidos salvajes”, fue investigar los aspectos técnicos de la recolección, dilución y crioconservación del semen. Los resultados fueron poco satisfactorios, la eficiencia es baja, pero se logró avances y produciendo descendientes viables mediante el uso de la inseminación en camélidos sudamericanos domésticos que utilizan semen fresco y congelado. La viabilidad del espermatozoides post- descongelación es muy baja, y se necesitan estudios para abordar las cuestiones de los procedimientos óptimos de congelación y descongelación, así como la dosis de inseminación. Tanto en camélidos como en équidos, la investigación sobre especies domésticas bajo condiciones controladas proporciona una excelente oportunidad para desarrollar técnicas eficaces de manejo de semen para su aplicación en especies silvestres y en peligro de extinción de las respectivas familias (Adams, Ratto, Collins, & Bergfelt, 2009).

Una investigación realizada por Hermes et al., (2009), evaluaron la inseminación artificial con semen criopreservado en el rinoceronte blanco meridional (*Ceratotherium simum simum*). Este semen congelado se utilizó en dos intentos de IA intrauterina en un rinoceronte femenino de 30 años en Hungría. El primer intento con una dosis de inseminación de aproximadamente 135×10^6 células móviles, fracasó. El segundo intento con una dosis de inseminación de aproximadamente 500×10^6 células móviles, resultó en el embarazo y el nacimiento de una descendencia sana. Esta fue el primer reporte de inseminación artificial exitoso usando el semen descongelado en un rinoceronte, poniéndolo entre muy pocas especies de la fauna silvestre que se

han logrado reproducir con esta técnica. La incorporación de esta herramienta de reproducción asistida abre el camino para manejar la diversidad genética en estos mamíferos en peligro de extinción.

El estudio “Colección manual y caracterización de semen de elefantes asiáticos (*Elephas maximus*)”, manifiesta que la recolección de semen en esta especie es dificultoso, sin embargo es necesario para su uso en programas de inseminación artificial e importante para su reproducción. Los eyaculados ricos en esperma generalmente se recolectaron como resultado de cada contracción eyaculatoria, se obtuvieron datos sobre la concentración de espermatozoides y el pH. Se consiguieron los siguientes resultados: volumen total medio de cada colección fue de 27,5 +/- 4,4 ml, la concentración media de la primera y segunda respuestas eyaculatorias de una colección fue 2,05 +/- 0,17 x 10⁹ y 1,34 +/- 0,19 x 10⁹ esperma / ml respectivamente. Determinaron que el material genético es valioso para los bancos de recursos del genoma y para su uso con técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial (Schmitt & Hildebrandt, 2009).

En la investigación sobre “Recolección de semen en Rinocerontes (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*) por electroeyaculación con una sonda de diseño único”, el objetivo de este estudio fue desarrollar un método confiable de electroeyaculación en el rinoceronte mediante el diseño de una sonda rectal que se ajusta adecuadamente a la anatomía de esta especie y mejorar el procedimiento de recolección de semen. Obteniendo muestras de alta calidad, ricos en espermatozoides, con valores medios (\pm SEM) de volumen, pH, osmolalidad y número total de espermatozoides para eyaculados que contienen fracciones de buena calidad (98.2 \pm 21.8 ml, 8.5 \pm 0.1, 290.4 \pm 6.7 mOsm, y 37.1 \pm 12.0 \times 10⁹, respectivamente) Resumiendo la investigación la tecnología ha avanzado hasta una etapa en la que se pueden producir muestras de semen de buena calidad para almacenar su esperma y la reproducción asistida, y por lo tanto pueden integrarse en estrategias intensivas de manejo del rinoceronte para la supervivencia de esta especie (Roth T. L et al., 2005).

El presente estudio “Electroeyaculación, características del semen y concentraciones séricas de testosterona de elefantes africanos que se desplazan libremente (*Loxodonta africana*)”, los objetivos fueron caracterizar las muestras de semen y medir los niveles de testosterona en esta especie. Demostrando que el semen de alta calidad puede ser recogido de forma consistente utilizando un protocolo de electroeyaculación (120 estimulaciones eléctricas, 10-30 V), el volumen medio global de eyaculación, la concentración espermática / ml de eyaculación, la motilidad espermática, el estado espermático y el pH de la eyaculación fueron 93.3 ml, 2408×10^6 espermatozoides / ml, 70%, 3.9 y 7.4, respectivamente y existen diferencias sorprendentes en la testosterona en suero entre los machos en libertad puede ser debido, en parte, a un ritmo diurno (Howard, Bush, De Vos, & Wildt, 2007).

El objetivo del estudio “Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano”, fue evaluar dos diluyentes para la criopreservación del semen equino, preciso en la tolerancia y capacidad fecundante post-descongelación de las células espermáticas. Los protocolos de congelación rápida fueron con los diluyentes Equipro y Gent. Las características seminales se evaluaron con ayuda de la tinción eosina-nigrosina con análisis computarizado de clase (SCA), los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$) para la movilidad total con medias de $50.9 \% \pm 19.4 \%$ y $42.2 \% \pm 15.1 \%$, para Equipro® y Gent® respectivamente, el diluyente Equipro produce tasas de movilidad total pos descongelación superiores al diluyente Gent en el semen de caballos de la raza criollo colombiano (Betancur, Suarez, Páez, Celis, & Henao, 2014).

El estudio “Eficiencia en la obtención de semen mediante electroeyaculación en pecarí de collar (*Pecari tajacu*) y venado temazate (*Mazama pandora*)”, fueron sometidos animales en cautiverio 17 pecarí de collar y 5 venados temazate, previa inmovilización química con una eficacia del 70.6% y 71.4% respectivamente, además se obtuvieron valores respecto al volumen del eyaculado, porcentaje de motilidad individual y concentración espermática para ambas especies. Se puede concluir que la electroeyaculación es una buena alternativa para la obtención de semen y conservar

en un banco de germoplasma para contrarrestar su extinción (Yerves, López, Cornelio, & Pérez, 2014).

Una investigación realizada por Hermes et al., (2005), evaluó la calidad de los espermatozoides crioconservados en el rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum sp.*), se compararon los métodos de congelación en nitrógeno líquido y congelación direccional con gradiente multi térmico. Utilizaron 16 machos, las muestras fueron tomadas con ayuda de electroeyaculación, y diluidos en cryoextender (Tris, lactosa, yema de huevo, DMSO) La calidad espermática se evaluó antes y después de la congelación, Biladyl y Gent extender mostraron una disminución en la motilidad de los espermatozoides antes de la congelación en un 5% y 10%. El resultado la congelación direccional demostró facilitar mayor supervivencia de gametos, efectivo en eyaculados de baja calidad espermática y es importante en especies en peligro de extinción donde los donantes de semen de alta calidad a menudo no son accesibles.

En él estudió “Criopreservación de semen de pecarí de collar (*Tayassu tajacu*) usando un diluyente a base de agua de coco en polvo (ACP-116c) más concentraciones de yema de huevo y glicerol”, el objetivo fue determinar la efectividad del diluyente en polvo de coco (ACP-116c), más varias concentraciones de yema de huevo y glicerol, como una alternativa para la crioconservación de semen de pecarí. Se recolectaron 12 eyaculados de machos cautividad mediante electroeyaculación, se evaluó la motilidad de los espermatozoides, la clasificación cinética, la viabilidad, la morfología y la integridad funcional de la membrana. Los resultados obtenidos fueron ACP-116c más 20% de yema de huevo y 3% de glicerol proporcionaron mejor ($P < 0.05$) motilidad espermática y calificación cinética ($48 \pm 6.1\%$ y 2.8 ± 0.2 , respectivamente) después de la descongelación que el extensor Tris ($30.4 \pm 5.7\%$ y 2.4 ± 0.2). En conclusión, un diluyente a base de agua de coco, ACP-116c, más un 20% de yema de huevo y un 3% de glicerol, fue efectivo para la crioconservación de semen de pecaríes con collar (Silva et al., 2012).

El estudio “Recuperación de esperma poscoital y crioconservación en el rinoceronte de Sumatra (*Dicerorhinus sumatrensis*) y aplicación al rescate de gametos en el rinoceronte negro africano

(*Diceros bicornis*)”, se recolectaron muestras de espermatozoides de una hembra post-copuladora y se caracterizaron para determinar su potencial para la conservación de espermatozoides y el uso futuro en inseminación artificial. Se evaluó el efecto de dos crioprotectores (glicerol y sulfóxido de dimetilo (DMSO) y dos protocolos post-descongelación. Los resultados obtenidos fueron que los espermatozoides de rinoceronte de Sumatra de calidad moderada pueden ser recolectados de hembras post-copuladoras, las muestras de esperma de rinoceronte muestran sólo ligeras reducciones en la calidad después de la crioconservación y descongelación, además proporciona información importante para la creación de bancos genéticos y su uso en la inseminación artificial (O'Brien & Roth, 2000).

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

2.2.1.1. DILUYENTES

En la actualidad existe una gran diversidad de diluyentes comerciales empleados en la conservación de semen, estos medios prolongan la vitalidad de células espermáticas por determinados periodos de tiempo, por ejemplo diluyentes equinos presentan una capacidad de conservación de 1 a 3 días, diluyentes bovinos de 2 a 4 días (Medina-Robles, Sanchez-Carvajal, & Velasco-Santamaria, 2007). Además, el uso de diluyentes permite aumentar el volumen de eyaculado y obtener más dosis para la inseminación artificial, tal es el caso de eyaculados bovinos que producen un promedio de 20 pajuelas de 0,5 ml/ eyaculado (Roca, Rodríguez, Gil, Carvajal, & Garcia, 2005).

Los diluyentes comerciales cumplen con las siguientes características (Palacios Angola & Zarco Quintero, 1996; Busch & Waberki, 2007):

1. Poseen en su composición una fuente de energía, que puede ser glucosa o fructosa.
2. Contiene crioprotectores para proteger a los espermatozoides contra el frio, pueden ser lipoproteínas o moléculas de alto peso molecular.

3. Genera un efecto buffers en el medio, para mantener un pH neutro en el medio de congelación.
4. Proporciona aditivos como enzimas y antibióticos, proporcionando un medio libre de agentes infecciosos.

2.2.1.2. Diluyentes utilizados en la criopreservación

Botu-Crio ®

Es un diluyente para criopreservación de semen equino, mantiene la viabilidad, motilidad, integridad de los espermatozoides y conserva una adecuada velocidad post-descongelación de semen. Además combina 20 aminoácidos diferentes como base, con una combinación de glicerol-metilformamida como crioprotector aumentando la motilidad, por esta razón la tasa de fecundación es mayor en comparación de semen procesado con otros diluyentes (Samper & Garcia, 2008). A continuación detallamos la composición en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes Botu-crio®

Composición	
Yema de huevo	5%
Carbohidratos	Glucosa
Aminoácidos	20
Glicerol	1%
Metilformamida	4%
Penicilina	1.0 g/L
Gentamicina	0.5 g/L
Amidas	dimetil- formamida
Agua no pirogénica	-
Excipientes	-

FUENTE: (Nidacon, 2013)

EquiPlus Freeze®

El diluyente EquiPlus Freeze® utiliza una combinación de diferentes sustancias con el propósito de obtener un efecto benéfico para la protección de células espermáticas favoreciendo la conservación de semen, además contiene antibióticos con la finalidad de inhibir la replicación bacteriana, destacando su uso para la criopreservación de semen equino (Salazar et al., 2011). A continuación detallamos la composición en la tabla 2.

Tabla 2. Componentes EquiPlus Freeze®

Composición	
Componente A	95 ml antibióticos
Componente B	5 ml yema de huevo + glicerol 3%

FUENTE: (MiniTube, 2013)

2.2.1.3 Dilución de semen

La dilución de semen aprovecha el eyaculado del reproductor aumentando el volumen e inseminando el mayor número de hembras por recolección de muestra, depende de factores como volumen y concentración para realizar una correcta dilución, por ejemplo la concentración normal en equinos es 200 a 500 (millones/ml), bovinos 800 a 1200 (millones/ml), porcinos 200 a 300 (millones/ml), cuando se obtiene una muestra de semen con bajo número de espermatozoides, al diluirlo hay que utilizar un volumen mayor (Hafez, 2002). La muestra diluida mínimo debe tener una concentración de 50 millones de espermatozoides por milímetro (Busch & Waberki, 2007).

Los espermatozoides reaccionan después de la dilución con actividad acentuada, inmediatamente la pérdida de motilidad y lesiones de membrana. Cuando el diluyente contiene demasiados electrolitos produce una pérdida considerable de vitalidad celular, esta reacción se llama “efecto

dilución”, causando daños que producen la pérdida de componentes intracelulares y sustancias protectoras del líquido seminal (Busch & Waberki, 2007).

2.2.2. VARIABLE DEPENDIENTE

2.2.2.1. CALIDAD DE SEMEN

La calidad seminal es una serie de pruebas de laboratorio importantes para evaluar la calidad de semen y función de las células espermáticas, información sustancial en el diagnóstico de la capacidad fecundante de las células del eyaculado, con el objetivo de identificar parámetros como motilidad, vitalidad, morfología y concentración espermática, en conjunto estos indicadores se conocen como índice de calidad espermática (Hafez, 2002). Un diagnóstico correcto califica la muestra como viable o no para el uso en la inseminación artificial (Busch & Waberki, 2007).

Las pruebas se detallan a continuación:

a) Volumen

El volumen del eyaculado depende de especie, raza, edad y factores ambientales. Una baja cantidad de eyaculado puede producirse por daño de las glándulas accesorias o factores externos de estrés (Busch & Waberki, 2007).

b) Concentración

También llamada densidad, es la cantidad de espermatozoides existentes en un centímetro cúbico de semen, el cual debe ser diluido con solución salina, colocado en la cámara de Neubauer y transferido al microscopio (Hafez, 2002).

c) Motilidad

Esta prueba evalúa el movimiento general e individual de los espermatozoides, mediante percepción sensorial subjetiva del porcentaje de espermatozoides y la condición de su desplazamiento. Siempre se evalúa analizando el vigor de las ondas entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo). La oscilación normal del espermatozoide es rectilíneo debido a los movimientos de su cola (Grupo Latino, 2013).

d) Vitalidad

Esta es una prueba de laboratorio que identifica los espermatozoides vivos y muertos utilizando para ello una tinción de vitalidad denominada Eosina- Nigrosina. Los espermatozoides muertos tienen laceraciones en la membrana por lo que son permeables al colorante de vitalidad, por lo que los espermatozoides muertos se tornaran de un color oscuro y los vivos no. Se contabiliza en un campo visible 200 células y con ayuda de una fórmula matemática se determina el índice de vitalidad (Busch & Waberki, 2007).

e) Morfología

Es el estudio de espermatozoides anormales, se relaciona con las alteraciones morfológicas que presentan y en qué cantidad se encuentran. Siempre existe cierto porcentaje de espermatozoides anormales pero no deben rebasar el 12%, cuando el porcentaje pasa el 20% se cree que el origen es patológico y se descarta al reproductor. Cuando existe bajo porcentaje de anomalías espermáticas se contabiliza 100 espermatozoides en un campo visible, sin embargo cuando este porcentaje es alto se contará 300 células (Tribulo, Tribulo, & Barth, 2008).

2.2.2.2. Criopreservación

La criopreservación es un método en el cual las células son congeladas y almacenadas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido. Busch & Waberki, (2007) manifiesta que el principio básico de la criopreservación es la extracción del agua al espacio extracelular, fracción importante para la velocidad perfecta sobre la congelación. Mediante la criopreservación de semen se obtiene un almacenamiento indefinido, deteniendo el proceso metabólico de los espermatozoides sin que exista una pérdida de la fertilidad, y así promover la conservación de germoplasma por tiempo indeterminado. Además las muestras seminales se pueden almacenar en refrigeración a 5°C . (Calvo, Elhordoy, Modernel, Tavares, & Aragunde, 2016).

El proceso de enfriamiento abarca tiempos de mantenimiento para lograr la adaptación de las células germinales antes de la crioconservación. Ball (2008) menciona que el manejo inadecuado durante la criopreservación de semen fresco produce daños y lesiones en las membranas disminuyendo la capacidad fecundante de los espermatozoides post descongelación.

Moore, Squires, Bruemmer, & Graham, (2006) manifiesta que el efecto de la criopreservación se evalúa utilizando la curva de enfriamiento demostrando la influencia directa del nivel de lesiones en la membrana de los espermatozoides, causado por la deshidratación y la formación de cristales de hielo intracelular.

2.2.2.3 Principios de la conservación

a) Capacidad Buffer

Los diluyentes espermáticos mantienen un pH óptimo que se mantiene en torno a la neutralidad, por lo que contiene sustancias iónicas y ejerce acciones buffer del medio. El poder tampón de un fluido permite manejar ambientes ácidos, con un cambio mínimo de pH, amortiguan el medio manteniendo la vitalidad de los espermatozoides *in vitro*, se utilizan mezclas de fosfatos y citratos

para crear condiciones óptimas de equilibrio de pH, aunque su intervalo de tolerancia es amplio (Kareskoski & Katila, 2008). Un pH ácido reduce la movilidad, la producción de ácido láctico y el consumo de oxígeno; mientras un pH alcalino aumenta el metabolismo, en ambos casos reduce la capacidad de fecundar del espermatozoide (Hafez, 2002).

b) Shock térmico

El descenso de temperatura disminuye el metabolismo de los espermatozoides, con este mecanismo prolonga la vitalidad de estos. El shock térmico es el conjunto de alteraciones que las células sufren al brusco descenso de temperatura; los cambios afectan a la motilidad generándose movimientos retrógrados y circulares y lesiones en la membrana plasmática, con pérdida de la composición intracelular. El daño del choque térmico depende de la variación de temperatura, estos efectos se pueden controlar agregando al diluyente con fuentes de proteínas y lípidos, además el enfriamiento controlado de temperatura (Busch & Waberki, 2007).

c) Fuentes de energía

Los diluyentes aportan fuentes de energía en forma de azúcares con la finalidad de mejorar la vitalidad espermática. Además aportan nutrientes necesarios para proteger a los espermatozoides del shock térmico y disminuir los efectos nocivos (daño de acrosoma, alteraciones de membrana celular) que se presentan durante el proceso de congelación (Busch & Waberki, 2007).

Los espermatozoides al ser eyaculados despliegan una actividad metabólica, por lo que utilizan las fuentes de energía como combustible a partir de carbohidratos que están depositados en sus cabezas. Los hidratos de carbono utilizados son sacarosa, glucosa y fructosa que además disminuyen la formación de cristales e interactúan con fosfolípidos de la membrana plasmática, aumentando la resistencia de las células al proceso de criopreservación (Kundu, Chakrabarty, Dutta, Bhattacharyya, & Ghosh, 2002).

Además el consumo de fructosa tiene una correlación positiva con la intensidad de motilidad de los espermatozoides (Roca, Rodríguez, Gil, Carvajal, & Garcia, 2005).

2.2.2.4. Crioprotectores

Los crioprotectores son líquidos hidrosolubles que disminuyen el punto de fusión de una solución, el descenso del punto de fusión se logra a bajas temperaturas, en esta reacción el espermatozoide se deshidrata, la gradiente osmótica será menor y el espacio extracelular se congela (Ávila, Madero, López, & León, 2006).

Bioquímicamente los crioprotectores se clasifican en: azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa), alcoholes (metanol, propanol, etanol) y el dimetil sulfóxido (DMSO). Otros investigadores también la clasifican de acuerdo a la permeabilidad celular en: penetrantes y no penetrantes (Busch & Waberki, 2007; Ávila, Madero, López, & León, 2006).

2.2.2.5. Congelamiento y almacenamiento

Busch & Waberki (2007) recomiendan que terminada la evaluación de semen fresco, hay que envasar las pajillas en volúmenes de 0.25 - 0.5 ml con una concentración de 100×10^6 , a temperatura ambiente. El congelamiento es un proceso gradual en forma descendente. En este sentido las primeras 2 horas la temperatura de conservación es de 5°C y posteriormente disminuirá a un rango de -80 a -100°C por 20 minutos utilizando vapores de nitrógeno. Finalmente se almacenará en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C hasta su utilización (Duran & Zambrano, 2013).

2.2.2.6. Evaluación post-descongelación

La finalidad de la evaluación post-descongelación es saber si el semen es apto para la inseminación artificial. Después de pasar por el proceso de congelación-descongelación un gran número de

espermatozoides aparecen dañados y por tanto a funcionales (Cruz, Medina, & Velasco, 2006). El análisis estándar para evaluar fertilidad del macho post-descongelación es la motilidad de los espermatozoides, parámetro fundamental para establecer la calidad de semen y su capacidad fecundante (Tartaglione & Ritta, 2004). Además, (Zhang, Larsson, Lundeheim, Haard, & Rodriguez, 1990) menciona que la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide evidencia la viabilidad, principal perjuicio que sufre la célula después de la criopreservación en el intercambio de fluidos y cambios enzimáticos que afectaría a la disminución de la fertilidad.

2.2.3. UNIDAD DE ANÁLISIS

2.2.3.1. SEMEN

El semen es un líquido viscoso y de color blanquecino que es expulsado por el proceso de eyaculación, está formado por la combinación de espermatozoides y diversos fluidos que se secretan a lo largo del aparato reproductor masculino llamados plasma seminal (Hafez, 2002). El 10% del volumen del eyaculado son espermatozoides y el otro 90% del volumen corresponde a líquido seminal, además los minerales que encontramos con mayor abundancia en el esperma son el sodio, potasio y calcio. Las propiedades físicas del esperma como la viscosidad, densidad y presión osmótica está relacionada con la concentración relativa de espermatozoides (Busch & Waberki, 2007).

Estructuras asociadas a la formación de semen

a) Túbulos seminíferos

En esta estructura se forman los espermatozoides, los mismos que al inicio en etapa de espermatogonias carecen de movilidad y se desplazan gracias a los movimientos peristálticos de los túbulos, posteriormente en etapas de espermátides y espermatozoides adquieren movimiento propio (Busch & Waberki, 2007).

b) Epidídimo

Los espermatozoides se movilizan por el epidídimo lentamente mediante impulsos de contracciones peristálticas del musculo liso de las paredes del conducto, además en este lugar se capacitan para alcanzar su potencial fecundante (Hafez, 2002).

c) Conductos deferentes

Son túbulos de musculo liso que unen al epidídimo con los conductos eyaculatorios, su funcionalidad está relacionada con el desplazamiento de semen en el proceso de la eyaculación mediante contracciones y expulsando el esperma hacia la uretra (Navarro & Salas, 2013).

d) Glándulas vesiculares seminales

Son glándulas que producen alrededor del 65% del plasma seminal, fabrican un material mucoide rico en carbohidratos principalmente fructosa entre otras sustancia nutritivas para las células, necesarios para aportar energía a los espermatozoides para su movimiento (Hafez, 2002).

e) Glándula prostática

Es una glándula que ejerce presión para que el semen sea expulsado a través de la uretra, también aporta el líquido prostático que contiene fibrinógeno, zinc (tiene propiedades bactericidas), magnesio (concede el aspecto lechoso al semen) y varias enzimas como fosfatasas ácidas y transglutaminasa (Busch & Waberki, 2007).

f) Glándulas bulbouretrales

Secretan sustancias ricas en proteínas que actúan como sistema buffer contra reacciones acidas que afectan a la viabilidad espermática (Busch & Waberki, 2007).

2.2.3.2. Composición de semen

2.2.3.1.1 Espermatozoides

El espermatozoide es una célula reproductora que contiene material genético específico de una especie. Se produce en los testículos y su función al unirse con el gameto femenino es formar el cigoto, que después dará lugar al embrión. Adicionalmente el espermatozoide es la única célula que tiene flagelo proporcionándole una gran movilidad y desplazamiento en el semen. La temperatura óptima para estas células son de 2 o 3 °C debajo de la temperatura corporal (Hafez, 2002).

Su estructura se compone de cabeza y flagelo, la cabeza tiene dos partes principales, el acrosoma constituido por las enzimas hialuronidasa, acrosina y neuraminidasa que cooperan en la ruptura de la zona pelúcida. El núcleo contiene cadenas de ADN enrolladas, además contienen protaminas importante proteína para la condensación material genético (Rios et al., 2010). El flagelo posee mitocondrias que crean ATP y proveen de energía para proporcionar movilidad a los espermatozoides (Dorado, Acha, Gálvez, Carrasco, & Hidalgo, 2013).

2.2.3.1.2 Plasma seminal

Es la mezcla de secreciones del epidídimo, glándulas accesorias y glándulas uretrales. El volumen y sustancias que componen el plasma seminal tienen grandes variaciones dependiendo de la especie. Cumplen funciones importantes destacando la reguladora debido a que aporta nutrientes y sustancias protectoras para los espermatozoides, por otra parte es un medio dispersante para las células en el aparato reproductor femenino que en algunas ocasiones produce la obstrucción del cérvix para evitar que existe un retroceso de semen (Scott, Sherwood, & Warby, 1991; Busch & Waberki, 2007).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

La criopreservación de semen fresco influye sobre las características seminales para la conservación del germoplasma en el Tapir Amazónico (*Tapirus terrestris*).

3.2. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la criopreservación de semen fresco para la conservación de germoplasma de tapir amazónico (*Tapirus terrestris*).

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las características seminales en semen fresco (% de motilidad total, % motilidad individual, % vitalidad y % anormalidades) en el tapir amazónico.
- Comparar el efecto de dos tipos diluyentes equinos sobre la calidad espermática en semen criopreservado de tapir amazónico.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se realizó en el Zoorefugio Tarqui ubicado A 3 Km de Puyo en la parroquia Tarqui, provincia de Pastaza situada en los flancos externos de la cordillera oriental de los Andes cuyas coordenadas geográficas son: a una latitud de 0° 59' -1" S y a una longitud de 77° 49' 0" W y una altitud de 940 msnm.

4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

La investigación se desarrolló en un laboratorio previamente adaptado en el área de consulta en el Zoorefugio, en el que se maneja condiciones ambientales de 18 a 26 °C y 83 % de humedad. Las condiciones meteorológicas de la parroquia Tarqui se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones meteorológicas

PARÁMETRO	VALOR
Temperatura:	21°C
Humedad relativa:	83 %
Precipitación:	390 mm
Vientos:	3 Km/hora

FUENTE: (INAMHI, 2015)

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1. Laboratorio

- Microscopio
- Centrifuga
- Baño María
- Nitrógeno líquido
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubre objetos
- Micropipetas de 10-100 μ l
- Vasos de Precipitación 100 ml
- Puntas micropipetas
- Colorante eosina
- Colorante nigrosina
- Diluyente Botu-Crio ®
- Diluyente EquiPlus Freeze ®
- Termómetro de tarjeta
- Termo pajuelas
- Pajillas de 0.5 ml
- Jeringuilla 3 ml
- Polvo sellador de pajuelas
- Tijeras
- Formalina
- Tubos de ensayo
- Cooler adaptado para exposición de pajuelas al nitrógeno líquido.
- Rapidógrafo
- Lapicero

- Libreta
- Cámara fotográfica

4.3.2. Campo

- Termómetro digital
- Tubos Corning
- Guantes látex
- Toalla de papel
- Jeringuilla 10 ml
- Dardo desechable
- Pistola lanza dardos
- Ketamina
- Medetomidina
- Butorfanol
- Atropina
- Agua
- Extensión de electricidad
- Electroeyaculador 110 V

4.3.5. Biológicos

- Tapir Amazónico

4.4. FACTORES EN ESTUDIO

Dos criopreservantes espermáticos equinos:

- Botu-Crio ®
- Diluyente EquiPlus Freeze ®

4.5. TRATAMIENTOS

Tabla 4. Criopreservantes congelación

Numero	Símbolo	Descripción
1	T1	Criopreservantes Botu-Crio
2	T2	Criopreservantes EquiPlus Freeze

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El esquema que se utilizó en este trabajo de investigación fue el T-TEST para medias de dos muestras emparejadas, con dos tratamientos y 9 repeticiones para cada uno de los tratamientos.

4.7. VARIABLE RESPUESTA

Una vez obtenido el semen criopreservado, se procedió a valorar las muestras post descongelación. A continuación detallamos la metodología que se utilizó para valorar la muestra, determinando el efecto de los diluyentes empleados sobre las características seminales.

4.7.1. Vitalidad

Luego de descongelar el semen, se colocó 20 μ l del colorante eosina en un extremo del porta objetos precalentado una temperatura de 37°C, posteriormente se agregó 20 μ l de semen junto al colorante y se homogeniza la mezcla, después de 30 segundos se adiciono 20 μ l de nigrosina y luego de 1 minuto se realizó el frotis.

Se observó al microscopio con un lente de 40x y se procedió a contar los espermatozoides vivos y muertos. Se contaron 200 espermatozoides en el frotis y por medio de la aplicación de una regla de tres se determinó el índice de vitalidad. Las células muertas tienen perforaciones y agujeros en sus

membranas, por lo que son permeables a la tinción eosina-nigrosina y por tanto aparecerán teñidos y los vivos no se tiñen (Tribulo, Tribulo, & Barth, 2008).

4.7.2. Morfología

Con el mismo frotis y bajo el mismo procedimiento de tinción descrito en la variable anterior se realizó el conteo de espermatozoides normales – anormales y se tomó el porcentaje de estos. Se observó las anomalías de cola (cola enroscada, cola doble, cola pequeña, sin cola) y de la cabeza (sin cabeza, doble cabeza, cabeza grande, cabeza pequeña) (Hafez, 2002).

4.7.3. Motilidad

4.7.3.1. Motilidad espermática masal

Se colocó 50 µl en un porta objetos a temperatura a 37 °C, se llevó al microscopio y observo con un lente de 40x, evaluando la presencia de ondas. En la tabla N°5 se muestra el criterio que se utilizó para valorar la muestra.

Tabla 5. Evaluación espermática motilidad masal

Escala	Valor descriptivo	Descripción	% de células móviles
5	Muy buena	Movimiento en ondas vigorosas y en remolinos muy rápidos	> 80%
4	Buena	Remolinos y ondas rápidas	61-80%
3	Regular	Movimiento progresivo lento, incluyendo detención y comienzo de movimiento	41-60%
2	Mala	Ligera o escasa ondulación sin progresión	<40%
1	Nula	Ninguna motilidad	0%

FUENTE: (Gómez & Migliorisi, 2015)

4.7.3.2 Motilidad espermática individual

Se realizó una dilución de semen de 1:100 con una solución salina de formalina al 10%, se retiró la cantidad de 50 µl con una micropipeta y se colocó en un porta objetos previamente temperado a 37 °C en el microscopio para analizarlo con los lentes 40x y 100x, de esta forma, se evaluó la motilidad individual. En la tabla N°6 se muestra el criterio para valorar la muestra.

Tabla 6. Análisis espermático de motilidad individual

Valor descriptivo	Descripción	% de células móviles
Muy buena	Lineal rápido	> 80%
Buena	Movimiento lineal moderadamente rápido	60-79%
Regular	Movimiento lineal lento	40-59%
Pobre	Muy lento y errático	<40%

FUENTE: (Gómez & Migliorisi, 2015)

4.7.4. Concentración

Para determinar la concentración espermática, se utilizó el conteo de la cámara de Neubauer con la muestra diluida 1:200.

4.8. Metodología

- **Ayuno del macho**

El tapir amazónico que fue sometido al proceso de electroeyaculación para obtener la muestra seminal tuvo un ayuno de 4 horas para evitar el vómito o regurgitación del contenido gástrico durante la anestesia o en la recuperación.

- **Evaluación pre anestésica**

Se aplicó el plan general de exploración clínica se evaluó los signos vitales como: temperatura, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, tiempo de llenado capilar y estado físico, clasificando al tapir como ASA I, es decir un paciente de riesgo quirúrgico leve.

- **Contención química**

La contención química para evitar el estrés de manejo, se realizó una mezcla de anestésicos (medetomidina 0,03 mg/kg + tartrato de butorfanol 0,15 mg/kg + Atropina 0,03 mg/kg + Ketamina 0,5 mg/kg) cargado en un solo dardo y calculado para un peso vivo estimado de 160 kg, aplicado intramuscularmente en la pierna del animal logrando una restricción química de 40 minutos, la presencia de otros animales no afectó en el manejo para la obtención de la muestra.

- **Colecta de semen**

Para obtener la muestra seminal se utilizó el método de electroeyaculación, para lo cual se insertó una sonda eléctrica dentro del recto hasta llegar a una ubicación adyacente a la próstata. Posteriormente se liberó cargas eléctricas que aumentaron gradualmente de 2-6 V, cada serie tenía 40 estimulaciones, se aplicó dos series con intervalo de 5 minutos hasta que el semen fue liberado y se lo recogió en un vaso de precipitación de 100 ml previamente esterilizado y a temperatura de 37 °C para evitar muerte espermática por shock térmico.

- **Análisis de la muestra**

Una vez recolectado el semen se midió su volumen (ml) observando directamente en el vaso volumétrico graduado en el que colectamos el semen. Para la determinación del pH se utilizó una tira reactiva medidora de pH donde se colocó una gota de semen y se procedió a interpretar el resultado.

Seguido a esto, en un portaobjetos temperado a 37°C, se colocó 50 µl de semen y se llevó al microscopio para ser observado y evaluado con un lente de 40-100x previo a su congelación. Se evaluó las características seminales (motilidad en masal e individual, vitalidad, morfología, y concentración espermática), siguiendo la metodología que se encuentra descrita en las variables respuesta.

- **Dilución**

Luego de analizada la concentración espermática, se calculó el número de pajuelas que debemos obtener de la muestra (volumen * concentración espermática * % motilidad * % normales / 50x10⁶ millones). Se centrifugó la muestra con una dilución 1:1 con diluyente de centrifugación para eliminar el plasma a 2200 rpm durante 10 min, se formó un pellet y se diluyó con diluyente de congelación calculando el volumen para cada uno de los diluyentes (# de pajuelas * 0,5 ml volumen de la pajueta).

- **Congelación**

La congelación se realizó después que el semen fue diluido, se procedió a envasar en pajuelas de 0.5 ml de volumen con ayuda de jeringuillas y selladas con polvo sellador de pajuelas con una concentración de 50x10⁶, a temperatura ambiente y posteriormente fue equilibrado por 2 horas a 5 °C temperatura. Seguidamente se procedió a congelar en vapores de nitrógeno (-80 a -100°C) por 20 minutos en el cooler previamente adaptado y se almacenó en termos contenedores de nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, las pajuelas se colocaron en las canastillas previamente identificados.

- **Análisis post descongelación**

Para evaluar las características seminales, se procedió a descongelar después de 30 días cada una de las pajuelas obtenidas en baño María a 37°C durante 30 segundos, se cortó la pajueta en un

extremo y coloco 50µl de semen sobre el portaobjetos templado, finalmente se observó en el microscopio con el lente objetivo de 40x y 100x, registrando la vitalidad, morfología, concentración y el porcentaje de motilidad masal e individual y de esta manera evaluar el efecto de los diluyentes utilizados.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

Semen fresco

En la tabla 7 se puede observar los resultados del análisis de semen fresco del tapir amazónico

Tabla 7. Analisis de las características seminales de semen fresco.

Característica seminal	V (ml)	pH	MT (%)	MI (%)	Concentración (x 10 ⁶ /ml)	Espermatozoides vivos (%)	Anormalidades (%)
	13	7,1	65	60	141 x 10 ⁶ /ml	65	28

La evaluación de las características seminales del tapir amazónico se obtuvo un volumen seminal de 13 ml, un pH 7.1, una concentración espermática de 141 x 10⁶/ml, además una motilidad total de 65%, la motilidad individual de 60% y porcentaje de células morfológicamente anormales del 28% como menciona la tabla 7. En otra investigación Pukazhenthí *et al.*, (2011) reportó las características seminales del *Tapirus bairdii* con los siguientes parámetros: volumen colectado 20 ml ± 4,3 que fue mayor al obtenido en esta investigación, un pH de 7,4 ± 0,1 valor que se relaciona con el de este estudio y la concentración espermática 101,2 ± 24,0 con un valor menor al de la investigación, en este mismo sentido Tipkantha *et al.*, (2011) colectó muestras del eyaculado del *Tapirus indicus* con una concentración espermática 185,4 ± 206,1 x 10⁶/ml, un pH 7,3 ± 3,4 y un porcentaje de motilidad espermática total de 24±15.4 %. Estos valores pueden variar por varios factores dependiendo principalmente por la especie, edad, alimentación y situaciones que podría presentar el animal bajo estrés como indica (Mina, 1999), Además Pukazhenthí, Quse, Hoyer, Sanjur, & Brown, (2013) hace énfasis sobre la morfología de los espermatozoides en estas especies contiene porcentajes considerables de células anormales principalmente defectos que aparecen en la espermatogénesis. En este mismo sentido Pukazhenthí *et al.*, (2011) reportó en varias especies de Perissodactilos una alta proporción de espermatozoides anormales.

Semen post descongelación

Tabla 8. Análisis de T de Student de la calidad seminal post descongelación utilizando diferentes diluyentes equinos

Variables	Media	Varianza	Estadístico T	P
Motilidad total				
T1	55,78 a	48,94	3,87	0,0047
T2	45,33 b	12,25		
Motilidad individual				
T1	46,55 a	42,77	3,60	0,0069
T2	37 b	11,75		
Vitalidad				
T1	49,83 a	44,31	4,42	0,0022
T2	34,33 b	36,25		
Morfológicas				
T1	35,5 a	11,93	1,04	0,3265
T2	37,47 a	17,24		

^{ab} Medias con letras distintas entre filas diferentes significativamente ($P < 0,05$). **T1:** Botu-Crio®, **T2:** EquiPlus Freeze®.

En la tabla 8, para la variable motilidad espermática luego de la congelación, el valor P fue $< 0,004$ observándose que existe una diferencia significativa entre diluyentes, en el cual el diluyente Botu-Crio® presentó un promedio de 55% de espermatozoides en relación al diluyente EquiPlus Freeze® con el 45%; posiblemente a que el diluyente Botu-Crio® presenta en su composición amidas especialmente dimetil-formamida que preserva la integridad de la membrana plasmática y disminuye el estrés osmótico y la formación de cristales de hielo durante la congelación como refiere Alvarenga, Papa, Landim-Alvarenga, & Medeiros, (2005), por otro lado EquiPlus Freeze® es a base de glicerol que debido a la concentración puede causar daño a los espermatozoides afectando tanto a la membrana plasmática como al acrosoma, así lo menciona Garner (1999). Además Botu-Crio® al igual que en la investigación realizada por Pukazhenthí., (2011) obtuvo un resultado similar en la motilidad espermática de 66,2% después de la congelación, determinándose que podría utilizarse como el diluyente más adecuado para la conservación de este recurso genético invaluable de esta especie en vías de extinción como menciona Montenegro (1999).

Con respecto a la variable vitalidad espermática después de la congelación, se determinó que el valor P fue $< 0,002$ por lo que observamos una diferencia altamente significativa entre diluyentes, determinando que el diluyente Botu-Crio® presenta un promedio mayor de 49,83% de espermatozoides en relación a EquiPlus Freeze© con un promedio de 34,33%, probablemente se deba a que el segundo diluyente presenta una elevada concentración de glicerol que actúa como crioprotector de la célula espermática; pero en el caso de esta especie causa daño en la membrana citoplasmática como lo menciona Helen & William (2017) ya que pierde el equilibrio osmótico y la posterior muerte del espermatozoide. El diluyente Botu-Crio® utilizado en la investigación de Pukazhenthí *et al.*, (2011) reveló datos que se asemejan a los obtenidos en esta investigación por lo que brinda una alternativa para criopreservación del semen del tapir amazónico. Además Ball, (2008) menciona que el estrés oxidativo que sufren los espermatozoides equinos durante su almacenamiento en la congelación afectan negativamente a la supervivencia y función de estas células.

En la tabla número 8, el resultado de la variable alteraciones morfológicas luego de la congelación, se determinó que el valor P fue 0,326 por lo que observamos que no existe una diferencia entre diluyentes, determinando que el diluyente Botu-Crio® con un promedio 35,5% de espermatozoides en relación a EquiPlus Freeze© con promedio de 37,47%, que puede deberse a que las anomalías espermáticas son mal formaciones durante la espermatogénesis que en el proceso de conservación de semen, mientras que Tipkantha *et al.*, (2011) reporta en el tapir malayo un porcentaje de células morfológicamente normales de $6,7 \pm 2,6$, de la misma manera Pukazhenthí *et al.*, (2011) en el *Tapirus bairdii* $6,9 \pm 1,4$ en otras especies de mamíferos perissodactylos también se reportan porcentajes bajos de espermatozoides normales en sus eyaculados Betancur *et al.*, (2014) en su evaluación de caballos criollos encontró $19,1 \pm 2,7$, de igual manera Hermes *et al.*, (2005) en el rinoceronte blanco $38,8 \pm 7,79$. Pukazhenthí B *et al.*, (2013) manifiesta estas variaciones en las alteraciones morfológicas son características innatas de los machos de este género y a la selección natural que han sufrido.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

- El semen fresco del tapir amazónico colectado mediante electroeyaculación presento una mejor calidad espermática que las muestras analizadas post descongelación, se encontró que el porcentaje de vitalidad espermática y motilidad total e individual presentan una disminución significativa, aunque en la prueba de anomalías con un 28% de espermatozoides no presentan una diferencia significativa por lo que se determina que posiblemente estas malformaciones espermáticas se producen durante la espermatogénesis, encontrándose principalmente: cola en ovillo, cabeza fusionada, cola de látigo, anomalías en la pieza intermedia.
- Se comparó el efecto post descongelación de semen criopreservado después de 30 días con diluyentes comerciales de la especie equina ya que son animales que provienen del orden Perissodactyla, siendo los mejores resultados obtenidos post descongelación en las pruebas de calidad espermática (porcentaje de motilidad total, porcentaje de vitalidad) con Botu-Crio® sobre EquiPlus Freeze®, posiblemente se debe a la composición de los diluyentes utilizados, obteniendo con Botu-Crio® una motilidad total > 50% que es un parámetro recomendado en semen congelado apto para la inseminación.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., & Bergfelt, D. (2009). Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*, 71(1), 172-185. Recuperado el 31 de Julio de 2017, de ELSEVIER: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0800650X>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1), 105-113. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- Arieta, R., & Fernandez, A. (23 de septiembre de 2014). Métodos de Extracción de Semen Bovino. *RedVet*, 64-79.
- Ávila, L., Madero, J., López, C., & León, M. (2006). Fundamentos de criopreservacion. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Bailey, J. L., Blodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview. doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. Obtenido de *Animal reproduction science*: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432008001437>
- Bennett, A. F., & Saunders, D. A. (2010). Habitat fragmentation and landscape change. *Conservation biology for all*, 1(93), 1544-1550. Obtenido de <http://ukcatalogue.oup.com/product/9780199554249.do>

- Betancur, G. R., Suarez, A. U., Páez, J. D., Celis, Á. D., & Henao, A. A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Lasallista de investigación*, 11(2), 63-70. Obtenido de www.redalyc.org/pdf/695/69539788008.pdf
- Busch, W., & Waberki, D. (2007). *Manual de inceminacion artificial de los animales domesticos y explotacion zootecnica*. Zaragoza-España: Acibia, S.A.
- Calvo, J., Elhordoy, D., Modernel, A., Tavares, E., & Aragunde, R. (2016). Obtención, Evaluación y Congelación de Semen de Antilope Adulto (*Addax nasomaculatus*) del Zoo-Parque Lecocq de Montevideo-Uruguay. *International Journal of Morphology*, 34(1), 276-279. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022016000100039>
- Castellano, A., & Brito, J. (2017). *mammalia: Ecuador*. Obtenido de *Mammalia.webEcuador*: <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/mamiferos/FichaEspecie.aspx?Id=2062>
- Castelo, T., Bezerra, F., Lima, G., Alves, H., Oliveira, L., E.A.A, S., . . . Silva, A. (2010). Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Cryobiology*, 61(3), 275-279. Obtenido de ELSEVIER: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224010001598>
- CONANP. (26 de DICIEMBRE de 2009). Programa de acción para la conservacion de la especie: tapir centroamericano (*Tapirus Bairdii*). Recuperado el 26 de JULIO de 2017, de http://www.conanp.gob.mx/pdf_especies/Pace_Tapir.pdf
- Cruz, P., Medina, V., & Velasco, J. (2006). Evaluación de diferentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 152-159.
- Danielle, A., Gray, C., Roth, T., Mitchell, S., & Graham, L. (2017). A simple, field-friendly technique for cryopreserving semen from Asian elephants (*Elephas maximus*). *Animal Reproduction Science*, 182, 84-94. Obtenido de ELSEVIER: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.003>

- Dietrich, G., Nynca, J., Szczepkowski, M., Dobosz, S., Szczepkowska, B., & Cierezko, A. (2016). The effect of cryopreservation of semen from whitefish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability. *Aquaculture*, 464, 60-64. Recuperado el 31 de Julio de 2017, de *Aquaculture*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.015>
- Dorado, J., Acha, D., Gálvez, M. J., Carrasco, J. J., & Hidalgo, M. (2013). Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. *Theriogenology*, 79(7), 1100-1109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.006>
- Duran, F., & Zambrano, E. (2013). *Inseminacion y transferencia de Embriones*. Medellin-Colombia: Grupo latina.
- Fontana, C., Moreira, N., Cubas, Z. S., Oliveira, M. J., Morais, W., Mangini, P. R., & Lopez, E. T. (2017). Sperm motility of Brazilian-tapir (*Tapirus terrestris*)pre and post-thawing. *Animal Reproduction*, 14(1), 364-364. Recuperado el 31 de Julio de 2017, de *Animal Reproduction*: <http://revistas.bvs-vet.org.br/animreprod/article/view/35933>
- Garner, D. L. (1999). The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*, 34(5), 399-404. doi:[10.1111/j.1439-0531.1999.tb01392.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01392.x)
- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., & Neild, D. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal reproduction science*, 118(1), 98-102. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.005>
- Gómez, V., & Migliorisi, L. (2015). Protocolo para la evaluacin de semen en rumiantes. UNLP, 1-5. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- Grupo Latino. (2013). *Inseminacion y transferencia de embriones en animales de granja*. (Vol. 1). Medellin-Colombia: D'vinni S.A.

- Hafez, E. (2002). *Reproduccion e inseminacion artificial en animales*. Mexico DF- Mexico: McGraw-Hill Interamericana.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. doi:10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
- Helen, B., & William, S. (2017). Interaction of extender composition and freezing method for effective semen cryopreservation in the North American river otter (*Lontra canadensis*). *Theriogenology*, 101, 26-34. Obtenido de ELSEVIER: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.019>
- Hermes, R., Göritz, F., Saragusty, J., Sos, E., Molnar, V., Reid, C. E., & Hildebrandt, T. B. (2009). First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros. *Theriogenology*, 71(3), 393-399. Obtenido de ELSEVIER: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08007309>
- Hermes, R., Hildebrandt, T. B., Blottner, S., Walzer, C., Silinski, S., Patton, M. L., & Göritz, F. (2005). Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*, 63(1), 219- 238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.04.007>
- Hoogewijs, M. M., Govaere, J., Johannisson, A., Piepers, S., & De Vliegher, S. (2011). Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, 43(40), 35-41. Obtenido de *Equine Veterinary Journal*: [10.1111/j.2042-3306.2011.00489.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00489.x)
- Howard, J., Bush, M., De Vos, V., & Wildt, D. E. (2007). Electroejaculation, semen characteristics and serum testosterone concentrations of free-ranging african elephants (*Loxodonta africana*). *Journal of reproduction and fertility*, 72(1), 187-195. Obtenido de <http://www.reproduction-online.org/content/72/1/187.short>

- Howard, J., Pursel, V., Wildt, D., & Bush, M. (1981). Comparison of various extenders for freeze-preservation of semen from selective captive wild ungulates. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(11), 1157-1164.
- Instituto nacional de meteorología e hidrología. (2015). Red de estaciones meteorológicas. INHAMI.
- Kareskoski, M., & Katila, T. (2008). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.013>
- Kundu, C. N., Chakrabarty, J., Dutta, Bhattacharyya, D., & Ghosh, A. (2002). Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*, 123(6), 907-913. Obtenido de <http://www.reproduction-online.org/content/123/6/907.short>
- Lira, I., Naranjo, E. J., & Reyes, M. (2005). Ampliación del área de distribución de *Tapirus bairdii*, Gill 1865 (Perissodactyla: Tapiridae) en Oaxaca, México. *SciELO*, 21(1), 107-110. Obtenido de *Acta zoológica mexicana*: www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372005000100005&lng=es&tlng=es.
- Luther, I., Jakop, U., Lueders, I., Tordiffe, A., Franz, C., Schiller, J., . . . Muller, K. (2016). Semen cryopreservation and radical reduction capacity of seminal fluid in captive African lion (*Panthera leo*). *Theriogenology*, 89, 295-304. Obtenido de ELSEVIER: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.024>
- Medina-Robles, V. M., Sanchez-Carvajal, E., & Velasco-Santamaria, Y. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia*, 11(1), 75-86. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89611108>
- Mina, D. (1999). *Equine artificial insemination*. New York: CAB international.

- MiniTube. (2013). EquiPlus Freeze, 1 paso, componentes A y B. Tecnología Reproductiva Animal. Obtenido de <http://www.minitube.es/es/Productos/Equino/Diluyentes-de-Semen/EquiPlus-Freeze-1-paso-componentes-A-y-B>
- Mittermeier, R., Robles, P., & Goetsch-Mittermeier, C. (1997). Megadiversidad: Los países biologicamente más ricos del mundo. Mexico DF: Cenex.
- Montenegro, O. L. (1999). Observaciones sobre la estructura de una población de tapires (*Tapirus terrestris*) en el sureste de la Amazonía peruana. Obtenido de Manejo y conservación de fauna silvestre en América Latina: http://www.comfauna.org/wp-content/uploads/2012/PDFs-Manejofaunasilvestre/santa-cruz-1997/437-442_omontenegro_ObservacionesEstructuraPoblacionTapires.pdf
- Moore, A. I., Squires, E. L., Bruemmer, J. E., & Graham, J. K. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*, 26(5), 215-218. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.03.003>
- Navarro, N. C., & Salas, A. S. (2013). Anatomía y fisiología de la eyaculación. Clasificación de los trastornos de la eyaculación. En N. C. Navarro, & A. S. Salas, *Reproducción y trastornos de la fertilidad* (Vol. 1, págs. 669-677). Buenos Aires, Argentina.
- Nidacon. (2013). Botucurio. Nidacon Equine Products. Obtenido de <http://nidacon.com/animal/botucurio/>
- Nogales, F., Tapia, A., Tapia, M., Tirira, D., & Zapata Ríos, G. (2011). Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador. 2da. edición. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- Noss, A. J., Cuéllar, R. L., Barrientos, J., Maffei, L., Cuéllar, E., Arispe, R., & Rivero, K. (2003). A camera trapping and radio telemetry study of lowland tapir (*Tapirus terrestris*) in Bolivian dry forests. Obtenido de Tapir conservation: http://atrium.tapirs.org/documents/Noss_AJ._et_al._2003._A_Camera_trapping_and_radio_telemetry_study_of_lowland_tapir_Tapirus_terrestris_in_Bolivian_Dry_Forest.pdf

- O'Brien, J. K., & Roth, T. L. (2000). Post-coital sperm recovery and cryopreservation in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) and application to gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Journal of reproduction and fertility*, 118(2), 263-271. Obtenido de <http://www.reproduction-online.org/content/118/2/263.short>
- Padilla, M., & Dowler, R. (1994). *Tapirus terrestris*. *Mammalian Species*, 481, 1-8.
- Palacios Angola, A., & Zarco Quintero, L. (1996). Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad posdescongelación del espermatozoide equino. (1996). Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bov. *Vet. Méx*, 27(3), 221-227.
- Pukazhenth, B. S., Togna, G. D., Padilla, L., Smith, D., Sanchez, C., Pelican, K., & Sanjur, O. I. (2011). Ejaculate traits and sperm cryopreservation in the endangered Baird's tapir (*Tapirus bairdii*). *Journal of andrology*, 32(3), 260-270. doi:10.2164/jandrol.110.011833
- Pukazhenth, B., Quse, V., Hoyer, M., van ENGELDORP GASTELAARS, H., Sanjur, O., & Brown, J. L. (2013). A review of the reproductive biology and breeding management of tapirs. *Integrative zoology*, 8(1), 18-34. doi:10.1111/j.1749-4877.2012.12008.x
- Richard, E., & Juliá, J. P. (2000). El tapir (*Tapirus terrestris*): dieta y manejo en un bosque secundario de la ecoregión de selvas pedemontanas. Estatus en Argentina. Estatus en Argentina. *Manejo de Fauna Silvestre en Amazonía y Latinoamérica*. CITES Paraguay, Fund. Moisés Bertoni y University of Florida, Asunción., 4(1), 1-17. Obtenido de *Manejo de Fauna Silvestre en Amazonía y Latinoamérica*.
- Rios, E., Cambron, A., Ambriz, D., Zuñiga, P., Ahiezer, R., & Rosado, A. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Departamento de Biología de la Reproducción*, 5(11), 1-7. Obtenido de <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiRm77WprHXAhWqxYMKHYrBAMMQFggnMAA&url=http%3A>

%2F%2Fwww.izt.uam.mx%2Fnewpage%2Fcontactos%2Fanterior%2Fn78ne%2Ffisiologia.pdf&usg=AOvVaw1ii_MIKR23ZVupk_E-Lqi_

- Roca, J., Rodríguez, M. J., Gil, M. A., Carvajal, G., & Garcia, E. M. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. doi:10.1002/j.1939-4640.2005.tb02867.x
- Roth, T. L., Stoops, M. A., Atkinson, M. W., Blumer, E. S., Campbell, M. K., Cameron, K. N., & Maas, A. K. (2005). Semen collection in rhinoceroses (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*) by electroejaculation with a uniquely designed probe. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(4), 617-627. doi:https://doi.org/10.1638/05-019.1
- Roth, T., Stoops, M., Atkinson, M., & Blumer, E. (2005). Semen collection in rhinoceroses (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*) by electroejaculation with a uniquely designed probe. Obtenido de BioOne: https://www.jstor.org/stable/20096516?seq=1#page_scan_tab_contents
- Salazar, J. L., Teague, S. R., Love, C. C., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, 76(3), 409-418. doi:https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.016
- Samper, J. C., & Garcia, A. (2008). Post-thaw characteristics and fertility of stallion semen frozen in extenders with different cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 3(107), 348-349. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.124
- Schmitt, D., & Hildebrandt, T. (2009). Manual collection and characterization of semen from Asian elephants (*Elephas maximus*). *Animal Reproduction Science*, 53(1), 209-314. Obtenido de *Animal Reproduction Science*: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432098001201>
- Scott, A. P., Sherwood, N. M., & Warby, C. M. (1991). Levels of steroids, including cortisol and 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, in plasma, seminal fluid, and urine of Pacific herring

- (*Clupea harengus pallasii*) and North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Canadian journal of zoology*, 69(1), 111-116. doi:<https://doi.org/10.1139/z91-016>
- Silva, M. A., Lima, G. L., Bezerra, J. A., Campos, L. B., Paiva, A. L., & Silva, A. R. (2012). Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*, 78(3), 605-611. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.006>
- Silva, M., Peixoto, G., Castelo, T., Lima, G., Silva, A., Oliveira, M., & A.R, S. (2013). Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. *Cryobiology*, 67(1), 50-55. Obtenido de ELSEVIER: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.009>
- Tapia, M. (1999). Guia para el manejo, cria y conservacion del "Tapir" *Tapirus terrestris*(Linnaeus,1758). Centro tecnologico de recursos Amazonicos de la OPIP, Centro Fatima., 1(1), 21-23. Obtenido de <http://w.tapirs.org/Downloads/standards/TapiaA-1999-guia-manejo-tapir.pdf>
- Tartaglione, C. M., & Ritta, M. N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62(7), 1245-1252. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.012>
- Terwilliger, V. (1978). Natural history of Baird's tapir on Barro Colorado Island, Panama Canal Zone. Obtenido de Biotropica: <http://www.jstor.org/stable/2387906>
- Tipkantha, W., Pukazhenthil, B., Siriaroonrat, B., & Thongphakdee, A. (2011). Características Eyaculantes del Tapir Malayo(*Tapirus indicus*). *Thai J Vet Med.*, 499-508.
- Tipkantha, W., Pukazhenthil, B., Siriaroonrat, B., Thongphakdee, A., Maikaew, U., Thomas, W., & Thongtipsiridech, S. (2011). Ejaculate characteristics of captive Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(4), 499-508. Obtenido de <https://search.proquest.com/docview/1011579406?pq-origsite=gscholar>

- Tirira, D., Burneo, S., & Montoya, G. (2011). Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador (2ª edición ed.). Quito, Pichincha, Ecuador: Imprenta Marical.
- Tribulo, H. E., Tribulo, R. J., & Barth, A. (2008). Evaluación de Toros y Calidad Seminal. Cordova, Argentina: IRAC.
- TSG. (2010). Estrategia Nacional para la Conservación de los Tapires (*Tapirus* spp.) en el Ecuador. Tapir Specialist Group UICN, 2(1), 14-15.
- Voss, R. S., Lunde, D. P., & Simmons, N. B. (2001). The mammals of Paracou, French Guiana: a neotropical lowland rainforest fauna. doi:doi.org/10.1206/0003-0090(2001)263<0003:TMOPFG>2.0.CO;2
- Yerves, J. M., López, J. R., Cornelio, R., & Pérez, M. (2014). Eficiencia en la obtención de semen mediante electro-eyaculación en pecarí de collar (*Pecari tajacu*) y venado temazate (*Mazama pandora*). *Bioagrocencias*, 7(2), 15-20. Obtenido de www.ccba.uady.mx/bioagro/V7N2/3.%20Electro-eyaculacion%20en%20pecari.pdf
- Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., Haard, M. G., & Rodriguez, H. (1990). Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *International journal of andrology*, 24(2), 253-260. doi:10.1046/j.1365-2605.1999.00178.x

6.3. ANEXOS

Anexo 1. Toma de datos: post descongelación.

T	R	MT (%)	MI (%)	Vitalidad		Morfología	
				Espermatozoides vivos (%)	Espermatozoides muertos (%)	Espermatozoides normales (%)	Espermatozoides anormales (%)
T1	1	60	51	54,5	45,5	65,5	34,5
	2	47	39	50,0	50,0	68,5	31,5
	3	65	54	55,0	45,0	66,0	34,0
	4	62	52	51,5	48,5	58,0	42,0
	5	60	52	58,0	42,0	61,0	39,0
	6	58	49	50,0	49,5	67,0	33,0
	7	55	45	48,5	51,5	67,5	32,5
	8	50	41	46,0	54,0	65,0	35,0
	9	45	36	35,0	65,0	62,0	38,0
T2	1	40	32	35,0	65,0	60,5	39,5
	2	45	36	30,5	69,51	62,0	38,0
	3	43	34	42,0	58,0	59,0	41,0
	4	50	42	32,5	67,5	66,0	34,0
	5	42	34	30,0	70,0	56,0	44,0
	6	50	41	37,5	62,5	59,3	40,7
	7	48	39	25,0	75,0	68,0	32,0
	8	44	36	32,5	67,5	65,0	35,0
	9	46	39	44,0	56,0	67,0	33,0

Donde T: tratamiento, **R:** repeticiones, **MT:** motilidad total, **MI:** motilidad individual, **T1:** Botu-Crio®, **T2:** EquiPlus Freeze®.

Anexo 2. Motilidad espermática Total (%).

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Botu-Crio</i> ®	<i>EquiPlus Freeze</i> ®
Media	55,77777778	45,33333333
Varianza	48,94444444	12,25
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,08848555	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	3,870738916	
P(T<=t) una cola	0,002368196	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,004736393	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

Anexo 3. Motilidad espermática individual (%).

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Botu-Crio</i> ®	<i>EquiPlus Freeze</i> ®
Media	46,55555556	37
Varianza	42,77777778	11,75
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,195141669	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	3,603724539	
P(T<=t) una cola	0,00347232	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,006944639	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

Anexo 4. Vitalidad: espermatozoides vivos (%).

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Botu-Crio</i> ®	<i>EquiPlus Freeze</i> ®
Media	49,83333333	34,33333333
Varianza	44,3125	36,25
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,373480906	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	4,423558896	
P(T<=t) una cola	0,001107975	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,00221595	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

Anexo 5. Vitalidad: espermatozoides muertos (%).

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Botu-Crio</i> ®	<i>EquiPlus Freeze</i> ®
Media	50,11111111	65,66777778
Varianza	44,36111111	36,25959444
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,368295492	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-4,446523722	
P(T<=t) una cola	0,001074606	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,002149211	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

Anexo 6. Alteraciones morfológicas: normales (%).

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Botu-Crio</i> ®	<i>EquiPlus Freeze</i> ®
Media	64,5	62,53333333
Varianza	11,9375	17,2475
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,093648043	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	1,045066549	
P(T<=t) una cola	0,163269556	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,326539111	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

Anexo 7. Alteraciones morfológicas: anormales (%)

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	<i>Botu-Crio</i> ®	<i>EquiPlus Freeze</i> ®
Media	35,5	37,46666667
Varianza	11,9375	17,2475
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,093648043	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1,045066549	
P(T<=t) una cola	0,163269556	
Valor crítico de t (una cola)	1,859548038	
P(T<=t) dos colas	0,326539111	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004135	

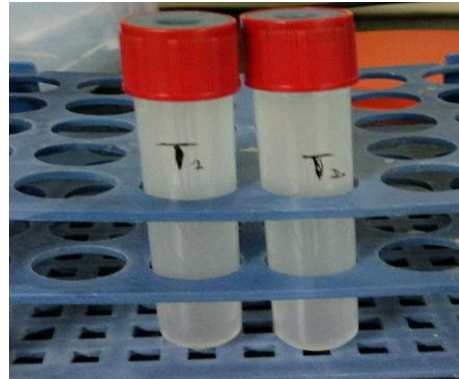
Anexo 8. Gráficos

Materiales	
 <p>Materiales utilizados en el análisis de laboratorio</p>	 <p>Diluyentes equinos utilizados para los tratamientos</p>
Evaluación, contención química y extracción	
 <p>Tapir macho de 20 años de edad</p>	 <p>Contención química en un solo dardo</p>
 <p>Electroeyaculación</p>	 <p>Colecta de muestra</p>

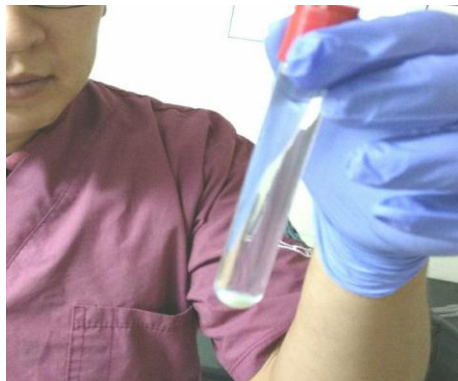
Preparación y dilución de semen



Conteo en la cámara de neubauer



División de la muestra y dilución para la centrifugación



Formación del pellet

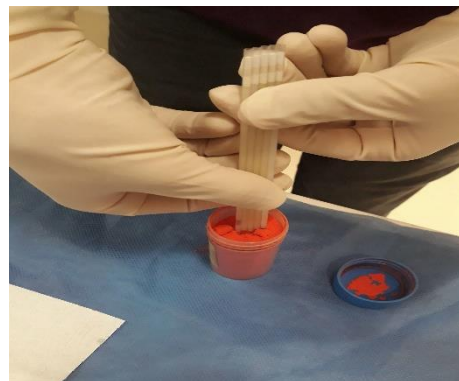


Dilución con diluyente de congelación

Congelación



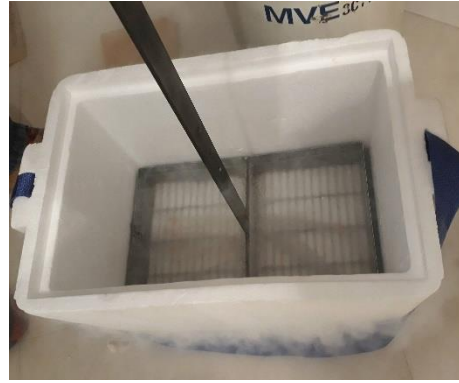
Envasado



Sellado



Preparaci3n para la congelaci3n

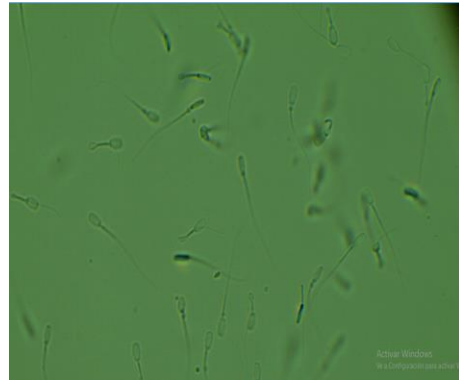


Congelaci3n en nitr3geno lquido

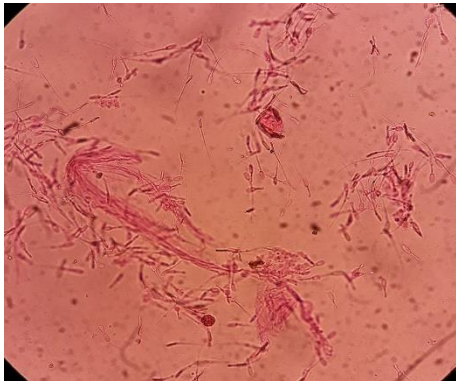
Evaluaci3n seminal



Evaluaci3n post descongelaci3n



Motilidad



Vitalidad



Morfologia

CAPÍTULO VII

7. PROPUESTA

Utilizar Botu-Crio® como criopreservante de semen para la conservación de germoplasma en el tapir Amazonico (*Tapirus terrestris*) como una alternativa para la preservación de la especie.

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Esta investigación trata de enseñar a médicos veterinarios y biólogos que trabajan en reservas, zoológicos y proyectos de conservación del tapir amazónico, alternativas para conservar el germoplasma que ayudará a la reproducción de estos animales en estado de cautiverio y su re inserción a la vida silvestre.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

En este trabajo de investigación se analizó el efecto de dos crioprotectores de semen equino para la conservación de semen en el *Tapirus terrestris*, en base a los resultados se obtuvo que Botu-Crio® tiene un efecto en la calidad seminal post- descongelación principalmente en vitalidad y por ende motilidad, por lo tanto se puede utilizar como alternativa para la reproducción de esta especie y contrarrestar su extinción.

7.3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la distribución sistemática de los mamíferos amazónicos es muy limitada (Voss, Lunde, & Simmons, 2001). En la actualidad las poblaciones del Tapir Amazónico en Ecuador se clasifican como una especie en vías de extinción (Tirira, Burneo, & Montoya, 2011). Los principales factores para la disminución local de sus poblaciones son la pérdida de hábitat, la cacería y las enfermedades transmitidas por el ganado doméstico (Lira, Naranjo, & Reyes, 2005).

La utilización de la criopreservación de semen en especies de fauna silvestre tiene como fin proveer a médicos veterinarios y biólogos que trabajan en reservas una alternativa para la reproducción de estos animales en cautiverio y su introducción a la vida silvestre, creando proyectos con el objeto de conservar al Tapir amazónico como un mamífero emblemático de la amazonia de nuestro país.

7.4. OBJETIVOS

- Utilizar Botu-Crio® para la conservación de espermatozoides en el tapir amazónico como un recurso genético de este mamífero silvestre.
- Generar proyectos de reproducción animal que se encuentren en vías de extinción.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

En el Ecuador en los últimos años el *Tapirus terrestris* ha sufrido un descenso del 30% de su población, por este motivo esta especie es catalogada en peligro de extinción, la propuesta es factible aplicar fomentando proyectos destinados a reproducción asistida de especies silvestres en vías de extinción, por otro lado creando áreas para la conservación de germoplasma.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

La criopreservación de semen es una de las herramientas de especial importancia en el desarrollo de biotecnologías para la reproducción asistida (Bailey, Blodeau, & Cormier, 2000). Esto permite una máxima distribución y una adecuada disponibilidad de material germinal de ejemplares de interés mediante su conservación a largo plazo, además del mantenimiento de especies en peligro de extinción (Lira, Naranjo, & Reyes, 2005), lo cual favorece al crear poblaciones autosostenibles de una especie, a través de la selección y de los cruzamientos dirigidos.

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

- Evaluación pre anestésica
- Contención química
- Colecta de semen
- Análisis de la muestra
- Dilución
 - ✓ Cálculo del número de pajuelas
 - ✓ Centrifugación
 - ✓ Dilución
 - ✓ Empacado
 - ✓ Estabilización
- Congelación
- Análisis post descongelación

7.8. ADMINISTRACIÓN

La Universidad Técnica de Ambato mediante la Facultad de Ciencias Agropecuarias, así como docentes y estudiantes serán responsables de la realización de esta propuesta que pueda llevar a una adecuada utilización creando proyectos de reproducción asistida de animales silvestres en peligro de extinción, además promover investigaciones que complementen la creación de áreas para conservar recursos genéticos.