

Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2021; 11:1-14. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.12>
Artículo Original. Recibido: 20/09/2020. Aceptado: 05/02/2021. Publicado: 27/02/2021. Clave:2020-80.

Criopreservación espermática de *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798)

Ambystoma mexicanum sperm cryopreservation (Shaw & Nodder, 1798)

Rivera-Pacheco Juan ^{1ID}, Herrera-Barragán José ^{2ID*}, León-Galván Miguel^{3ID},
Ocampo-Cervantes José ^{4ID}, Pérez-Rivero Juan ^{2ID}, Gual-Sill Fernando^{2ID}

¹Maestría en Biología de la reproducción animal; Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa CDMX, CP, 09340. ²Departamento de Producción Agrícola y Animal; Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Calzada del hueso 1100, Coyoacán CDMX, CP. 04960. ³Departamento de Biología., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa CDMX, CP, 09340. ⁴Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC / UAM-X), Rinconada Cuernavaca S/N, Xochimilco, CDMX; CP 16035. *Autor para correspondencia: José Antonio Herrera Barragán, Departamento de Producción Agrícola y Animal. Edificio W, piso 3. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco Calzada del hueso 1100, Coyoacán CDMX, CP. 04960. Correo electrónico: jherrerab@correo.xoc.uam.mx, jcripbiologia@gmail.com, leon@xanum.uam.mx, jocampo@correo.xoc.uam.mx, jjperez1_1999@yahoo.com, fguals@correo.xoc.uam.mx

Resumen

El *Ambystoma mexicanum* se encuentra en peligro de extinción en vida libre, debido a efectos antropogénicos; la criopreservación espermática para su reproducción en cautiverio, puede ayudar a su conservación ex situ. El objetivo de esta investigación fue identificar la viabilidad en fresco y post descongelación de espermatozoides provenientes de diferentes espermatóforos. Durante la temporada reproductiva se indujo en nueve ejemplares, la liberación de espermatóforos mediante la reducción de la temperatura del agua. La concentración promedio por espermatóforo fue de $2.6 \pm 0.6 \times 10^4$ espermatozoides. Se determinó en espermatozoides en fresco y post descongelación, una reducción del 30% de espermatozoides vivos y un incremento de 15 % de morfología anormal. Con las lectinas WGA y PNA, unidas a FITC, se determinaron dos patrones de fluorescencia distintos con cada una, lo cual evidencio la presencia y distribución membranal de N-acetil glucosamina, ácido siálico y manosa respectivamente. Los porcentajes de espermatozoides con cada patrón de fluorescencia mostraron diferencias asociadas al número de espermatóforos de cada liberación. Se determinaron diferencias en la viabilidad de espermatozoides obtenidos de liberaciones con diferente número de espermatóforos. El protocolo para la obtención y criopreservación espermática de *A mexicanum*, fue eficiente como herramienta para utilizar semen criopreservado para su reproducción ex situ.

Palabras clave: Anfibio, conservación, espermatóforo, urodelo.

Abstract

Ambystoma mexicanum is in danger of extinction in free-living, due to anthropogenic actions; sperm cryopreservation for captive breeding can help in its ex-situ conservation. This research aimed to identify the viability of fresh and post-thawing sperm from different spermatophores. During the breeding season, the spermatophores releasing was induced in nine specimens by reducing water temperature. The mean concentration per spermatophorous was $2.6 \pm 0.6 \times 10^4$ sperm. A reduction of 30 % of living sperms and an increase of 15 % of abnormal morphology were determined in fresh and post-thawing sperm. With the WGA and PNA lectins bounded to FITC, two different fluorescence patterns were determined in each one, that showed the membrane presence and distribution of N-acetyl glucosamine, sialic acid, and mannose respectively. Sperm percentages in each fluorescence pattern showed differences associated with the number of spermatophores in each release. Differences in sperm viability from releases with different

numbers of spermatophores were determined. The sperm collection and cryopreservation protocol of *A mexicanum* were efficient as tools for using cryopreserved semen for ex situ reproduction.

Keywords: Amphibian, conservation, spermatophorous, urodele.

INTRODUCCIÓN

La disminución en las poblaciones de anfibios los han llevado en casos severos a la extinción, las principales causas son la contaminación o modificación de su hábitat, la introducción de especies exóticas invasoras y enfermedades (Catenazzi, 2015; Jiménez *et al.*, 2017; Tietje y Rödel, 2018). Actualmente, La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2020), indican que más del 85% de las especies de anfibios de México se encuentran en alguna categoría de riesgo, debido a esta situación, la mayoría de las especies del género *Ambystoma* en vida silvestre, actualmente se ha optado por reproducirlos en condiciones de laboratorio (Mendoza, 2012; Khattak *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2017). De manera específica el *Ambystoma mexicanum*, está incluido en la NOM-059 - SEMARNAT- 2010 como especie en peligro de extinción (NOM-059-ECOL, 2010).

La reproducción *ex situ* utilizando semen criopreservado, es una herramienta de reproducción asistida en cautiverio que puede contribuir a la conservación del *Ambystoma mexicanum*; además de contribuir a incrementar su variabilidad genética, debido a que en la mayoría de los casos la amenaza se encuentra en su propio hábitat (Clulow *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2017). Sin embargo, antes de implementar un protocolo de criopreservación espermática, es necesario conocer la biología reproductiva y las características espermáticas de la especie, para lograr un mayor éxito (Chester, 2013; Silla y Byrne, 2019).

Actualmente, las técnicas de obtención de gametos (espermatozoides y óvulos) que se realizan en anfibios son altamente invasivas, pues la mayoría de los procesos requieren del sacrificio del ejemplar para la extracción de los testículos o conductos eferentes y proceder a macerarlos (Chester, 2013; Shishova *et al.*, 2011). La mayoría de los protocolos de criopreservación utilizados en espermatozoides de diferentes especies, de anfibios, han sido extrapolados de los reportados en de peces (Comizzoli *et al.*, 2012); mostrando resultados variables entre cada uno. Chester (2013) criopreservó espermátóforos completos de *A mexicanum* utilizando sucrosa como principal crioprotector, reportando 84 % de espermatozoides vivos después de ser descongelados; sin embargo, no reporta el parámetro de espermatozoides vivos antes de su congelación. Se sabe que la manipulación *in vitro* de los espermatozoides ocasiona alteraciones en su membrana plasmática, en la cual se ha descrito la presencia de carbohidratos membranales, los cuales tienen una función en el reconocimiento entre gametos para lograr la fertilización (Peláez *et al.*, 2011).

Debido a que es limitada la base de datos sobre estudios morfológicos y de criopreservación en espermatozoides de anfibios, en específico del orden Urodela ([Browne y Chester, 2011](#); [Chester, 2013](#); [Sunny et al., 2014](#)).

El objetivo de esta investigación fue identificar los parámetros de evaluación básica y características membranales en espermatozoides provenientes de diferentes ejemplares y espermatóforos de cada uno, para evaluar un protocolo de criopreservación que permita mantener su capacidad fertilizante post descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuidado y bienestar

El manejo de los ajolotes se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC-UAMX), con apego al Plan de Manejo, autorizado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) a la Unidad de Para el Manejo y Conservación de la Vida Silvestre (UMA) CIBAC, con registro DGVS-CR-IN 0952-D.F./07/UMA CIBAC.

Alojamiento y obtención de espermatóforos

Los ajolotes fueron alojados para su monitoreo durante un año de manera individual en contenedores de 60 L, a una temperatura de 18°C, con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad. Para estimular la liberación de espermatóforos, los machos se trasladaron a un contenedor de cristal con capacidad de 700 L de agua, el cual se acondicionó con suelo arenoso y plantas acuáticas; durante las horas de oscuridad, utilizando chiller de 0.25 HP (Ártica Resun CL-600), se redujo la temperatura del agua; de igual manera para todos los ejemplares de 18 °C a 14°C, introduciendo 3 hembras por macho. Los espermatóforos fueron recuperados del fondo del contenedor, al inicio de las siguientes 12 horas de luz.

Manejo de espermatóforos y obtención de espermatozoides

Los espermatóforos liberados por cada ejemplar fueron recolectados a 5 °C en 2 ml de medio Simplified Amphibian Ringer (SAR), compuesto por NaCl 113 mM, CaCl 1mM, KCl 2.0 mM y NaHCO 3.6 mM, con 220 mOsmol kg⁻¹. Los espermatozoides se obtuvieron colocando los espermatóforos de cada ejemplar en una caja Nunc^{MR} de 4 pozos con 0.5 ml de medio SAR; en el primer pozo se lavaron para eliminar residuos de materia orgánica; en el segundo pozo se retiró el material gelatinoso (glucoproteínas) para obtener el capuchón que contiene los espermatozoides; en el tercer pozo se utilizó 0.5 ml de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 20%, para reblandecer el capuchón por 10 min ([Taku et al., 2004](#)); en el cuarto pozo con 0.5 ml de medio SAR, los espermatozoides se extrajeron por maceración del capuchón. Mediante aspiración se extrajeron los espermatozoides del sobrenadante, enseguida se filtraron con una malla de 30 µm y se recuperó el total de espermatozoides de los espermatóforos de cada liberación en un

tubo Eppendorf con 500 µl de medio SAR a 5°C, para realizar un pool espermático de cada liberación.

Criopreservación espermática

Cada pool espermático, conservado a 5°C, se ajustó con 6% de Dimetilacetamida (DMA), enseguida se llenaron pajillas de 0.25 ml, para mantener en equilibrio por 10 min a 2°C, luego se colocaron a 5 cm sobre vapor de nitrógeno a -76 °C por 15 minutos y posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido a -196°C, para ser criopreservados por 30 días hasta su posterior descongelación a 15 °C por 5 min ([Atencio et al., 2013](#)).

Evaluación espermática básica

El porcentaje de espermatozoides vivos, se determinó a través de un frotis que se realizó con una mezcla 1:5 espermatozoides con tinción de eosina-nigrosina, en la cual se contaron 100 espermatozoides bajo el microscopio a 40X; Se consideraron espermatozoides vivos, los no teñidos y muertos, los que presentaron tinción. La morfología espermática fue evaluada en la misma tinción, para determinar porcentajes de espermatozoides con alteraciones morfológicas en las regiones de la cabeza, cuello o flagelo ([Tanisław et al., 2017](#)).

Distribución de carbohidratos membranales

Con el uso de las lectinas de *Triticum vulgaris aglutinina* (WGA), con afinidad a residuos de N-Acetilglucosamina y de *Arachis hypogaea* (PNA) con afinidad a β-galactosa, aconjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FICT), se pretendió determinar la presencia de los carbohidratos que se ha reportado son receptores para el reconocimiento entre los gametos ([Herrera et al., 2017](#)) y como partes estructurales del plasmalema espermático ([Miller, 2015](#)). En un volumen final de 40 µl de medio SAR, con 5x10⁶ espermatozoides, se adicionó 10µl de WGA-FICT o PNA-FITC a una concentración de 15 mg/ml; se incubaron a 25°C por 30 minutos, estos espermatozoides cubriéndolos de la luz; enseguida se realizaron preparaciones sobre porta objetos, para observarlas al microscopio. Cada preparación se observó directamente en un microscopio de fluorescencia a 260 nm de excitación y >560 nm emisión, contabilizando 100 espermatozoides. Se determinó la presencia de los carbohidratos membranales, mediante patrones de fluorescencia y la proporción de espermatozoides con cada patrón determinado ([Naofumi, 2015](#)).

Análisis estadístico

Se determinó la frecuencia de espermatozoides vivos, con morfología normal y con los diferentes patrones de fluorescencia en las muestras frescas y descongeladas, las cuales fueron expresadas como proporción con su respectivo error estándar (EE). Las diferentes variables fueron comparadas entre los grupos de espermatozoides en fresco y

descongeladas con una prueba de χ^2 con un una alfa de 0.05; utilizando el paquete estadístico de libre acceso [EpiInfo 7.3](#)

RESULTADOS

Se determinó diferente cantidad de eventos reproductivos y número de espermátóforos liberados por cada ejemplar; se obtuvieron un total de 61 espermátóforos. La frecuencia en la cantidad de espermátóforos liberados por ejemplar, fue la siguiente: 1:12, 2:10, 1:8, 1:6, 3:4 y 1:3. La concentración espermática tuvo un promedio de $2.6 \pm 0.6 \times 10^4$ espermatozoides/ml, con un rango entre 1.0 ± 2.5 a 4.0 ± 3.0 . La concentración espermática en liberaciones con seis o más espermátóforos (2.5×10^4 espermatozoides/ml), fue mayor ($P < 0.05$) a la concentración de espermatozoides (2.5×10^4 espermatozoides/ml) en liberaciones con menos de seis espermátóforos.

Parámetros de evaluación espermática

Los porcentajes de espermatozoides vivos disminuyeron ($P < 0.05$), aproximadamente 30 % en post descongelación; encontrando promedios de 89 % en espermatozoides en fresco y del 58 % post descongelación. Los porcentajes de espermatozoides vivos que se determinaron en liberaciones con diferente número de espermátóforos, mostró diferencias ($P < 0.05$), encontrando un rango de 79% al 100 % en espermatozoides en fresco y del 45 % al 67 %, en espermatozoides descongelados (tabla 1).

La morfología espermática normal de igual manera mostró una reducción ($P < 0.05$) de aproximadamente el 15 %, encontrando porcentajes del 98 % en morfología normal de espermatozoides en fresco y del 83 % post descongelación. Los porcentajes de espermatozoides con morfología normal que se determinaron en liberaciones con diferente número de espermátóforos, no mostró diferencias ($P > 0.05$), encontrando un rango promedio de 95% al 100% en espermatozoides en fresco; sin embargo, determinados post descongelación fue diferente ($P < 0.5$), con porcentajes con rango promedio entre 78% al 90% (tabla1).

Presencia y distribución de carbohidratos membranales

Con el uso de la lectina WGA-FITC: En espermatozoides en fresco y post descongelación, la intensidad de la fluorescencia que emitió la lectina WGA-FITC sobre la membrana del espermatozoide, evidenció la presencia de residuos de N-Acetil glucosamina presentes en la membrana espermática de *A mexicanum*. Se determinaron dos patrones de fluorescencia denominados: Patrón A) Con fluorescencia intensa homogénea en la región del flagelo y cuello y con menor intensidad, pero evidente en la región de la cabeza (figura 1A); y patrón B), con fluorescencia evidente homogénea en toda la estructura espermática (figura 1B).

Tabla 1. Parámetros de evaluación espermática en fresco y post descongelación de *A. mexicanum*, en eyaculados de cada ejemplar evaluado

ID	Espermatóforos n=	% Espermatozoides con Patrón A ± EE			% Espermatozoides con Patrón B ± EE		
		Fresco	Descongelado	χ^2 <i>p</i>	Fresco	Descongelado	χ^2 <i>p</i>
A	12	46 ± 3	51 ± 7	0.3 >0.05	54 ± 3	50 ± 7	0.1 >0.05
B	10	44 ± 3	46 ± 3	0.02 >0.05	48 ± 4	53 ± 3	0.3 >0.05
C	10	52 ± 4	56 ± 6	0.2 >0.05	47 ± 4	43 ± 6	0.2 >0.05
D	8	56 ± 5	55 ± 8	0.01 >0.05	46 ± 5	46 ± 8	1.0 >0.05
E	6	52 ± 3.5	57 ± 9	0.3 >0.05	47 ± 3	43 ± 9	0.2 >0.05
F	4	49 ± 7.7	57 ± 7	0.9 >0.05	61 ± 4	42 ± 7	6.5 <0.05
G	4	41 ± 4.2	55 ± 6	3.9 <0.05	59 ± 4 ^a	45 ± 6	3.9 <0.05
H	4	45 ± 7.3	56 ± 6	2 <0.05	55 ± 7	44 ± 6	2.0 >0.05
I	3	45 ± 2.8	55 ± 5	1.6 <0.05	65 ± 3	45 ± 5	7.3 <0.05

Literal diferente en súper índice (a,b,c), indica diferencia (P<0.05) al comparar la misma variable entre columnas (Fresco VS Descongelado). Número diferente en súper índice (1,2,3), indica diferencia (P<0.05) al comparar los promedios en la misma columna

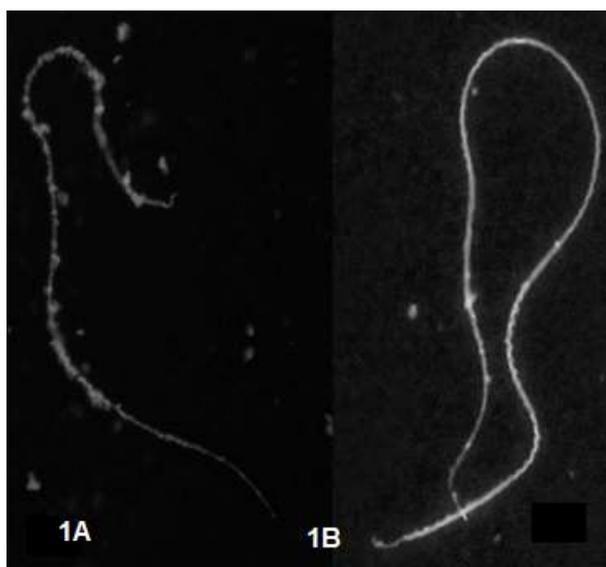


Figura 1. Patrones de fluorescencia de espermatozoide con la lectina WGA-FITC. 1A). Se observa mayor intensidad de fluorescencia en las regiones del flagelo y cuellos y con menor intensidad en la cabeza. 1B se observa con intensidad homogénea en toda la estructura espermática

La proporción de patrones determinados con WGA-FITC (tabla 2), mostraron que:

El porcentaje de espermatozoides con patrón A, procedentes de liberaciones de doce a seis espermátóforos, fueron similares ($P>0.05$) en fresco y post descongelación; en comparación con los porcentajes de espermatozoides procedentes de liberaciones entre ocho y tres espermátóforos, en los que se incrementó ($P<0.05$), en espermatozoides descongelados. Al comparar los porcentajes de espermatozoides con patrón A, obtenidos en espermatozoides de cada ejemplar en fresco, se determinó en promedio 48%, con rango entre 44% a 56%; sin encontrar diferencia ($P<0.05$) entre éstos, en espermatozoides descongelados; se determinó un promedio de 54% con rango entre 46% a 57%, encontrando porcentajes mayores ($P>0.05$), en espermatozoides con el patrón A, procedentes de liberaciones con 3 y 4 espermátóforos.

Los porcentajes de espermatozoides con patrón B, procedentes de liberaciones de doce a seis espermátóforos fueron similares ($P>0.05$) en fresco y post descongelación; los porcentajes de espermatozoides procedentes de liberaciones con cuatro y tres espermátóforos, fueron mayores ($P<0.05$) en fresco, comparados con los descongelados. En fresco se determinó en promedio 53%, con rango entre 46 a 65%, sin encontrar diferencia ($P<0.05$) entre éstos; en espermatozoides descongelados, se determinó un promedio de 46 % con rango entre 42% a 53%, encontrando porcentajes mayores ($P>0.05$) en espermatozoides procedentes de liberaciones con 10 y 12 espermátóforos. Al realizar la comparación general total (Pool) de los porcentajes, fue evidente una diferencia y de manera inversa el por porcentajes totales determinados, los cuales fueron para espermatozoides con el Patrón A: X^2 de 7.21 $p<0.05$, en semen fresco con 47.7 % y de 54.3 % para semen descongelado; con respecto a espermatozoides con el Patrón B: se determinó una X^2 de 10.8 $p<0.05$, en semen fresco con 53.5 % y de 45.6 % en semen descongelado.

Con el uso de la lectina PNA-FITC: en espermatozoides en fresco y post descongelación, la intensidad de la fluorescencia que emitió la lectina PNA-FITC sobre la membrana del espermatozoide, lo que evidenció la presencia de residuos glicosídicos de β -galactosa, presentes en la membrana del espermatozoide de *A mexicanum*. Se determinaron dos patrones de fluorescencia: C) Con fluorescencia intensa y homogénea a lo largo de toda la estructura espermática (figura 2A); patrón D) Con fluorescencia tenue homogénea en toda la estructura espermática (figura 2B).

La proporción de patrones determinados con PNA-FITC, (tabla 3), mostró que:

Con los patrones C y D, los porcentajes de espermatozoides procedentes de liberaciones entre 6 a 12 espermátóforos fueron similares ($P>0.05$) en fresco y post descongelación, en comparación con los porcentajes de espermatozoides procedentes de liberaciones con tres y cuatro espermátóforos, que se incrementaron ($P<0.05$), en espermatozoides descongelados.

Tabla 2. Porcentajes de espermatozoides en fresco y post descongelación, con dos patrones de fluorescencia A y B determinados con el uso de la lectina WGA-FITC

ID	Espermatóforos n=	% Espermatozoides con Patrón A ± EE			% Espermatozoides con Patrón B ± EE		
		Fresco	Descongelado	χ^2 p	Fresco	Descongelado	χ^2 p
A	12	46 ± 3	51 ± 7	0.3 >0.05	54 ± 3	50 ± 7	0.1 >0.05
B	10	44 ± 3	46 ± 3	0.02 >0.05	48 ± 4	53 ± 3	0.3 >0.05
C	10	52 ± 4	56 ± 6	0.2 >0.05	47 ± 4	43 ± 6	0.2 >0.05
D	8	56 ± 5	55 ± 8	0.01 >0.05	46 ± 5	46 ± 8	1.0 >0.05
E	6	52 ± 3.5	57 ± 9	0.3 >0.05	47 ± 3	43 ± 9	0.2 >0.05
F	4	49 ± 7.7	57 ± 7	0.9 >0.05	61 ± 4	42 ± 7	6.5 <0.05
G	4	41 ± 4.2	55 ± 6	3.9 <0.05	59 ± 4 ^a	45 ± 6	3.9 <0.05
H	4	45 ± 7.3	56 ± 6	2 <0.05	55 ± 7	44 ± 6	2.0 >0.05
I	3	45 ± 2.8	55 ± 5	1.6 <0.05	65 ± 3	45 ± 5	7.3 <0.05

Literal diferente en súper índice ^(a,b,c), indica diferencia (P<0.05) al comparar la misma variable entre columnas (Fresco vs Descongelado).

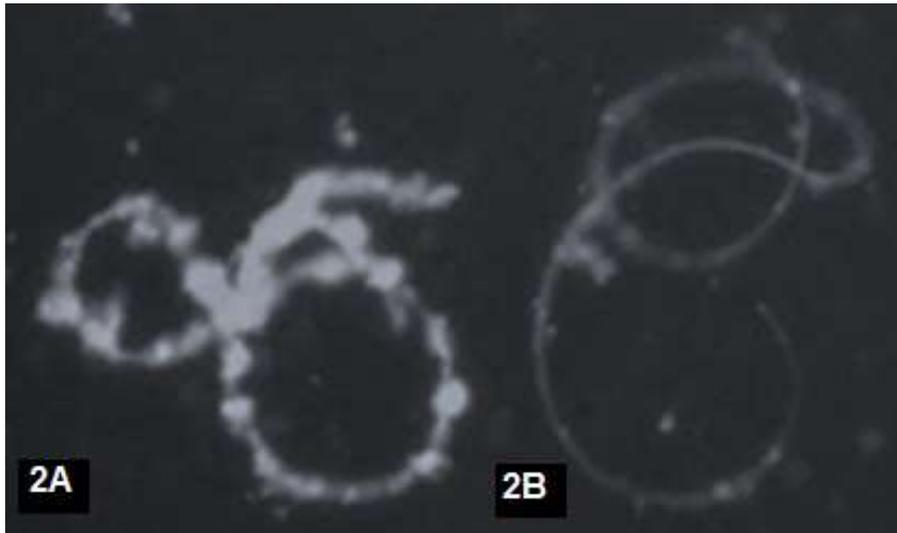


Figura 2. Patrones de fluorescencia obtenidos con lectina PNA-FITC: A) Con fluorescencia intensa homogénea, B) Con fluorescencia tenue homogénea

Los porcentajes de espermatozoides con patrón C y D, determinados con la lectina PNA-FITC, únicamente mostraron diferencia ($P < 0.05$) post descongelación, cuando los espermatozoides provinieron de liberaciones con ocho espermátóforos, observando mayor porcentaje en espermatozoides con patrón C post descongelación y de manera inversa, en espermatozoides con el patrón D. El porcentaje fue mayor en semen fresco, en los porcentajes de espermatozoides provenientes de liberaciones con doce, diez, seis, cuatro o tres espermátóforos, Al comparar los porcentajes de **espermatozoides con el Patrón C** de cada ejemplar, en fresco con un promedio de 54%, con rango entre 49% a 58% y post descongelación con promedio de 60% y con rango entre 47% a 69%, no se encontraron diferencias ($P < 0.05$).

Al comparar los porcentajes de **espermatozoides con patrón D** de cada ejemplar, en fresco con un promedio de 48%, con rango entre 42% a 55% no se observaron porcentajes diferentes ($P < 0.05$). En espermatozoides descongelados se encontró en promedio de 42% con rango entre 24% a 53%, tampoco se observaron porcentajes diferencias ($P < 0.05$).

Tabla 3. Porcentajes de espermatozoides en fresco y post descongelación, con dos patrones de fluorescencia C y D determinados con el uso de la lectina PNA-FITC

ID	Espermátóforos n=	% ± EE Espermatozoides con Patrón C			% ± EE Espermatozoides con Patrón D		
		Fresco	Descongelado	χ^2 p	Fresco	Descongelado	χ^2 p
A	12	51 ± 4	47 ± 5	0.2 >0.05	49 ± 4	53 ± 5	0.2 >0.05
B	10	51 ± 5	49 ± 5	0.02 >0.05	49 ± 5	50 ± 5	0.01 >0.05
C	10	53 ± 5	52 ± 6	0.01 >0.05	48 ± 7	47 ± 6	0.01 >0.05
D	8	49 ± 4	66 ± 3	5.23 <0.05	51 ± 5	24 ± 3	14.4 <0.05
E	6	57 ± 4	60 ± 7	0.08 >0.05	47 ± 7	40 ± 11	0.7 >0.05
F	4	55 ± 7	62 ± 4	0.07 >0.05	45 ± 10	37 ± 4	1.01 >0.05
G	4	55 ± 4	68 ± 6	0.7 >0.05	55 ± 6	44 ± 7	2.0 >0.05
H	4	57 ± 3	69 ± 4	2.6 >0.05	52 ± 6	42 ± 6	1.62 >0.05
I	3	58 ± 5	67 ± 5	1.36 >0.05	42 ± 8	43 ± 9	0.01 >0.05

Literales diferentes en súper índice ^(a,b,c), indica diferencia ($P < 0.05$) al comparar la misma variable entre columnas (Fresco VS Descongelado).

DISCUSIÓN

En cuanto a la concentración espermática, los datos mostraron que existen diferencias entre espermátóforos de un mismo ejemplar y entre ejemplares. Estos resultados son similares a los publicados por [Doyle et al. \(2011\)](#), en el número de espermatozoides entre los espermátóforos liberados de ejemplares de *A maculatum*. La cantidad y el tamaño de los espermátóforos que pueden ser liberados varía ampliamente, relacionándose con la fisiología y adaptación reproductiva de cada especie ([Browne et al., 2019](#)); así como de tres características físicas: tamaño corporal, tamaño de los testículos o la edad ([Uribe y Mejía-Roa, 2014](#)), lo cual también fue observado en nuestro estudio. La viabilidad espermática observada en fresco fue de 80 a 98%, siendo este el primer trabajo que registra el porcentaje de espermatozoides vivos extraídos de los espermátóforos. Estos resultados se contraponen a los reportados por [Mansour et al. \(2011\)](#), quienes obtuvieron espermatozoides por medio de masaje cloacal, reportando un 100% de espermatozoides vivos en todas las muestras analizadas.

Por otra parte, un estudio realizado por [Chester \(2013\)](#), menciona que obtuvo de 64 a 86 % de viabilidad espermática después de llevar a cabo la criopreservación de espermátóforos. Estos datos difieren de lo obtenido en este trabajo, donde la viabilidad obtenida en espermatozoides descongelados estuvo en un promedio de 45 a 68 %, por lo que este resultado nos indica que la membrana del capuchón puede funcionar como una barrera, la cual protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de la congelación ([Chester, 2013](#); [Hall et al., 2016](#)).

La utilización de lectinas WGA-FITC y PNA-FITC mostró ser una alternativa para identificar la presencia y distribución de los residuos glucosídicos B-galactosa y Acetilglucosamina. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por [Sáez et al., \(2004\)](#), en donde se determinó que en el momento de la espermatogénesis diferentes carbohidratos entre ellos B- galactosa y acetilglucosamina se presentan en la membrana de las células que se encuentran en diferente etapa de desarrollo durante la espermiogénesis.

La presencia y distribución de los residuos glucosídicos, indica diferencias a lo largo de toda la membrana, lo cual se determinó con cada lectina, que cada una identificó al menos dos patrones de fluorescencia diferentes; los cuales pueden estar asociados a diferentes estados metabólicos de los espermatozoides que les permitan o no el reconocimiento entre gametos.

La presencia y distribución de los residuos glucosídicos permite caracterizar la membrana de los espermatozoides que se encuentren en diferente estado metabólico, asociados a la capacitación y reacción acrosomal, y por lo cual su capacidad fertilizante,

(Browne *et al.*, 2015). Lo anterior puede ser de utilidad en protocolos de reproducción asistida que involucren el manejo *in vitro* de los espermatozoides.

Utilizando la reproducción asistida en cautiverio, se contribuye a la conservación de la especie; además de disminuir la extracción de animales de su medio y venta ilegal (Jimenez *et al.*, 2017); los cuales pueden tener un aprovechamiento sustentable destinando ejemplares a la conservación, investigación biomédica y conservación en colecciones públicas y privadas (Prieto *et al.*, 2014), que es en estas últimas, en las cuales es donde se han reproducido los ejemplares fuera de su hábitat natural; sin embargo, la reproducción de anfibios y su cría en cautiverio es relativamente mínimo (Ananjeva *et al.*, 2015).

CONCLUSIÓN

El protocolo de criopreservación utilizado demostró ser eficiente, manteniendo parámetros de viabilidad e integridad membranal, a pesar de encontrar diferencias espermáticas asociadas al número de espermátóforos presentes en cada liberación, por lo cual este estudio aporta herramientas y conocimientos para la reproducción asistida en cautiverio del *Ambystoma mexicanum*.

LITERATURA CITADA

ANANJEVA NB, Uteshev VK, Orlov NL, Gakhova EN. 2015. Strategies for conservation of endangered amphibian and reptile species. *Biological Bulletin*. 42:432–439.

<https://link.springer.com/article/10.1134/S1062359015050027>

ATENCIO V, Pérez E, Espinosa J, Pardo S. 2013. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de *Bocachico prochilodus magdalenae*. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 45(2):151-158.

<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200006>

BROWNE R, Chester R, Figiel Jr. 2011. Amphibian conservation and cryopreservation of sperm, cells, and tissues. *In Cryopreservation in Aquatic Species*. 8(3):345-365.

http://www.herpconbio.org/Volume_8/Issue_3/Figiel_2013.pdf

BROWNE RK, Kaurova SA, Uteshev VK, Shishova NV, McGinnity D, Figiel CR, Mansour N, Agnew D, Wu M, Gakhova EN, Dzyuba B, Cosson J. 2015. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*. 83(1):1-13.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.018>

BROWNE RK, Silla AJ, Upton R, Della-Togna G, Marcec-Greaves R, Shishova NV, Uteshev VK, Proaño B, Pérez OD, Mansour N, Kaurova SA, Gakhova EN, Cosson J, Dyzuba B, Kramarova LI, McGinnity D, Gonzalez M, Clulow J, Clulow S. 2019. Sperm collection and storage for the sustainable management of amphibian biodiversity. *Theriogenology*. 5:133:187-200. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.035>. PMID: 31155034.

CATENAZZI A. 2015. State of the world's amphibians. *Annual Review of Environment and Resources*. 40:91-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102014-021358>

CLULOW J, Trudeau VL, Kouba AJ. 2014. Amphibian declines in the twenty-first century: Why we need assisted reproductive technologies. In *Reproductive Sciences in Animal Conservation*, W.V. Holt, J.L. Brown, and P. Comizzoli, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 275-316. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_12

COMIZZOLI P, Songsasen N, Hagedorn M, Wildt DE. 2012. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology*. 78(8):1666-1681. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.008>.

CHESTER RF. 2013. Cryopreservation of sperm from the axolotl *Ambystoma mexicanum*: implications for conservation. *Herpetological Conservation and Biology*. 8(3):748-755. http://www.herpconbio.org/Volume_8/Issue_3/Figiel_2013.pdf

DOYLE JM, McCormick CR, De Woody JA. 2011. The quantification of spermatozoa by real-time quantitative PCR, spectrophotometry, and spermatophore cap size: Technical advances. *Molecular Ecology Resources*. 11(1):101-106. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02892.x>.

EPI. Info R7. 2020. paquete estadístico de libre acceso Epi. Info 7R. https://www.cdc.gov/epiinfo/esp/es_pc.html

HERRERA JA, Calderón G, Cruz C, Ávila MA, Quintero GE, Fierro RC. 2017. Changes in the membrane carbohydrates from sperm cryopreserved with dimethylsulfoxide or polyvinylpyrrolidone of red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). *Cryo Letters*. 38(4):257-262. PMID: 29734426. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29734426/>

HALL KW, Eisthen HL, Williams BL. 2016. Proteinaceous pheromone homologs identified from the cloacal gland transcriptome of a male axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *PLOS ONE* 11, e0146851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146851>

JIMÉNEZ JO, Aviña CR, Ramírez AE, Lucero FG, Andreu CG. 2017. Conservación *ex-situ* de poblaciones en riesgo de ajolotes (*Ambystoma* spp.) del estado de Puebla, Mexico. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 8(18):1-10. [http://cmas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/90/1/8\(18\)-1.pdf](http://cmas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/90/1/8(18)-1.pdf)

KHATTAK S, Murawala P, Andreas H, Kappert V, Schuez M, Sandoval-Guzmán T, Crawford K, Tanaka EM. 2014. Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-promediated recombination. *Nature Protocols*. 9(3):529-540. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.040>

NOM-059-SEMARNAT-2010, Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf

MANSOUR N, Lahnsteiner F, Patzner RA. 2011. Collection of gametes from live axolotl, *Ambystoma mexicanum*, and standardization of *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 75(2): 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.006>

MENDOZA VT. 2012. Importancia ecológica y cultural de una especie endémica de ajolote (*Ambystoma dumerilii*) del lago de Patzcuaro Michoacan. *Etnobiología*. 10(2):40-49. <https://revistaetnobiologia.mx/index.php/etno/article/view/212/213>

Miller DJ. 2015. Regulation of Sperm Function by Oviduct Fluid and the Epithelium: Insight into the Role of Glycans. *Reproduction in Domestic Animals*. 50 Suppl (2):31-39. PMID: 26174917 DOI: 10.1111/rda.12570

NAOFUMI M. 2015. Protein-carbohydrate interaction between sperm and the egg-coating envelope and its regulation by dicalcin, a *Xenopus laevis*, zona pellucida protein-associated protein. *Molecules*. 20(5):9468-9486. <https://doi.org/10.3390/molecules20059468>

PRIETO MT, Sanchez-Calabuig MJ, Hildebrandt TB, Santiago-Moreno J. Saragusty J. 2014. Sperm cryopreservation in wild animals. *European Journal of Wildlife Research*. 60: 851-864. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10344-014-0858-4>

SÁEZ FJ, Madrid JF, Cardoso S, Gómez L, Hernández F. 2004. Glycoconjugates of the urodele amphibian testis shown by lectin cytochemical methods. *Microscopy Research and Technique*. 64(1):63-76. <https://doi.org/10.1002/jemt.20059>

SHISHOVA NR, Uteshev VK, Kaurova SA, Browne RK, Gakhova EN. 2011. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with rana temporaria as a model research species. *Theriogenology*. 75(2):220-232. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.008>

SILLA AJ, y Byrne PG. 2019. The Role of Reproductive Technologies in Amphibian Conservation Breeding Programs. *Annual Review of Animal Biosciences*. 7(1):499-519. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115056>

SUNNY A, Monroy-Vilchis O, Fajardo V, Aguilera-Reyes U. 2014. Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in México. *Conservation Genetics*. 15:49-59.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-013-0520-9>

TANISŁAW K, Anna W, Magdalena K, Krzysztof G. 2017. Application of two staining methods for sperm morphometric evaluation in domestic pigs. *Journal of Veterinary Research*. 61(3):345-349. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0045>

PELÁEZ J, Bongalhardo DC, Long JA. 2011. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poultry Science*. 90(2):435-43. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00998>.

TAKU S, Masakazu A, Seiji G. 2004. A new method to extract sperm from spermatophores of the male spiny king crab *P aralithodes brevipes* (Anomura: *lithodidae*). *Crustacean Research*. (33):10-14.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/crustacea/33/0/33_KJ00004479508/_pdf

IUCN the Red List of Threatened Species. 2020. Disponible en línea en: <https://www.iucnredlist.org/search?query=AMBYSTOMA%20MEXICANUM&searchType=species>

URIBE MC, Mejía-Roa V. 2014. Testicular structure and germ cells morphology in salamanders. *Spermatogenesis*. 4, e988090.

<https://doi.org/10.4161/21565562.2014.988090>

TIETJE M, Rödel M. 2018. Evaluating the predicted extinction risk of living amphibian species with the fossil record. *Ecology Letters*. 21(8):1135-1142.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ele.13080>