

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

Criopreservação 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 correspondência: 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

Resumo

Ambystoma mexicanum está em perigo de extinção em vida livre, devido aos efeitos antropogênicos; a criopreservação de espermatozoides para sua reprodução em cativeiro pode auxiliar na sua conservação *ex situ*. O objetivo desta pesquisa foi identificar a viabilidade fresco e pós-descongelamento de espermatozoides de diferentes espermatóforos. Durante a estação reprodutiva, a liberação de espermatóforos foi induzida em nove espécimes pela redução da temperatura da água. A concentração média por espermatóforo foi de $2,6 \pm 0,6 \times 10^4$ espermatozoides. Uma redução de 30% nos espermatozoides vivos e um aumento de 15% na morfologia anormal foram determinados nos espermatozoides frescos e pós-descongelamento. Com as lectinas WGA e PNA, ligadas ao FITC, foram determinados dois padrões diferentes de fluorescência com cada um, os quais evidenciaram a presença e distribuição na membrana de N-acetil glucosamina, ácido siálico e manose respectivamente. As porcentagens de espermatozoides com cada padrão de fluorescência apresentaram diferenças associadas ao número de espermatóforos de cada liberação. Diferenças na viabilidade de espermatozoides obtidos de liberações com diferentes números de espermatóforos foram determinadas. O protocolo de obtenção e criopreservação do esperma de *A mexicanum* mostrou-se eficiente como ferramenta de utilização do sêmen criopreservado para sua reprodução *ex situ*.

Palavras-chave: Anfíbio, conservação, 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 spermatophores 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, spermatophore, urodele.

INTRODUÇÃO

A diminuição das populações de anfíbios os levou à extinção em casos graves, as principais causas são a poluição ou modificação de seu habitat, a introdução de espécies exóticas invasoras e doenças (Catenazzi, 2015; Jiménez *et al.*, 2017; Tietje e Rödel, 2018). Atualmente, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2020), indica que mais de 85% das espécies de anfíbios do México estão em alguma categoria de risco, devido a esta situação, a maioria das espécies do gênero *Ambystoma* em estado selvagem vida, atualmente foi escolhido para reproduzi-los em condições de laboratório (Mendoza, 2012; Khattak *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2017). Especificamente, *Ambystoma mexicanum* está incluído no NOM-059 - SEMARNAT- 2010 como uma espécie ameaçada de extinção (NOM-059-ECOL, 2010).

A reprodução *ex situ* com sêmen criopreservado é uma ferramenta de reprodução assistida em cativeiro que pode contribuir para a conservação de *Ambystoma mexicanum*; além de contribuir para aumentar sua variabilidade genética, pois na maioria dos casos a ameaça está em seu próprio habitat (Clulow *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2017). No entanto, antes de implementar um protocolo de criopreservação de espermatozoides, é necessário conhecer a biologia reprodutiva e as características espermáticas da espécie, para obter maior sucesso (Chester, 2013; Silla e Byrne, 2019).

Atualmente, as técnicas de obtenção de gametas (espermatozoides e óvulos) realizadas em anfíbios são altamente invasivas, uma vez que a maioria dos processos exige o sacrifício do espécime para extrair os testículos ou dutos eferentes e proceder à maceração (Chester, 2013; Shishova *et al.*, 2011). A maioria dos protocolos de criopreservação usados em espermatozoides de diferentes espécies, de anfíbios, foram extrapolados daqueles relatados em peixes (Comizzoli *et al.*, 2012); mostrando resultados variáveis entre cada um. Chester (2013) criopreservou espermátóforos inteiros de *A mexicanum* usando sacarose como principal crioprotetor, relatando 84% de espermatozoides vivos após serem descongelados; no entanto, ele não informa o parâmetro de esperma vivo antes do congelamento.

Sabe-se que a manipulação *in vitro* dos espermatozoides acarreta alterações em sua membrana plasmática, nas quais foi descrita a presença de carboidratos de membrana, que têm um papel no reconhecimento entre os gametas para a fertilização (Peláez *et al.*, 2011).

Porque a base de dados sobre estudos morfológicos e de criopreservação em espermatozoides anfíbios, especificamente da ordem Urodelo, é limitada (Browne e Chester, 2011; Chester, 2013; Sunny *et al.*, 2014).

O objetivo desta pesquisa foi identificar os parâmetros básicos de avaliação e características de membrana em espermatozoides de diferentes espécimes e espermatóforos de cada um, para avaliar um protocolo de criopreservação que permita manter sua capacidade de fertilização pós-descongelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Cuidado e bem estar

O manejo do axolote foi realizado nas instalações do Centro de Pesquisas Biológicas e Aquícolas de Cuemanco (CIBAC-UAMX), de acordo com o Plano de Manejo, autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente e Recursos Naturais (SEMARNAT) à Unidade da Para a Manejo e Conservação de Fauna Silvestre (UMA) CIBAC, com registro DGVS-CR-IN 0952-DF/07/UMA CIBAC.

Alojamento e coleção de espermatóforos

Os axolotes foram alojados para monitoramento por um ano individualmente em recipientes de 60 L, a uma temperatura de 18 °C, com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuridão. Para estimular a liberação dos espermatóforos, os machos foram transferidos para um recipiente de vidro com capacidade para 700 L de água, que foi condicionado com solo arenoso e plantas aquáticas. Durante as horas de escuridão, usando um chiller de 0,25 HP (Ártica Resun CL-600), a temperatura da água foi reduzida; da mesma forma para todos os espécimes de 18 a 14 °C, introduzindo 3 fêmeas por macho. Os espermatóforos foram recuperados do fundo do recipiente, no início das 12 horas de luz seguintes.

Gerenciamento de espermatóforos e coleta de esperma

Os espermatóforos liberados por cada espécime foram coletados a 5 °C em 2 ml de meio Simplified Amphibian Ringer (SAR), composto por 113 mM NaCl, 1 mM CaCl, 2,0 mM KCl e 3,6 mM NaHCO, com 220 mOsmol kg⁻¹. Os espermatozoides foram obtidos colocando os espermatóforos de cada espécime em uma caixa Nunc^{MR} de 4 poços com 0,5 ml de meio SAR; no primeiro poço, foram lavados para retirada de resíduos de matéria orgânica. No segundo poço, o material gelatinoso (glicoproteínas) foi retirado para obtenção da tampa contendo os espermatozoides; no terceiro poço, 0,5 ml de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 20% foi usado para amolecer a tampa por 10 min (Taku *et al.*, 2004); no quarto poço com 0,5 ml de meio SAR, os espermatozoides foram extraídos por maceração da tampa. Por aspiração, os espermatozoides foram extraídos do sobrenadante, em seguida foram filtrados com malha de 30 µm e o total de espermatozoides foi recuperado dos espermatóforos de cada liberação num tubo

Eppendorf com 500 µl de meio SAR a 5 °C, para fazer um pool de espermatozoides de cada lançamento.

Criopreservação de espermatozoides

Cada pool de espermatozoides, mantido a 5 °C, foi ajustado com 6% Dimetilacetamida (DMA), então canudos de 0,25 ml foram preenchidos, para manter o equilíbrio por 10 min a 2 °C, então eles foram colocados a 5 cm em vapor de nitrogênio em -76 °C por 15 minutos e posteriormente submerso em nitrogênio líquido a -196 °C, para ser criopreservado por 30 dias até posterior descongelamento a 15 °C por 5 min ([Atencio et al., 2013](#)).

Avaliação espermática básica

A porcentagem de espermatozoides vivos foi determinada por meio de esfregaço feito com mistura 1: 5 de espermatozoides com coloração de eosina-nigrosina, em que 100 espermatozoides foram contados ao microscópio a 40X. Foram considerados espermatozoides vivos, os não corados e mortos, os que apresentaram coloração. A morfologia espermática foi avaliada na mesma coloração, para determinar as porcentagens de espermatozoides com alterações morfológicas na cabeça, pescoço ou região do flagelo ([Tanisław et al., 2017](#)).

Distribuição de carboidratos na membrana

Com o uso de lectinas da aglutinina *Triticum vulgare* (WGA), com afinidade para resíduos de N-acetilglucosamina e *Arachis hypogaea* (PNA) com afinidade para β-galactose, conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FICT), pretendeu-se determinar a presença de carboidratos que foram relatados são receptores de reconhecimento entre gametas ([Herrera et al., 2017](#)) e como partes estruturais do plasmalema de espermatozoides ([Miller, 2015](#)). Num volume final de 40 µl de meio SAR, com 5×10^6 espermatozoides, foram adicionados 10 µl de WGA-FICT ou PNA-FITC na concentração de 15 mg/ml; foram incubados a 25 °C por 30 minutos, esses espermatozoides cobrindo-os com luz; imediatamente, as preparações foram feitas em lâminas de objetos, para serem observadas ao microscópio. Cada preparação foi observada diretamente em um microscópio de fluorescência a 260 nm de excitação e > 560 nm de emissão, contando 100 espermatozoides. A presença de carboidratos de membrana foi determinada por padrões de fluorescência e a proporção de espermatozoides com cada padrão determinado ([Naofumi, 2015](#)).

Análise estatística

Foi determinada a frequência de espermatozoides vivos, com morfologia normal e com os diferentes padrões de fluorescência nas amostras frescas e descongeladas, que foram expressos em proporção com seus respectivos erros padrão (EP). As diferentes variáveis foram comparadas entre os grupos de espermatozoides frescos e descongelados com o teste χ^2 , com alfa de 0,05; usando o pacote estatístico de acesso livre [EpiInfo 7.3](#).

RESULTADOS

Diferentes quantidades de eventos reprodutivos e número de espermátóforos liberados por cada espécime foram determinados; Foi obtido um total de 61 espermátóforos. A frequência da quantidade de espermátóforos liberados por espécime foi a seguinte: 1:12, 2:10, 1:8, 1:6, 3:4 e 1:3. A concentração de espermatozóides foi em média $2,6 \pm 0,6 \times 10^4$ espermatozóides/ml, com um intervalo entre $1,0 \pm 2,5$ a $4,0 \pm 3,0$. A concentração de espermatozóides em liberações com seis ou mais espermátóforos ($2,5 \times 10^4$ espermatozóides/ml), foi maior ($P < 0,05$) do que a concentração de espermatozóides ($2,5 \times 10^4$ espermatozóides/ml) em liberações com menos de seis espermátóforos.

Parâmetros de avaliação de esperma

As porcentagens de espermatozóides vivos diminuíram ($P < 0,05$), aproximadamente 30% no pós-descongelamento; encontrando médias de 89% nos espermatozóides frescos e 58% pós-descongelamento. As porcentagens de espermatozóides vivos que foram determinadas em liberações com diferentes números de espermátóforos mostraram diferenças ($P < 0,05$), encontrando uma faixa de 79% a 100% em espermatozóides frescos e de 45% a 67% em espermatozóides descongelados (Tabela 1).

Da mesma forma, a morfologia normal dos espermatozóides mostrou uma redução ($P < 0,05$) de aproximadamente 15%, encontrando porcentagens de 98% na morfologia normal do esperma fresco e 83% após o descongelamento. As porcentagens de espermatozóides com morfologia normal que foram determinadas em lançamentos com diferentes números de espermátóforos não mostraram diferenças ($P > 0,05$), encontrando-se uma faixa média de 95% a 100% nos espermatozóides frescos; entretanto, alguns pós-descongelamento foram diferentes ($P < 0,5$), com percentuais com variação média entre 78% e 90% (Tabela 1).

Presença e distribuição de carboidratos de membrana

Com o uso da lectina WGA-FITC: Nos espermatozóides frescos e pós-descongelamento, a intensidade da fluorescência emitida pela lectina WGA-FITC na membrana espermática, evidenciou a presença de resíduos de N-acetil glucosamina presentes na membrana de *A. mexicanum*. Foram determinados dois padrões de fluorescência denominados: Padrão A) Com fluorescência homogênea intensa no flagelo e região do pescoço e com menor intensidade, mas evidente na região da cabeça (Figura 1A); e padrão B), com fluorescência homogênea evidente em toda a estrutura do esperma (Figura 1B).

Tabela 1. Parâmetros de avaliação de espermatozoides frescos e pós-descongelamento de *A. mexicanum*, nos ejaculados de cada espécime avaliado

ID	Espermatóforos n=	% Espermatozoides com Padrão A ± EP			% Espermatozoides com Padrão B ± EP		
		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 no superíndice (a,b,c), indica diferença (P <0,05) ao comparar a mesma variável entre colunas (Fresco VS Descongelado). Número diferente no super índice (1,2,3), indica diferença (P <0,05) ao comparar as médias na mesma coluna

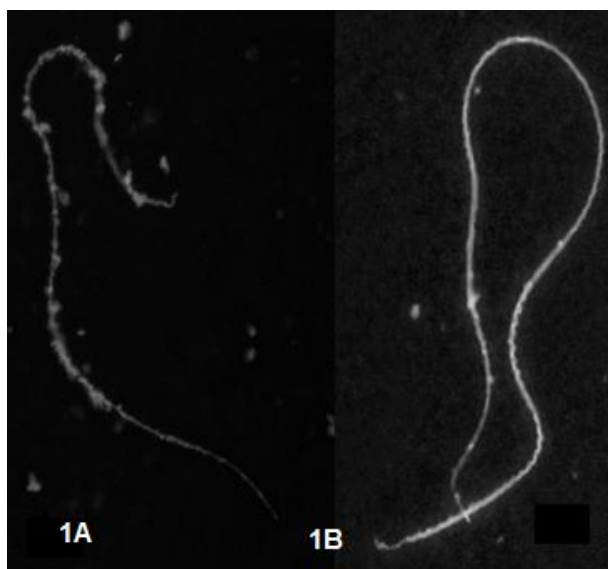


Figura. 1. Padrões de fluorescência do espermatozoides com lectina WGA-FITC. 1A). Maior intensidade de fluorescência é observada nas regiões do flagelo e pescoço e com menor intensidade na cabeça. 1B é observado com intensidade homogênea em toda a estrutura do espermatozoides

A proporção de padrões determinados com WGA-FITC (Tabela 2), mostrou que:

A porcentagem de espermatozoides com padrão A, de liberações de doze a seis espermatóforos, foi semelhante ($P > 0,05$) fresco e pós-descongelamento; em comparação com as porcentagens de espermatozoides de liberações entre oito e três espermatóforos, em que aumentou ($P < 0,05$), nos espermatozoides descongelados. Ao comparar as porcentagens de espermatozoides com padrão A, obtidas nos espermatozoides frescos de cada espécime, foi determinada uma média de 48%, com variação entre 44% e 56%; sem encontrar diferença ($P < 0,05$) entre estes, em espermatozoides descongelados; determinou-se uma média de 54% com variação de 46% a 57 %, encontrando-se percentuais maiores ($P > 0,05$), nos espermatozoides com padrão A, a partir de liberações com 3 e 4 espermatóforos.

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

As porcentagens de espermatozoides com padrão B, das liberações de doze a seis espermatóforos foram semelhantes ($P > 0,05$) fresco e pós-descongelamento; as porcentagens de espermatozoides de liberações com quatro e três espermatóforos foram maiores ($P < 0,05$) quando frescos, em comparação aos descongelados. No fresco, foi determinada uma média de 53%, com variação entre 46 a 65%, sem encontrar diferença ($P < 0,05$) entre eles; nos espermatozoides descongelados, foi determinada uma média de 46% com variação de 42% a 53%, encontrando-se percentuais mais elevados ($P > 0,05$) nos espermatozoides de liberações com 10 e 12 espermatóforos.

Ao realizar a comparação geral total (Pool) das porcentagens, ficou evidente a diferença e inversamente a diferença pelas porcentagens totais apuradas, que foram para espermatozoides com Padrão A: X^2 de 7,21 $p < 0,05$, no sêmen fresco com 47,7% e 54,3 % para sêmen descongelado; Em relação aos espermatozoides com Padrão B: foi determinado um X^2 de 10,8 $p < 0,05$, no sêmen fresco com 53,5% e 45,6% no sêmen descongelado.

Com o uso da lectina PNA-FITC: em espermatozoides frescos e pós-descongelamento, a intensidade da fluorescência emitida pela lectina PNA-FITC na membrana espermática, que evidenciou a presença de resíduos glicosídicos β -galactose, presentes nos espermatozoides membrana de *A mexicanum*. Foram determinados dois padrões de fluorescência: C) com fluorescência intensa e homogênea em toda a estrutura do esperma (Figura 2A); padrão D) Com fluorescência fraca homogênea em toda a estrutura do esperma (Figura 2B).

A proporção de padrões determinados com PNA-FITC, (Tabela 3), mostrou que:

Com os padrões C e D, as porcentagens de espermatozoides de liberações entre 6 a 12 espermatóforos foram semelhantes ($P > 0,05$) fresco e pós-descongelamento, em comparação com as porcentagens de espermatozoides de liberações com três e quatro espermatóforos, que foram aumentadas ($P < 0,05$), no esperma descongelado.

Tabela 2. Porcentagens de espermatozoides frescos e pós-descongelamento, com dois padrões de fluorescência A e B determinados com o uso da lectina WGA-FITC

	Espermatóforos n=	% Espermatozoides com padrão A ± EP			% Espermatozoides com padrão B ± EP		
		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 no superíndice (a,b,c), indica diferença ($P < 0,05$) ao comparar a mesma variável entre as colunas (Fresco vs Descongelado)

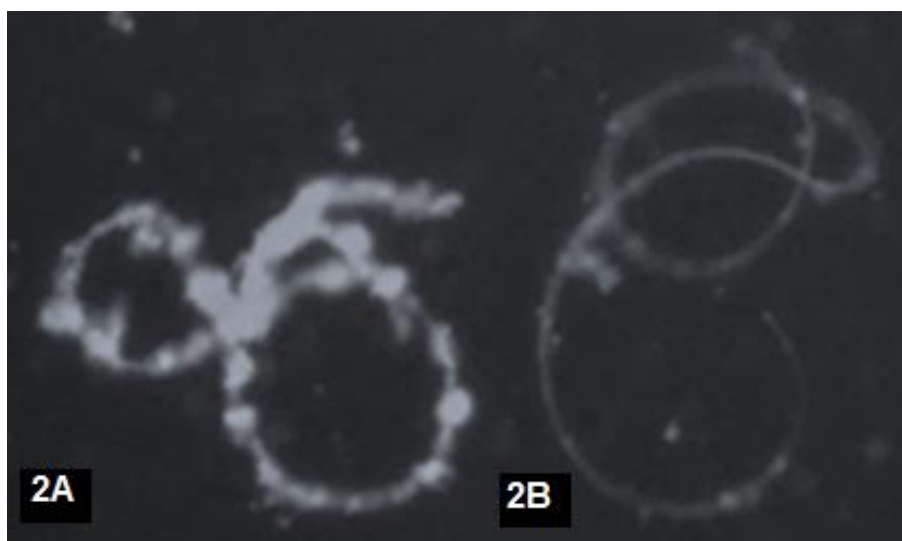


Figura 2. Padrões de fluorescência obtidos com lectina PNA-FITC: A) Com fluorescência intensa homogênea, B) Com fluorescência fraca homogênea

Os percentuais de espermatozoides com padrão C e D, determinados com a lectina PNA-FITC, só apresentaram diferença ($P < 0,05$) após o descongelamento, quando os espermatozoides vieram de liberações com oito espermatóforos, observando-se maior percentual nos espermatozoides com padrão C pós descongelamento e, inversamente, em espermatozoides com padrão D. A porcentagem foi maior no sêmen fresco, nas porcentagens de espermatozoides de liberações com doze, dez, seis, quatro ou três espermatóforos. Ao comparar as porcentagens de **espermatozoides com Padrão C** de cada espécime, fresco com média de 54%, com variação entre 49% a 58% e pós-descongelamento com média de 60% e variação entre 47% e 69%, não foram encontradas diferenças ($P < 0,05$).

Ao comparar as porcentagens de **espermatozoides com o padrão D** de cada espécime, fresco com média de 48%, com variação entre 42% a 55%, não foram observadas porcentagens diferentes ($P < 0,05$). Nos espermatozoides descongelados, foi encontrada uma média de 42%, com variação entre 24% a 53%, não foram observados percentuais de diferença ($P < 0,05$).

Tabela 3. Porcentagens de espermatozoides frescos e pós-descongelamento, com dois padrões de fluorescência C e D determinados com o uso da lectina PNA-FITC

ID	Espermatóforos n=	% ± EP Espermatozoides com padrão C			% ± EP Espermatozoides com padrão 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

Literal diferente no superíndice ^(a,b,c), indica diferença ($P < 0,05$) ao comparar a mesma variável entre as colunas (Fresco vs Descongelado)

DISCUSSÃO

Em relação à concentração espermática, os dados mostraram que existem diferenças entre os espermatóforos dum mesmo espécime e entre os espécimes. Esses resultados são semelhantes aos publicados por [Doyle et al. \(2011\)](#), no número de espermatozóides entre os espermatóforos liberados de espécimes de *A maculatum*. A quantidade e o tamanho dos espermatóforos que podem ser liberados variam amplamente, estando relacionados à fisiologia e adaptação reprodutiva de cada espécie ([Browne et al., 2019](#)); além de três características físicas: tamanho do corpo, tamanho do testículo ou idade ([Uribe e Mejía-Roa, 2014](#)), o que também foi observado em nosso estudo. A viabilidade espermática observada a fresco foi de 80 a 98%, sendo este o primeiro estudo a registrar a porcentagem de espermatozóides vivos extraídos dos espermatóforos. Esses resultados contrastam com os relatados por [Mansour et al. \(2011\)](#), que obteve esperma por meio da massagem cloacal, relatando 100% de espermatozóides vivos em todas as amostras analisadas.

Por outro lado, estudo realizado por [Chester \(2013\)](#) menciona que obteve de 64 a 86% de viabilidade espermática após a realização da criopreservação de espermatóforos. Esses dados diferem do obtido neste trabalho, onde a viabilidade obtida em espermatozóides descongelados foi em média de 45 a 68%, portanto este resultado indica que a membrana cap pode funcionar como uma barreira, que protege os espermatozóides de oscilações de congelamento ([Chester, 2013](#); [Hall et al., 2016](#)).

A utilização das lectinas WGA-FITC e PNA-FITC mostrou-se uma alternativa para identificar a presença e distribuição dos resíduos glicosídicos B-galactose e Acetilglucosamina. Esses resultados são consistentes com o trabalho realizado por [Sáez et al., \(2004\)](#), onde foi determinado que, no momento da espermatogênese, diferentes carboidratos, incluindo B-galactose e acetilglucosamina, estão presentes na membrana das células encontradas em diferentes estágios de desenvolvimento durante a espermiogênese.

A presença e distribuição de resíduos glicosídicos indicam diferenças em toda a membrana, o que foi determinado com cada lectina, em que cada uma identificou pelo menos dois padrões de fluorescência diferentes; que podem estar associados a diferentes estados metabólicos dos espermatozóides que permitem ou não o reconhecimento entre gametas.

A presença e distribuição de resíduos glicosídicos permite caracterizar a membrana dos espermatozóides que se encontram em diferentes estados metabólicos, associados ao treinamento e reação acrossomal e, portanto, sua capacidade fertilizante ([Browne et al., 2015](#)). Isso pode ser útil em protocolos de reprodução assistida que envolvem o manuseio *in vitro* de espermatozóides.

Utilizando a reprodução assistida em cativeiro, contribui para a conservação da espécie; além de reduzir a extração de animais de seu ambiente e a venda ilegal (Jimenez *et al.*, 2017); que pode tem um uso sustentável alocando espécimes para conservação, investigação biomédica e conservação em coleções públicas e privadas (Prieto *et al.*, 2014), sendo nestas últimas onde os espécimes foram produzidos fora de seu hábitat natural; no entanto, a reprodução e reprodução de anfíbios em cativeiro é relativamente mínima (Ananjeva *et al.*, 2015).

CONCLUSÃO

O protocolo de criopreservação utilizado mostrou-se eficiente, mantendo parâmetros de viabilidade e integridade de membrana, apesar de encontrar diferenças espermáticas associadas ao número de espermatóforos presentes em cada liberação, para os quais este estudo fornece ferramentas e conhecimentos para a reprodução assistida em cativeiro de *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, Dzyuba 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 *Pandalus 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>