



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Implementación de una metodología para la criopreservación de espermatozoides de saurios del género *Sceloporus*”.**

T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Uriel Ángel Sánchez Rivera

Tutor Principal:  
Dr. Martín Martínez Torres  
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala)

Comité tutor:  
Dr. José Alfredo Medrano Hernández  
(Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán)

Dr Julián Santiago Moreno  
(Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, España)

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Agosto de 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous?  
Telle est bien la beauté et la noblesse de la science:  
désir sans fin de repousser les frontières du savoir,  
de traquer les secrets de la matière et de la vie  
sans idée préconçue des conséquences éventuelles.*

Marie Curie

## **Dedicatorias**

A mis padres, Sonia y Hugo, por su apoyo y comprensión en cada etapa de mi vida. Por siempre motivarme para superarme y dar lo mejor de mi.

A mi hermano Hugo, a mi cuñada Karla y a mis sobrinos Leah y Santiago. Por los grandes momentos compartidos y los momentos de alegría.

A Bere por ser la mejor compañía que puedo tener en mis aventuras, por todo lo que compartimos, por su comprensión, consejos, cariño, por el crecimiento que seguimos teniendo en muchos ámbitos y lo que nos falta por alcanzar.

A grandes personas que han contribuido a mi formación profesional, el Dr. Martín y Dr. Alfredo por brindarme la confianza para continuar mi formación, por el conocimiento y las oportunidades. A la maestra Carmen por ser una gran consejera y amiga. Por transmitirnos su alegría y conocimientos no sólo del Laboratorio.

A Yabín por su amistad, por las pláticas emocionantes sobre la ciencia y la búsqueda por generar información para aportar algo a nuestros organismos. A mis demás amigos ectotermos, Rodrigo Dávila, Eduardo Loya (aunque se resista a ser ectotermo), Alejandro Cadena, María Muciño y Evelyn Martínez por todos los momentos compartidos.

A mis amigos Raquel Gutierrez, Eduardo Cid, Carol Galindo, Yazmín Sánchez, Carlos Corona, Diana Rellstab, Karina Martínez, Fernanda López, Cynthia García, Jennifer Martínez, Luis Romero, Julián Torres, Julio Martínez, Daysi Martínez, Miguel Olguín, Karen Flores, Berenice Bernal, Ivette Reyes, Sandra Mestas, Estefanny Lima, Luis García, Cynthia Ibarra, Eduardo Hernández, Suleyma Esquivel, Carlos Contreras y Claudia Rocha.

A nuestra gran diversidad y a los animales por brindarnos la oportunidad de aprender de, por y para ellos.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por brindarme la oportunidad y los medios para el desarrollo de mi formación profesional.

Al Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, sitio donde he podido aprender y adquirir mucho conocimiento y experiencias. A mi tutor, el Dr. Martín Martínez Torres, por todo el apoyo, esfuerzo y dedicación para la culminación de este proyecto, por la constante búsqueda del progreso en esta área.

Al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto, particularmente al Dr. Alfredo Medrano Hernández y a la M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez por su apoyo absoluto, así como por hacerme sentir parte de este equipo de investigación.

A mi Comité Tutor, al Dr. Alfredo Medrano Hernández y al Dr. Julián Santiago Moreno, ya que su experiencia, comentarios y sugerencias fueron fundamentales y benéficos para el desenvolvimiento del presente trabajo.

A mi Comité revisor de tesis, al Dr. Andrés Aragón Martínez, a la Dra. Mayel Espín Chirinos del Valle y al Dr. Enrique Othón Hernández González por su empeño en la revisión y acertados comentarios al trabajo escrito.

A mis colegas y grandes amigos, con quienes formamos un grupo sinérgico y con quienes encuentro apoyo para las colectas, el cuidado de los organismos, en los experimentos y en las jornadas intensas de trabajo: a la M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez por siempre estar al pendiente de todos, a la M. en C. Norma Berenice Cruz Cano por las discusiones que enriquecen el trabajo, al Biol. Yabín Castro Camacho y al Biol. Rodrigo Dávila Govantes.

Al Laboratorio de Espermatología y Criobiología Comparada del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria por la oportunidad de aprender distintas técnicas y la oportunidad de integrarme en los proyectos de investigación que desarrollan. En especial al Dr. Julián Santiago y la Dra. Berenice Bernal por compartir sus conocimientos en la fisiología espermática aviar.

Al p. M.V.Z. Julián Torres Gloria y a la p. M.V.Z. Sandra Mestas por su apoyo en la realización del experimento.

Al CONACyT por el apoyo brindado por medio de la beca de Posgrado: 703732 y al proyecto UNAM-PAPIIT: IN220419 por el financiamiento de la investigación.

## Resumen

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza estima que el 20% de los lagartos se encuentran en alguna categoría de riesgo, debido principalmente a las actividades humanas. A pesar de que se han desarrollado diversos programas de conservación, los esfuerzos no han sido suficientes para revertir esta situación, por lo que aplicar las técnicas de reproducción asistida es una alternativa para contribuir a la preservación de la herpetofauna. Por ello, el propósito de este estudio fue evaluar y comparar la respuesta de los espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* al proceso de criopreservación. Previo a la etapa de cortejo, se colectaron machos sexualmente maduros de *S. aeneus* (n = 21), *S. grammicus* (n = 20) y *S. torquatus* (n = 21). Para la obtención del semen, se indujo la relajación para limpiar la cloaca y realizar la opresión de las papilas genitales. Se midió el volumen y se diluyó el semen en medio de Tris yema de huevo hasta 150 µl. Se evaluaron distintos parámetros como: concentración espermática, motilidad progresiva, viabilidad y morfología espermática e integridad de la membrana plasmática y acrosomal. El volumen restante se enfrió a una velocidad de 0.1 °C/ minuto hasta 5 °C, para incorporar en dos fracciones el glicerol (8% v/v). Se procedió a congelar cápsulas de 40 µl sobre hielo de CO<sub>2</sub> y se sumergieron en nitrógeno líquido para su almacenamiento por al menos tres semanas. Se descongelaron las muestras durante 3 minutos a 29 °C y se diluyeron 1:1 en medio sin crioprotector para su valoración. Se observó que la opresión de la papila genital es un método eficiente para la obtención del semen y con la selección adecuada de los machos, se pudieron obtener muestras de buena calidad. Se encontró una relación del peso con el volumen seminal para *S. aeneus* y *S. torquatus*, así como con la concentración espermática para *S. grammicus*. Se encontraron cambios asociados con la criopreservación en todos los parámetros evaluados. Los espermatozoides de *S. torquatus* y *S. aeneus* mostraron una mayor tolerancia a la congelación, respecto a los de *S. grammicus*. Esta metodología permitió la criopreservación de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* con la mayor afectación en la motilidad y viabilidad espermática.

Palabras clave: Criopreservación, espermatozoides, lagartijas, *Sceloporus*, reproducción asistida.

## Abstract

The International Union for Conservation of Nature estimates that 20% of lizards are in some category of risk, mainly due to human activities. Although various conservation programs have been developed, the efforts have not been enough to reverse this situation. The application of assisted reproduction techniques is an alternative that could contribute to the preservation of herpetofauna. Thus, the purpose of this study was to evaluate and compare Sceloporine lizard's spermatozoa response to the cryopreservation method. Sexually mature males of *S. aeneus* (n = 21), *S. grammicus* (n = 20), and *S. torquatus* (n = 21) were collected before the courtship season. For semen obtaining, relaxation was induced to clean the cloaca, and the oppression of the genital papillae was performed. Seminal volume was measured and semen was diluted in Tris egg yolk medium to 150  $\mu$ l. Different parameters such as: sperm concentration, progressive motility, sperm viability, and morphology, as well as integrity of the plasma and acrosomal membrane were evaluated. The remaining volume was cooled at a rate of 0.1  $^{\circ}$ C / minute up to 5  $^{\circ}$ C, to incorporate in two fractions the glycerol (8%, v/v). The 40  $\mu$ l pellets were frozen on CO<sub>2</sub> ice and immersed in liquid nitrogen for their storage for at least three weeks. For samples evaluation, they were thawed for 3 minutes at 29  $^{\circ}$ C and diluted 1: 1 in the medium without cryoprotectant. It was observed that the oppression of the genital papilla is an efficient method for obtaining semen, and with the proper selection of males, good sperm quality samples could be obtained. A relationship between weight and seminal volume was found for *S. aeneus* and *S. torquatus*, as well as with sperm concentration for *S. grammicus*. Changes associated with cryopreservation were found in all the parameters evaluated. *S. torquatus* and *S. aeneus* showed a higher tolerance, compared to *S. grammicus*. This methodology allowed the cryopreservation of sperm from lizards of the *Sceloporus* genus with a higher affectation in motility and sperm viability.

Keywords: Cryopreservation, sperm, lizards, *Sceloporus*, assisted reproduction.

## Índice

<b>Dedicatorias</b> .....	I
<b>Agradecimientos</b> .....	II
<b>Resumen</b> .....	III
<b>Abstract</b> .....	IV
<b>Índice de cuadros</b> .....	VIII
<b>Índice de figuras</b> .....	VIII
<b>Introducción</b> .....	1
Situación actual de los reptiles.....	1
Conservación de especies silvestres .....	2
A)    Protección <i>in situ</i> .....	3
B)    Traslocación de las especies .....	3
C)    Mantenimiento en cautiverio .....	4
D)    Reproducción en cautiverio .....	4
E)    Reproducción asistida en machos de especies silvestres .....	5
I.    Aspectos reproductivos de las especies.....	6
II.    Colección de semen .....	7
III.    Análisis del potencial fértil .....	8
a.    Análisis seminal.....	8
b.    Análisis espermático asistido por computadora .....	9
c.    Prueba de unión a la membrana del ovocito .....	9
d.    Inseminación artificial .....	10
IV.    Criopreservación de espermatozoides.....	10
Principios del daño por el proceso de criopreservación .....	11
a)    Características del espermatozoide.....	11
b)    Formación de cristales de hielo.....	14
c)    Estrés osmótico.....	14
d)    Cambios en la membrana plasmática.....	15
e)    Cambios nucleares .....	16
f)    Estrés oxidativo y daño mitocondrial .....	17
g)    Cambios en la expresión genética .....	18

Estrategias para combatir el daño celular.....	19
a) Velocidad de enfriado.....	19
b) Empleo de agentes crioprotectores.....	21
c) Velocidad de descongelación .....	22
d) Composición de los diluyentes .....	22
e) Variaciones al método de criopreservación .....	23
<b>Antecedentes</b> .....	24
Métodos actuales en la investigación de la biología reproductora de reptiles .....	24
Especies de estudio .....	25
Reproducción asistida en reptiles.....	28
a) Obtención del semen. ....	28
b) Procesamiento del semen .....	28
c) Criopreservación.....	31
d) Elección del diluyente.....	31
<b>Justificación</b> .....	34
<b>Objetivos</b> .....	35
General: .....	35
Particulares:.....	35
<b>Metodología</b> .....	36
a) Colecta y mantenimiento de los organismos .....	36
b) Obtención del semen.....	36
c) Dilución y evaluación del semen .....	37
d) Enfriamiento y congelación .....	38
e) Descongelación .....	38
f) Análisis estadístico .....	38
<b>Resultados</b> .....	40
a) Características morfométricas de los organismos .....	40
b) Características del semen.....	40
c) Correlación del volumen seminal y la concentración espermática con el peso y la talla.....	42
d) Motilidad progresiva.....	43
e) Viabilidad espermática .....	44
f) Integridad de la membrana plasmática .....	45

g) Morfología espermática.....	46
h) Integridad del acrosoma.....	47
i) Índices de congelabilidad.....	48
<b>Discusión</b> .....	49
Método de obtención del semen y elección de los individuos .....	49
Características del semen fresco .....	51
Evaluación del daño asociado al proceso de congelación-descongelación .....	53
a) Motilidad progresiva .....	54
b) Viabilidad espermática .....	56
c) Integridad de la membrana plasmática.....	57
d) Morfología espermática .....	58
e) Integridad del acrosoma .....	60
Consideraciones finales .....	60
<b>Conclusiones</b> .....	62
<b>Perspectivas</b> .....	63
<b>Anexos</b> .....	64
Anexo 1: Análisis seminal .....	64
Anexo 2. Evaluación de las características seminales de <i>S. aeneus</i> .....	69
Anexo 3. Evaluación de las características seminales de <i>S. grammicus</i> .....	70
Anexo 4. Evaluación de las características seminales de <i>S. torquatus</i> .....	71

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Métodos de obtención y procesamiento del semen en reptiles.....	29
Cuadro 2. Características morfométricas y del semen de machos del género <i>Sceloporus</i> .....	41
Cuadro 3. Valores de correlación (r) y de p para el volumen seminal con el peso y LHC de machos del género <i>Sceloporus</i> .....	42
Cuadro 4. Índices de congelabilidad para las diferentes variables estudiadas en individuos del género <i>Sceloporus</i> .....	48
Cuadro 5. Evaluación de las características seminales de <i>S. aeneus</i> previo y posterior a la criopreservación.....	69
Cuadro 6. Evaluación de las características seminales de <i>S. grammicus</i> previo y posterior a la criopreservación.....	70
Cuadro 7. Evaluación de las características seminales de <i>S. torquatus</i> previo y posterior a la criopreservación.....	71

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura y ultraestructura del espermatozoide del lagarto de collar, <i>Crotaphytus bicinctores</i> .....	13
Figura 2. Daños principales producidos por la criopreservación de los espermatozoides .....	19
Figura 3. Velocidad de enfriamiento y eventos físicos durante la congelación .....	20
Figura 4. Ejemplar macho adulto de <i>Sceloporus aneneus</i> en Tlazala de Isidro Fabela, Estado de México .....	25
Figura 5. Ejemplar macho adulto de <i>Sceloporus grammicus</i> en Los Reyes Ixtacala, Tlalnepantla, Estado de México .....	26
Figura 6. Ejemplar macho adulto de <i>Sceloporus torquatus</i> en el Parque Estatal Sierra de Guadalupe, Estado de México .....	27
Figura 7. Curva de temperatura a la que se someten los espermatozoides de lagartijas del género <i>Sceloporus</i> durante el proceso de criopreservación.....	39

Figura 8. Emisión de semen blanco lechoso y espeso, en individuo de <i>Sceloporus grammicus</i> .....	40
Figura 9. Cambios en la motilidad progresiva de espermatozoides de lagartijas del género <i>Sceloporus</i> previo y posterior al proceso de criopreservación. ....	43
Figura 10. Cambios en la viabilidad de espermatozoides de lagartijas del género <i>Sceloporus</i> previo y posterior al proceso de criopreservación .....	44
Figura 11. Cambios en la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides de lagartijas del género <i>Sceloporus</i> previo y posterior al proceso de criopreservación.....	45
Figura 12. Cambios en la morfología de espermatozoides de lagartijas del género <i>Sceloporus</i> previo y posterior al proceso de criopreservación .....	46
Figura 13. Cambios en la integridad del acrosoma de espermatozoides de lagartijas del género <i>Sceloporus</i> después del proceso de criopreservación .....	47
Figura 14. Localización de los recuadros para el conteo en la cámara de Neubauer. ....	65
Figura 15. Evaluación de la integridad de la membrana mediante la tinción de SyBR 14-PI.....	66
Figura 16. Evaluación de la viabilidad espermática (tinción con eosina y nigrosina). ....	67
Figura 17. Evaluación de la morfología espermática (tinción con eosina y nigrosina).....	67
Figura 18. Evaluación de integridad del acrosoma con lectinas fluorescentes-PI.....	68

## **Introducción**

### Situación actual de los reptiles

Los reptiles, con cerca de 10793 especies (Uetz et al., 2018), son el segundo grupo de vertebrados más diverso del planeta; han colonizado casi todos los tipos de ambiente, exceptuando la tundra (D'Ortona & McRobert, 2018). Esto se debe a la gran capacidad adaptativa de este clado y que es evidente en las distintas historias de vida, así como en las diferentes estrategias que presentan para conseguir la reproducción (modo de reproducción, momento de la cópula, tipo de paridad, tamaño de camada, entre otras) (Molinia et al., 2010; Vitt & Caldwell, 2014). Sin embargo, la interacción con un entorno que es rápida y continuamente modificado o deteriorado ocasiona la pérdida de la biodiversidad e, inclusive, podría culminar con la extinción de las especies (Fitzgerald et al., 2018).

A pesar de que la extinción de las especies es parte del proceso natural de la evolución y es inevitable, está ocurriendo a un ritmo muy acelerado, principalmente a consecuencia de las actividades humanas (Shivaji et al., 2003). Este fenómeno se ha atribuido a cuatro factores impulsores clave: la sobreexplotación de recursos, la pérdida o fragmentación del hábitat, la introducción de especies invasoras y el cambio climático global (Tingley et al., 2016). Se sabe que tales situaciones incrementan la endogamia y la pérdida de la variabilidad genética, lo que provoca un menor éxito reproductivo debido a una baja fertilidad, al aumento de la mortalidad juvenil y la susceptibilidad a las enfermedades (Comizzoli, 2017). Además, existen especies con mayor amenaza debido a que son especialistas y se encuentran en pequeños rangos geográficos (como la serpiente de cascabel, *Crotalus adamanteus*), son de gran tamaño corporal, presentan madurez sexual tardía (como es el caso de varias tortugas marinas) o porque tienen baja fecundidad (Fitzgerald et al., 2018).

La falta de estudios de distribución impide conocer realmente el estado de vulnerabilidad de la biodiversidad de los reptiles (Roll et al., 2017). Actualmente, sólo cerca del 45% de las especies descritas han sido evaluadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) (Ananjeva et al., 2015; Tingley et al., 2016).

Böhm y colaboradores (2013) realizaron un análisis global de 1500 especies de reptiles en el cual encontraron que aproximadamente una de cada cinco especies de reptiles se encuentra en riesgo; además existe una alta deficiencia de datos en el resto de las especies, por lo cual destacaron la urgencia en materia de conservación para cubrir estas brechas en el conocimiento. Dentro de los grupos de reptiles más estudiados, se sabe que para los Testudines (tortugas), el 46% a 57% de las especies descritas, se encuentran amenazadas; para Crocodylia (cocodrilos, gaviales y caimanes), 11 de las 23 especies (47%); así como para Serpentes (serpientes), el 12% de las especies. En particular, en el caso de Sauria (lagartos) se estima que el 21% de las especies están en alguna categoría de riesgo. Sin embargo, para este último, a pesar de ser el clado más diverso, existe una deficiencia en los datos que pudieran subestimar la situación actual en la que se encuentran (Fitzgerald et al., 2018). Por ello, el comprender el estado en que se encuentra la biodiversidad de los reptiles es una prioridad para poder dirigir los esfuerzos de conservación a distintas dimensiones (Shivaji et al., 2003).

#### Conservación de especies silvestres

La biología de la conservación como disciplina reconoce el grado en que el humano depende de la biodiversidad y los servicios que los ecosistemas le brindan, incluso si se encuentran perturbados para en última instancia, garantizar la persistencia de paisajes naturales, ecosistemas saludables, especies, poblaciones, genes y los procesos dinámicos que los caracterizan. Esta rama de la biología es necesariamente transdisciplinaria y debe integrar las distintas perspectivas para el estudio de la problemática como son la fisiología, la ecología, la genética de poblaciones, la economía, la biogeografía, la antropología, la psicología, la educación, la ingeniería, el derecho, la administración y la política pública. Lo anterior para entender el nivel de afectación, para actuar en consecuencia; incluso antes de conocer todos los factores y sus efectos (Soulé, 1985; Soulé, 1991; Dobson et al., 2013).

En el área de conservación de la biodiversidad han surgido numerosas investigaciones; sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, su intervención no está llevando a acciones suficientes que se reflejen en la preservación de las especies y sus hábitats (Vitt & Caldwell, 2014).

A continuación, se enlistan las herramientas con las que actualmente se busca reducir la pérdida de la biodiversidad:

A) Protección *in situ*

La forma más efectiva de conservar especies es manteniendo todos los procesos que caracterizan la biodiversidad en un ecosistema a largo plazo (Comizzoli, 2017). Esto es, a través de espacios limitados con poca perturbación humana. Las áreas naturales protegidas, parques silvestres y reservas de la biosfera actualmente ocupan cerca del 12.7% de la superficie terrestre del planeta (Geldmann et al., 2013). Sin embargo, su efectividad se ve comprometida ya que sus objetivos declarados no se cumplen debido a que su persistencia depende de los beneficios económicos generados y suelen requerir suplementación *ex situ*. Además, en las áreas circundantes no se pueden evitar los cambios en el uso del suelo, lo que reduce efectivamente su extensión y evita la posibilidad de migraciones por el aislamiento geográfico (Dobson et al., 2013). Particularmente para el caso de la mayoría de las tortugas no marinas, serpientes y lagartijas es una opción aceptable debido a que estos animales permanecen en un territorio que no excede de varios cientos de metros cuadrados durante toda su vida (Ananjeva et al., 2015). A pesar de ello, solo el 3.5% de especies de reptiles se encuentran restringidos en áreas naturales y de éstos, en proporción el grupo menos atendido son las lagartijas (Roll et al., 2017).

B) Traslocación de las especies

Se le conoce como traslocación o repatriación al movimiento deliberado de la vida silvestre (IUCN, 2016). Es importante hacer la distinción entre los tipos de traslocación de acuerdo a sus fines. En la traslocación con fines de mitigación, el objetivo es la movilización de organismos de su hábitat debido principalmente a un conflicto antropogénico (Fitzgerald et al., 2018). En la traslocación con fines de conservación, se puede utilizar a los individuos para reforzar las poblaciones en disminución, así como para restablecer las poblaciones extirpadas (Mitchell et al., 2016). La elección de los sitios de liberación es la principal dificultad que esta herramienta presenta, ya que se debe proporcionar un entorno que permita el desarrollo de los procesos fisiológicos y el comportamiento de las especies (Fitzgerald et

al., 2018). Adicionalmente, deben estar libres de las amenazas como los depredadores invasores o las enfermedades, que pueden causar más daño a la población (Vitt & Caldwell, 2014). Distinto a otros grupos, los reptiles carecen de un período altricial o de habituación al ambiente; por lo cual no es necesario llevar a cabo una aclimatación o *rewilding* para su liberación (Ananjeva et al., 2015). Se ha sugerido el traslado de huevos (previo al desarrollo de asociaciones con un sitio de origen), como un método efectivo; pero se deben respetar los límites de temperatura y humedad aceptables para los embriones por lo cual es preferible la traslocación de animales jóvenes (Baling et al., 2016; Fitzgerald et al., 2018).

### C) Mantenimiento en cautiverio

Cuando el hábitat de las especies está siendo reemplazado rápidamente o se encuentra bajo alguna amenaza inminente en la naturaleza, el mantenimiento de estas poblaciones en cautiverio es la única acción a corto plazo para prevenir su extinción (Dobson et al., 2013). De este modo se pueden proteger durante varias etapas de su vida y conjuntamente se puede producir descendencia para la reintroducción de poblaciones extintas o para incrementar el tamaño de una población existente. Particularmente esto es útil ya que los reptiles pueden permanecer en condiciones de cautividad por periodos cortos o largos de su vida e incluso pueden ser liberados sin afectar su comportamiento en el hábitat (Vitt & Caldwell, 2014). Esta estrategia se apoya en los zoológicos y herpetarios, alojando algunas especies mientras se tratan los agentes del declive en su hábitat de procedencia. Las principales funciones de estas instalaciones son el promover la educación y sensibilización por medio de la interacción con las especies, así como la investigación de aspectos reproductivos, de alimentación y de comportamiento (Ananjeva et al., 2015). Además, permiten generar consciencia sobre los desafíos y las oportunidades ante la actual crisis de la biodiversidad. También son potencialmente importantes para recaudar fondos que luego se pueden invertir en la conservación del hábitat origen de los animales en exhibición (Dobson et al., 2013).

### D) Reproducción en cautiverio

La reproducción en cautiverio (RC) es la única opción para preservar las especies que están extintas o cercanas a la extinción en la naturaleza (Ralls & Ballou, 2013). Estos

programas se basan en el manejo de los adultos reproductores en combinación con los enfoques de zootecnia (producción de suficientes huevos y crías) para el aprovechamiento sostenible de la fauna (productos de consumo, comercio para reducir la demanda de animales capturados) o para la traslocación, que ha coadyuvado exitosamente en la persistencia y recuperación de algunas especies (Vitt & Caldwell, 2014; Fitzgerald et al., 2018) como actualmente se realiza con el *Alligator mississippiensis* (Todd et al., 2010).

El éxito de la RC se basa en el conocimiento de la biología reproductora de las especies, el comportamiento reproductivo, la estimulación hormonal de los ciclos sexuales, el monitoreo durante la incubación o la gestación en condiciones controladas. Un aspecto que se debe considerar es la disminución de la diversidad genética (Prieto et al., 2014) o la aparición de híbridos entre especies y, especialmente, entre subespecies como ha ocurrido en el caso de algunos boidos como *Python spilotes* con *P. amethystinus* y *P. spilotes* con *Liasis mackloti* (Banks & Schwaner, 1984), lo cual no se daría en condiciones naturales (Ananjeva et al., 2015).

Por otro lado, la reproducción puede verse afectada por la falta de espacio, la dieta inadecuada, los problemas de salud, el manejo, la modificación de la conducta sexual, la incompatibilidad de parejas, etcétera. El número de especies de reptiles en peligro de extinción criados en cautiverio para su recuperación es relativamente bajo (Vitt & Caldwell, 2014). Se conocen tres casos concretos en reptiles: el gavial del Ganges, *Gavialis gangeticus* (Choudhury & Chowdhury, 1986), el lagarto ágil, *Lacerta agilis* (Corbett & Moulton, 1998) y la tortuga gigante de la Española, *Chelonoides hoodensis* (Milinkovitch et al., 2013).

#### E) Reproducción asistida en machos de especies silvestres

El futuro de la biología de la conservación reside en el trabajo de equipo, la visión audaz y la asignación de más tiempo para la actuación y menos para la evaluación (Dobson et al., 2013). Por lo tanto, la alternativa es desarrollar nuevas estrategias de cría en cautiverio para mejorar el estado de fertilidad y el rendimiento reproductivo con la ayuda de enfoques biotecnológicos, que se conocen mejor como reproducción asistida (RA) (Shivaji et al., 2003;

D'Ortona & McRobert, 2018). La RA incorpora una amplia gama de técnicas que se utilizan para incrementar la probabilidad de producir crías mediante la obtención y el manejo directo de los gametos o los embriones dentro o fuera del cuerpo del animal (Kaser et al., 2019).

#### I. Aspectos reproductivos de las especies

Previo al establecimiento de cualquier técnica de RA para la conservación de animales en alguna categoría de riesgo es esencial establecer criterios para determinar el estatus de las poblaciones. Esto se realiza evaluando dentro de una población el estado de salud de los individuos. Además, se debe conocer la fisiología reproductiva de la especie (actividad gonadal, perfil hormonal, ciclicidad, época de cortejo, ovulación, etcétera) (Prieto et al., 2014). Es conocido que, similar a otros vertebrados, en los reptiles el eje hipotálamo-hipofisis-gónada es la principal vía reguladora para la reproducción. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo es secretada en respuesta a los distintos estímulos ambientales y permite la liberación de gonadotropinas (GTH) de la hipófisis anterior (adenohipófisis). Contrario a esta función, se conoce una hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH), también de origen hipotalámico. La acción de GTH en el testículo ocurre mediante una acción dual con el estímulo de las células de Sertoli de los túbulos seminíferos para el inicio y sucesión de fases de la espermatogénesis (función tipo hormona folículo estimulante, FSH); mientras en las células de Leydig promueve la producción de esteroides sexuales principalmente testosterona (T) y la liberación de los gametos (función tipo hormona luteinizante, LH) (Norris & Carr, 2013).

La producción de T se asocia a la actividad de los testículos y durante la recrudescencia incrementa su síntesis así como lo hace el volumen gonadal, resultado de la actividad proliferativa (mitótica) dentro de los túbulos seminíferos. En esta etapa de crecimiento testicular también ocurre la fase meiótica. Durante la espermiogénesis, periodo conocido como de actividad máxima, los testículos alcanzan su volumen máximo. La mayor concentración de T circulante se alcanza durante la época de cortejo y permanece constante; por lo que se ha asociado al comportamiento reproductivo. La quiescencia es el periodo en el cual los testículos permanecen inactivos y la T mantiene niveles basales hasta el comienzo

del siguiente ciclo reproductor (Gribbins et al., 2011; Al-Amri et al., 2013; Villagrán-Santa Cruz et al., 2014).

Los espermatozoides son transportados desde la *rete testis*, a través de los conductos eferentes al epidídimo; órgano para la secreción y la absorción de productos celulares donde ocurre la pérdida de la gota citoplásmica, la adquisición de la motilidad así como el almacenamiento (Tourmente et al., 2007; Breton et al., 2019). A través de su tránsito retrógrado por el conducto deferente, el segmento sexual renal vierte las secreciones que constituyen el plasma seminal, las cuales sirven como fuente de energía, participan en la activación y en la sobrevivencia espermática. El contenido se vacía en un agrandamiento ampular del urodeo conocido como papila genital que desemboca directamente en la cloaca (Akbarsha et al., 2005; Rheubert et al., 2014). De ahí es dirigido hacia los hemipenes, órganos copuladores pareados con ornamentaciones variables, ubicados lateralmente en la base ventral de la cola. Cada uno contiene un surco seminal por donde fluye el semen para depositarlo en la vagina de la hembra (Rheubert et al., 2014; Barten & Simpson, 2019).

A pesar de lo que se conoce de la fisiología de este clado, las características de las poblaciones varían, incluso si se trata de la misma especie. Por ello, se requiere estudiar las características particulares de las poblaciones de las especies de estudio. Una vez conocidos los aspectos reproductivos de la especie en riesgo se puede implementar la técnica y el momento en que se pueden aplicar. Esta parte de la revisión permite identificar las dificultades y la posibilidad de éxito o fracaso de la RA (Shivaji et al., 2003).

## II. Colección de semen

Las técnicas empleadas en animales domesticados no son siempre aplicables para la obtención y recuperación del semen de animales silvestres. En algunas especies se ha optado por la colección post coital como en el rinoceronte de Sumatra, *Dicerorhinus sumatrensis* (O'Brien & Roth, 2000), en la llama *Lama glama* y en la alpaca *Vicugna pacos* (Adams et al., 2009); la estimulación peneana como en primates (Schneiders et al., 2004); la inducción hormonal como en el ajolote, *Ambystoma mexicanum* (Mansour et al., 2011) o en la rana bermeja, *Rana temporaria* (Shishova et al., 2011); la inducción farmacológica de la

eyaculación con imipramina oral como en equinos (McDonnell, 2001) y el masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias guiado por ultrasonido (TUMASG) en asociación con la electroestimulación mediante el contacto con las glándulas sexuales accesorias como en el muflón del Atlas, *Ammotragus lervia sahariensis* (Santiago-Moreno et al., 2013). Este último ha sido el más recurrido e involucra la anestesia de los organismos (Comizzoli, 2017). Empleando este método, el volumen seminal es muy bajo, lo que hace que la evaluación rutinaria del semen sea un desafío si se desea utilizar para otras técnicas de RA como la criopreservación o la inseminación (Johnson, 2018). Incluso, se presenta una baja calidad asociada *per se* al método utilizado (Zimmerman & Mitchell, 2017). El desarrollo de una técnica para la obtención de semen representa un gran reto (Comizzoli, 2017), razón por la cual debe elegirse dependiendo de las circunstancias y características de cada especie (Santiago-Moreno et al., 2010).

### III. Análisis del potencial fértil

La prueba definitiva de la fertilidad de un macho es la concepción. Sin embargo, en especies de fauna silvestre es complicado recrear para su estudio las condiciones controladas en espacios restringidos que estimulen sus conductas; es decir, si son monógamos o polígamos, la competencia, selección y preferencia entre individuos, el momento de la ovulación, entre otros (Shivaji et al., 1998). Por esta razón se han utilizado una serie de pruebas para determinar indirectamente el potencial fértil de los individuos y a continuación se enlistan:

#### a. Análisis seminal

En animales domesticados se han desarrollado una serie de pruebas de laboratorio que se correlacionan con la capacidad fértil de los individuos (Shivaji et al., 2003). Los parámetros tradicionales que se utilizan para evaluar la calidad del semen son el volumen de eyaculación, la motilidad, la concentración y la morfología espermática. Estas pruebas se han empleado en diversas especies de grandes felinos como el león (*Panthera leo*), el tigre (*Panthera tigris*) y el leopardo (*Panthera pardus*) (Shivaji et al., 1998), así como en el oso tibetano (*Ursus thibetanus japonicus*) (Kojima et al., 2001) o en la paloma bravía (*Columba livia*) (Cheng et al., 2002), con el fin de establecer los valores de referencia en los distintos momentos de

recuperación del semen para evaluar el efecto de los tratamientos a los que se pueden someter las muestras.

b. Análisis espermático asistido por computadora

El sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis, por sus siglas en inglés), determina el recuento de espermatozoides y el número de espermatozoides móviles. Además, muestra la cinemática individual, la morfometría espermática, la fragmentación del DNA e incluso permite analizar subpoblaciones celulares (Sadeghi et al., 2016; Valverde et al., 2019). Se ha utilizado rutinariamente para reducir el tiempo de análisis y eliminar la naturaleza subjetiva de la evaluación de rutina de los espermatozoides (Shivaji et al., 2003). Este método se ha practicado en algunas especies silvestres como en el salmón común, *Salmo salar* (Caldeira et al., 2018), en el zorro ártico, *Alopex lagopus* (Soler et al., 2017) y el mico de Goeldii, *Callimico goeldii* (Valle et al., 2013). Si bien este sistema ofrece una gran cantidad de ventajas, el costo de adquisición es muy elevado, requiere regularmente del mantenimiento y las distintas configuraciones con las que cuenta pueden modificar drásticamente los resultados (Schleh & Leoni, 2013).

c. Prueba de unión a la membrana del ovocito

Esta prueba se utiliza para explorar la capacidad fecundante de los espermatozoides. Se basa en la capacidad de los espermatozoides de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito de la misma (homóloga) o de una especie distinta a la estudiada (heteróloga) y provocar la descondensación nuclear, lo cual es posible cuando previamente, se elimina la zona pelúcida que es la estructura de reconocimiento especie-específica (Shivaji et al., 2003). Generalmente se han empleado ovocitos desnudos de hámster con distintas especies de roedores como *Calomys musculinus* y *C. laucha* (Lasserre et al., 2000). Del mismo modo se han empleado ovocitos murinos o de bovino intactos como en el delfín *Tursiops truncatus* (Sánchez-Calabuig et al., 2015) e incluso, se ha evaluado la unión a la membrana vitelina del huevo de ave en el pecarí de collar, *Pecari tajacu* (Campos et al., 2017) o en el perro (Brito et al., 2017).

#### d. Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) es el proceso de depositar los espermatozoides del semen fresco o descongelado en el tracto reproductor de una hembra (Molinia et al., 2010). Permite maximizar el uso de machos de alto valor genético para su diseminación, incluso a distancia. Esto reduce los costos del mantenimiento y transporte de los individuos, evita el riesgo de las lesiones por conductas de agresión ante la incompatibilidad de las parejas, así como la propagación de enfermedades de transmisión sexual (Comizzoli et al., 2000).

La IA puede integrarse a la evaluación de la capacidad fertilizante de los individuos, aunque se deben considerar factores de acuerdo a la especie como: a) el sitio de deposición (vagina, cuello uterino o útero); b) el momento de la ovulación, ya que en algunas especies es tardía con respecto a la cópula (Comizzoli et al., 2000; Shivaji et al., 2003), c) el almacenamiento espermático, que puede extender el potencial de IA a lo largo del tiempo e incluso interferir en la evaluación, así como d) la presentación de la partenogénesis facultativa en algunas especies de serpientes y lagartijas (Durrant, 2009; Browne et al., 2011). La IA se ha empleado en diversas especies de mamíferos silvestres como el gamo común (*Dama dama*; Asher et al., 1990), el hurón (*Mustela putorius furo*; Howard et al., 1991) y el guepardo (*Acinonyx jubatus*; Wildt & Roth, 1997).

#### IV. Criopreservación de espermatozoides

Este método de RA tiene por objetivo el mantenimiento de gametos viables a temperaturas bajas (entre -80 °C y -196 °C) por un tiempo indefinido, sin cambios en la funcionalidad celular ni en la información genética (Ávila-Portillo et al., 2006; Bagchi et al., 2008). Esta técnica es empleada para preservar la fertilidad del macho y en el mejoramiento genético de las especies domesticadas (Shivaji et al., 2003; Benson et al., 2012). En el caso de especies silvestres permite el establecimiento de repositorios o bancos de germoplasma con el fin de proteger y respaldar los programas de conservación, desacelerar la pérdida de la diversidad genética, extender el intervalo de generación de los individuos de manera indefinida y mantener la heterocigosidad genética de las poblaciones, sin la presencia del individuo adulto (Comizzoli, 2015; Clulow & Clulow, 2016).

La evaluación de la calidad espermática previa al congelamiento es indispensable para la selección de individuos y muestras ya que influye en la resistencia al proceso. En caso de no efectuarse de manera adecuada se podrían estar transmitiendo o amplificando los defectos genéticos en las poblaciones (Comizzoli, 2015). En la actualidad la investigación en criobiología busca entender los cambios que ocurren en las células y los factores que influyen en el proceso para así poder recuperar de manera óptima la viabilidad sin disminuir la capacidad fecundante de los gametos (Hezavehei et al., 2018).

### Principios del daño por el proceso de criopreservación

#### a) Características del espermatozoide

El éxito de la criopreservación es inverso a la complejidad del sistema biológico. En el caso de los espermatozoides, al tratarse de células individuales con distinto tamaño y composición que el resto de los tejidos animales, la congelación ha sido empleada satisfactoriamente en diversas especies (Ávila-Portillo et al., 2006; Benson et al., 2012). El espermatozoide es el producto de la gametogénesis masculina que en la evolución se desarrolló como una célula con capacidad de motilidad. Su estructura es muy particular y está altamente conservada en los distintos grupos de vertebrados. En los reptiles tiene aspecto filiforme y curvado. Consta de tres componentes: la cabeza, el cuello y el flagelo (Figura 1) (Temple-Smith et al., 2018).

Cabeza: La cabeza contiene al complejo acrosómico que cubre al núcleo en distintas proporciones. Es ligeramente puntiagudo en el ápice y redondeado en la base. Según las diferencias en la densidad electrónica, tiene dos zonas evidentes, una médula central y una corteza circundante (Scheltinga et al., 2001). Esta complejidad, ausente en mamíferos y aves, se ha sugerido que ayuda en la liberación secuencial de enzimas hidrolíticas durante la fertilización (Gribbins, 2011). En la región medular se encuentra el *perforatorium*; el cual puede tener un papel mecánico en la penetración del ovocito, es epinuclear y reside en los espacios subacrosómicos. El núcleo se inserta en dichos espacios, es elongado y contiene al material genético altamente empaquetado principalmente por protaminas. El *rostrum* nuclear contiene conos acrosomales proyectados postero lateralmente. El diámetro del núcleo se

extiende caudal hasta los hombros nucleares y culmina en la fosa nuclear (Colli et al., 2007; Gribbins et al., 2013).

Cuello: El cuello o pieza de conexión une a la cabeza con el flagelo. Esta región incluye los centriolos y el primero de los cuerpos densos. La fosa nuclear contiene la mitad anterior del centriolo proximal y está inclinado aproximadamente  $80^\circ$  respecto al centriolo distal. El centriolo distal no se proyecta hacia la vaina fibrosa. Los lagartos y las serpientes tienen un prominente cilindro que separa el núcleo de la pieza media (Scheltinga et al., 2001).

Flagelo: El flagelo se une al extremo caudal del núcleo dentro de la fosa de implantación. Generalmente se subdivide en pieza media, pieza principal y pieza final. La pieza media comienza con el primero de una serie de anillos de cuerpos densos discontinuos interrumpidos por niveles variables de mitocondrias que rodean un gran porcentaje de la vaina fibrosa y al axonema. Las mitocondrias tienen la capacidad de producir energía química en forma de trifosfato de adenosina (ATP) (Scheltinga et al., 2001). El axonema, como en el resto de los vertebrados, se compone de nueve tripletes de microtúbulos y un par central (9 + 2). Se origina a partir del centriolo distal en el cuello y se extiende hacia la región posterior. La función crítica del axonema es escindir el ATP y convertir la energía química liberada en energía mecánica que mueve al flagelo. La pieza media termina con el *annulus* (Temple-Smith et al., 2018).

La pieza principal comienza a partir del *annulus* y es la parte más larga del espermatozoide. Se caracteriza por la ausencia de mitocondrias y la vaina fibrosa que continúa rodeando el axonema. Estas estructuras contienen enzimas y sustratos para desarrollar vías glucolíticas anaerobias para el movimiento (Blengini et al., 2014). En esta región, la membrana plasmática está ampliamente separada por un citoplasma granular. Todas las fibras densas periféricas y la fibra central están ausentes a este nivel. Una longitud corta del axonema se extiende más allá del límite posterior de la vaina fibrosa conformando la pieza terminal, donde el patrón normal de los microtúbulos se ve interrumpido cada vez más hasta donde termina. Esta región únicamente se encuentra rodeada por el plasmalema (Scheltinga et al., 2001).

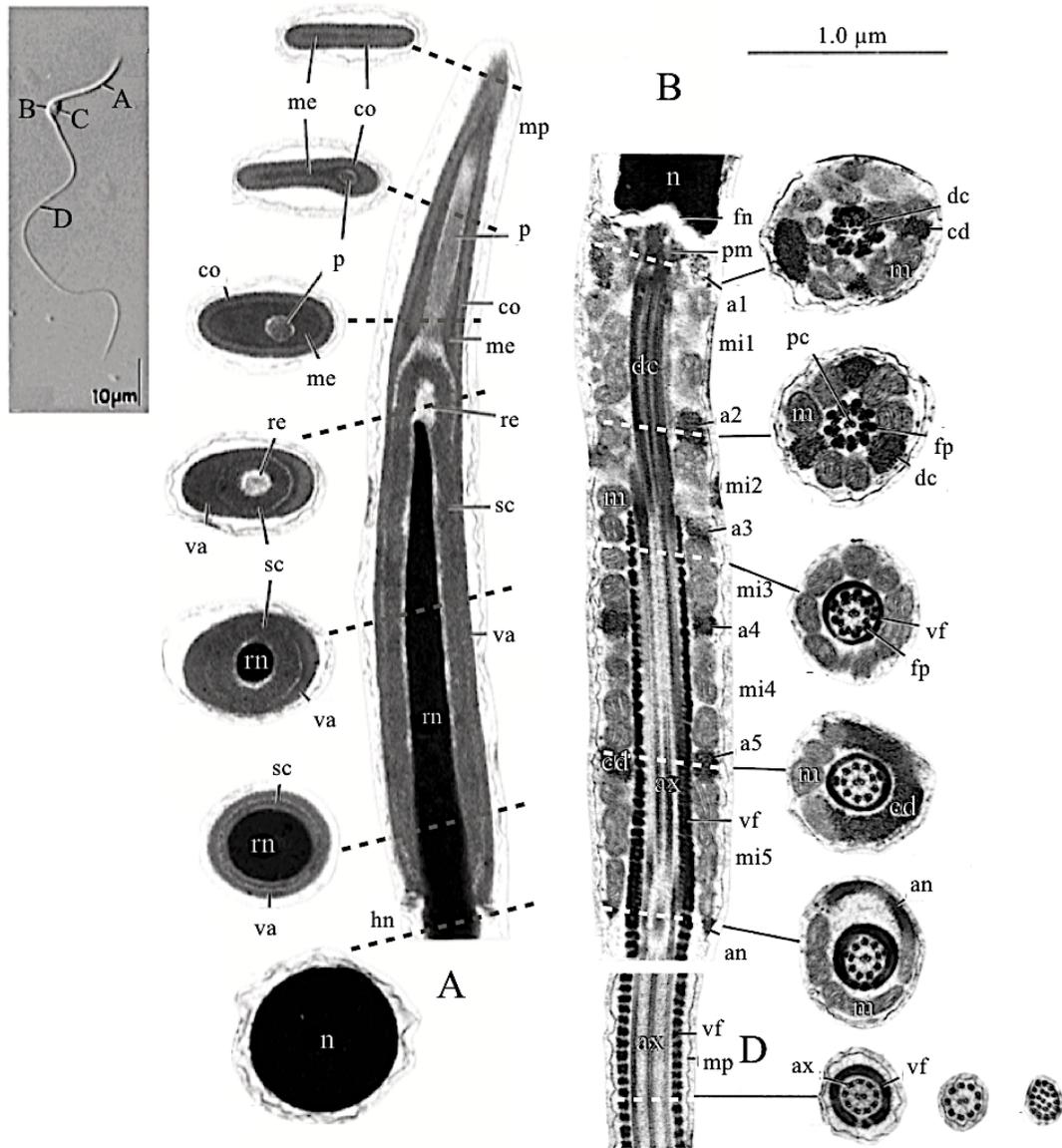


Figura 1. Estructura y ultraestructura del espermatozoide del lagarto de collar, *Crotaphytus bicinctores*. Vista de un espermatozoide (figura superior izquierda) y secciones longitudinales de las distintas regiones del espermatozoide (figura central y derecha): A. Cabeza; me, médula del acrosoma; co, corteza del acrosoma; mp, membrana plasmática; p, perforatorium; re, región epinuclear electroluminosa; va, vesícula acrosómica; cs, cono subacrosomal; rn, rostrum nuclear; n, núcleo; hn, hombros nucleares, B. Pieza media; fn, fosa nuclear, pm, material pericentriolar, dc, centriolo distal, a, estructura de anillo, m, mitocondria, mi, anillo de mitocondrias, pc, par central, fp, fibras periféricas, cd, cuerpos densos, vf, vainas fibrosas, ax, axonema, an, annulus, C. Gota citoplasmática, D. Flagelo. Modificado de Scheltinga et al., 2001.

En general, con los distintos grupos de vertebrados, comparten la característica de ser una célula pequeña de una amplia superficie; lo cual afecta la viscosidad y la temperatura de transición vítrea del citosol intracelular, lo que les hace menos susceptibles a los posibles daños (Hezavehei et al., 2018). Existe una complicación importante en la criobiología, la determinación de un protocolo de congelación exitoso depende primero de la morfología específica de los espermatozoides de la especie respectiva y de los individuos. Por lo que es esencial comprender los fundamentos de enfriar una célula particular desde temperaturas fisiológicas a temperaturas bajo cero, mantenerlas en esa temperatura y su posterior descongelamiento (Woods et al., 2004).

#### b) Formación de cristales de hielo

El agua es indispensable para la estructura y la función de toda célula, ya que la compone en un 60 a 85% mediante uniones complejas con proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros solutos (Bagchi et al., 2008). Durante el enfriamiento en el proceso de criopreservación, el agua protoplasmática se convierte en hielo, ya sea, dentro de la célula (aproximadamente a  $-0.5$  °C) o si se mantiene sobre-enfriada (hasta  $-15$  °C). La presión de vapor resultante y la diferencia de potencial químico proporcionan una fuerza impulsora para que esta salga de la célula; es decir, se deshidrata y el agua se congela externamente (Mazur, 1984; Fuller et al., 2004). La inducción de estos cristales de hielo puede conducir a la destrucción mecánica de los orgánulos en los espermatozoides (Hezavehei et al., 2018).

#### c) Estrés osmótico

Las relaciones osmóticas y la cinética con la que se alcanza el equilibrio se modifican con el descenso de la temperatura. En los procesos de congelación-descongelación, la transición de fase y la rapidez en la que esta ocurre, impiden que los movimientos de moléculas dentro y fuera de las células realicen procesos de transporte activo y facilitado. La célula se ajusta a las concentraciones de agua y solutos para alcanzar un equilibrio del potencial químico, siempre que la membrana sea permeable a ese componente (Ávila-Portillo et al., 2006).

El volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula se deshidrata, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia a

seguir perdiendo volumen. La dinámica del cambio del volumen con el retorno a las condiciones isotónicas luego de la descongelación es importante, ya que al excederse la resistencia física de la membrana, se contribuye al estiramiento, ruptura mecánica y se producirán cambios irreversibles en la permeabilidad, así como la muerte celular (Ávila-Portillo et al., 2006; Woods et al., 2004).

#### d) Cambios en la membrana plasmática

La permeabilidad para el movimiento del agua y de los solutos a través de la membrana está determinada por su estructura y composición. La membrana se encuentra organizada según el modelo de mosaico fluido en una bicapa de lípidos anfipáticos principalmente fosfolípidos insaturados (65-70%) que le brindan fluidez a la membrana (Yeste, 2016). Sus cadenas no polares se encuentran orientadas hacia el interior de la célula, mientras que las cabezas polares se encuentran dirigidas hacia el citoplasma acuoso y hacia el medio externo (Fuller et al., 2004). Cuanto más larga es la cadena del ácido graso, más fácilmente se forman uniones, existe un mayor empaquetamiento y la membrana es más rígida. Estas cadenas se encuentran posicionadas en paralelo e intercaladas con moléculas de colesterol, componentes que incrementan su estabilidad. Además, la membrana se compone de algunas proteínas y en menor porcentaje de carbohidratos (Holt, 2000a; Ávila-Portillo et al., 2006).

La composición y las propiedades biofísicas del plasmalema es variable en las especies y están relacionadas con los reordenamientos estructurales y la susceptibilidad al frío que presentan los espermatozoides (Yeste, 2016; Hezavehei et al., 2018). A temperaturas fisiológicas, esta asociación restringe el libre movimiento lateral de los fosfolípidos y, por tanto, disminuye la fluidez. Ante las reducciones de temperatura (menor de 10 a 16 °C), las cantidades variables de esteroides responden e impiden la cristalización, favorecen la transición de una fase líquida a una fase de gel incrementando la fluidez e inestabilidad de la membrana (Figura 2). Algunos fosfolípidos insaturados se gelifican antes que otros y se puede producir la separación de fases (Holt, 2000a).

Aunado a ello, durante la deshidratación celular existe una pérdida de componentes, la interrupción de las interacciones de los lípidos y las proteínas del citoesqueleto (como la

vimentina y la actina) lo que le da un alto grado de fragilidad a la membrana, afecta su integridad por la pérdida de la capacidad de expansión durante la rehidratación (Holt, 2000b; Ávila-Portillo et al., 2006). También ocurre la desintegración parcial de regiones de las membranas nuclear, mitocondrial, flagelar, así como acrosomal generando el agotamiento de su contenido, la fusión de membranas, la invaginación o la formación de vesículas (Figura 2) (Hezavehei et al., 2018).

La permeabilidad selectiva también se pierde, lo que aumenta la afluencia de iones, como calcio y bicarbonato, desde el espacio extracelular. Las respuestas de las vías de transducción de señales también podrían estar alteradas por dichos cambios, lo que provoca la capacitación espermática acelerada o crio capacitación que contribuye a la reducción de la longevidad (Yeste, 2016).

#### e) Cambios nucleares

La cromatina espermática está conformada por ácido desoxirribonucleico (ADN) y asociado a nucleoproteínas, principalmente protaminas (P1 y P2) y entre el 2 y 15% de histonas H1, que permiten la alta compactación del material genético lo cual dista de cualquier célula somática. Los mecanismos de inestabilidad del ADN provocados por los procesos de congelación- descongelación aún son poco claros. Algunos de estos podrían ser debido a cambios en la ubicación, distribución o interacción a través de la interrupción de los puentes disulfuro entre los radicales de cisteína de las protaminas (Yeste, 2016). El alcance de esta interrupción está relacionado con la fragmentación y su extensión difiere entre las especies, según la relación P1:P2 que presentan. Aunado a ello, la reducción del volumen celular, la desestabilización y disrupción de las proteínas del citoesqueleto, principalmente de la teca perinuclear (región que rodea el núcleo), pueden causar la hidrólisis ácida del ADN y conducir a una conformación monocatenaria (Figura 2). Una explicación adicional del daño y de la fragmentación del ADN que se atribuye como la principal causa, es el estrés oxidativo (Yeste, 2016; Ezzati et al., 2019), del cual se abunda a continuación.

f) Estrés oxidativo y daño mitocondrial

La energía para el movimiento espermático proviene de la glucólisis en el citoplasma y fundamentalmente de la fosforilación oxidativa. En las mitocondrias, el acoplamiento del transporte de electrones mantiene un alto potencial de membrana requerido para la producción de ATP. El ATP generado proporciona la energía accesible a los filamentos, lo que facilita una propulsión eficiente. Producto de su metabolismo, las mitocondrias son un sitio importante para la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), aniones superóxido ( $O_2^-$ ), óxido nítrico (NO) así como radicales hidroxilo ( $OH^-$ ) (Guthrie & Welch, 2012).

El estrés oxidativo asociado a la acumulación de ROS afecta la función de los espermatozoides. Los radicales libres tienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas que pueden reaccionar con las diversas biomoléculas, sustrayendo electrones de los carbohidratos, proteínas o lípidos constituyentes para lograr su estabilidad, causando daños estructurales y funcionales en la célula (Membrillo-Ortega et al., 2003; Guthrie & Welch, 2012). La criopreservación también induce la formación de ROS (Hezavehei et al., 2018). Particularmente, en la peroxidación lipídica, el  $OH^-$  es responsable de iniciar la reacción de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y es generada por NO que se une con  $O_2^-$  formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), lo cual se refleja en un daño a los fosfolípidos, modifica la integridad acrosomal y nuclear exponiendo al ADN. Esta situación disminuye la viabilidad espermática y el potencial de membrana mitocondrial. Además, los ROS han sido asociados a la capacitación prematura, la inducción de la apoptosis y la senescencia (Membrillo-Ortega et al., 2003; Chen et al., 2014). Es probable que el  $H_2O_2$  sea responsable de gran parte del daño a la estructura y función de la célula, debido a su alta permeabilidad de membrana y la abundancia de SO-dismutasa mitocondrial y citoplasmática en los espermatozoides de mamíferos (Guthrie & Welch, 2012).

El acoplamiento del transporte de electrones en los espermatozoides puede ser interrumpido por el desequilibrio entre la acumulación de ROS y los mecanismos antioxidantes en los procesos de congelación-descongelación. Esto puede disminuir la actividad mitocondrial, la

producción del ATP requerido para la motilidad de espermatozoides (O'Connell et al., 2002) y la fosforilación de tirosina asociados con la capacitación espermática, lo cual es perjudicial para el rendimiento espermático posterior (Figura 2) (Guthrie & Welch, 2012).

g) Cambios en la expresión genética

Durante el proceso de congelación-descongelación se modulan la expresión de genes, la estabilidad del ARNm y el contenido epigenético de los espermatozoides de mamífero (Figura 2). Algunos genes (ADD1, ARNT, BIK, FSHB, PEG1/MEST, PRM1, SNORD116/PWSAS, UBE3A) y transcritos (ADAM2, B2M, BLM, CYP19, DNMT3A, DNMT3B, HPRT1, JHDM2A, KAT8, MYC, PGK1, PPIA, PRM1, PRM2, RPL4, S18, SDHA, YWHAZ) de importancia en el potencial fértil e involucrados en el desarrollo temprano son afectados (Figura 1). Algunos cambios epigenéticos se han reportado en proteínas de unión a ADN, como las histonas H1 y en proteínas de unión a los enlaces disulfuro del ADN; así como en algunos genes como DNMT3a, DNMT3B, JHDM2A, KAT8, PRM1, PRM2 e IGF2 (Yeste, 2016; Hezavehei et al., 2018).

También se ha reportado el incremento de proteínas entre las que destacan algunas que combaten el estrés oxidante como la glutatión-S-transferasa, la superóxido dismutasa 1, la fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa; fosfoproteínas como la proteína de cola asociada a rofilina 1, la proteína de anclaje a cinasa A-3 y A-4, relacionadas con la capacitación prematura; proteínas del metabolismo energético como la triosefosfato isomerasa 1, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglicerato cinasa 2, la subunidad alfa de la ATP sintasa F1; proteínas de estabilidad estructural como la proteína de fibras densas externas 2, la tubulina  $\beta$ , la cadena de tubulina alfa-1A, el antígeno 12 asociado al espermatozoide y proteínas relacionadas con la apoptosis como la L- aminoácido oxidasa, las anexinas 1, 3 y 4, clusterinas; y proteínas nucleares como la histona 1H4A y la karioferina subunidad beta 1 (Chen et al., 2014; Hezavehei et al., 2018).

Dentro de las proteínas que se ven disminuidas encontramos la proteína de choque térmico 90, la peroxiredoxina 6, la aconitasa hidratasa mitocondrial, la 3-oxoácido CoA-transferasa 1, la tectina1, la alfa enolasa 1, la vimentina, la proteína que contiene al dominio de

tiorredoxina 2, la glutatión S-transferasa M3, la citocromo b5 reductasa 2, la proteína de unión a acrosina, la proteína 3 asociada a la membrana del acrosoma espermático, la proteína espermática 1 del segmento ecuatorial, las proteínas de unión a zona pelúcida 1 y 2, la proteína secretora de 16 kDa, así como se han encontrado cambios en la ubicación de proteínas como la actina y la mitofusina 2, el transportador de glucosa GLUT3, cambios en las proteínas de canal iónico y el descenso del nivel de fosforilación de tirosina; todas ellas, relacionadas con modificaciones en el metabolismo, la motilidad, la viabilidad, la estructura e integridad del acrosoma y flagelo del espermatozoide (Yeste, 2016; Hezavehei et al., 2018).

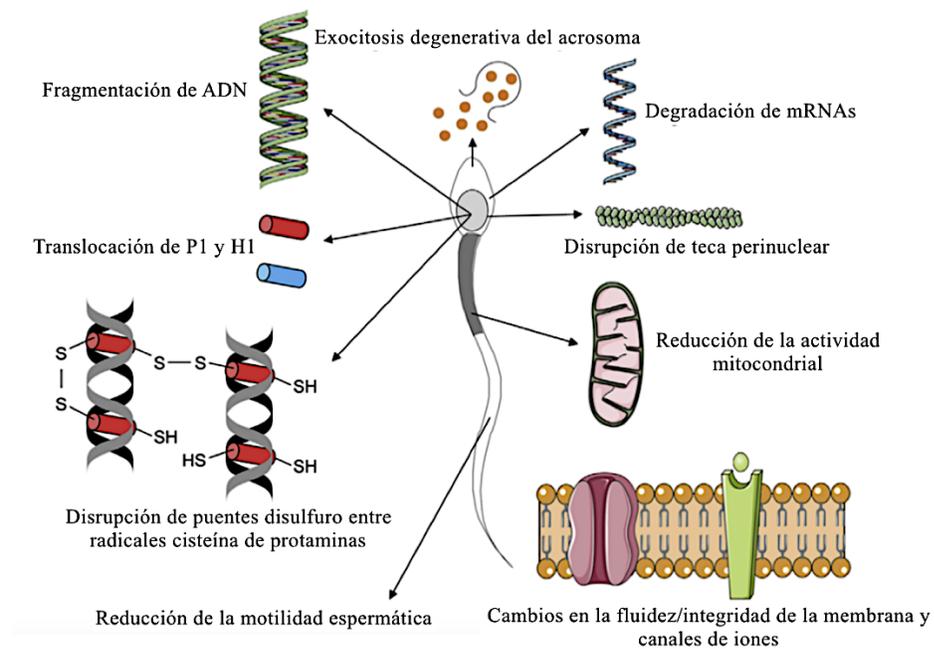


Figura 2. Daños principales producidos por la criopreservación de los espermatozoides (Modificado de Yeste, 2016).

### Estrategias para combatir el daño celular

#### a) Velocidad de enfriado

Un factor importante en la sobrevivencia es la velocidad de enfriado. Existen tratamientos en los cuales el enfriamiento es lento (hasta 4 horas), lo cual permite a las células mantener el potencial químico entre el ambiente intra y extracelular, concentrando su citoplasma; pero exponiéndolo a altas concentraciones del soluto durante largos períodos de tiempo. Si el enfriamiento es demasiado rápido (no mayor a 10 minutos), no pierde agua lo suficientemente

rápido como para mantener el equilibrio; la célula se sobre enfría y alcanza el equilibrio formando hielo intracelular (Figura 3) (Mazur, 1984; Benson et al., 2012).

La velocidad de enfriamiento óptima es lo más rápida posible para minimizar los daños debidos a la concentración de solutos, pero lo suficientemente lenta como para que las células puedan deshidratarse para evitar la formación de hielo intracelular (Yeste, 2016). Estos fenómenos competitivos tienen una velocidad característica de enfriamiento en forma de "U" invertida y es específica de cada especie. En la vitrificación o congelación ultra rápida (inmersión directa en nitrógeno líquido) se induce un estado sólido amorfo o vítreo que evita el daño osmótico e impide la formación y propagación del hielo intracelular (Figura 3) (Mazur, 1984; Benson et al., 2012; Hezavehei et al., 2018).

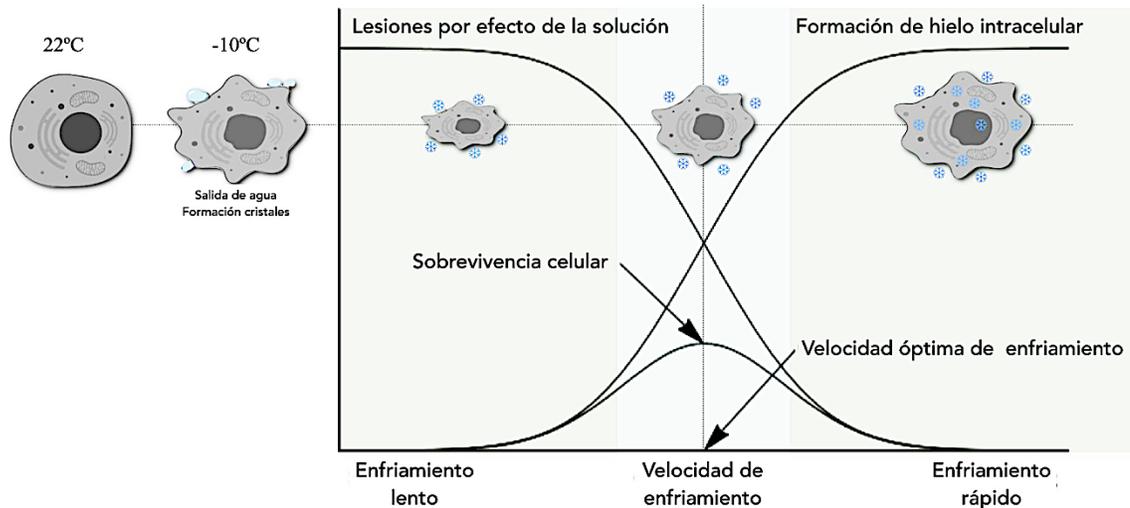


Figura 3. Velocidad de enfriamiento y eventos físicos durante la congelación. Cuando la temperatura es menor a 5 °C, se forma hielo en el medio, el agua sale de la célula. Si la tasa de enfriamiento es rápida, se forman cristales de hielo dentro de la célula. Si es lenta, se deshidratan, reducen el volumen de los orgánulos y las membranas. La velocidad óptima debe ser lo suficientemente lenta para evitar la formación de hielo, pero rápida para reducir la lesión por la concentración de soluto y volumen. Modificado de Benson et al., (2012) y de Yeste (2016).

## b) Empleo de agentes crioprotectores

La composición de los medios de congelación desempeña un papel crucial en la congelación lenta y rápida. Los agentes crioprotectores (ACPs) son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad a concentraciones 1M o incluso un poco mayores, que por sus propiedades químicas se añaden a los medios, lo que les confiere protección a las células contra el daño. De acuerdo con su mecanismo de acción, existen dos tipos: los crioprotectores penetrantes y los no penetrantes (Ávila-Portillo et al., 2006; Yeste, 2016).

Los ACPs penetrantes son de bajo peso molecular, permeables a la membrana celular e interactúan con los componentes citoplasmáticos. Concretamente disminuyen el punto eutéctico del agua y permiten la sobrevivencia en condiciones hiperosmóticas ya que cambian la tasa de difusión, lo que conduce a cambios sutiles y no perjudiciales en el volumen celular a medida que el agua intercelular se congela (Ávila-Portillo et al., 2006; Blanco et al., 2008). Sin embargo, estas sustancias pueden dañar la célula e inducir cambios en el volumen osmótico a temperaturas superiores a 5 °C, razón por la cual es necesario adicionar los ACPs antes del punto de congelación y deben separarse rápidamente al descongelar. Algunos ejemplos son el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO), el dimetilacetaldehído (DMA), la dimetilformamida (DMF), el propilenglicol, el metanol y el etilenglicol. Estos ACPs se utilizan en protocolos de congelación lentos y rápidos (Yeste, 2016; Hezavehei et al., 2018).

Los ACPs no penetrantes son de alto peso molecular, no pueden ingresar a través de la membrana celular, pero confieren propiedades protectoras extracelularmente, estabilizan las proteínas de membrana, modifican la viscosidad e impiden la formación de hielo. Por ello, son efectivos a velocidades ultra rápidas de congelación ya que promueven la rápida deshidratación celular (Comizzoli, 2015). Pueden además, aumentar la efectividad en combinación con los ACPs permeables y permiten disminuir su concentración. Algunos ejemplos son azúcares como sacarosa, trehalosa, rafinosa, lactosa, algunos dextranos, proteínas de la yema de huevo, albúmina, lipoproteínas de baja densidad (LDL) o compuestos como el polietilenglicol, el hidroxietilalmidón, los citratos y la polivinilpirrolidona (Yeste, 2016; Hezavehei et al., 2018).

La adecuada composición crioprotectora basada en el uso de las concentraciones molares de ACPs ha brindado gran flexibilidad al establecimiento de distintos protocolos para las distintas especies. Sin embargo, los cambios de osmolaridad durante la adición y eliminación de estas sustancias son cruciales para asegurar una deshidratación celular adecuada y evitar la lisis. Cuanto mayor sea la concentración de ACP requerida, mayor será la probabilidad de daño debido a la deshidratación inicial extensa seguida de la rehidratación e hinchazón tras su eliminación. Por esta razón, se utilizan a concentraciones bajas y de acuerdo a las características biofísicas se determina el número mínimo de pasos para la adición durante el enfriamiento y la posterior eliminación del ACP durante el calentamiento, para evitar el estrés osmótico (Woods et al., 2004).

#### c) Velocidad de descongelación

La sobrevivencia celular también es afectada por lesiones criogénicas durante la descongelación. De hecho, si la velocidad de descongelación es baja puede resultar en la recristalización de las estructuras, mientras que si la velocidad es alta se puede producir un estrés osmótico, ya que los ACPs no pueden abandonar la célula lo suficientemente rápido (Yeste, 2016). Tal aumento osmótico en el citoplasma conduce al ingreso del agua y esto, finalmente altera la membrana plasmática (Holt, 2000a). Por esta razón, la velocidad óptima de descongelamiento debe representar un equilibrio entre estos dos escenarios. En el caso de los espermatozoides de mamífero generalmente se realiza a 37 °C durante 20 segundos y hasta 5 minutos; pero recientemente se ha demostrado que velocidades de 5-8 segundos a 70 °C, dan mejores resultados (Tomás et al., 2014). Por lo tanto, los ajustes en los protocolos de criopreservación buscan no solo encontrar la velocidad óptima de enfriamiento, sino también de descongelamiento, con el fin de evitar las lesiones criogénicas tanto como sea posible (Yeste, 2016).

#### d) Composición de los diluyentes

El diluyente es un medio que tiene un pH cercano a la neutralidad y es hiperosmótico respecto al plasma seminal por lo que induce una mejor deshidratación celular y, por tanto,

reduce la formación de cristales durante la congelación. Tiene distintas funciones de acuerdo a los componentes que se adicionen: incrementan o sustituyen el volumen del eyaculado, tienen un componente tampón (como Tes, Tris, Hepes, Pipes, Mes o Tricine), preservan la viabilidad del espermatozoide al suministrar energía (como glucosa o fructosa), confieren protección contra productos del metabolismo (como antioxidantes), microorganismos (como penicilina o estreptomicina) y variaciones de temperatura (como ACPs) (Shivaji et al., 2003; Guerrero et al., 2009; Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

El uso de los antioxidantes se efectúa con el fin de neutralizar la generación de ROS y el estrés oxidativo durante el congelamiento, mejoran la función espermática (motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y del ADN) y en consecuencia de la capacidad fértil. Los antioxidantes se clasifican por su actividad en enzimáticos (glutathion peroxidasa, SOD y catalasa) y no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutathion, taurina y cofactores como selenio, zinc, l-carnitina o melatonina) (Hezavehei et al., 2018). Sin embargo, la adición de los antioxidantes en los diluyentes no es común, en parte porque hay una serie de posibles agentes entre los cuales seleccionar, por las diferentes vías en las que actúan y por las distintas respuestas en las diferentes especies (Watson, 2000).

#### e) Variaciones al método de criopreservación

Han surgido otros procedimientos que han sido poco estudiados para mejorar la respuesta a la criopreservación de los espermatozoides como son la aplicación de proteínas anticongelantes, el agua magnetizada para ionizar y formar cristales más pequeños, el precondicionar a un estrés subletal a la célula previo al congelamiento, el almacenar pocos espermatozoides mediante el empleo de crio-loops, microgotas, pajillas cortadas, mini pajillas, pajillas abiertas, perlas de alginato, microesferas de gel de agarosa, criotop, capilares y pajillas de alta seguridad, la inserción espermática en zona pelúcida libre previa al congelado, la vitrificación en superficie sólida y la liofilización (Hezavehei et al., 2018). Sin embargo, deben ampliarse los estudios en estos métodos para lograr un progreso en la preservación en vías de mejorar la calidad espermática y reducir los daños que mejoren la fecundidad para la reproducción asistida.

## **Antecedentes**

### Métodos actuales en la investigación de la biología reproductora de reptiles

El estudio de la reproducción en reptiles actualmente se centra en describir las variaciones en el dimorfismo sexual, los ciclos reproductores y la regulación asociada a su ambiente (Amey & Whittier, 2000; Ferreira et al., 2009; Zena et al., 2020). Lance (2010) ha recopilado información acerca de los estudios en fisiología reproductiva de reptiles (actividad gonadal u hormonal), pero la mayoría de los estudios han involucrado procedimientos invasivos que implican la captura de los individuos para obtener las muestras, e incluso destructivos ya que recurren a la eutanasia de los organismos. En el caso de la hembra, se han utilizado para la evaluación de los ciclos reproductores métodos no destructivos, como la laparoscopia en el desarrollo folicular (Cree et al., 2016); la celiotomía paramediana, donde además se relaciona con el estradiol durante el ciclo reproductor (Cruz Cano, 2017) e incluso la histerectomía parcial para estudiar aspectos de fisiología durante la gestación (Castro Camacho, 2018). Asimismo, se ha abordado mediante métodos no invasivos como la radiografía (Cree et al., 2016), la ecografía y la palpación (Gartrell et al., 2002), así como la ultrasonografía (Martínez-Torres et al., 2006).

La condición reproductiva del macho se ha evaluado mediante la observación de los cambios de los tipos celulares en la espermatogénesis (Gribbins, 2011) y las variaciones morfométricas del testículo durante el ciclo reproductor (Feria-Ortiz et al., 2001), lamentablemente utilizando en ambos estudios métodos destructivos. Además, se ha determinado el momento de mayor actividad testicular mediante la ultrasonografía (López-Juri et al., 2018). Existe sólo un estudio invasivo que no implica la eutanasia de los organismos que utiliza la celiotomía con biopsia testicular para evaluar el tamaño y celularidad del testículo en el ciclo reproductor, donde además se relaciona con las concentraciones de testosterona (Sánchez Rivera, 2017). Estos dos últimos métodos permiten que la investigación no contribuya a la disminución de las poblaciones, que finalmente es la razón de ser de estos estudios.

### Especies de estudio

*Sceloporus aneneus*: La lagartija espinosa de pastizales del Anáhuac es una lagartija esbelta pequeña cuya longitud hocico-cloaca (LHC) en adultos alcanza hasta los 60 mm. Se caracteriza por presentar un par de escamas cantales y ser de color olivo grisáceo, con un par de franjas de color café claro en la región dorsal (Figura 4). Tiene hábitos terrestres y diurnos, se distribuye en zonas de clima templado de México, en altitudes de 1850 y 3600 m.s.n.m. Su reproducción es estacional de verano, ovípara con un promedio de 5 huevos por puesta con medidas de 9.8 x 7.5 mm (Ramírez-Bautista et al., 2009a; Dixon & Lemos Espinal, 2010). La IUCN clasifica esta especie como de preocupación menor (Canseco-Márquez et al., 2007a). Ramírez-Bautista y colaboradores (2016a) han reportado que los machos adultos presentan tallas mayores a las hembras. También sugieren que la precipitación y la temperatura pueden influir en este rasgo, así como en el desarrollo folicular de un año a otro. Además, se han reportado dos momentos de postura durante un ciclo reproductor y se ha relacionado positivamente la talla de la hembra con el tamaño de la puesta (Ramírez-Bautista et al., 2016b). Se ha registrado un volumen seminal de  $2.7 \pm 1.0$  ml y una concentración espermática de  $38.8 \pm 13.4 \times 10^6$  espermatozoides /ml (Martínez-Torres et al, 2019b).



Figura 4. Ejemplar macho adulto de *Sceloporus aneneus* en Tlazala de Isidro Fabela, Estado de México.

*Sceloporus grammicus*: La lagartija del Mezquite es una especie pequeña a mediana cuya LHC en adultos alcanza una hasta los 76 mm. Es de color verde a gris intenso con una franja transversal de color crema en la región frontal. Los machos presentan parches de color azul cielo a azul intenso, con dos líneas negras en la parte media del vientre (Figura 5) y las hembras de color pajizo a naranja. Habita en las montañas de clima templado, incluso en zonas con presencia humana; se puede considerar como una especie oportunista. Es vivípara, diurna y estacional, el apareamiento en poblaciones del Ajusco ocurre durante el verano, tiene de 8 a 12 crías que nacen durante la primavera siguiente (Ramírez- Bautista et al., 2009). Se encuentra a elevaciones entre 1400 y 3500 m.s.n.m., la temperatura operativa se ha descrito en el rango de 25.3– 37.6 °C (Lara-Reséndiz et al., 2014). La IUCN clasifica esta especie como de preocupación menor (Hammerson et al., 2007). Además, Hernández-Salinas y colaboradores (2010) encontraron que los ciclos de dos poblaciones (La Estanzuela y Tilcuautla, Hidalgo) presentaban asincronía entre machos y hembras con inicio de la actividad gonadal de ambos sexos en mayo-julio, la regresión testicular para octubre-noviembre y la ovulación en noviembre-diciembre. Esta especie es considerada como un complejo de subespecies ya que las poblaciones que habitan en altitudes menores a 2400 y mayores a 2800 presentan un menor número de cromosomas ( $2n = 32$ ) con respecto a los que se ubican en los 2600 m.s.n.m. ( $2n = 34$ ) (Arévalo et al., 1993). Se ha registrado un volumen seminal de  $4.1 \pm 2.5$  ml y una concentración espermática de  $347.3 \pm 123.2 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Martínez-Torres et al, 2019b).



Figura 5. Ejemplar macho adulto de *Sceloporus grammicus* en Los Reyes Ixtacala, Tlalnepantla, Estado de México.

*Sceloporus torquatus*: La lagartija espinosa de collar, es una especie endémica de nuestro país. Es robusta de talla grande, cuya LHC alcanza hasta los 123 mm. Presenta escamas supraoculares arregladas en una sola hilera, las dorsales ligeramente quilladas y mucronadas. Es café olivo oscuro con manchas claras. Presentan un collar de color negro en la región dorsal del cuello, rodeado de dos hileras de escamas color blanco (Figura 6). Habita en comunidades de bosque de encino y pino-encino; es de hábitos diurnos, se le encuentra en las grietas o rocas a altitudes de 1600 a 3000 m.s.n.m. (Ramírez-Bautista et al., 2009; Dixon & Lemos Espinal, 2010). Es vivípara, las gónadas incrementan su tamaño a partir de junio, en septiembre los testículos alcanzan su volumen y peso máximos. El apareamiento ocurre en el otoño cuando las hembras presentan folículos preovulatorios. La ovulación ocurre entre noviembre y diciembre. Tiene de 3 a 13 crías que nacen en abril-mayo (Feria- Ortiz et al., 2001). La IUCN clasifica esta especie como de preocupación menor (Canseco-Márquez et al., 2007b). Sánchez Rivera en 2017 observó que hay un incremento significativo en la concentración de testosterona plasmática de esta lagartija durante la época de cortejo; sin embargo, se desconoce si existe relación entre los niveles de esta hormona con la calidad espermática. Se ha registrado un volumen seminal de  $8.5 \pm 3.4$  ml y una concentración espermática de  $103.6 \pm 44.8 \times 10^6$  espermatozoides /ml (Martínez-Torres et al, 2019b).



Figura 6. Ejemplar macho adulto de *Sceloporus torquatus* en el Parque Estatal Sierra de Guadalupe, Estado de México.

## Reproducción asistida en reptiles

### a) Obtención del semen.

En los reptiles se han utilizado varios métodos de obtención de semen como la electroeyaculación en serpientes (Quinn et al., 1989), tortugas (Zimmerman & Mitchell, 2017) y saurios (Zimmerman et al., 2013; Martínez-Torres et al., 2019a). Además se ha practicado la obtención *postmortem* de espermatozoides del conducto deferente (Young et al., 2017). Se ha empleado el masaje abdominal en cocodrilos (Johnston et al., 2014a y b), serpientes (Tourmente et al., 2007) y en una especie de lagartija (Molinia et al., 2010), pero no en todas las especies este método es exitoso. Recientemente, Martínez-Torres y colaboradores (2019b) describieron un método en saurios que consiste en la opresión de la papila genital, el cual permite realizar la evaluación completa del semen sin aparente repercusión en la calidad espermática.

### b) Procesamiento del semen

De manera habitual, las investigaciones en este tópico se han enfocado en la evaluación básica del semen (volumen, concentración, motilidad y viabilidad espermática). Recientemente se ha comenzado a implementar la evaluación de la dinámica del movimiento con sistemas computarizados en cocodrilos (Valverde et al., 2019). Además, el semen de distintas especies se ha enfriado y mantenido en refrigeración (hasta 72 horas) como en el caso de tortugas (Zimmerman & Mitchell, 2017), serpientes (Fahrig et al., 2007), iguanas (Zimmerman et al., 2013) y cocodrilos (Johnston et al., 2014b). En menor medida, se ha inseminado con semen fresco sin efectividad en lagartijas (*Oligosoma maccanni*; Molinia et al., 2010) y serpientes (*Thamnophis marcianus*; Quinn et al., 1989). Solo se ha reportado un caso donde se obtuvieron crías de serpientes, empleando semen refrigerado por 72 horas (Mattson et al., 2007). En el Cuadro 1 se muestran los distintos métodos de obtención y las investigaciones desarrolladas con el semen de distintas especies de reptiles. El caso de la criopreservación del semen en reptiles se trata más adelante.

Cuadro 1. Métodos de obtención y procesamiento del semen en reptiles

Especies de estudio	Método de obtención	Contención empleada	Estudio realizado
<b>Tortugas</b>			
<i>Lepidochelys olivacea</i> y <i>Eretmochelys imbricata</i> (Sirinarumitr et al., 2010)	EE	-	Dilución y refrigeración en diversos medios
<i>Siebenrockiella crassicollis</i> (Kimskulvech & Suttiyotin, 2012)	EE	Ketamina (40 mg/kg)	Tinción de espermatozoides
<i>Eretmochelys imbricata</i> (Kawazu et al., 2014)	EE	-	Evaluación básica del semen
<i>Stigmochelys pardalis</i> (Zimmerman & Mitchell, 2017)	EE	Propofol (10 mg/kg)	Evaluación previa y posterior a la refrigeración
<b>Serpientes</b>			
<i>Thamnophis marcianus</i> (Quinn et al., 1989)	EE	-	Evaluación del volumen, motilidad e IA
<i>Elaphe guttata</i> (Fahrig et al., 2007)	Masaje ventral	-	Evaluación previa y posterior a la refrigeración
<i>Elaphe guttata</i> (Mattson et al., 2007)	Masaje ventral	-	Evaluación, refrigeración e IA
<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Zacariotti et al., 2007) <sup>a</sup> y <i>C. ruber</i> (Zacariotti et al., 2012) <sup>b</sup>	Manual	Lidocaína (15 mg local)	Evaluación de las características básicas seminales <sup>a</sup> y criopreservación <sup>b</sup>
Especies de los géneros <i>Boa</i> <sup>c</sup> , <i>Morelia</i> <sup>c</sup> , <i>Pituophis</i> <sup>c</sup> y <i>Crotalus</i> <sup>c,d</sup> , (Fuentes-Mascorro et al., 2014 <sup>c</sup> y Fuentes-Mascorro et al., 2015 <sup>d</sup> )	Masaje ventral	-	Dilución en diversos medios <sup>c</sup> y refrigeración <sup>d</sup>
<i>Bothrops insularis</i> (Silva et al., 2015)	Manual	Lidocaína (15 mg local)	Evaluación básica y variaciones a lo largo del año
<i>Pantherophis guttatus</i> , <i>Hydrodynastes gigas</i> , <i>Corallus hortulanus</i> y <i>Sanzinia madagascariensis</i> (Oliveri et al., 2018)	Masaje ventral	-	IA oviductal por endoscopia

EE: electroeyaculación, CD: recuperación de los conductos deferentes, IA: Inseminación artificial.

Cuadro 1. Métodos de obtención y procesamiento del semen en reptiles (continuación)

Especies de estudio	Método de obtención	Contención empleada	Estudio realizado
<b>Saurios</b>			
<i>Hoplodactylus maculatus</i> , <i>H. pacificus</i> , <i>Naultinus grayii</i> y <i>N. stellatus</i> (Todd, 2003)	Manual	-	Morfología espermática y variaciones entre las especies
<i>Oligosoma maccanni</i> (Molinia et al., 2010)	Manual	-	IA
<i>Iguana iguana</i> (Zimmerman et al., 2013)	EE	Propofol (10 mg/kg)	Evaluación básica del semen y refrigeración
<i>Tupinambis merinae</i> (Young et al., 2017)	CD	<i>Postmortem</i>	Evaluación básica del semen y criopreservación
<i>Tropidurus spinulosus</i> (López-Juri et al., 2018)	EE	-	Evaluación básica del semen
<i>Sceloporus torquatus</i> (Martínez-Torres et al., 2019a)	EE	Pentobarbital sódico (16 mg/kg)	Morfología y concentración espermática
<i>S. anahuacus</i> , <i>S. aeneus</i> , <i>S. grammicus</i> , <i>S. torquatus</i> y <i>Phrynosoma orbiculare</i> (Martínez-Torres et al., 2019b)	Opresión papila genital	Pentobarbital sódico (16 mg/kg)	Evaluación de las características básicas del semen
<b>Cocodrilos</b>			
<i>Alligator mississippiensis</i> (Larsen et al., 1984)	CD	<i>Postmortem</i>	Dilución, congelación en hielo de CO <sub>2</sub> e IA
<i>Crocodylus porosus</i> (Johnston et al., 2014a <sup>c</sup> ; Johnston et al., 2014b <sup>f</sup> )	Masaje ventral	Diacepam y bromuro de pancuronio	Evaluación básica del semen <sup>e</sup> y criopreservación <sup>f</sup>
<i>C. porosus</i> (Fitri et al., 2018)	Masaje ventral	-	Evaluación básica y refrigeración
<i>C. porosus</i> (Nixon et al., 2016)	Masaje ventral	-	Evaluación básica e incubación en medios de capacitación
<i>Caiman crocodilus fuscus</i> (Valverde et al., 2019)	Masaje ventral	-	Evaluación básica y de la cinética del movimiento en sistema CASA

EE: electroeyaculación, CD: recuperación de los conductos deferentes, IA: Inseminación artificial.

### c) Criopreservación

En el caso de reptiles, las investigaciones en este t3pico son escasas. Se pueden enlistar casos concretos: en espermatozoides de la serpiente *Crotalus ruber* (Zacariotti et al., 2012), del cocodrilo *Crocodylus porosus* (Johnston et al., 2014b) y para el caso de saurios 3nicamente existe un estudio, donde cabe destacar que se trabaj3 con el semen de los ejemplares *postmortem* (*Tupinambis merianae*; Young et al., 2017). Por esta raz3n, se debe trabajar en esta materia para determinar la composici3n del diluyente y el agente crioprotector adecuados, asi como las condiciones para el enfriamiento y descongelaci3n que permitan un buen porcentaje de sobrevivencia para que pueda utilizarse como un m3todo de rutina en la RA de este grupo de animales.

### d) Elecci3n del diluyente

Las caracter3sticas morfol3gicas, las propiedades biof3sicas de la membrana del espermatozoide, la tolerancia osm3tica y la permeabilidad vuelven necesario el establecimiento de protocolos espec3ficos para cada especie (Clulow & Clulow, 2016; Anzalone et al., 2018). En cualquier especie en que se desee establecer un protocolo de criopreservaci3n, el manejo apropiado de las muestras es un paso cr3tico, previo a la exposici3n de los espermatozoides a bajas temperaturas o a soluciones crioprotectoras (Yeste, 2016). Se requiere de la modificaci3n y evaluaci3n experimental de los componentes que constituyen al diluyente (Santiago-Moreno & Galarza, 2019) para incrementar el volumen del eyaculado, preservar la calidad esperm3tica y mantener su capacidad fecundante (Guerrero et al., 2009).

En este respecto, se ha planteado que los reptiles pueden emparejarse con las aves cuando se consideran los desaf3os derivados del desconocimiento de la anatom3a, fisiolog3a y biolog3a del desarrollo de este clado (Clulow & Clulow, 2016). Los espermatozoides aviares tienen distintas tolerancias osm3ticas. Los espermatozoides de gallo presentan una osmolaridad cr3tica menor de hasta 17 mOsm/L (Long, 2006). En el caso la grulla de Sandhill (*Grus canadensis*), los espermatozoides pueden permanecer viables hasta los 3000 mOsm/L, mientras que los de pavo se da3an ante una exposici3n a los 500 mOsm/L. Los

espermatozoides del águila imperial (*Aquila adalberti*) y el halcón peregrino (*Falco peregrinus*) tienen una mayor tolerancia osmótica hasta los 8000 mOsm/L (Comizzoli et al., 2012). En los espermatozoides de algunas serpientes (*Boa*, *Crotalus*, *Morelia* y *Pituophis*) expuestos a distintas osmolaridades se encontró que entre 420 y 480 mOsm/L no se produce un estrés osmótico (Fuentes-Mascorro et al., 2015). En el caso del cocodrilo *Crocodylus porosus*, los espermatozoides expuestos a una variedad de medios anisotónicos hipotónicos incrementan la incidencia del enrollamiento flagelar y con el posterior retorno a medios entre 220 a 390 mOsm/L, mantienen la motilidad sin daño en la membrana plasmática (Johnston et al., 2014b). En general, se ha documentado que la osmolaridad del diluyente debe ser más alta (350 mOsm/L) que la del suero específico (~300 mOsm/L) y su pH ligeramente alcalino, cercano a la neutralidad (Comizzoli, 2012).

Dentro de estas características existen diversos tipos de diluyentes de animales domesticados, que han sido empleados en animales silvestres, como son: Tyrode, Ham F-10, Tris-citrato-glucosa y Tris-yema de huevo (Comizzoli et al., 2000). Particularmente, en *Crocodylus porosus*, la solución salina tamponada con amortiguador salino de fosfatos (PBS) no alteró la fisiología de los espermatozoides, incluso posterior al congelado-descongelado (Johnston et al., 2014b). En el estudio de Young y colaboradores (2017) para el tegú blanco, se empleó el Tris-yema de huevo al 20% como diluyente. Los componentes de la yema de huevo (lipoproteínas, fosfolípidos y colesterol), interaccionan con la membrana plasmática, le confieren protección contra el choque frío ya que se adhieren a esta, la estabilizan y crean un entorno hiperosmótico (Rakha et al., 2018) y junto al TES, un agente zwitteriónico, adiciona un efecto favorable como fuente de energía para el movimiento espermático (Santiago-Moreno et al., 2013).

#### e) Elección del crioprotector

El tris-yema de huevo presenta un mayor efecto benéfico en combinación con un agente crioprotector (Swelum et al., 2018). Los dos agentes crioprotectores más empleados en los protocolos de espermatozoides aviares son el glicerol y el DMSO (Long, 2006). El crioprotector menos tóxico y más eficaz ha sido por muchos años el glicerol ya que preserva

una mayor motilidad, integridad en la membrana, el segmento apical, la mitocondria y el acrosoma, así como la fertilidad posterior al descongelado (Woolley & Richardson, 1978; Blesbois et al., 2007; Mocé et al., 2010). Es un soluto pequeño polihidroxiado con una alta solubilidad al agua que puede interactuar mediante los enlaces de hidrógeno e ingresar lentamente a través de la membrana plasmática (Fuller, 2004). En los espermatozoides puede ingresar mediante difusión facilitada por proteínas integrales de membrana para agua denominadas acuaporinas (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) (Wang et al., 2006); además, puede proporcionar una fuente extra de energía metabolizable (Santiago-Moreno & Galarza, 2019). Las diferentes especies muestran distintas tolerancias a las concentraciones de glicerol: hasta 5% en bovinos, 4% en venados, 3% en cerdos, 1.75% en ratones, 6% en chinchilla (Comizzoli et al., 2000). El glicerol a concentraciones entre 4 y 11% tiene menos efectos nocivos en aves que el DMSO y el DMA (Tselutin et al., 1999).

Sin embargo, debe ser adicionado a temperaturas menores a 4 °C, durante el periodo de equilibrio del crioprotector, lo cual permite una correcta estabilización del plasmalema (Long, 2006) y, debe ser eliminado al descongelado, por sus efectos de toxicidad a temperaturas mayores a 4 °C, por el estrés osmótico (al pasar rápidamente de 1300 a 300 mOsm/L) y por sus efectos contraceptivos (Abouelezz et al., 2014). Young y colaboradores (2017), en el tegu argentino, reportan que el mejor índice de congelación; el cual relaciona la motilidad, integridad de la membrana y del acrosoma, tuvo una mejor respuesta con glicerol al 8 %. Estas razones nos permitieron establecer para la criopreservación de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* con Tris yema de Huevo al 20% y glicerol al 8% (v/v).

## **Justificación**

Los lagartos son el grupo más diverso de reptiles con cerca de 6512 especies (Uetz et al., 2018). Son considerados excelentes indicadores biológicos ya que funcionan como: a) depredadores controlando poblaciones de artrópodos, b) presas de algunas serpientes, aves y mamíferos e incluso c) diseminando semillas (Olesen & Valido, 2003). Ante la pérdida actual de la biodiversidad, algunas de las especies persistirán, aunque en rangos geográficos cada vez más pequeños y fragmentados. En aquellas especies altamente vulnerables se requerirán acciones eficaces para asegurar su sobrevivencia (Fitzgerald et al., 2018). Las técnicas de RA podrían asociarse a los programas de conservación para complementar las insuficientes medidas actuales. Particularmente, la criopreservación únicamente se ha practicado con individuos *postmortem* (Young et al., 2017). Existen diversas especies de las cuales se conocen características de su ciclo reproductor, que por su abundancia y docilidad podrían ser utilizadas como modelos para dar continuidad al desarrollo de estas técnicas (Vitt & Caldwell, 2014). Por todo lo antes expuesto, se seleccionaron a tres especies de lagartijas del género *Sceloporus*, con distintos tipos de hábitat, tamaño, estrategia de paridad, además de una evidente estacionalidad, excelentes para desarrollar un método de aplicación para la criopreservación de espermatozoides de diversas especies.

## Objetivos

### General:

- Implementar una metodología para la criopreservación de espermatozoides de saurios del género *Sceloporus* que permita la sobrevivencia espermática posterior al descongelado.

### Particulares:

- Establecer una técnica eficiente para la obtención y evaluación de la calidad del semen de lagartijas de *Sceloporus aeneus*, *S. grammicus* y *S. torquatus*.
- Analizar si existe relación entre el volumen seminal y la concentración espermática con las características morfométricas de los individuos.
- Desarrollar un método adecuado para el enfriamiento, adición del crioprotector y congelación de los espermatozoides de lagartija.
- Comparar la calidad espermática del semen fresco y descongelado entre las tres especies de estudio.

## Metodología

### a) Colecta y mantenimiento de los organismos

Se capturaron machos adultos de tres especies del género *Sceloporus* en distintas localidades del Estado de México: 21 individuos de *S. aeneus* en Tlazala de Isidro Fabela (19.55 N, 99.41 W, 2793 m.s.n.m.); 20 individuos de *S. grammicus* en la FES-Iztacala, UNAM, Tlalnepantla (19.52 N, 99.18 W, 2246 m.s.n.m.); y 21 individuos de *S. torquatus* en el Parque Estatal Sierra de Guadalupe, Coacalco (19.61 N, 99.11 W, 2480 m.s.n.m.), previo a la época de apareamiento de cada especie (marzo-abril, junio-julio y octubre-noviembre, respectivamente), bajo el permiso de colecta SGPA/DGVS/02921/19.

Los criterios de inclusión de los organismos para el estudio fueron mediante la observación de conductas de cortejo *in situ* como el cabeceo, las flexiones, la persecución de las hembras y los intentos de monta (Martínez- Torres et al., 2019b), así como por la presencia de características morfológicas visibles indicativas de esta condición (hipertrofia de poros femorales y coloraciones intensas). Se identificó a cada uno de los individuos mediante la ectomización de falanges y se obtuvieron sus valores morfométricos (longitud hocico-cloaca, longitud cloaca-cola y peso).

Todos los animales se mantuvieron en confinamiento en condiciones de semicautiverio con un ambiente recreado en encierros (3m x 5m x 2 m) del invernadero anexo del Laboratorio de Biología de la Reproducción (Unidad de Morfología y Función) de la FES Iztacala, UNAM, con acceso al agua *ad libitum* y alimento vivo cada tercer día (grillos domésticos, *Acheta domestica*; larvas de palomilla, *Galleria mellonella* y escarabajos, *Tenebrio molitor*) durante el periodo experimental (no mayor a dos semanas). Luego de este periodo, todos los organismos fueron liberados en su hábitat de procedencia.

### b) Obtención del semen

El procedimiento con los animales fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Facultad de Medicina

Veterinaria y Zootecnia con número de protocolo: MC-2018/2-16. Los individuos se trasladaron al Laboratorio de Reproducción Animal (Unidad de Investigación Multidisciplinaria) de la FES Cuautitlán, UNAM. Se indujo la relajación de cada uno de los organismos con pentobarbital sódico mediante inyección intracelómica (26 mg/kg). Inmediatamente después de alcanzar el estado de inconsciencia, definido por la ausencia de respuesta a estímulos y la disminución de la frecuencia respiratoria, se retiraron los uratos, la materia fecal y se limpió la cloaca utilizando hisopos con solución salina fisiológica de reptil (0.07% NaCl). Se obtuvo el semen realizando la opresión de las papilas genitales y se recuperó mediante puntas de micropipeta graduadas cada microlitro (Martínez-Torres et al., 2019b) para determinar el volumen de cada eyaculado. Los individuos se mantuvieron a temperatura entre 18 a 24 °C durante todo el procedimiento y en observación hasta recuperar el estado de consciencia.

#### c) Dilución y evaluación del semen

Para la evaluación y congelación se empleó el medio de tris yema de huevo: TES 211 mM, Tris 96 mM, dextrosa 11 mM, penicilina-estreptomicina al 1% en yema de huevo de gallina fresco al 20%, pH de 7.6 (Chan et al., 1987). La osmolaridad del medio (323 mOsm) se determinó con el osmómetro automático de alta precisión modelo 5002 Osmette A, Precision Systems Inc. El volumen de semen fresco obtenido de cada uno de los individuos se diluyó hasta alcanzar un volumen final de 150  $\mu$ l. De esta solución, se tomaron 50  $\mu$ l para el análisis de la calidad espermática empleando una batería de pruebas básicas utilizada en mamíferos. Se midió el volumen, la concentración espermática y la motilidad progresiva (Contreras-Mendez & Medrano, 2016). La viabilidad y el porcentaje de células con morfología normal se evaluaron aplicando la tinción de eosina-nigrosina; la integridad de la membrana plasmática mediante la tinción con SyBR-14/ Yoduro de Propidio (PI); y la integridad del acrosoma a través del uso de lectinas de chícharo unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Alcántar-Rodríguez & Medrano, 2017) utilizando PI como contraste (para mayores detalles, ver Anexo 1).

#### d) Enfriamiento y congelación

El volumen restante de cada una de las muestras (100  $\mu$ l) se sometió a enfriamiento a razón de 0.1  $^{\circ}$ C por minuto. El descenso de temperatura se monitoreó empleando un termómetro con sonda tipo K, HANNA HI 93532R con el programa HANNA Instruments (HI 9200, versión 5.0.26). Una vez alcanzada la temperatura de 5  $^{\circ}$ C, se adicionaron 100  $\mu$ l del medio con glicerol al 16% en dos fracciones con 10 minutos de equilibrio cada uno, para alcanzar una dilución final del 8% (v/v; Young et al., 2017). Posteriormente se hicieron bolitas de 40  $\mu$ l en CO<sub>2</sub> sólido (-79  $^{\circ}$ C), se mantuvieron durante 2 minutos a esta temperatura, previo a la inmersión en nitrógeno líquido (-196  $^{\circ}$ C) y deposición en criotubos de 2 ml para su almacenamiento (Figura 7).

#### e) Descongelación

Después de al menos tres semanas de almacenamiento, se realizó el descongelado de 3 bolitas por cada uno de los organismos mediante la incubación durante 3 minutos a 29  $^{\circ}$ C en baño maría y a temperatura de laboratorio entre 23-26  $^{\circ}$ C (Figura 7). Se diluyó cada una de las muestras con 40  $\mu$ l del medio sin glicerol (relación 1:1 v/v) para disminuir la toxicidad del crioprotector e inmediatamente después fueron evaluadas, similar descrito para el semen fresco. Finalmente, se obtuvieron los índices de congelabilidad [(valor al descongelado/valor en fresco) x 100], para comparar la resistencia de las especies a las diferentes pruebas (O'Brien et al., 2019).

#### f) Análisis estadístico

Se obtuvo la media y la desviación estándar de los valores morfométricos de los individuos, de las evaluaciones del semen fresco y descongelado; así como de los índices de congelabilidad para cada especie. Se practicó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos y de acuerdo a ello, se compararon cada una de las variables entre las especies mediante la prueba de ANOVA de una vía o Kruskal- Wallis y se determinaron las diferencias mediante la comparación múltiple de Holm-Sidak o Dunn, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Asimismo, mediante la prueba de Pearson se determinó si existían correlaciones

significativas entre el volumen seminal y la concentración espermática, así como con el peso y la LHC para cada especie ( $p < 0.05$ ). Además, se determinó si los tratamientos (fresco y descongelado) presentaron diferencias significativas mediante la prueba de t pareada o la de Wilcoxon, cuando no cumplieron con los requisitos de normalidad ( $p < 0.001$ ). Todas estas pruebas se realizaron empleando el programa SigmaPlot 10 para Windows y el Kaleidagraph 12.0 para iOS para la elaboración de los gráficos.

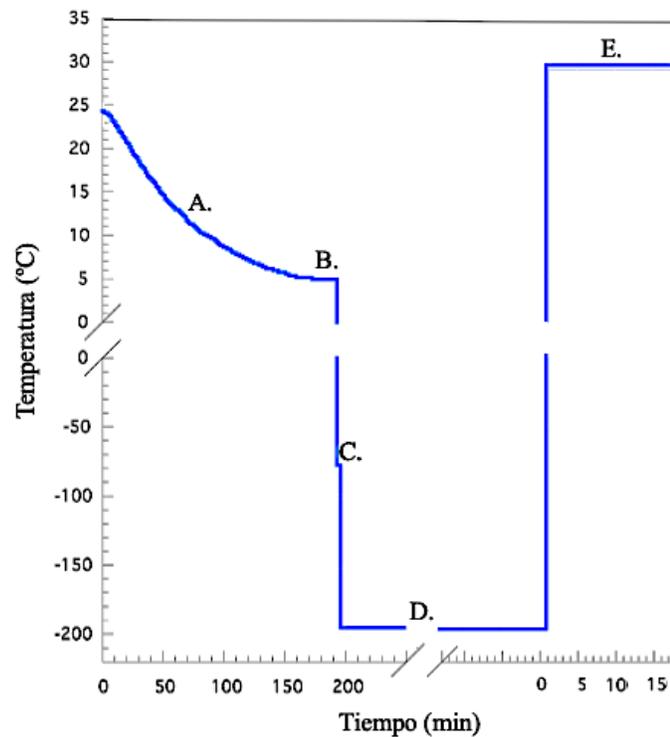


Figura 7. Curva de temperatura a la que se sometieron los espermatozoides de las lagartijas del género *Sceloporus* durante el proceso de criopreservación: A. Los espermatozoides en el medio de Tris yema de huevo se enfriaron a una velocidad lenta ( $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), hasta alcanzar la temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  cuando, B. se adicionó el glicerol en dos fracciones con 10 minutos de equilibrio entre cada una, hasta alcanzar una concentración de 8% (v/v), C. se realizaron bolitas de  $40\text{ }\mu\text{l}$  en hielo de  $\text{CO}_2$  a  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos, D. se sumergieron en nitrógeno líquido para su almacenamiento por al menos 3 semanas y E. se descongelaron durante 3 minutos a  $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La evaluación espermática se realizó a la misma temperatura.

## Resultados

### a) Características morfométricas de los organismos

Todos los machos de las tres especies del género *Sceloporus* ( $n = 62$ ) del presente estudio fueron maduros sexualmente. Además, se encontraron diferencias significativas entre las especies en las siguientes características morfométricas: peso ( $H_{(2)} = 54.22$ ,  $p = <0.001$ ), longitud hocico-cloaca (LHC,  $H_{(2)} = 53.91$ ,  $p = <0.001$ ), longitud cloaca-cola (LCC,  $H_{(2)} = 32.83$ ,  $p = <0.001$ ). Los valores promedio y el intervalo de las características se presentan en el Cuadro 2.

### b) Características del semen

En todos los individuos se logró la obtención de semen. Sólo en algunos casos ocurrió la eversión de los hemipenes. La apariencia del semen fue blanco lechoso de consistencia espesa sin presencia de heces, uratos ni sangre en las tres especies (Figura 8). El número de emisiones ( $F_{(2,61)} = 1.024$ ,  $p = 0.365$ ) y la concentración espermática ( $H_{(2)} = 0.791$ ,  $p = 0.673$ ), no presentaron diferencias significativas entre las especies. Únicamente se encontraron diferencias con el volumen seminal de *S. torquatus* ( $H_{(2)} = 19.67$ ,  $p = <0.001$ ) (Cuadro 2).

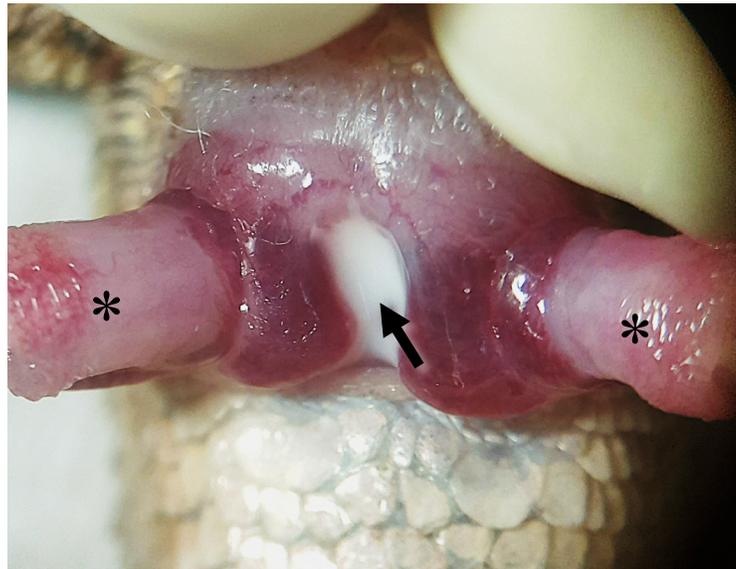


Figura 8. Emisión de semen blanco lechoso y espeso (señalado con una flecha ) , con la eversión de hemipenes (señalados con asteriscos  ) en un individuo de *Sceloporus grammicus*.

Cuadro 2. Características morfométricas y del semen de machos del género *Sceloporus*.

Especie	Peso (g)	LHC (cm)	LCC (cm)	Emisiones	Volumen (μl)	Concentración (x 10 <sup>6</sup> /ml)
<i>S. aeneus</i> (n=21)	3.46 ± 0.58 <sup>a</sup> (2.61 - 4.76)	4.91 ± 0.47 <sup>a</sup> (4.20 - 5.60)	5.30 ± 1.34 <sup>a</sup> (2.20 - 7.10)	2.61 ± 0.74 (1.0 - 4.0)	3.90 ± 1.88 <sup>a</sup> (1.5 - 9.0)	223.39 ± 133.74 (62.40 - 535.00)
<i>S. grammicus</i> (n=20)	11.41 ± 2.74 <sup>b</sup> (5.52 - 15.27)	7.07 ± 0.6 <sup>b</sup> (6.0 - 8.50)	6.96 ± 2.04 <sup>a</sup> (1.9 - 9.8)	2.95 ± 1.14 (1.0 - 5.0)	5.92 ± 3.72 <sup>a</sup> (1.0 - 16.0)	285.24 ± 190.19 (79.68 - 780.0)
<i>S. torquatus</i> (n = 21)	33.20 ± 9.29 <sup>c</sup> (18.07 - 52.48)	9.79 ± 0.95 <sup>c</sup> (8.0 - 11.30)	10.24 ± 2.35 <sup>b</sup> (4.0 - 13.70)	3.04 ± 1.11 (1.0 - 5.0)	13.57 ± 9.58 <sup>b</sup> (3.0 - 32.0)	272.84 ± 211.8 (69.56 - 765.0)

LHC: longitud hocico-cloaca

LCC: longitud cloaca-cola

Los datos presentados son la media ± la desviación estándar. Entre parentesis se presenta el intervalo de los datos. Las diferencias significativas entre las especies ( $p < 0.05$ ) se representan con letras distintas.

c) Correlación del volumen seminal y la concentración espermática con el peso y la talla.

Se encontraron únicamente relaciones significativas entre el peso de los organismos y el volumen seminal para *S. grammicus* y *S. torquatus*; así como entre el peso de los organismos de *S. grammicus*, donde se encontró una relación negativa con la concentración espermática ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de correlación (r) y de p para el volumen seminal con el peso y LHC de machos del género *Sceloporus*.

Especie	Peso-volumen seminal	LHC-volumen seminal	Peso-concentración espermática	LHC-concentración espermática	Volumen-concentración espermática
<i>S. aeneus</i>	r = 0.091 p = 0.694	r = 0.071 p = 0.759	r = 0.111 p = 0.630	r = -0.199 p = 0.386	r = -0.407 p = 0.066
<i>S. grammicus</i>	r = 0.634* p = 0.002	r = 0.427 p = 0.060	r = -0.574* p = 0.008	r = -0.417 p = 0.671	r = -0.340 p = 0.132
<i>S. torquatus</i>	r = 0.507* p = 0.019	r = 0.199 p = 0.387	r = -0.286 p = 0.209	r = -0.205 p = 0.373	r = -0.407 p = 0.066

Las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) se resaltan con un asterisco (\*).

d) Motilidad progresiva

Los individuos de *S. torquatus* y *S. aeneus* ( $90.52 \pm 7.97\%$  y  $88.57 \pm 10.14\%$ ) presentaron porcentajes similares de motilidad progresiva ( $H_{(2)} = 13.38$ ,  $p = 0.001$ ), mayores en relación a *S. grammicus* ( $77.60 \pm 14.94\%$ ) ( $p < 0.05$ , Figura 9). El proceso de congelamiento-descongelamiento indujo una disminución estadísticamente significativa en la motilidad progresiva de las tres especies: *S. aeneus* ( $t_{20} = -22.086$ ,  $p = 8.059 \times 10^{-16}$ ), *S. grammicus* ( $t_{19} = 21.835$ ,  $p = 3.211 \times 10^{-15}$ ) y *S. torquatus* ( $t_{20} = 33.679$ ,  $p = 2.166 \times 10^{-19}$ ). Luego del tratamiento, *S. aeneus* ( $20.22 \pm 11.36\%$ ) y *S. torquatus* ( $17.0 \pm 7.87\%$ ) de igual manera, presentaron mayor motilidad ( $H_{(2)} = 17.19$ ,  $p = <0.001$ ) respecto a *S. grammicus* ( $8.63 \pm 5.41\%$ ) ( $p < 0.05$ , Figura 9).

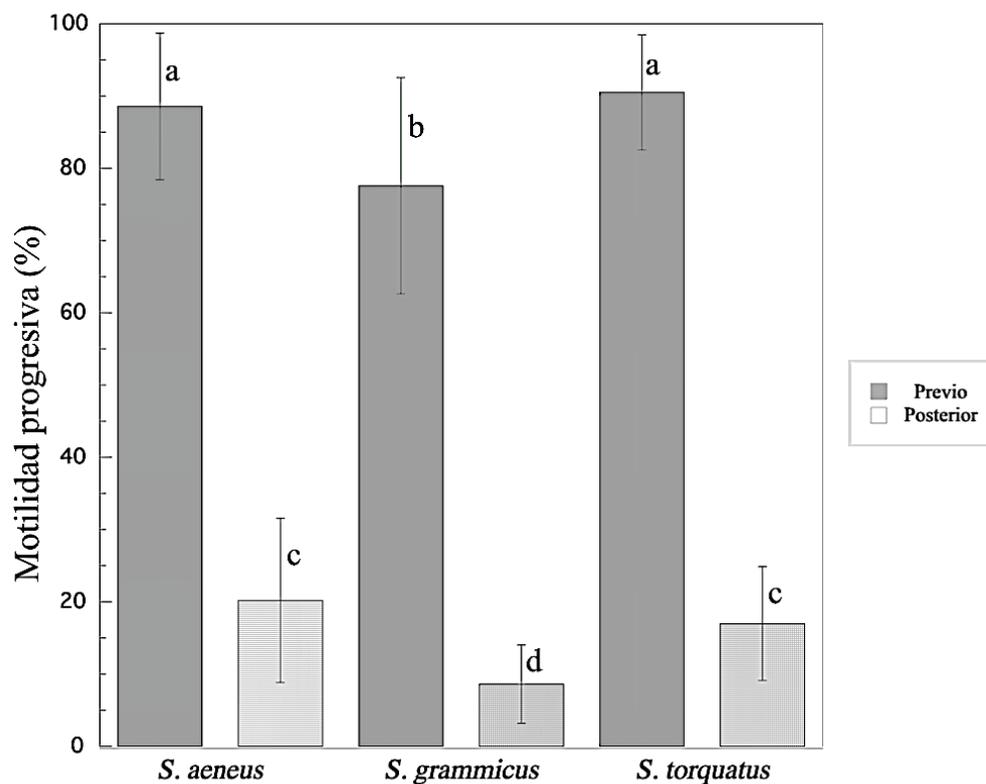


Figura 9. Cambios en la motilidad progresiva de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* previo y posterior al proceso de criopreservación. Las líneas representan la desviación estándar. Las diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) están señaladas con letras distintas.

e) Viabilidad espermática

Los individuos de *S. torquatus* difirieron ( $H_{(2)} = 13.77$ ,  $p = <0.001$ ) con un mayor porcentaje de viabilidad en el semen fresco ( $88.8 \pm 6.10\%$ ), respecto a los individuos de *S. aeneus* ( $91.9 \pm 4.31\%$ ) y *S. grammicus* ( $79.3 \pm 13.3\%$ ); los cuales fueron similares estadísticamente ( $p < 0.05$ , Figura 10). La criopreservación indujo una disminución significativa en la viabilidad espermática de las tres especies: *S. aeneus* ( $t_{20} = 33.965$ ,  $p = 3.668 \times 10^{-19}$ ), *S. grammicus* ( $t_{19} = 18.968$ ,  $p = 4.161 \times 10^{-14}$ ) y *S. torquatus* ( $t_{20} = 19.312$ ,  $p = 1.043 \times 10^{-14}$ ). Al descongelado, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de las tres especies ( $H_{(2)} = 17.19$ ,  $p = 0.099$ ): *S. aeneus* ( $22.1 \pm 9.9\%$ ), *S. grammicus* ( $19.0 \pm 8.1\%$ ) y *S. torquatus* ( $27.2 \pm 13.2\%$ ) (Figura 10).

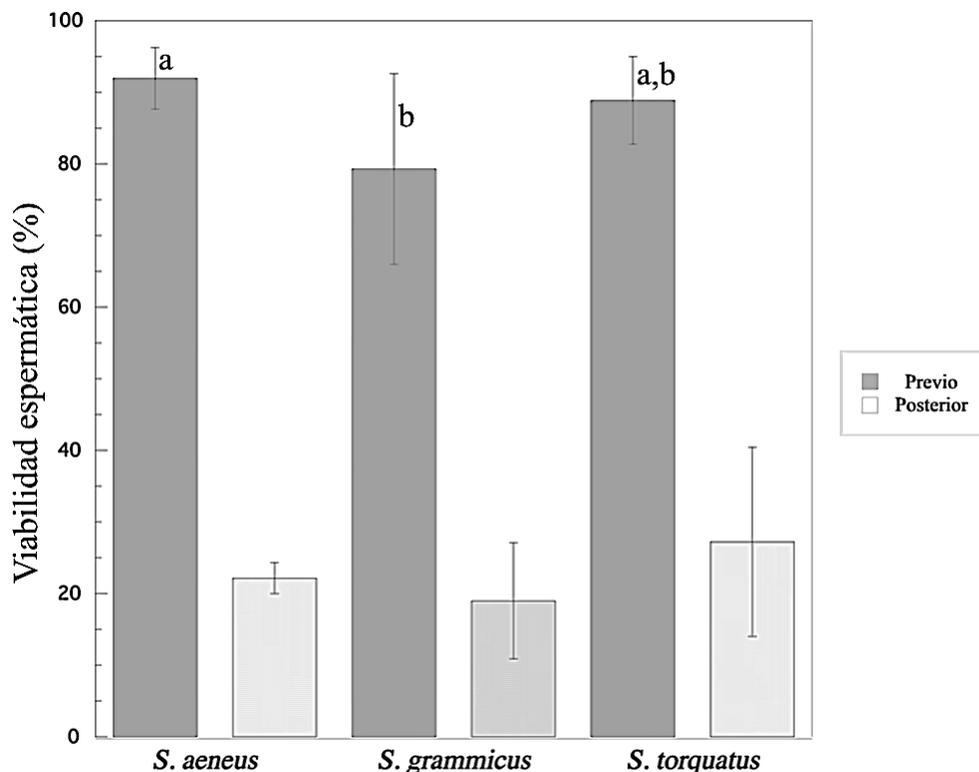


Figura 10. Cambios en la viabilidad de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* previo y posterior al proceso de criopreservación. Las líneas representan la desviación estándar. Las diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) están señaladas con letras distintas.

f) Integridad de la membrana plasmática

El valor promedio más alto para esta evaluación lo presentó *S. torquatus* ( $88.2 \pm 7.2\%$ ), el cual fue distinto estadísticamente ( $F_{(2,61)} = 8.305$ ,  $p = <0.001$ ), respecto a *S. aeneus* ( $78.8 \pm 12.9\%$ ) y *S. grammicus* ( $73.4 \pm 17.5\%$ ) ( $p < 0.05$ , Figura 11). Además, se encontraron diferencias significativas por el proceso de criopreservación en las tres especies: *Sceloporus aeneus* ( $t_{20} = 15.791$ ,  $p = 4.647 \times 10^{-13}$ ), *S. grammicus* ( $t_{19} = 15.229$ ,  $p = 2.108 \times 10^{-12}$ ) y *S. torquatus* ( $t_{20} = 15.928$ ,  $p = 3.960 \times 10^{-13}$ ). Luego del descongelado, los valores promedio de integridad de la membrana fueron: *S. aeneus* ( $24.4 \pm 10.1\%$ ), *S. grammicus* ( $15.1 \pm 10.7\%$ ) y *S. torquatus* ( $27.3 \pm 12.8\%$ ); sin embargo, sólo existió una diferencia significativa ( $H_{(2)} = 7.262$ ,  $p = 0.026$ ) entre *S. grammicus* y *S. torquatus* ( $p < 0.05$ , Figura 11).

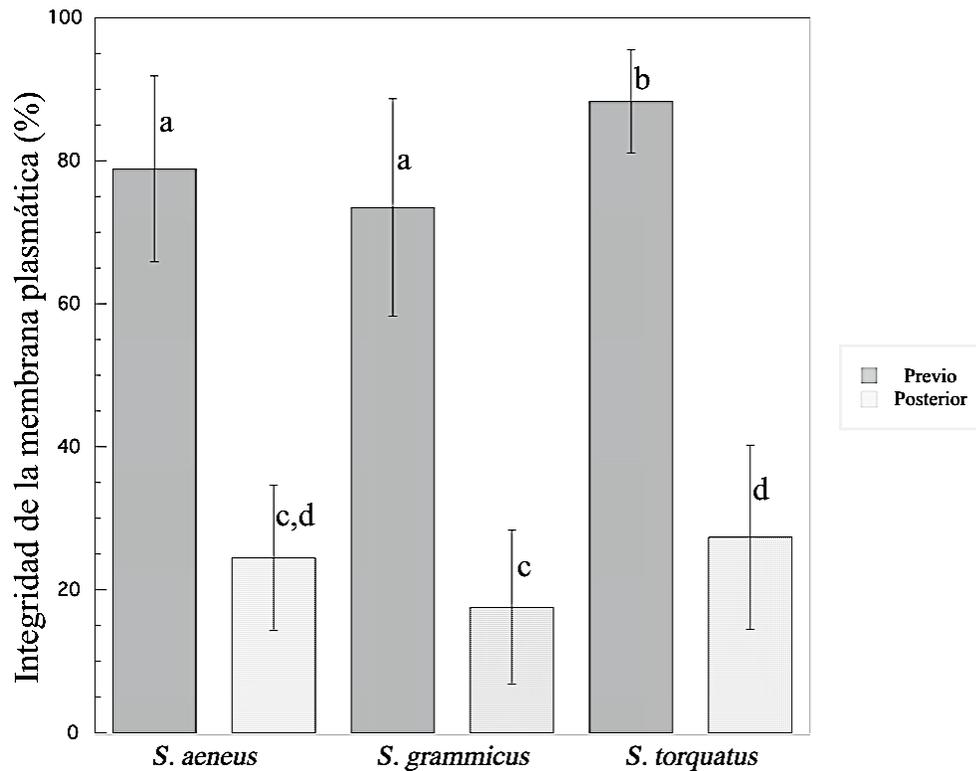


Figura 11. Cambios en la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* previo y posterior al proceso de criopreservación. Las líneas representan la desviación estándar. Las diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) están señaladas con letras distintas.

g) Morfología espermática

Se observó que las tres especies estudiadas presentaron elevados porcentajes de espermatozoides con morfología normal en el semen fresco: *S. aeneus* ( $92.1 \pm 7.6\%$ ) y *S. torquatus* ( $88.7 \pm 10.7\%$ ) fueron estadísticamente similares ( $F_{(2,61)} = 13.219$ ,  $p < 0.001$ ); *S. grammicus* ( $76.1 \pm 11.0\%$ ) significativamente menor ( $p < 0.05$ , Figura 12). Posterior al descongelado, se encontraron diferencias en las tres especies ( $F_{(2,61)} = 18.067$ ,  $p < 0.001$ ); siendo *S. torquatus* ( $69.2 \pm 10.7$ ) la que presentó el valor más alto, seguido de *S. aeneus* ( $60.6 \pm 11.3$ ) y finalmente *S. grammicus* ( $49.3 \pm 10.4$ ) ( $p < 0.05$ , Figura 12). Se encontraron diferencias significativas por el proceso de criopreservación en las tres especies: *S. aeneus* ( $t_{20} = 12.836$ ,  $p = 2.049 \times 10^{-11}$ ), *S. grammicus* ( $t_{19} = 10.674$ ,  $p = 9.110 \times 10^{-11}$ ) y *S. torquatus* ( $t_{20} = 8.682$ ,  $p = 1.610 \times 10^{-8}$ ).

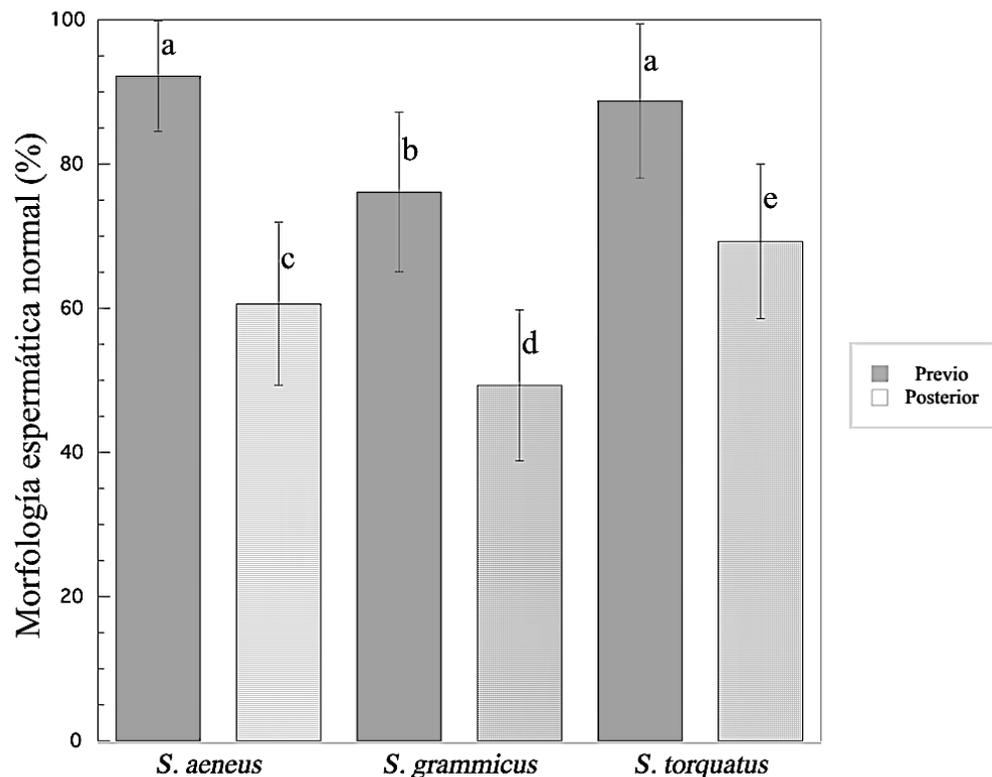


Figura 12. Cambios en la morfología de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* previo y posterior al proceso de criopreservación. Las líneas representan la desviación estándar. Las diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) están señaladas con letras distintas.

#### h) Integridad del acrosoma

En esta evaluación no existieron diferencias significativas en los valores del semen fresco: *S. aeneus* ( $90.3 \pm 4.0\%$ ), *S. grammicus* ( $88.1 \pm 7.8\%$ ) y *S. torquatus* ( $91.4 \pm 7.5\%$ ) ( $F_{(2,61)} = 1.451$ ,  $p = 0.243$ ). El proceso de congelación-descongelación indujo una disminución estadísticamente significativa en la integridad del acrosoma en las tres especies: *S. aeneus* ( $t_{20} = 9.734$ ,  $p = 4.970 \times 10^{-9}$ ), *S. grammicus* ( $t_{19} = 6.640$ ,  $p = 1.180 \times 10^{-6}$ ) y *S. torquatus* ( $p < 0.001$ ). Al descongelado, *S. torquatus* fue estadísticamente mayor ( $83.1 \pm 6.3\%$ ) ( $H_{(2)} = 19.549$ ,  $p < 0.01$ ) respecto a *S. aeneus* ( $74.5 \pm 6.5\%$ ) y *S. grammicus* ( $65.2 \pm 16.6\%$ ) ( $p < 0.05$ , Figura 13).

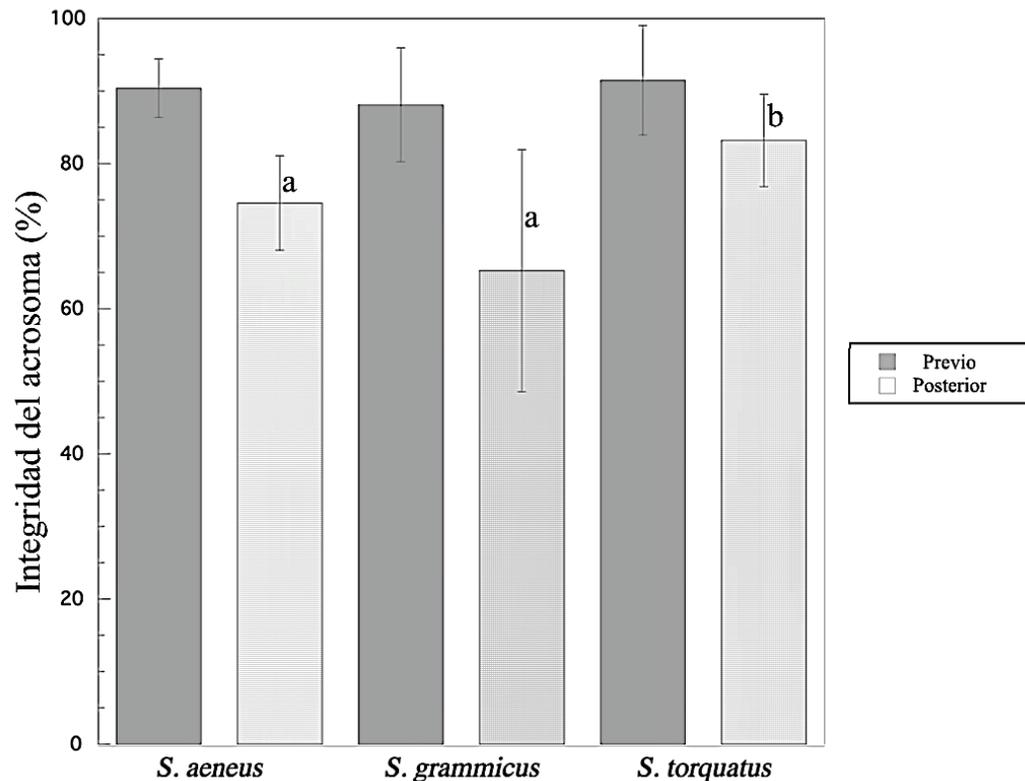


Figura 13. Cambios en la integridad del acrosoma de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* después del proceso de criopreservación. Las líneas representan la desviación estándar. Las diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) están señaladas con letras distintas.

i) Índices de congelabilidad

En el Cuadro 4 se presentan los índices de congelabilidad de las tres especies estudiadas para cada una de las distintas evaluaciones realizadas. Se encontraron diferencias significativas entre las especies para la motilidad progresiva ( $H_{(2)} = 13.71$ ,  $p = 0.001$ ), la morfología espermática ( $H_{(2)} = 7.88$ ,  $p = <0.001$ ) y la integridad del acrosoma ( $H_{(2)} = 15.26$ ,  $p = <0.001$ ). En el índice de crioresistencia, que relaciona todas las variables, se encontró que de las tres especies estudiadas, *S. torquatus* y *S. aeneus* presentan una mayor crioresistencia significativa respecto a *S. grammicus* ( $F_{(2,61)} = 8.840$ ,  $p = < 0.001$ ).

Cuadro 4. Índices de congelabilidad para las diferentes variables estudiadas en individuos del género *Sceloporus*.

Espece	Motilidad progresiva	Viabilidad espermática	Integridad de membrana	Morfología Espermática	Integridad del acrosoma	Índice de crio resistencia
<i>S. aeneus</i>	<b>22.93</b> ± 12.56 <sup>a</sup>	24.00 ± 10.46	31.63 ± 13.31	65.88 ± 12.53 <sup>a</sup>	82.64 ± 7.90 <sup>a</sup>	45.42 ± 7.75 <sup>a,b</sup>
<i>S. grammicus</i>	11.12 ± 6.45 <sup>b</sup>	24.37 ± 10.69	24.08 ± 14.00	65.21 ± 12.88 <sup>a</sup>	74.01 ± 17.08 <sup>a</sup>	39.75 ± 7.99 <sup>a</sup>
<i>S. torquatus</i>	18.80 ± 8.48 <sup>a</sup>	<b>30.79</b> ± 15.35	<b>31.82</b> ± 16.68	<b>78.45</b> ± 10.88 <sup>b</sup>	<b>91.31</b> ± 8.21 <sup>b</sup>	<b>50.23</b> ± 8.19 <sup>b</sup>

Se destacan en negritas los valores más altos para cada parámetro. Las diferencias significativas entre las medias de cada índice ( $p < 0.05$ ) están señaladas con letras distintas.

## Discusión

La situación desoladora en la que se encuentran las especies de lagartos en el mundo y las escasas e insuficientes acciones para mantener la diversidad vuelve ineludible el desarrollo de estrategias en beneficio de la conservación de estos organismos. La implementación de métodos de RA puede ser una buena alternativa de aplicación en la conservación al permitir que se perdure la diversidad genética de una gran cantidad de especies amenazadas. Tal es el caso de la criopreservación de gametos, donde pueden generarse bancos de germoplasma (Ananjeva et al., 2015; Clulow & Clulow, 2016). Inicialmente se deben utilizar como modelos las especies que no se encuentren en riesgo, trabajando con poblaciones que sean abundantes, de las cuales se conozcan los aspectos básicos de su fisiología reproductora y que el desarrollo de estos estudios no comprometa la vida de los organismos. Estos son los motivos por los cuales se seleccionaron especies del género *Sceloporus* para el desarrollo de este trabajo (Vitt & Caldwell, 2014).

### Método de obtención del semen y elección de los individuos

Existen diversos métodos por los cuales se ha logrado obtener gametos masculinos de distintas especies de saurios, aunque en algunos de ellos aplican la eutanasia para recuperar los espermatozoides del testículo, del epidídimo (*Lacerta vivipara*; Depeiges & Dacheux, 1985) o del conducto deferente (*Tupinambis merianae*; Young et al., 2017). La electroeyaculación a pesar de ser una técnica no destructiva, no es completamente efectiva para la emisión del semen, con una eficiencia de 77% hasta 94% (*Iguana iguana*; Zimmerman et al., 2013; *Tropidurus spinulosus*; López-Juri et al., 2018; *S. torquatus*; Martínez-Torres et al., 2019a) y, además, puede causar lesiones rectales e incidir en la calidad de la muestra (Zimmerman & Mitchell, 2017). Se ha obtenido semen a partir de masajes ventrales (*Hoplodactylus maculatus*; Todd, 2003; *Oligosoma macanni*; Molinia et al., 2010), que a pesar de no provocar dolor; no se permite la relajación de los individuos. Inducir el estado de relajación es importante, ya que el estrés provocado por el manejo puede interferir con la eyaculación y disminuir el volumen seminal emitido. Aunque se desconoce el impacto del estrés en los reptiles, esta situación está bien documentada en el caso de aves (Cheng et al., 2002). Además, debido a que la estructura donde desemboca el semen es común al sistema

digestivo y urinario, existe un posible riesgo de contaminación con uratos (Johnston *et al.*, 2014a). Recientemente, Martínez-Torres y colaboradores (2019b) desarrollaron un método sencillo, rápido y eficaz para la obtención de semen que no provoca daños en el macho: la opresión de la papila genital. Con una adecuada selección y relajación del macho, en este estudio, la efectividad utilizando este método fue del 100%.

La adecuada elección de los individuos es fundamental en el desarrollo de estos estudios, ya que diversos factores están relacionados con la obtención en cantidad y calidad de los gametos. El momento de captura es un factor importante a considerar, ya que en diversas especies de reptiles el periodo reproductivo está limitado a una época del año (Kawazu *et al.*, 2014). Existen una serie de características que permiten inferir cual es el momento más adecuado para la obtención de los gametos como la exhibición de coloraciones vistosas, el desarrollo de glándulas femorales, la presentación de posturas de cortejo (flexiones, agitación de la cabeza, movimientos de la cola como látigo e intentos de cópula), la agresión ante individuos del mismo sexo y, en el caso de algunos geckos, las vocalizaciones de cortejo (Pandav *et al.*, 2007).

Además, si el individuo ya ha copulado, el volumen obtenido es menor (Johnston, 2014a) y las posibilidades de obtención de las muestras se reducen mientras progresa la temporada (Depeiges & Dacheux, 1985). Debido a las razones previamente expuestas, los individuos fueron capturados previo al inicio de su actividad reproductiva. Particularmente, en el caso de *S. grammicus*, a pesar de ser una especie estacional, presenta cierta plasticidad, ya que existen poblaciones en localidades con distintas condiciones ambientales que presentan periodos reproductivos de mayor duración (mayo-noviembre) (Hernández-Salinas *et al.*, 2010). Esto se pudo constatar en este estudio, ya que se logró obtener muestras a lo largo del año a partir de individuos de esta misma especie, sin embargo, la calidad de las muestras suele ser variable en los distintos momentos (Silva *et al.*, 2015).

Otro factor a considerar es la edad de los individuos (Johnston, 2014a). En los mamíferos, los animales jóvenes, una vez alcanzada madurez sexual, son utilizados preferencialmente como donantes de semen ya que es conocido que presentan mayor volumen seminal y

concentración espermática (Ahmad et al., 2010). En las aves, se ha descrito que existe un mayor porcentaje de integridad del plasmalema en individuos maduros sexualmente (Long et al., 2010). En el caso de los reptiles, el peso y la talla suelen ser un mejor indicador de la madurez reproductiva que la edad, ya que el crecimiento y desarrollo están influenciados por el ambiente (Ball & Wade, 2013; Hall & Warner, 2017). Para el caso de las tres especies estudiadas, todos los individuos se encontraban en la talla mínima reportada para la madurez sexual: *S. aeneus* (mayor a 37 mm; Ramírez-Bautista, Lozano, et al., 2016a); *S. grammicus* (mayor a 42 mm; Hernández-Salinas et al., 2010) y *S. torquatus* (mayor a 74 mm; Vázquez, 2009), lo que se confirmó con la presencia de espermatozoides en el fluido seminal obtenido.

Aunado a ello, el estado nutricional de los organismos desempeña un papel fundamental en la sobrevivencia, pues influye directamente en el estado de salud. Estas condiciones son importantes pues están relacionadas con el éxito reproductivo ya que inciden directamente en la capacidad para producir gametos de buena calidad (Cheng *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2014a). Está documentado que, en el caso de lagartos, el almacenamiento de energía en forma de cuerpos grasos no está relacionado con el recrudescimiento testicular cuando hay aporte de alimento constante (Guillette & Casas-Andreu, 1981). Sin embargo, se ha demostrado que, posterior al período de apareamiento las secreciones del epidídimo disminuyen (Depeiges & Dacheux, 1985), posiblemente por la ausencia en el aporte de andrógenos. Todos los organismos que fueron empleados para este estudio mostraron una buena condición corporal y buen estado de salud aparente, ya que se consiguió la emisión de semen de calidad en todos los machos para el desarrollo de esta investigación.

#### Características del semen fresco

El aspecto del semen en las tres especies del presente estudio fue blanco, espeso; situación común a la apariencia reportada en distintas especies de reptiles como el cocodrilo de agua salada *Crocodylus porosus* (Johnston *et al.*, 2014a) y en distintos lagartos de la familia Phrynosomatidae (Martínez- Torres *et al.*, 2019b). Por las bondades del método de obtención, el semen se recuperó sin contaminantes (uratos, heces o eritrocitos). Los eyaculados se pudieron inducir en algunas ocasiones desde el primer intento y hasta luego de 5 opresiones, similar a lo reportado en individuos del mismo género (Martínez- Torres *et al.*,

2019b). El volumen promedio obtenido en este estudio para *S. torquatus* fue mayor al reportado por Martínez-Torres *et al.* (2019a) mediante la obtención por el método de electroeyaculación. Esta misma situación se observó en la misma especie, así como en *S. aeneus* y *S. grammicus* mediante la opresión de la papila genital (Martínez-Torres *et al.*, 2019b), posiblemente debido a que, en esta investigación, capturamos a los individuos previo al encuentro con las hembras. En el caso de *Iguana iguana*, se pudieron obtener hasta 50  $\mu$ l, lo cual puede explicarse por la diferencia de tamaño de esta especie (Zimmerman *et al.*, 2013). Sin embargo, la prueba de correlación de Pearson únicamente mostró relación del volumen con el peso para *S. grammicus* y *S. torquatus*, más no para la talla de los organismos.

Se ha planteado que en los reptiles, el volumen del eyaculado es reducido respecto a otros grupos de vertebrados (desde 70  $\mu$ l en serpientes; Zacariotti *et al.*, 2007; 260  $\mu$ l en tortugas; Zimmerman y Mitchell, 2017; hasta 1.5 ml en el caso de cocodrilos; Johnston *et al.*, 2014a). Posiblemente esto se deba a la fisiología de los organismos, pues el tracto reproductor de este grupo tiene menor cantidad de glándulas sexuales accesorias, respecto de otros clados; los saurios en particular presentan el segmento sexual y el ampulla en la parte final del conducto deferente por lo que pudiera no ser necesaria una gran cantidad de plasma seminal, o que las especies compensen esta situación con una concentración alta de espermatozoides (Gist *et al.*, 2000). Sin embargo, al respecto no existen estudios que contemplen el tamaño del individuo, el momento y el método de obtención que permitan aclarar dicho planteamiento.

Por otro lado, en algunos mamíferos se ha observado que la relación entre el peso del organismo y la concentración espermática puede ser inversa, como en el caso del guepardo (*Acinonyx jubatus*; 40 kg y  $40 \times 10^6$ /ml; Wildt & Roth, 1997), en comparación el hurón de patas negras (*Mustela nigripes*; 0.8 kg y  $25 \times 10^6$ /ml; Howard *et al.*, 1991), situación que pudo observarse únicamente para el caso de *S. grammicus*. En otros casos se percibe una diferencia entre especies silvestres y domesticadas donde se puede destacar el caso de aves como el cernícalo americano (*Falco sparverius*;  $0.03 \times 10^6$ /ml) respecto al pavo común (*Meleagris gallopavo*; 8 a  $12 \times 10^9$ /ml) (Comizzoli *et al.*, 2012) o en el gallo doméstico (*Gallus domesticus*;  $6806.4 \times 10^6$ /ml) y la gallina de Guinea (*Numida meleagris*;  $2408.33 \times$

10<sup>6</sup>/ml) (García-Herreros, 2016), debida posiblemente a la selección genética y el manejo reproductivo que se efectúa con los machos de especies domesticadas.

En reptiles, además, la concentración espermática es muy variable, pues en tortugas se ha reportado de 101.62 x 10<sup>6</sup>/ml (*Stigmochelys pardalis*; Zimmerman y Mitchell, 2017), en serpientes de 852 x 10<sup>6</sup>/ml (*Elaphe guttata*; Mattson *et al.*, 2007) y de hasta 3400 x 10<sup>6</sup>/ml en cocodrilos (*Crocodylus porosus*; Johnston *et al.*, 2014a). La concentración en saurios es mucho menor respecto al resto de los reptiles, independientemente del tamaño de los organismos: de gran tamaño, 269.0 ± 311.64 x 10<sup>6</sup>/ml (*Iguana iguana*, Zimmerman *et al.*, 2013) y de menor tamaño, desde 34.8 ± 13.4 hasta 347.3 ± 123.2 x 10<sup>6</sup>/ml (Martínez-Torres *et al.*, 2019b), situación similar a las del presente estudio. Esto nos permite suponer que en este clado dicha concentración puede ser suficiente para lograr la fecundación. Mattson y colaboradores (2007) por sus estudios de inseminación en serpientes (*Elaphe guttata*) indican que en una muestra fértil, la concentración debe ser mayor a 3 x 10<sup>6</sup>/ml. Es necesario efectuar estudios en este sentido para establecer si este parámetro se puede aplicar a otros grupos de reptiles.

#### Evaluación del daño asociado al proceso de congelación-descongelación

Los procesos de congelación-descongelación deben preservar la calidad espermática para las manipulaciones reproductivas; por lo tanto, debe realizarse una evaluación con pruebas funcionales que permitan estimar el potencial de fertilidad (Brito *et al.*, 2017). En este sentido, los trabajos previos en distintos reptiles, no realizan un análisis integral mediante pruebas que permitan estimar este potencial, como en el caso de algunos mamíferos o aves (Silva & Gadella, 2006) mismo que pueda ser empleado como referencia ante los distintos tratamientos a los que se someten los espermatozoides, pues solo se centran en la evaluación de la motilidad o viabilidad (Johnston *et al.*, 2014b; Young *et al.*, 2017), situación que se propone en este trabajo, mediante distintas pruebas adaptadas del trabajo rutinario en algunas especies domesticadas (Contreras-Mendez & Medrano, 2016; Alcántar-Rodríguez & Medrano, 2017).

La criopreservación y evaluación de espermatozoides de reptiles se ha realizado mediante la combinación del semen de múltiples machos de la misma especie (*Crocodylus porosus*, Johnston *et al.*, 2014b; *Tupinambis merianae*, Young *et al.*, 2017). Dada la variación potencial individual y la asociada con el semen agrupado, a menudo se evalúa en el caso de algunas aves cada macho individualmente para conocer el potencial reproductivo (*Spheniscus magellanicus*, O'Brien *et al.*, 2016; *Gallus gallus domesticus*, Long, 2006), ya que el examen individual incrementa el poder de la evaluación y es una herramienta potencialmente importante para seleccionar donantes de semen (Holsberger *et al.*, 1998). En vista de lo anterior, se realizó la evaluación individual de los machos de las tres especies utilizadas en este estudio, tanto previo como posterior al tratamiento criogénico.

a) Motilidad progresiva

Los espermatozoides de distintas especies de lagartijas han mostrado porcentajes altos de motilidad mayores a 75% en especies como *Iguana iguana* (Zimmerman *et al.*, 2013), *Tropidurus spinulosus* (López-Juri *et al.*, 2018) y cinco especies de la familia Phrynosomatidae (Martínez-Torres *et al.*, 2019b), independientemente del método de obtención. Posiblemente en este estudio, el momento de separación de los individuos y de obtención (al comienzo de la época de cortejo), nos permitió obtener mayores valores de motilidad del semen fresco como mostraron Depeiges & Dacheux (1985) en *Lacerta vivipara*. Cabe destacar que algunos ejemplares de *S. grammicus*, fuera de su temporada reproductiva, presentaron porcentajes bajos de motilidad (menores a 40%) y abundantes anomalías morfológicas (hasta 80%), motivo por el cual esas muestras fueron descartadas.

El mantenimiento de la motilidad en diversas especies de reptiles se ha permitido mediante el empleo de medios isotónicos (Clulow y Clulow, 2016), como en la tortuga leopardo *Stigmochelys pardalis* (Zimmerman y Mitchell, 2017) y la serpiente *Elaphe guttata* durante 24-72 horas (hasta 40%; Fahrig *et al.*, 2007), incluso en temperaturas entre 0 a 4 °C. En *Iguana iguana*, luego de 24 horas en refrigeración, la motilidad fue de 60% y a las 48 horas de 33% (Zimmerman *et al.*, 2013). En el scincido de McCann se observó un 70% de motilidad luego de cinco días en un medio modificado con yema de huevo (*Oligosoma*

*maccanni*; Molina *et al.*, 2010). Los ensayos preliminares practicados con el diluyente de Tris con yema de huevo nos permitieron observar motilidad hasta 96 horas a 4 °C, situación que se ha documentado en el caso de *Elaphe guttata*, donde se logró la fertilización mediante inseminación (Mattson *et al.*, 2007). Esto nos permite pensar que la mayor afectación, ocurre a temperaturas inferiores a las de refrigeración.

Además, se ha estudiado que luego del proceso de criopreservación, el porcentaje de motilidad se ve afectado. En el caso de aves, los espermatozoides retienen menos del 2% de la capacidad de fertilizar, principalmente a causa de la disminución de la motilidad (Long, 2006). Esta es una función clave de los gametos para migrar y superar las barreras anatómico-fisiológicas del tracto reproductor femenino (Campos *et al.*, 2017) y en los reptiles no es la excepción (Clulow y Clulow, 2016), por lo cual se debe procurar su preservación en el establecimiento de estas técnicas. En el tegu argentino, el glicerol al 8% mostró la mejor respuesta de motilidad al descongelar a 37 °C, respecto a otras concentraciones con el mismo crioprotector (12 o 16%) (Young *et al.*, 2017). Se ha documentado esta propiedad benéfica del glicerol, respecto a otros crioprotectores (Mocé *et al.*, 2010; Hezavehei *et al.*, 2018), incluso frente al DMSO (Purdy *et al.*, 2009). Las diferencias encontradas en motilidad con nuestro método pueden deberse a que la evaluación al descongelado se realizó a 29 °C; temperatura que fue seleccionada a partir de la evidencia que a más de 32 °C, la motilidad de los espermatozoides de aves (Cheng *et al.*, 2002) y algunos reptiles se ve afectada (Johnston *et al.*, 2014b), tal como observamos incubando espermatozoides del semen fresco a temperaturas mayores a 30 °C con la consecuente pérdida de motilidad.

Es posible que el empleo de algunos aditivos como la cafeína pueda ayudar a promover la motilidad espermática. En algunos trabajos con *Lacerta vivipara* se encontró que luego de la adición 6.0 mM de este inhibidor de la fosfodiesterasa A en espermatozoides del epidídimo, aumenta la velocidad por una vía dependiente del AMP cíclico (Depeiges & Dacheaux, 1985), así como en espermatozoides criopreservados, luego de 10 minutos de su adición (10 mM), estimula la motilidad hasta un 48% (*Varanus panoptes*; Campbell *et al.*, 2018). Sin embargo, antes de pensar en el uso de aditivos, se deben atender las causas del descenso de esta característica y la principal causa de esto puede ser la baja sobrevivencia espermática.

## b) Viabilidad espermática

La viabilidad es un indicador claro de la proporción de espermatozoides vivos (Moskovtsev & Librach, 2013). Esta propiedad presentó valores mayores a 70%, similar a lo reportado por Martínez-Torres y colaboradores (2019b) en el caso del semen fresco para las tres especies de estudio. Sin embargo, los valores disminuyeron posterior al descongelado, característica que se ha asociado típicamente con una menor retención de la motilidad (menor de 60%), luego de la criopreservación (Bagchi et al., 2008). La velocidad de enfriamiento se ha relacionado con los porcentajes de viabilidad en espermatozoides de grúa y pavo. Cuando estos se congelaron a velocidad moderada (5 °C/min) o lenta (1 °C/min) se obtiene, independientemente de la concentración del crioprotector, un número mayor de gametos viables (> 24%). Esta característica también se relacionó con un alto porcentaje de fertilidad con semen descongelado (57.5%) y fresco (71.4%) para estas especies (Blanco et al., 2012).

En el caso del tegú argentino, se encontró que el medio con glicerol (16%, v/v) mantuvo mayor proporción de espermatozoides viables respecto a otras concentraciones (8 y 12%) a una velocidad moderada a lenta (0.3 °C/min) (Young *et al.*, 2017). La tasa de congelación difiere de este estudio, pues en la presente investigación la velocidad de enfriamiento podría considerarse como lenta (0.1 °C/min); sin embargo, se debe realizar un mayor esfuerzo en la optimización de la rampa de enfriamiento y en el tiempo de equilibrado con el crioprotector, ya que en ello puede residir el efecto negativo para la viabilidad (Santiago-Moreno & Galarza, 2019). Es decir, que si es demasiado lenta, se pueden estar acentuando los efectos de la deshidratación en los espermatozoides de los saurios.

La mayoría de las evaluaciones de la vitalidad de los espermatozoides se basan en la capacidad de la membrana celular para evitar que los colorantes vitales ingresen en los espermatozoides. Se sabe que algunos espermatozoides vivos, pueden tener una membrana no funcional (Moskovtsev & Librach, 2012); por ello, las tinciones empleadas tienen limitaciones por lo que esta característica se evalúa mediante otra prueba, que a continuación se discute.

### c) Integridad de la membrana plasmática

Los espermatozoides de las especies involucradas en el presente estudio, muy similar a la viabilidad espermática, mostraron valores promedio elevados en el semen fresco. Al descongelado, la afectación en la membrana plasmática es muy evidente por el proceso de criopreservación. Como se ha comentado previamente, en este estudio se evalúa la integridad del plasmalema dadas las funciones en que está involucrado este organito. El mantener intacta esta estructura es esencial para las funciones metabólicas, la capacitación espermática, la interacción con las células oviductales, la unión a la zona pelúcida, la reacción del acrosoma y la fusión con el oolema (Campos *et al.*, 2017). Las sondas fluorescentes pueden interactuar con la membrana y quedar atrapadas en la célula si la membrana está intacta, mientras que estas se escapan fácilmente de las células deterioradas con membranas dañadas. Por ello, la utilización de la prueba con SyBR14-PI resulta más adecuada para evaluar la capacidad funcional de la membrana plasmática (Silva & Gadella, 2006) y a su vez de la vitalidad; sin embargo, esta debe evaluarse en los primeros minutos de efectuada la reacción.

En un estudio Moce y colaboradores (2010) encontraron que el DMA fue más perjudicial respecto al glicerol para la integridad de la membrana plasmática en la criopreservación de espermatozoides aviares. Sin embargo, Johnston y colaboradores (2014b) describieron que las alteraciones en la membrana plasmática de los espermatozoides del cocodrilo *Crocodylus porosus* aparecen por el choque frío, más no por el tipo y la concentración de crioprotector. Cuando ellos emplearon una mayor cantidad de crioprotector, el efecto fue benéfico para esta propiedad, mientras que para la motilidad es perjudicial. Por esta razón, el incrementar la concentración de estos agentes, no puede ser la única estrategia para mejorar la respuesta al procedimiento. Además, con la separación del crioprotector al descongelado, se puede observar un menor daño en esta característica. Esta razón nos lleva a considerar que el efecto lesivo en este estudio puede deberse a la exposición prolongada al glicerol (Hammerstedt & Graham 1992) ya que, para reducir su efecto tóxico, únicamente se diluyó a razón 1: 2. Las diluciones graduales seguidas de centrifugación han mostrado mejores resultados en espermatozoides de gallo (Purdy *et al.*, 2009); sin embargo, se requiere evaluar distintas condiciones para asegurar que el daño en los espermatozoides de lagartija, no se produzca por el proceso de separación del crioprotector.

De igual manera, las diferencias en la capacidad de responder osmóticamente se relacionan con la forma espermática y con la composición de la membrana plasmática. La composición de la membrana de los espermatozoides de reptil aún no ha sido descrita, por lo que se desconoce el grado de fluidez que pudieran presentar para hacer frente a las transiciones de fase inducidas por los cambios de temperatura y, por consiguiente, cómo puede ser afectada (Yeste, 2016). Los crioprotectores pueden alterar la composición membranal así como citoplasmática y modificar los procesos de transporte de iones y transducción de señales (Hammerstedt & Graham 1992). Por ello, es necesario incluir una prueba de función de la membrana o del estado de fluidez para determinar el grado en que estos procesos afectan al espermatozoide de lagarto (Steckler et al., 2015).

Además, las recientes evidencias de cambios moleculares que ocurren en la membrana de espermatozoides del cocodrilo *Crocodylus porosus*, similar a lo que ocurre durante la capacitación espermática en los mamíferos (Nixon et al., 2017) y el periodo de permanencia en el oviducto de los reptiles, previo al encuentro con el ovocito (Zhang *et al.*, 2015), reportado en algunas especies como el saurio vivíparo *S. torquatus* (Martínez-Torres, 2009), nos permite sugerir la inclusión de una evaluación para determinar si el proceso de criopreservación puede ocasionar una capacitación inducida, situación que repercutiría en su capacidad fecundante (Yeste, 2016).

#### d) Morfología espermática

A lo largo de la evaluación, la principal anomalía observada en el semen fresco fue la presencia de la gota citoplasmática unida a la pieza media de los espermatozoides, fenómeno que es altamente variable en el caso de la tortuga *Chrysemys picta* (Gist *et al.*, 1992). A pesar de que en los mamíferos se considera que la gota citoplasmática es un indicador de inmadurez, Zhang y colaboradores (2015) sugieren que en las tortugas pueden ser una fuente de energía endógena para los espermatozoides epididimarios y desaparecer a nivel del oviducto. Recientemente, se ha reportado que la gota citoplasmática puede presentarse de manera fisiológica, tener importancia funcional al estar involucrada en la hiperactivación, la

capacitación y la reacción acrosomal, pero cuando se encuentra en exceso, puede producir grandes cantidades de ROS (Gatimel et al., 2017).

En el cocodrilo *Crocodylus porosus* se ha reportado la presencia de otras anomalías como espermatozoides sin flagelo, macrocefálicos por problemas meióticos (Johnston *et al.*, 2014a) y con colas enrolladas; esto último debido al estrés osmótico (Johnston *et al.*, 2014b). En el caso del gecko *Hoplodactylus maculatus* se ha reportado la presencia de espermatozoides microcefálicos, posiblemente a causa de su degradación en el tracto masculino. Estos se consideran no fértiles y nadan en círculos apretados (Todd, 2003). La cantidad de estas formas anormales fueron muy reducidas en el semen fresco, particularmente en *S. aeneus* y *S. torquatus*, posiblemente esto se deba a la evidente estacionalidad de sus ciclos reproductores. En cambio, la lagartija de mezquite (*S. grammicus*) mostró una mayor incidencia de anomalías. Esta observación debida probablemente a que esta especie presentó un alargamiento del periodo de apareamiento (de al menos 6 meses), como han reportado en otras poblaciones de la misma especie (Hernández- Salinas *et al.*, 2010). Esta situación podría promover alteraciones en el líquido seminal y en los espermatozoides, relacionados con el envejecimiento, la degradación o la reabsorción celular (Lee, 2018).

El proceso de congelación-descongelación por sí mismo puede originar una serie de cambios morfológicos irreversibles en las estructuras del espermatozoide (Long, 2006). Dentro de los que encontramos en este estudio, se observó 1) hinchazón, posiblemente debida a cambios osmóticos ante una exposición prolongada al crioprotector (Hammerstedt & Graham., 1992; Ozkavukcu et al., 2008); 2) espermatozoides sin flagelo y 3) gotas citoplasmáticas, en menor proporción, ambas debido presumiblemente a los daños mecánicos asociados al proceso. Además, como consecuencia del proceso, puede ocurrir la destrucción de otros orgánulos como las mitocondrias que a su vez pueden provocar una falla en la producción de energía para el movimiento, contribuir al daño por producción de EROs y dañar la integridad del ADN, lo cual resulta perjudicial para el desarrollo posterior del embrión (Silva & Gadella, 2006; Hezavehei *et al.*, 2018). Esto podría explicar la disminución de la viabilidad y motilidad. Los estudios de ultraestructura de los gametos criopreservados podrían ayudar a elucidar cuales de estas estructuras están siendo afectadas.

#### e) Integridad del acrosoma

Del mismo modo, otra de las consecuencias adicionales del método de criopreservación, son las alteraciones de la región apical de la cabeza mediante la formación de poros, la pérdida del contenido acrosómico y la aparición de vesículas en esta estructura (Ozkavukcu, *et al.*, 2008). En esta investigación, se encontraron valores altos de integridad del acrosoma de las muestras frescas y una menor afectación a la criopreservación respecto las demás evaluaciones, incluso en comparación a lo reportado por Young y colaboradores (2018) en el tegu argentino empleando la misma concentración de glicerol. La integridad del acrosoma no fue afectada de manera importante por el tipo, la concentración del agente crioprotector, la velocidad de enfriado posiblemente debido a la propiedad protectora de la yema de huevo a la membrana acrosomal (Swelum *et al.*, 2018). A pesar de que se conocen algunas características morfológicas y ultraestructurales del acrosoma, se desconoce la forma en que este interactúa con el ovocito. Es claro que debe permanecer intacto durante el tránsito por el tracto reproductor para lograr la interacción y unión con el gameto femenino (Lin *et al.*, 2007).

#### Consideraciones finales

No todas las especies e individuos presentan la misma resistencia a los procedimientos de congelación-descongelación. Existe una variación en los porcentajes de las pruebas de calidad que pueden ayudarnos a seleccionar individuos "buenos" o "malos" congeladores, analizando y relacionando las características del semen fresco y del descongelado (Yeste, 2016). En este estudio a partir de las distintas evaluaciones encontramos que *S. torquatus* y *S. aeneus* tienen una resistencia superior al congelado, respecto a *S. grammicus*, donde se encontraron muestras de menor calidad seminal, lo cual contribuyó directamente en la respuesta al descongelado.

La interacción de algunas especies con los entornos urbanos ha alterado el crecimiento y reproducción de los individuos (Hall & Warner, 2018), esta podría ser la causa de tal diferencia en esta población de *S. grammicus*. Además, esta situación abre la posibilidad de que pueda ser utilizado para la investigación de los factores ambientales que pudieran influir en la producción de gametos, en la calidad de los mismos y en la respuesta al congelado con

modelos de alta y baja crioresistencia. Por otro lado, es necesario analizar la composición del plasma seminal, ya que puede ser una de las causas de estas variaciones (Santiago-Moreno et al., 2019). Además, esto permitiría modificar la composición de los medios de congelación o determinar si su presencia afecta, como se ha observado en algunas especies domesticadas (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

La criopreservación mediante este método permitió la sobrevivencia de los espermatozoides de las tres especies estudiadas. Sin embargo, se requiere mejorar algunas características como la motilidad y viabilidad espermática. A partir de estos resultados, se debe dar un seguimiento al proceso, que permita el progreso de esta área tanto para otras especies de saurios como de otros reptiles y así lograr optimizar la composición del diluyente y la elección del crioprotector. Como se ha mencionado previamente, el glicerol ha sido menos tóxico y eficaz respecto a otros ACPs ya que preserva la motilidad, la integridad de la membrana, del segmento apical, la mitocondria y del acrosoma (Woolley & Richardson, 1978; Blesbois et al., 2007; Mocé et al., 2010). Sin embargo, deben realizarse estudios con otros crioprotectores como el DMSO que se ha empleado en el tegu blanco (Young et al., 2017), o como la DMA o DMF, que actualmente se emplean en la investigación con aves (Thélie et al., 2019; Shanmugam & Mahapatra, 2019). Además, se deben evaluar distintos protocolos para el enfriamiento y considerar el empleo de aditivos que mejoren la respuesta al procedimiento, así como de otros métodos para la separación del glicerol, sobre todo si se desea aplicar para la reproducción asistida (Clulow & Clulow, 2016).

## Conclusiones

1. La opresión de la papila genital es un método eficiente para la obtención del semen de las especies estudiadas para el proceso de criopreservación.
2. La selección adecuada de los machos permite obtener muestras de buena calidad espermática para la congelación.
3. Existe únicamente una relación entre el peso con el volumen seminal para *S. aeneus* y *S. torquatus*, así como con la concentración espermática para *S. grammicus*.
4. *Sceloporus torquatus* y *S. aeneus* mostraron una mayor resistencia al congelado en las distintas evaluaciones, respecto a *S. grammicus*.
5. El medio de Tris-yema de huevo al 20 % adicionado con glicerol al 8% permite la criopreservación de espermatozoides de lagartijas del género *Sceloporus* con la mayor afectación en la motilidad y viabilidad espermática.

## **Perspectivas**

1. Evaluar distintas concentraciones de glicerol y el empleo de otros crioprotectores para mejorar la respuesta al proceso criogénico.
2. Implementar un método de separación del glicerol, debido a su toxicidad, sobre todo si se desea emplear para la inseminación.
3. Establecer técnicas adicionales para la evaluación del daño en otros orgánulos como la mitocondria y el núcleo que pueden ser afectados por el proceso de criopreservación.
4. Desarrollar pruebas para demostrar la funcionalidad del espermatozoide fresco y descongelado como la prueba de unión a la zona pelúcida y penetración de ovocitos homólogos o heterólogos.

## Anexos

### Anexo 1: Análisis seminal

El análisis del semen fresco y descongelado se realizó mediante la adaptación de pruebas de mamíferos desarrollada por Contreras-Mendez & Medrano (2016) y Alcántar-Rodríguez & Medrano (2017). Para garantizar el manejo adecuado y la correcta evaluación del semen de lagartijas del género *Sceloporus*, los análisis se realizaron a temperatura controlada de laboratorio entre 23 a 28 °C.

- A. Aspecto: En esta característica se consideró la consistencia típica del semen, el cual debía ser blanco, lechoso. La observación del color se consideró importante, ya que la muestra podía estar contaminada con la presencia de heces, uratos o eritrocitos, motivos por los cuales es recomendable descartar dicha muestra. Si fuera transparente o muy acuoso puede tratarse de otro tipo de secreción del aparato urinario o digestivo. Si este fuera demasiado espeso y grumoso podría tratarse de individuos con espermatozoides retenidos por un periodo largo de tiempo.
- B. Volumen: El volumen se midió mediante la recuperación con puntas de micropipetas graduadas cada  $\mu\text{l}$ , debido al poco volumen del eyaculado. Asimismo, se registró el número de emisiones de cada macho. Posteriormente, se realizó la dilución en el medio de Tris-Yema de huevo sin crioprotector. Para la evaluación del semen fresco se separaron 50  $\mu\text{l}$ . El volumen restante se destinó para el tratamiento experimental. Es recomendable realizar una homogeneización mediante dos a tres succiones con la punta de micropipeta previo a recuperar el volumen requerido para cada evaluación.
- C. Concentración espermática. A partir de los 50  $\mu\text{l}$  del semen diluido en el medio, se recuperaron 5  $\mu\text{l}$  para diluirlos en 495  $\mu\text{l}$  de una solución salina formolada al 3% (SSF; Dilución 1:100). Luego de la fijación, esta evaluación se podía realizar *a posteriori*.

Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de la dilución en SSF en cada uno de los espacios de la cámara de Neubauer. Luego de 5 minutos de reposo, se visualizaron y localizaron en el microscopio óptico con el

objetivo de 40X los cuadrantes que a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños. Se efectuó el conteo iniciando en los cuadrantes de los extremos y, finalmente, en el central. Para realizar el conteo se consideraron únicamente las cabezas que se encontraban dentro de dichos recuadros. Las cabezas localizadas dentro del margen inferior y lateral derecho se descartaron (Figura 14).

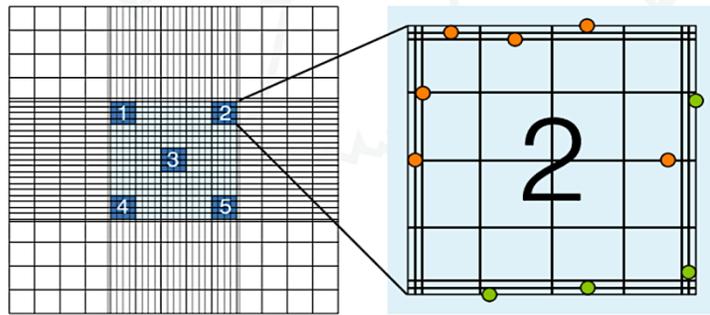


Figura 14. Localización de los recuadros para el conteo en la cámara de Neubauer.

Para calcular la concentración, se consideró el número de espermatozoides promedio contenido en ambas cámaras y se multiplicó por 5 para considerar los 25 cuadrantes, luego se multiplicó por el factor de la dilución realizada (se consideró que primero se realizó la dilución hasta 150  $\mu$ l y a partir de esta se efectuó una segunda dilución 1:100 en SSF). Finalmente se multiplicó por un factor de 10000 para alcanzar el volumen de 1.0 ml. El resultado se reportó como espermatozoides  $\times 10^6$ /ml.

Las siguientes evaluaciones, se realizaron en cada una de las muestras en fresco y posterior al descongelado.

- D. Motilidad progresiva. Se depositaron 5  $\mu$ l del semen diluido en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para observarse en el microscopio óptico al objetivo de 40X. Mediante un recorrido panorámico de los distintos campos, se registró el movimiento de los espermatozoides como grupo, considerando al menos 5 campos. Esta prueba se reportó en porcentaje mediante el cálculo de la proporción de los espermatozoides que presentaron movimiento con un avance progresivo y fueran capaces de desplazarse en el campo de observación.

E. Integridad de la membrana plasmática mediante la tinción de SyBR-14 en combinación con yoduro de propidio (PI). A 10  $\mu\text{l}$  de la muestra del semen diluido se le adicionaron 5  $\mu\text{l}$  del preparado de SyBR-14 (100nM) (dilución 1: 50, v/v en el mismo medio de dilución empleado). Posterior a 5 minutos de incubación se le agregó 1  $\mu\text{l}$  de PI (12  $\mu\text{M}$ ) e incubó durante 2 minutos adicionales (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit: Termofischer SCIENTIFIC). Finalmente se depositó 1  $\mu\text{l}$  de glutaraldehído al 0.4% a la solución y se montó en un portaobjetos 5  $\mu\text{l}$  del preparado y se le colocó un cubreobjetos. Esta técnica se observó en un microscopio de epifluorescencia con filtro verde (516-617 nm) en el objetivo de 100X en los primeros 5 minutos de su preparación. La interpretación se efectuó mediante un conteo de 200 espermatozoides. En aquellos que presentaron una coloración verde brillante se consideró íntegra su membrana plasmática, mientras que los que presentaron regiones o con la cabeza completamente teñida de color rojo brillante se consideraron con la membrana plasmática dañada. El resultado se expresó en porcentaje (Figura 15).

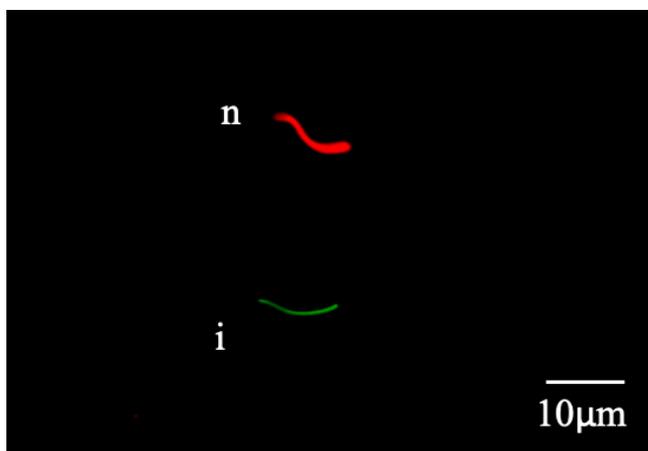


Figura 15. Evaluación de la integridad de la membrana mediante la tinción de SyBR 14-PI: espermatozoides con membrana íntegra (i) y no íntegra (n).

F. Viabilidad y morfología espermática. Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  del semen diluido en un portaobjetos junto a 10  $\mu\text{l}$  de Eosina-Nigrosina. Se homogeneizaron ambas gotas con la punta de micropipeta, se realizó un frotis y se dejó secar al aire. Las preparaciones se observaron en el microscopio óptico con el objetivo de 100X. Para la viabilidad se consideraron muertos los espermatozoides que permitieron el ingreso de la eosina y se encontraban con tonalidades rosadas o en alguna de las regiones del espermatozoide, mientras que los espermatozoides vivos no permitían el ingreso del colorante y se observaban en tonalidades blancas (Figura 16).

Se realizó el conteo de 200 células para determinar la proporción de espermatozoides viables. El resultado se expresó en porcentaje.

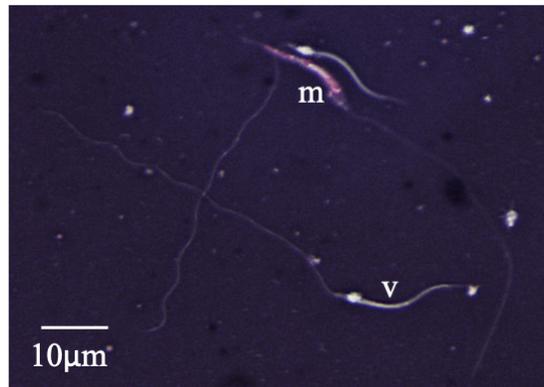


Figura 16. Evaluación de la viabilidad espermática (tinción con eosina y nigrosina): espermatozoide vivo (v) y muerto (m).

Asimismo, pudo determinarse la relación entre espermatozoides con morfología normal de aquellos que presentaron alguna anomalía. Se realizó el conteo de 200 células de las cuales se identificaron aquellos que presentaron anomalías en la cabeza, flagelo, gotas citoplasmáticas a distintos niveles, o que se encontraron hinchados o descabezados (Figura 17). El resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides normales.

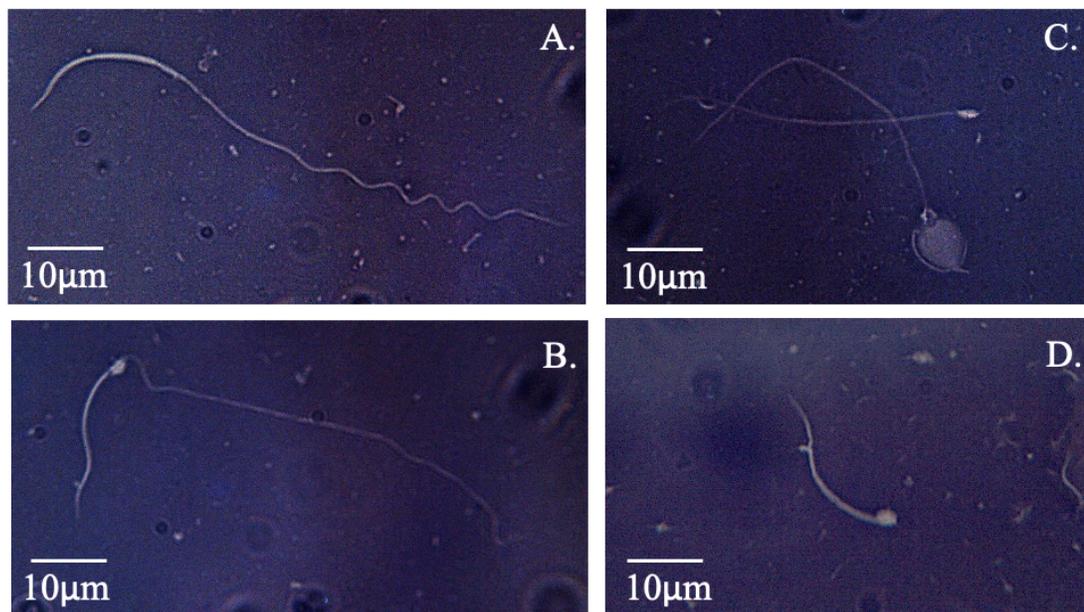


Figura 17. Evaluación de la morfología espermática (tinción con eosina y nigrosina): A. Espermatozoides con morfología normal, B. Espermatozoides con presencia de gota citoplasmática, C. Espermatozoides hinchados, con cabezas desprendidas, y D. Espermatozoides sin flagelo.

G. Integridad del acrosoma mediante la tinción con Lectinas fluorescentes de chícharo *Pisum sativum* acopladas a isotianato de fluoresceína FITC (FITC-PSA) y adicionadas con PI. Se realizó un frotis con 5  $\mu$ l de la muestra del semen diluido y se dejó secar al aire. Se fijó con etanol al 96% por inmersión durante un segundo. Una vez seco, se colocaron y extendieron 30  $\mu$ l de la preparación de FITC-PSA (100  $\mu$ g/ml en agua mili-Q; 0770, Sigma, St. Louis MO, EE. UU.). Se incubó durante 7 minutos en cámara húmeda. Posterior a ello, se adicionaron 3  $\mu$ l de PI (12  $\mu$ M) durante 3 minutos adicionales. Finalmente se agregó 1 gota de DABCO (220 mM en glicerol, D-2522, Sigma, St. Louis MO, EE. UU.) para extender el tiempo de fluorescencia y se colocó un cubreobjetos. Esta tinción se observó en un microscopio de epifluorescencia con filtro violeta (475-490 nm) con el objetivo de 100X. La evaluación se efectuó realizando un conteo de 200 espermatozoides. Los espermatozoides que presentaron el acrosoma intacto (punta de coloración verde brillante anterior al núcleo de color rojizo) se distinguieron de aquellos que carecían de acrosoma (Figura 18). El resultado de espermatozoides con el acrosoma intacto se expresó en porcentaje.

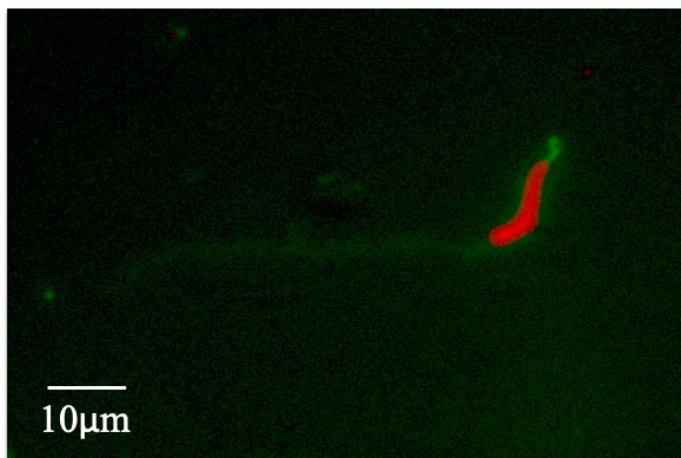


Figura 18. Evaluación de integridad del acrosoma con lectinas fluorescentes-PI

Anexo 2. Evaluación de las características seminales de *S. aeneus*

Cuadro 5. Evaluación de las características seminales de *S. aeneus* previo (Pre) y posterior (Post) a la criopreservación

ID	Motilidad progresiva (%)		Viabilidad espermática (%)		Integridad de la membrana (%)		Morfología espermática (%)		Integridad del acrosoma (%)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
SA01	85	14	93	23	73	25	98	66	92	77
SA02	90	32	97	30	67	42	97	58	94	79
SA03	85	11	96	21	46	14	100	57	94	76
SA04	95	11	95	8	60	17	93	66	89	83
SA05	60	11	85	12	69	19	98	69	84	70
SA06	60	17	85	14	91	15	91	72	88	71
SA07	90	13	88	17	68	12	98	62	84	72
SA08	90	15	97	28	93	22	97	55	87	59
SA09	95	21	88	23	93	20	92	61	87	80
SA10	90	26	93	32	67	33	99	69	90	80
SA11	95	21	93	32	83	29	89	59	89	83
SA12	95	6	93	7	92	13	87	54	86	81
SA13	90	5	94	9	77	16	93	37	96	70
SA14	95	8	85	12	94	15	76	28	86	71
SA15	95	15	91	13	75	20	100	76	95	74
SA16	95	31	85	35	77	28	98	61	94	63
SA17	85	43	95	39	85	37	85	72	96	79
SA18	95	35	92	24	78	35	97	63	97	74
SA19	95	27	98	26	89	48	87	72	90	72
SA20	90	19	96	38	92	25	72	62	90	69
SA21	90	43	95	22	90	29	90	56	90	83
<b>Promedio</b>	<b>88.57</b>	<b>20.22</b>	<b>91.95</b>	<b>22.17</b>	<b>78.88</b>	<b>24.48</b>	<b>92.19</b>	<b>60.63</b>	<b>90.38</b>	<b>74.57</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>10.14</b>	<b>11.36</b>	<b>4.31</b>	<b>9.90</b>	<b>12.98</b>	<b>10.15</b>	<b>7.66</b>	<b>11.32</b>	<b>4.02</b>	<b>6.50</b>

Anexo 3. Evaluación de las características seminales de *S. grammicus*

Cuadro 6. Evaluación de las características seminales de *S. grammicus* previo (Pre) y posterior (Post) a la criopreservación

ID	Motilidad progresiva (%)		Viabilidad espermática (%)		Integridad de la membrana (%)		Morfología espermática (%)		Integridad del acrosoma (%)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
SG01	95	16	95	27	90	25	91	60	99	87
SG02	95	7	89	31	98	13	98	61	97	83
SG03	95	13	86	27	91	31	65	39	97	87
SG04	90	2	74	6	84	5	83	48	80	49
SG05	85	6	82	18	83	7	70	42	94	85
SG06	75	18	78	11	84	19	93	64	84	77
SG07	40	4	41	11	36	4	73	52	68	54
SG08	82	6	86	12	65	9	77	57	85	64
SG09	85	3	82	9	76	4	64	40	88	48
SG10	75	3	71	13	78	9	75	52	97	54
SG11	60	12	61	19	55	15	90	53	88	65
SG12	90	20	96	23	82	27	77	59	90	51
SG13	70	2	70	23	52	16	68	40	77	55
SG14	60	3	69	36	70	38	62	42	98	69
SG15	85	10	95	14	56	16	75	38	87	50
SG16	70	9	76	26	69	31	60	41	86	72
SG17	90	11	93	19	78	19	80	28	90	28
SG18	60	6	86	11	65	12	86	45	90	88
SG19	65	10	74	20	80	38	72	66	82	77
SG20	85	11	86	24	80	12	65	59	85	62
<b>Promedio</b>	<b>77.60</b>	<b>8.63</b>	<b>79.30</b>	<b>19.01</b>	<b>73.46</b>	<b>17.58</b>	<b>76.13</b>	<b>49.30</b>	<b>88.10</b>	<b>65.24</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>14.94</b>	<b>5.41</b>	<b>13.30</b>	<b>8.10</b>	<b>15.19</b>	<b>10.77</b>	<b>11.09</b>	<b>10.45</b>	<b>7.85</b>	<b>16.69</b>

Anexo 4. Evaluación de las características seminales de *S. torquatus*

Cuadro 7. Evaluación de las características seminales de *S. torquatus* previo (Pre) y posterior (Post) a la criopreservación

ID	Motilidad progresiva (%)		Viabilidad espermática (%)		Integridad de la membrana (%)		Morfología espermática (%)		Integridad del acrosoma (%)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
ST01	95	16	93	27	97	15	100	86	96	91
ST02	97	16	95	24	95	22	98	82	97	88
ST03	90	17	84	27	94	16	96	69	98	87
ST04	95	24	92	17	92	26	98	87	92	87
ST05	95	11	91	16	94	26	98	70	99	81
ST06	95	18	87	14	84	16	96	77	91	90
ST07	95	16	85	15	84	11	81	66	72	88
ST08	90	2	73	10	89	9	98	60	95	87
ST09	97	13	95	16	95	23	100	73	96	88
ST10	90	5	88	15	94	7	90	53	96	87
ST11	90	12	94	15	91	19	94	74	95	87
ST12	92	17	95	11	97	22	98	71	96	85
ST13	100	34	94	46	90	39	80	63	95	84
ST14	65	17	87	38	72	37	72	70	76	69
ST15	85	27	90	36	86	45	69	65	93	85
ST16	90	30	79	35	89	39	89	76	98	81
ST17	95	25	95	35	87	36	87	49	85	74
ST18	90	12	82	54	75	49	80	71	85	71
ST19	95	24	91	39	93	45	92	77	88	77
ST20	75	14	85	40	86	35	85	70	82	75
ST21	85	9	95	44	76	40	65	47	98	84
<b>Promedio</b>	<b>90.52</b>	<b>17.00</b>	<b>88.86</b>	<b>27.24</b>	<b>88.29</b>	<b>27.37</b>	<b>88.76</b>	<b>69.29</b>	<b>91.48</b>	<b>83.19</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>7.97</b>	<b>7.87</b>	<b>6.10</b>	<b>13.20</b>	<b>7.20</b>	<b>12.89</b>	<b>10.70</b>	<b>10.71</b>	<b>7.54</b>	<b>6.38</b>

## Referencias

1. Abouelezz, F., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M., López-Sebastián, A., Campo, J., & Santiago-Moreno, J. (2014). Effect of the Interaction Between Cryoprotectant Concentration and Cryopreservation Method on Frozen/Thawed Chicken Sperm Variables. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 135–141. <https://doi.org/10.1111/rda.12464>
2. Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., & Bergfelt, D. R. (2009). Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*, 71(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.005>
3. Akbarsha, M. A., Tamilarasan, V., Kadalmani, B., & Daisy, P. (2005). Ultrastructural evidence for secretion from the epithelium of ampulla ductus deferentis of the fan-throated lizard *Sitana ponticeriana cuvier*. *Journal of Morphology*, 266(1), 94–111. <https://doi.org/10.1002/jmor.10369>
4. Al-Amri, I. S., Mahmoud, I. Y., Waring, C. P., Alkindi, A. Y., Khan, T., Bakheit, C., & Al-Mawali, K. M. (2013). The reproductive cycle of the male house gecko, *Hemidactylus flaviviridis*, in relation to plasma steroid concentrations, progesterone receptors, and steroidogenic ultrastructural features, in Oman. *General and Comparative Endocrinology*, 187, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.040>
5. Alcántar-Rodríguez, A., & Medrano, A. (2017). The effect of cooling to different subzero temperatures on dog sperm cryosurvival. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(3), 422–428. <https://doi.org/10.1111/rda.12924>
6. Ahmad, E., Ahmad, N., Naseer, Z., Aleem, M., Khan, M. S., Ashiq, M., & Younis, M. (2010). Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. *Tropical Animal Health and Production*, 43(1), 159–164. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9668-1>
7. Amey, A. P., & Whittier, J. M. (2000). The annual reproductive cycle and sperm storage in the bearded dragon, *Pogona barbata*. *Australian Journal of Zoology*, 48(4), 411–419. <https://doi.org/10.1071/ZO00031>
8. Ananjeva, N. B., Uteshev, V. K., Orlov, N. L., & Gakhova, E. N. (2015). Strategies for conservation of endangered amphibian and reptile species. *Biology Bulletin*, 42(5), 432–439. <https://doi.org/10.1134/S1062359015050027>
9. Anzalone, D. A., Palazzese, L., Iuso, D., Martino, G., & Loi, P. (2018). Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species. *Animal Reproduction Science*, 190(2010), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.010>
10. Arévalo, E., Casas, G., Davis, S. K., Lara, G., Sites, J. W. (1993). Parapatric Hybridization between Chromosome Races of the *Sceloporus grammicus* Complex (Phrynosomatidae): Structure of the Ajusco Transect. *Copeia*, 1993(2), 352. <https://doi.org/10.2307/1447136>

11. Asher, G. W., Kraemer, D. C., Magyar, S. J., Brunner, M., Moerbe, R., & Giaquinto, M. (1990). Intrauterine insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*) with frozen-thawed semen via laparoscopy. *Theriogenology*, 34(3), 569–577. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(90\)90012-i](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90012-i)
12. Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74342006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008)
13. Bagchi, A., Woods, E. J., & Critser, J. K. (2008). Cryopreservation and vitrification: Recent advances in fertility preservation technologies. *Expert Review of Medical Devices*, 5(3), 359–370. <https://doi.org/10.1586/17434440.5.3.359>
14. Baling, M., Stuart-Fox, D., Brunton, D. H., & Dale, J. (2016). Habitat suitability for conservation translocation: The importance of considering camouflage in cryptic species. *Biological Conservation*, 203, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.10.002>
15. Ball, G. F., & Wade, J. (2013). The value of comparative approaches to our understanding of puberty as illustrated by investigations in birds and reptiles. *Hormones and Behavior*, 64(2), 211–214. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.05.002>
16. Banks, C., & Schwaner, T. D. (1984). Two cases of interspecific hybridization among captive Australian boid snakes. *Zoo Biology*, 3(3), 221–227. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430030305>
17. Barten, S., & Simpson, S. (2019). 9 - Lizard Taxonomy, Anatomy, and Physiology. En: S. J. Divers & S. J. Stahl, Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery, Third Edition. *Saunders Editions*, United States of America, pp. 63-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48253-0.00009-X>
18. Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78 (8), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
19. Blanco, J. M., Long, J. A., Gee, G., Donoghue, A. M., & Wildt, D. E. (2008). Osmotic tolerance of avian spermatozoa: Influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, 56(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.09.004>
20. Blanco, J. M., Long, J. A., Gee, G., Wildt, D. E., & Donoghue, A. M. (2012). Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Effects of freezing and thawing rates on turkey and sandhill crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 131(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.001>
21. Blengini, C. S., Sergio, N., Gabriela, C., Giojalas, L. C., & Margarita, C. (2014). Variability in sperm form and function in the context of sperm competition risk in two *Tupinambis* lizards. *Ecology and Evolution*, 4(21), 4080–4092. <https://doi.org/10.1002/ece3.1262>
22. Blesbois, E., Seigneurin, F., Grasseau, I., Limouzin, C., Besnard, J., Gourichon, D., Coquerelle, G., Rault, P. & Tixier-Boichard, M. (2007). Semen Cryopreservation for *Ex Situ* Management of Genetic

Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*, 86(3), 555–564. <https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555>

23. Böhm, M., Collen, B., Baillie, J. E. M., Bowles, P., Chanson, J., Cox, N., Hammerson, G., Hoffmann, M., Livingstone, S. R., Ram, M., Rhodin, A. G. J., Stuart, S. N., van Dijk, P. P., Young, B. E., Afuang, L. E., Aghasyan, A., García, A., Aguilar, C., Ajtic, R., ... Zug, G. (2013). The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation*, 157, 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.07.015>
24. Breton, S., Nair, A. v., & Battistone, M. A. (2019). Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology*, 7 (5), 631–643. <https://doi.org/10.1111/andr.12632>
25. Brito, M. M., Losano, J. D., Angrimani, D. R., Lúcio, C. F., Dalmazzo, A., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2017). Sperm-binding to the perivitelline membrane of chicken egg yolk as a functional test for sperm evaluation in dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54(4), 366–374. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.127331>
26. Browne, R. K., Li, H., Robertson, H., Uteshev, V. K., Shishova, N. R., McGinnity, D., Nofs, S., Figiel, C. R., Mansour, N., Lloyd, R. E., Agnew, D., Carleton, C. L., Wu, M., & Gakhova, E. N. (2011). Reptile and amphibian conservation through gene banking and other reproduction technologies. *Russian Journal of Herpetology*, 18(3), 165–174.
27. Caldeira, C., García-Molina, A., Valverde, A., Bompert, D., Hassane, M., Martin, P., & Soler, C. (2018). Comparison of sperm motility subpopulation structure among wild anadromous and farmed male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr using a CASA system. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 897–906. <https://doi.org/10.1071/RD17466>
28. Campbell, L., Upton, R., Doody, S. J., Nixon, B., Clulow, J., & Clulow, S. (2018). Model protocol for cryopreservation of lizard sperm using the phosphodiesterase inhibitor caffeine. *Cryobiology*, 85(2018), 150. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.120>
29. Campos, L. B., Peixoto, G. C. X., da Silva, A. M., Souza, A. L. P., de Souza Castelo, T., Maia, K. M., Pereira, A. F., & Silva, A. R. (2017). Estimating the binding ability of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) sperm using heterologous substrates. *Theriogenology*, 92, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.008>
30. Canseco-Márquez, L., Mendoza-Quijano, F., & Ponce-Campos, P. (2007a). *Sceloporus aeneus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e.T64084A12735261*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T64084A12735261.EN>
31. Canseco-Márquez, L., Mendoza-Quijano, F., & Ponce-Campos, P. (2007b). *Sceloporus torquatus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e.T64155A12749796*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T64155A12749796.EN>

32. Castro Camacho, Y. J. (2018). Estructura histológica y actividad esteroidogénica de la onfaloplacenta y la alantoplacenta de la lagartija vivípara *Plestiodon copei* (Squamata: Scincidae). Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM, México. Pp 123.
33. Chan, S. Y. W., Li, S. Q., & Wang, C. (1987). TEST-egg yolk buffer storage increases the capacity of human sperm to penetrate hamster eggs *in vitro*. *International Journal of Andrology*, 10(3), 517–524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00351.x>
34. Chen, X., Zhu, H., Hu, C., Hao, H., Zhang, J., Li, K., ... Wang, D. (2014). Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction*, 147(3), 321–330. <https://doi.org/10.1530/rep-13-0313>
35. Cheng, F. P., Guo, T. J., Wu, J. T., Lin, T. E., Ursem, P. J. F., Colenbrander, B., & Fung, H. P. (2002). Annual variation in semen characteristics of pigeons (*Columba livia*). *Poultry Science*, 81(7), 1050–1056. <https://doi.org/10.1093/ps/81.7.1050>
36. Choudhury, B. C., & Chowdhury, S. (1986). Lessons from Crocodile Reintroduction Projects *India*. *Indian Forester*, [Oct. 1986], pp. 881-890. ISSN 2321-094X. Disponible en: <http://www.indianforester.co.in/index.php/indianforester/article/view/9991>. Consultado el 14 diciembre de 2019.
37. Clulow, J., & Clulow, S. (2016). Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles: Bringing the ARTs up to speed. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(8), 1116–1132. <https://doi.org/10.1071/RD15466>
38. Colli, G. R., Teixeira, R. D., Scheltinga, D. M., Mesquita, D. O., Wiederhecker, H. C., & Bão, S. N. (2007). Comparative study of sperm ultrastructure of five species of teiid lizards (Teiidae, Squamata), and *Cercosaura ocellata* (Gymnophthalmidae, Squamata). *Tissue and Cell*, 39(1), 59–78. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2006.12.001>
39. Comizzoli, P., Mermillod, P., & Mauget, R. (2000). Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development*, 40(5), 493–504. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000113>
40. Comizzoli, P., Songsasen, N., Hagedorn, M., & Wildt, D. E. (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>
41. Comizzoli, P. (2015). Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 640. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153849>
42. Comizzoli, P. (2017). Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Animal Reproduction*, 14(1), 30–33. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR889>
43. Contreras-Méndez, L. A., & Medrano, A. (2016). A comparative study of two cooling protocols on stallion sperm cryosurvival. *Andrologia*, 48(5), 558–563. <https://doi.org/10.1111/and.12479>

44. Corbett, K. F., & Moulton, N. R. (1998). Sand lizard Species Recovery Programme project (1994-1997), *English Nature Research Reports*, 288, 60pp. ISSN 0967-876X. Disponible en: <http://publications.naturalengland.org.uk/file/6153763114975232>. Consultado el 14 diciembre de 2019.
45. Cree, A., Cockrem, J.F., Brown, M.A., Watson, P.R., Guillette, L.J., Newman, D.G., & Chambers, G.K. (1991). Laparoscopy, radiography, and blood analyses as techniques for identifying the reproductive condition of female tuatara. *Herpetologica*, 47 (2), 238-249. <https://www.jstor.org/stable/3892739>
46. Cruz Cano, N. (2017). Inducción de la actividad ovárica en la lagartija vivípara *Barisia imbricata* (Reptilia: Anguidae) mediante el manejo de la temperatura y administración de PMSG. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, México. Pp 112.
47. Depeiges, A., & Dacheux, J. L. (1985). Acquisition of sperm motility and its maintenance during storage in the lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74(1), 23–27. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0740023>
48. Dixon, J. R., & Lemos Espinal, J. A. (2010). Anfibios y reptiles del estado de Querétaro, México. Texas A & M University y Universidad Nacional Autónoma de México, México, 428 pp.
49. Dobson, A. P., Nowak, K., & Rodríguez, J. P. (2013). Conservation Biology, Discipline of. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 238–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00272-0>
50. D’Ortona, P., & McRobert, S. (2018). Captive Breeding Wildlife: Fish, Amphibians and Reptiles. In *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, 791–795. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20632-8>
51. Durrant, B. S. (2009). The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology*, 71(1), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.004>
52. Ezzati, M., Shanehbandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaiasl, M. (2019). Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell and Tissue Banking*, 21, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09797-0>
53. Fahrig, B. M., Mitchell, M. A., Eilts, B. E., & Paccamonti, D. L. (2007). Characterization and Cooled Storage of Semen from Corn Snakes (*Elaphe guttata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38 (1), 7–12. <https://doi.org/10.1638/05-098.1>
54. Feria Ortiz, M., de Oca, A. N.-M., & Salgado, I. H. (2001). Diet and Reproductive Biology of the Viviparous Lizard *Sceloporus torquatus torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Journal of Herpetology*, 35 (1), 104-112. <https://doi.org/10.2307/1566029>
55. Ferreira, A., Silva, DN., Van Sluys, M., & Dolder, H. (2009). Seasonal changes in testicular and epididymal histology of the tropical lizard, *Tropidurus itambere* (Rodrigues, 1987), during its

reproductive cycle. *Brazilian Journal of Biology*, 69(2), 429-435. <https://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842009000200028>

56. Fitri, W. N., Wahid, H., Rinalfi, P. T., Rosnina, Y., Raj, D., Donny, Y., Qayyum, L., & Malek, A. A. A. (2018). Digital massage for semen collection, evaluation and extension in Malaysian estuarine crocodile (*Crocodylus porosus*). *Aquaculture*, 483, 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.026>
57. Fitzgerald, L. A., Walkup, D., Chyn, K., Buchholtz, E., Angeli, N., & Parker, M. (2018). The Future for Reptiles: Advances and Challenges in the Anthropocene. *Encyclopedia of the Anthropocene*, Elsevier, 163–174. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809665-9.10291-5>
58. Fuentes-Mascorro, G., Álvarez, T. A., Bautista M., Girón D. & Ramírez L.M. (2014). Diluciones como método de conservación de semen del género *Crotalus*. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 4, 97-99.
59. Fuentes-Mascorro, G., Simón Salvador, P. R., Tamayo Martínez, H. D., & Álvarez, T. A. (2015). Osmolaridad Del Espermatozoide De Los Reptiles. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 6, 218–225.
60. Fuller, B. J., Lane, Nick., & Benson, E. E. (2004). Life in the frozen state. CRC Press. United States of America, 672 pp.
61. Fuller, B. (2004). Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo letters*, 25, 375-88.
62. García-Herreros, M. (2016). Sperm subpopulations in avian species: A comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and Guinea fowl (*Numida meleagris*). *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 889–894. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188448>
63. Gartrell, B. D., Girling, J. E., Edwards, A., & Jones, S. M. (2002). Comparison of noninvasive methods for the evaluation of female reproductive condition in a large viviparous lizard, *Tiliqua nigrolutea*. *Zoo Biology*, 21(3), 253–268. <https://doi.org/10.1002/zoo.10017>
64. Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. D. (2017). Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 5(5), 845–862. <https://doi.org/10.1111/andr.12389>
65. Geldmann, J., Barnes, M., Coad, L., Craigie, I. D., Hockings, M., & Burgess, N. D. (2013). Effectiveness of terrestrial protected areas in reducing habitat loss and population declines. *Biological Conservation*, 161, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.02.018>
66. Gist, D. H., Hess, R. A., & Thurston, R. J. (1992). Cytoplasmic droplets of painted turtle spermatozoa. *Journal of Morphology*, 214(2), 153–158. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052140205>
67. Gist, D. H., Turner, T. W., & Congdon, J. D. (2000). Chemical and thermal effects on the viability and motility of spermatozoa from the turtle epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 119(2), 271–277. <https://doi.org/10.1530/reprod/119.2.271>

68. Gribbins, K. (2011). Reptilian spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 1(3), 250–269. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.18092>
69. Gribbins, K. M., Rheubert, J. L., Touzinsky, K., Hanover, J., Matchett, C. L., Granados-González, G., & Hernández-Gallegos, O. (2013). Spermiogenesis in the imbricate alligator lizard, *Barisia imbricata* (Reptilia, Squamata, Anguillidae). *Journal of Morphology*, 274(6), 603–614. <https://doi.org/10.1002/jmor.20117>
70. Gribbins, Kevin, Anzalone, M., Collier, M., Granados-González, G., Villagrán-Santa Cruz, M., & Hernández-Gallegos, O. (2011). Temporal germ cell development strategy during continuous spermatogenesis within the montane lizard, *Sceloporus bicanthalis* (Squamata; Phrynosomatidae). *Theriogenology*, 76(6), 1090–1099. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.015>
71. Guerrero, H., Huanca, W., Fernando, R. T., Huerta, S., & Ramos, D. (2009). Hypertonic extenders in the Cryopreservation of ovine semen. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 20, 41–46.
72. Guillette, L. J., & Casas-Andreu, G. (1981). Seasonal Variation in Fat Body Weights of the Mexican High Elevation Lizard *Sceloporus grammicus microlepidotus*. *Journal of Herpetology*, 15(3), 366. <https://doi.org/10.2307/1563443>
73. Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 78(8), 1700–1708. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.002>
74. Hall, J. M., & Warner, D. A. (2017). Body size and reproduction of a non-native lizard are enhanced in an urban environment. *Biological Journal of the Linnean Society*, 122(4), 860–871. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx109>
75. Hall, J. M., & Warner, D. A. (2018). Thermal spikes from the urban heat island increase mortality and alter physiology of lizard embryos. *Journal of Experimental Biology*, 221(14). <https://doi.org/10.1242/jeb.181552>
76. Hammerson, G. A., Vazquez Díaz, J., & Quintero Díaz, G. E. (2007). *Sceloporus grammicus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e.T64107A12744035* <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T64107A12744035.EN>
77. Hammerstedt, R. H., & Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26–38. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90004-1)
78. Hernández-Salinas, U., Ramírez-Bautista, A., Leyte-Manrique, A., & Smith, G. R. (2010). Reproduction and Sexual Dimorphism in Two Populations of *Sceloporus grammicus* (Sauria: Phrynosomatidae) from Hidalgo, Mexico. *Herpetologica*, 66(1), 12–22. <https://doi.org/10.1655/08-053.1>
79. Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and

advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>

80. Holsberger, D. R., Donoghue, A. M., Froman, D. P., & Ottinger, M. A. (1998). Assessment of ejaculate quality and sperm characteristics in turkeys: sperm mobility phenotype is independent of time. *Poultry Science*, 77(11), 1711–1717. <https://doi.org/10.1093/ps/77.11.1711>
81. Holt, W. V. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
82. Holt, W. V. (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00239-3)
83. Howard, J. G., Bush, M., Morton, C., Morton, F., Wentzel, K., & Wildt, D. E. (1991). Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius furo*) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92(1), 109–118. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0920109>
84. IUCN. (2016). IUCN Red List of Threatened Species. Consultado el 10 de diciembre de 2019. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>.
85. Johnson, A. K. (2018). Assisted Reproduction in the Male Cat. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 48(4), 511–521. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.001>
86. Johnston, S. D., Lever, J., McLeod, R., Oishi, M., Qualischefski, E., Omanga, C., Leitner, M., Price, R., Barker, L., Kamau, K., Gaughan, J., & D’Occhio, M. (2014a). Semen collection and seminal characteristics of the Australian saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). *Aquaculture*, 422–423, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.002>
87. Johnston, S. D., Lever, J., McLeod, R., Qualischefski, E., Brabazon, S., Walton, S., & Collins, S. N. (2014b). Extension, osmotic tolerance and cryopreservation of saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) spermatozoa. *Aquaculture*, 426–427, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.014>
88. Kaser, D. J., Ginsburg, E. S., Carrell, D. T., & Racowsky, C. (2019). Assisted Reproduction. In *Yen & Jaffe’s Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*, Eighth Edition. Elsevier, 779-822. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00031-7>
89. Kawazu, I., Maeda, K., Koyago, M., Nakada, K., & Sawamukai, Y. (2014). Semen Evaluation of Captive Hawksbill Turtles. *Chelonian Conservation and Biology*, 13(2), 271–278. <https://doi.org/10.2744/ccb-1064.1>
90. Kimskulvech, S., & Suttiyotin, P. (2012). Stimulation patterns for erection and ejaculation using electroejaculator in black marsh turtles. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 42(3), 325–332.

91. Kojima, E., Tsuruga, H., Komatsu, T., Murase, T., & Tsubota, T. (2001). Characterization of semen collected from beagles and captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Environmental Sciences*, 10306020, 717–731.
92. Lance, V. A. (2010). Reptile reproduction and endocrinology. In: W. Holt, A. Pickard, J. Rodger, & D. Wildt (Eds.), *Reproductive Science and Integrated Conservation* (Conservation Biology), Cambridge University Press, 338–358. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511615016.027>
93. Lara-Reséndiz, R. A., Díaz De La Vega-Pérez, A. H., Jiménez-Arcos, V. H., Gadsden, H., & Méndez-De La Cruz, F. R. (2014). Termorregulación de dos poblaciones de lagartijas simpátricas: *Sceloporus lineolateralis* y *Sceloporus poinsettii* (Squamata: Phrynosomatidae) en Durango, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(3), 875–884. <https://doi.org/10.7550/rmb.36603>
94. Larsen, R. E., Cardeilhac, P. T., & Lane, T. (1984). Semen Extenders for Artificial Insemination in the American alligator. *Aquaculture*, 42, 141–149. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90361-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90361-2)
95. Lasserre, A., Cebal, E., & Vitullo, A. D. (2000). Successful capacitation and homologous fertilization in vitro in *Calomys musculinus* and *Calomys laucha* (Rodentia-Sigmodontinae). *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(1), 41–47. <https://doi.org/10.1530/reprod/120.1.41>
96. Lee, J.H. (2018). Morphological changes of cauda epididymis, sperm infiltration into cauda epididymis, sperm storage and sperm disappearance of cauda epididymis in *Rhinolophus ferrumequinum korai* (Chiroptera: Rhinolophidae). *The European Zoological Journal*, 85:1, 118–127. <https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1445786>
97. Lin, Y.-N., Roy, A., Yan, W., Burns, K. H., & Matzuk, M. M. (2007). Loss of Zona Pellucida Binding Proteins in the Acrosomal Matrix Disrupts Acrosome Biogenesis and Sperm Morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 27(19), 6794–6805. <https://doi.org/10.1128/mcb.01029-07>
98. Long, J. A. (2006). Avian semen cryopreservation: What are the biological challenges? *Poultry Science*, 85(2), 232–236. <https://doi.org/10.1093/ps/85.2.232>
99. Long, J. A., Bongalhardo, D. C., Pelaéz, J., Saxena, S., Settar, P., O’Sullivan, N. P., & Fulton, J. E. (2010). Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science*, 89(5), 966–973. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00227>
100. López Juri, G., Chiaraviglio, M., & Cardozo, G. (2018). Electrostimulation is an effective and safe method for semen collection in medium-sized lizards. *Theriogenology*, 118, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.035>
101. Mansour, N., Lahnsteiner, F., & Patzner, R. A. (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>
102. Martínez-Torres, Martín, Guzmán-Rodríguez, R., Cárdenas-León, M., & Brunner-Reynaldo, N. (2006). Follicular development and ovulation determined by ultrasound imaging in the viviparous

- lizard *Barisia imbricata* (Reptilia: Anguidae). *The Southwestern Naturalist*, 51(3), 401–406. [https://doi.org/10.1894/0038-4909\(2006\)51\[401:FDAODB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1894/0038-4909(2006)51[401:FDAODB]2.0.CO;2)
103. Martínez-Torres, M., Álvarez-Rodríguez, C., Luis, J., & Sánchez-Rivera, U. A. (2019a). Electroejaculation and semen evaluation of the viviparous lizard *Sceloporus torquatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Zoo Biology*, 38(4), 393–396. <https://doi.org/10.1002/zoo.21499>
  104. Martínez-Torres, M., Sánchez-Rivera, U. Á., Cruz-Cano, N. B., Castro-Camacho, Y. J., Luis, J., & Medrano, A. (2019b). A non-invasive method for semen collection and evaluation in small and median size lizards. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(S4), 54–58. <https://doi.org/10.1111/rda.13536>
  105. Mattson, K. J., de Vries, A., McGuire, S. M., Krebs, J., Louis, E. E., & Loskutoff, N. M. (2007). Successful artificial insemination in the corn snake, *Elaphe gutatta*, using fresh and cooled semen. *Zoo Biology*, 26(5), 363–369. <https://doi.org/10.1002/zoo.20144>
  106. Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology*, 247 (3, Pt 1), C125- C142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.c125>
  107. McDonnell, S. M. (2001). Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Animal Reproduction Science*, 68(3–4), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00152-X)
  108. Membrillo-Ortega, A., Córdova-Izquierdo, A., Hicks-Gómez, J. J., Olivares-Corichi, I. M., Martínez-Torres V.M., & Valencia-Méndez, J. J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. *Interciencia*, 28(12), 699-704. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442003001200006](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001200006)
  109. Milinkovitch, M. C., Kanitz, R., Tiedemann, R., Tapia, W., Llerena, F., Caccone, A., Gibbs, J. P., & Powell, J. R. (2013). Recovery of a nearly extinct Galápagos tortoise despite minimal genetic variation. *Evolutionary Applications*, 6(2), 377–383. <https://doi.org/10.1111/eva.12014>
  110. Mitchell, N. J., Rodriguez, N., Kuchling, G., Arnall, S. G., & Kearney, M. R. (2016). Reptile embryos and climate change: Modelling limits of viability to inform translocation decisions. *Biological Conservation*, 204, Part A, 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.04.004>
  111. Mocé, E., Grasseau, I., & Blesbois, E. (2010). Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science*, 122(3–4), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.10.010>
  112. Molinia, F. C., Bell, T., Norbury, G., Cree, A., & Gleeson, D. M. (2010). Assisted breeding of skinks or how to teach a lizard old tricks! *Herpetological Conservation and Biology*, 5(2), 311–319.
  113. Moskovtsev, S. I., & Librach, C. L. (2013). Methods of Sperm Vitality Assessment. *Spermatogenesis*, 13–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_2)
  114. Nixon, B., Anderson, A. L., Smith, N. D., Mcleod, R., & Johnston, S. D. (2016). The Australian saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) provides evidence that the capacitation of spermatozoa

may extend beyond the mammalian lineage. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 20160495. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0495>

115. Norris, D. O., & Carr, J. A. (2013). Comparative Aspects of Vertebrate Reproduction. In *Vertebrate Endocrinology*, 375-441. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394815-1.00011-2>
116. 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. <https://doi.org/10.1530/reprod/118.2.263>
117. O'Brien, J. K., Schmitt, T. L., Nollens, H. H., Dubach, J. M., & Robeck, T. R. (2016). Reproductive physiology of the female Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*): Insights from the study of a zoological colony. *General and Comparative Endocrinology*, 225, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.013>
118. O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., López-Sebastián, A., Martínez-Navado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R. S., Guillamón, F. G., & Santiago-Moreno, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, 129, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.024>
119. O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704–709. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>
120. Olesen, J. M., & Valido, A. (2003). Lizards as pollinators and seed dispersers: An island phenomenon. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(4), 177–181. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00004-1)
121. Oliveri, M., Bartoskova, A., Spadola, F., Morici, M., di Giuseppe, M., & Knotek, Z. (2018). Method of Semen Collection and Artificial Insemination in Snakes. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 27(2), 75–80. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2018.02.034>
122. Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., & Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), 403–411. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3>
123. Pandav, B. N., Shanbhag, B. A., & Saidapur, S. K. (2007). Ethogram of courtship and mating behaviour of garden lizard, *Calotes versicolor*. *Current Science*, 93(8), 1165–1167. <https://jstor.org/stable/24099181>
124. Prieto, M. T., Sanchez-Calabuig, M. J., Hildebrandt, T. B., Santiago-Moreno, J., & Saragusty, J. (2014). Sperm cryopreservation in wild animals. *European Journal of Wildlife Research*, 60(6), 851–864. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0858-4>

125. Purdy, P. H., Song, Y., Silversides, F. G., & Blackburn, H. D. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science*, 88(10), 2184–2191. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00402>
126. Quinn, H., Blasedel, T., & Platz, C. C. (1989). Successful artificial insemination in the Checkered garter snake *Thamnophis marcianus*. *International Zoo Yearbook*, 28(1), 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1989.tb03277.x>
127. Rakha, B. A., Ansari, M. S., Akhter, S., Santiago-Moreno, J., & Blesbois, E. (2018). Cryoprotectant effects of egg yolk on Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Theriogenology*, 119, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.015>
128. Ralls, K., & Ballou, J. D. (2013). Captive Breeding and Reintroduction. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*, 1, 662–667. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00268-9>
129. Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., García-Vázquez, U. O., Leyte-Manrique, A., Canseco-Márquez, L. (2009). Herpetofauna del Valle de México: Diversidad y Conservación. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 241pp.
130. Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., Cruz-Elizalde, R., Lozano, A., & Rodríguez-Romero, F. J. (2016a). Sexual dimorphism and reproductive traits over time in *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae), based on a population in the Transmexican Volcanic Belt, Mexico. *Salamandra*, 52(2), 197–203. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2009000400009>
131. Ramírez-Bautista, A., Lozano, A., Hernández-Salinas, U., & Cruz-Elizalde, R. (2016b). Female Reproductive Characteristics Among Populations of the Oviparous Lizard *Sceloporus aeneus* (Squamata: Phrynosomatidae) from Central Mexico. *Herpetologica*, 72(3), 196–201. <https://doi.org/10.1655/herpetologica-d-15-00020.1>
132. Rheubert, J., Sever, D., Siegel, D., & Trauth SE. (2014). Male Reproductive Anatomy: The Gonadoducts, Sexual Segment of the Kidney, and Cloaca. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Lizards and Tuatara*. CRC Press, United States of America, 264–312. <https://doi.org/10.1201/b17961-12>
133. Roll, U., Feldman, A., Novosolov, M., Allison, A., Bauer, A. M., Bernard, R., Böhm, M., Castro-Herrera, F., Chirio, L., Collen, B., Colli, G. R., Dabool, L., Das, I., Doan, T. M., Grismer, L. L., Hoogmoed, M., Itescu, Y., Kraus, F., Lebreton, M., ... Meiri, S. (2017). The global distribution of tetrapods reveals a need for targeted reptile conservation. *Nature Ecology and Evolution*, 1(11), 1677–1682. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0332-2>
134. Sadeghi, S., Garca-Molina, A., Celma, F., Valverde, A., Fereidounfar, S., & Soler, C. (2016). Morphometric comparison by the ISAS@CASA-DNA system of two techniques for the evaluation of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 18, 835-839. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.186875>

135. Sánchez Rivera, U. Á. (2017). Análisis hormonal y citológico de la espermatogénesis mediante biopsia testicular en *Sceloporus torquatus* (Sauria: Phrynosomatidae). Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México. Pp 81.
136. Sánchez-Calabuig, M. J., López-Fernández, C., Johnston, S. D., Blyde, D., Cooper, J., Harrison, K., de la Fuente, J., & Gosálvez, J. (2015). Effect of Cryopreservation on the Sperm DNA Fragmentation Dynamics of the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 227–235. <https://doi.org/10.1111/rda.12474>
137. Santiago-Moreno, J., Coloma, M. A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Gómez-Brunet, A., & López-Sebastián, A. (2010). Assisted reproduction in Mediterranean wild ruminants: lessons from the Spanish ibex (*Capra pyrenaica*). *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 67, 431–441. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21755689>
138. Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estesó, M. C., López-Sebastián, A., Guerra, R., Ruiz, M. J., Mendoza, N., Luna, C., Cebrián-Pérez, J. A., & Hildebrandt, T. B. (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology*, 79(2), 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.011>
139. Santiago-Moreno, J., & Galarza, D. A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 18–38.
140. Santiago-Moreno, J., Bernal, B., Pérez-Cerezales, S., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estesó, M. C., Gutiérrez-Adán, A., López-Sebastián, A., Gil, M. G., Woelders, H., & Blesbois, E. (2019). Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLOS ONE*, 14(1), e0209910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910>
141. Scheltinga, D. M., Jamieson, B. G., Espinoza, R. E., & Orrell, K. S. (2001). Descriptions of the mature spermatozoa of the lizards *Crotaphytus bicinctores*, *Gambelia wislizenii* (Crotaphytidae), and *Anolis carolinensis* (Polychrotidae) (Reptilia, Squamata, Iguania). *Journal of Morphology*, 247(2), 160–171. [https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200102\)247:2<160::AID-JMOR1010>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200102)247:2<160::AID-JMOR1010>3.0.CO;2-R)
142. Schleh, C., & Leoni, A. L. (2013). How to optimize the benefits of computer assisted sperm analysis in experimental toxicology. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-8-6>
143. Schneiders, A., Sonksen, J., & Hodges, J. K. (2004). Penile vibratory stimulation in the marmoset monkey: A practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. *Journal of Medical Primatology*, 33(2), 98–104. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2004.00058.x>
144. Shanmugam, M., & Mahapatra, R. (2019). Pellet Method of Semen Cryopreservation: Effect of Cryoprotectants, Semen Diluents and Chicken Lines. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, e19180188. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180188>

145. Shishova, N. R., Uteshev, V. K., Kaurova, S. A., Browne, R. K., & Gakhova, E. N. (2011). Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology*, 75(2), 220–232. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.008>
146. Shivaji, S., Jayaprakash, D., & Patil, S. (1998). Assessment of inbreeding depression in big cats: Testosterone levels and semen analysis. *Current Science*, 75(9), 923-930. [www.jstor.org/stable/24101667](http://www.jstor.org/stable/24101667)
147. Shivaji, S., Kholkute, S. D., Verma, S. K., Gaur, A., Umapathy, G., Singh, A., Sontakke, S., Shailaja, K., Reddy, A., Monika, S., Sivaram, V., Jyotsna, B., Bala, S., Ahmed, M. S., Bala, A., Chandrashekar, B. V. N., Gupta, S., Prakash, S., & Singh, L. (2003). Conservation of wild animals by assisted reproduction and molecular marker technology. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(7), 710–723.
148. Silva, K. B., Zogno, M. A., Camillo, A. B., Pereira, R. J. G., & Almeida-Santos, S. M. (2015). Annual changes in seminal variables of golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. *Animal Reproduction Science*, 163, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.012>
149. Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958–978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
150. Sirinarumitr, K., Patthong, Y., Jaimjaturong, P., Woonwong, Y., Petchsamut, W., Limpasuntisin, P., Manawatthana, S., Sirinarumitr, T., Sanyathitiseree, P., Kornkaewrat, K., & Suithunmapinunta, P. (2010). Extender for Sperm Dilution in Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea*) and Hawksbill Turtle (*Eretmochelys imbricata*) Semen. *Proceedings of the 5th International Symposium on Southeast Asia Sea Turtle Associative Research and Bio-logging Science*. January, 7–10.
151. Soler, C., Contell, J., Bori, L., Sancho, M., García-Molina, A., Valverde, A., & Segarvall, J. (2017). Sperm kinematic, head morphometric and kinetic-morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Asian Journal of Andrology*, 19(2), 154–159. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188445>
152. Soulé, M. E. (1985). What is Conservation Biology? A new synthetic discipline addresses the dynamics and problems of perturbed species, communities, and ecosystems. *BioScience*, 35(11), 727–734.
153. Soulé, M. E. (1991). Conservation: Tactics for a constant crisis. *Science*, 253(5021), 744–750. <https://doi.org/10.1126/science.253.5021.744>
154. Steckler, D., Stout, T. A. E., Durandt, C., & Nöthling, J. O. (2015). Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. *Theriogenology*, 83(9), 1451–1460. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.019>
155. Swelum, A. A.-A., Saadeldin, I. M., Alanazi, M. B., Ba-Awadh, H., Afifi, M., & Alowaimer, A. N. (2018). Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris glycerol extender on the post-

- thawing quality of buck semen. *Animal Reproduction Science*, 195, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.016>
156. Temple-Smith, P. D., Ravichandran, A., & Horta Nunez, F. E. (2018). Sperm: Comparative Vertebrate. In *Encyclopedia of Reproduction*, Second Edition, Vol. 6. Elsevier, 210-220. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20558-x>
  157. Thélie, A., Bailliard, A., Seigneurin, F., Zerjal, T., Tixier-Boichard, M., & Blesbois, E. (2019). Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poultry science*, 98(1), 447–455. <https://doi.org/10.3382/ps/pey360>
  158. Tingley, R., Meiri, S., & Chapple, D. G. (2016). Addressing knowledge gaps in reptile conservation. *Biological Conservation*, 204, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.07.021>
  159. Todd, A. C. (2003). Mating strategies and sperm competition in New Zealand geckos (Family Gekkonidae). Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Zoology, University of Canterbury New Zealand, 192pp.
  160. Todd, B., Willson, J., & Gibbons, J. (2010). The Global Status of Reptiles and Causes of Their Decline. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Second Edition, 47–67.
  161. Tomás, C., Gómez-Fernández, J., Gómez-Izquierdo, E., & de Mercado, E. (2014). Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 144(3–4), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.011>
  162. Tourmente, M., Cardozo, G. A., Guidobaldi, H. A., Giojalas, L. C., Bertona, M., & Chiaraviglio, M. (2007). Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of *Boa constrictor occidentalis*, a threatened snake species. *Research in Veterinary Science*, 82(1), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.06.001>
  163. Tsélutin, K., Seigneurin, F., & Blesbois, E. (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 78(4), 586–590. <https://doi.org/10.1093/ps/78.4.586>
  164. Uetz, P., Freed, P., & Hošek, J. (2018). *The Reptile Database*. Consultado el 21 de diciembre de 2019. Disponible en: <http://www.reptile-database.org/>
  165. Valle, R. R., Arakaki, P. R., Carvalho, F. M., Muniz, J. A. P. C., Leal, C. L. V., & García-Herreros, M. (2013). Identification of sperm head subpopulations with defined pleiomorphic characteristics in ejaculates of captive Goeldi's monkeys (*Callimico goeldii*). *Animal Reproduction Science*, 137(1–2), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.12.007>
  166. Valverde, A., Madrigal-Valverde, M., Castro-Morales, O., Gadea-Rivas, A., Johnston, S., & Soler, C. (2019). Kinematic and head morphometric characterisation of spermatozoa from the Brown Caiman (*Caiman crocodilus fuscus*). *Animal Reproduction Science*, 207(March), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.011>

167. Vázquez, S. (2009). Algunas características ecológicas y reproductivas de la lagartija de collar *Sceloporus torquatus torquatus* Wiegmann 1828 (Squamata: Prhynosomatidae) en la Sierra de Tepotzotlán, Estado de México. Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM, México. Pp 61.
168. Villagrán-SantaCruz, M., Hernández-Aguacaliente, M. J., Méndez-de la Cruz, F. R., Gribbins, K. M., Granados-González, G., & Hernández-Gallegos, O. (2014). The germ cell development strategy and seasonal changes in spermatogenesis and Leydig cell morphologies of the spiny lizard *Sceloporus mucronatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Zoomorphology*, 133(2), 151–165. <https://doi.org/10.1007/s00435-013-0210-7>
169. Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). *Herpetology: An introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 4th Edition, Elsevier, United Kingdom, 596 pp.
170. Wang, F., Feng, X. C., Li, Y. M., Yang, H., & Ma, T. H. (2006). Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(4), 395–401. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00318.x>
171. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
172. Wildt, D. E., & Roth, T. L. (1997). Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *International Zoo Yearbook*, 35(1), 164–172. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1997.tb01207.x>
173. Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48(2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>
174. Woolley, D. M., & Richardson, D. W. (1978). Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53(2), 389–394. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0530389>
175. Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
176. Young, C., Ravida, N., Curtis, M., Mazzotti, F., & Durrant, B. (2017). Development of a sperm cryopreservation protocol for the Argentine black and white tegu (*Tupinambis meriana*). *Theriogenology*, 87, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.006>
177. Zacariotti, R. L., Grego, K. F., Fernandes, W., Sant'Anna, S. S., & de Barros Vaz Guimarães, M. A. (2007). Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). *Zoo Biology*, 26(2), 155–160. <https://doi.org/10.1002/zoo.20126>
178. Zacariotti, R., Guimarães, M., Jensen, T., & Durrant, B. (2012). 117 Cryopreservation of snake semen: Are we frozen in time? *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 171. <https://doi.org/10.1071/rdv24n1lab117>

179. Zena, L. A., Dillon, D., Hunt, K. E., Navas, C. A., Buck, C. L., & Bicego, K. C. (2020). Hormonal correlates of the annual cycle of activity and body temperature in the South-American tegu lizard (*Salvator merianae*). *General and Comparative Endocrinology*, 285, 113295. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113295>
180. Zhang, L., Yang, P., Bian, X., Zhang, Q., Ullah, S., Waqas, Y., Chen, X., Liu, Y., Chen, W., Le, Y., Chen, B., Wang, S., & Chen, Q. (2015). Modification of sperm morphology during long-term sperm storage in the reproductive tract of the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Scientific Reports*, 5(October), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep16096>
181. Zimmerman, D. M., Mitchell, M. A., & Heggem Perry, B. (2013). Collection and characterization of semen from green iguanas (*Iguana iguana*). *American Journal of Veterinary Research*, 74(12), 1536–1541. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.12.1536>
182. Zimmerman, D. M., & Mitchell, M. A. (2017). Semen collection and ejaculate characteristics of the Leopard Tortoise (*Stigmochelys pardalis*). *Conservation Physiology*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/conphys/cox062>