



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU
AMBIENTE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL POR INVESTIGACIÓN

**Evaluación espermática *postmortem* en
conductos deferentes y epidídimo del ajolote
Ambystoma granulosum (Amphibia: Caudata)**

QUE PRESENTA EL ALUMNO:

Martínez Alvarado Denilson Jordan

Matrícula: 2173064592

ASESORES:

**Dra. Gabriela Vázquez Silva - (No. Económico 30288)
Laboratorio de Limnobiología y Acuicultura, UAM Xochimilco**

**Biol. Ana Karen López De la Rosa - (No. de Cédula 12194410)
Laboratorio de Limnobiología y Acuicultura, UAM Xochimilco**

México, CDMX

Marzo 2023.

RESUMEN

México cuenta con 18 especies del género *Ambystoma*, de las cuales 16 son endémicas y 15 se encuentran en alguna categoría de riesgo, como lo es el caso de la especie *Ambystoma granulosum* cuyas poblaciones en vida silvestre han disminuido en los últimos años debido a presiones ambientales y antropogénicas, por lo que se encuentra clasificada en la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010 como especie bajo Protección especial (Pr), a nivel internacional se encuentra incluida en la Lista Roja de Especies Amenazadas como especie en Peligrocrítico (CR). La aplicación de técnicas de reproducción asistida ha permitido preservar la biodiversidad animal, por lo que es importante desarrollar y aplicar métodos que permitan la obtención, conservación y uso de gametos; es por ello que la recuperación espermática *postmortem*, la criopreservación y el almacenamiento de espermatozoides epididimales son técnicas importantes para preservar los gametos y obtener reservas de material genético de animales de interés como el ajolote. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar macroscópicamente y microscópicamente el contenido espermático del ajolote *Ambystoma granulosum* a diferentes horas *postmortem*. Para la evaluación seminal se utilizaron cinco organismos recién muertos de la especie *A. granulosum*, los cuales no se mantuvieron en refrigeración ni en congelación. Las muestras del material seminal *postmortem* fueron incubadas en cuatro tiempos 0, 24, 48 y 72 h. Posteriormente se observaron algunas características del semen como el color, pH, movimiento y porcentaje de viabilidad, mediante la tinción eosina-nigrosina. Las variables macroscópicas en los conductos deferentes y epidídimo de *A. granulosum* en diferentes regiones de los compartimientos gonadales tuvieron una coloración similar, pero a través del tiempo ésta cambió, de lechoso a las 0 h hasta una coloración amarilla a las 72 h. El pH se mantuvo constante con un valor de 7 para todas las regiones y tiempos. En cuanto al movimiento se observó que es mayor en los conductos deferentes a las 0 h disminuyendo hacia las 24 h y posteriormente un decremento hasta un movimiento igual a 0 a las 48 y 72 h; en las regiones del epidídimo no se detectó ningún movimiento en ningún tiempo. Para los valores promedio de viabilidad se determinó que hay diferencias significativas en todas las regiones excepto en CDMED ($P < 0.05$). La mejor viabilidad en los conductos deferentes se encuentra en la región CDCAU a las 0h con un valor promedio de 99% y la menor viabilidad en la región CDCR a las 48h con tan solo el 70.66%. Para el epidídimo la región ECO es donde hay más viabilidad con el 98%, y la menor en las regiones de ECA y ECU con una viabilidad promedio del 73% a las 72h. De acuerdo a lo anterior, es necesario generar programas en cuanto al manejo del contenido seminal de especies como el ajolote, lo cual será una estrategia para la reproducción en cautiverio y para la crio preservación espermática de dicha especie.

Palabras clave: ajolote, conductos deferentes, epidídimo, espermatozoides, *postmortem*, viabilidad.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	4
2	REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1	Aspectos generales de <i>Ambystoma</i>	6
2.2	Taxonomía.....	7
2.3	Distribución Geográfica.....	7
2.4	Descripción de <i>Ambystoma granulosum</i>	8
2.5	Conservación de la Especie.....	9
2.6	Reproducción en <i>Ambystoma</i> ssp.....	9
2.7	Epidídimo y Conducto Deferente.....	10
2.8	Espermatogénesis.....	11
2.9	Evaluación seminal.....	12
3	OBJETIVO GENERAL.....	13
4	OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
5	METODOLOGÍA.....	14
5.1	Descripción de los datos.....	14
5.2	Análisis estadístico.....	14
5.3	Evaluación Seminal.....	14
6	RESULTADOS.....	15
7	DISCUSIÓN.....	21
8	CONCLUSIÓN.....	23
9	REFERENCIAS.....	24

1 INTRODUCCIÓN

Los anfibios son un grupo de organismos, que existe desde hace 350 millones de años, siendo la clase de vertebrados terrestres más antigua del mundo. En la actualidad, se encuentran registradas 8,384 especies de anfibios a nivel mundial, ranas, sapos, salamandras, tritones y cecilias se podrían considerar cosmopolitas, pues están presentes en todos los continentes con excepción de la Antártida. En particular, México cuenta con 411 especies de anfibios, de los cuales 252 especies poseen un alto grado de endemismo con 158 especies que pertenecen al orden Caudata (Mattoon, 2000; Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008; AmphibiaWeb, 2021). Desafortunadamente a nivel global, se considera que los anfibios están sufriendo la peor crisis de extinción de toda su historia, su tasa de declive supera a la de otros vertebrados. Actualmente, en México 164 especies de anfibios están en riesgo de desaparecer, una situación muy alarmante pues es el equivalente al 43% de la diversidad total (Stuart *et al.*, 2004; Parra-Olea *et al.*, 2014). En cuanto al Orden Caudata, México alberga 18 especies del género *Ambystoma*, de las cuales 16 son endémicas y 15 se encuentran en alguna categoría de riesgo, un ejemplo de esto es *Ambystoma granulatum* cuyas poblaciones en vida silvestre han disminuido en los últimos años debido a presiones ambientales y antropogénicas, por lo que se encuentra clasificada en la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010 como especie bajo Protección especial (Pr) (SEMARNAT, 2010), a nivel internacional se encuentra incluida en la Lista Roja de Especies Amenazadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como especie en Peligro crítico (CR) (IUCN, 2021). Una de las estrategias de conservación de la vida silvestre es el mantenimiento de colonias en cautiverio en tanto la restauración de su medio no sea el adecuado y sus poblaciones naturales sean reducidas, por lo que la reproducción *ex situ* es una de las alternativas para la conservación de especies que se encuentran en riesgo, esta condición se ha planteado como respuesta ante crisis de conservación (Gascon *et al.*, 2007). Este tipo de decisiones son aceptadas cuando las poblaciones en inminente peligro de desaparecer son manejadas adecuadamente, pues de esta forma se asegura su permanencia fuera de su ambiente natural, mientras a la par se realizan acciones de recuperación del hábitat

o al menos se detengan las causas que ocasionan su desaparición. Esto se lleva a cabo con desarrollo, promoción, coordinación y apoyo de estrategias de trabajo, estudio, investigación, manejo y reproducción de especies silvestres (Lascuráin *et al.*, 2009; SEMARNAT, 2018). Al respecto, en México se considera que las especies prioritarias de atención son aquellas que se encuentran en riesgo, en términos de pérdida de la biodiversidad se aúna el grado de endemismo, por lo cual es imperante conocer aspectos básicos de la reproducción como, por ejemplo, *A. granulorum* y *A. lermaense* especies amenazadas y endémicas de las cuales es posible su reproducción *ex situ* bajo condiciones controladas (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009).

La aplicación de técnicas de reproducción asistida ha permitido preservar la biodiversidad animal, por lo que es importante desarrollar y aplicar métodos que permitan la obtención, conservación y uso de gametos; sin embargo, la principal causa por la que se ha impulsado el desarrollo de estas técnicas en la recuperación de gametos ante la muerte imprevista de animales de alto valor genético ya sea de interés zootécnico, animales en vías de extinción o especímenes en zoológicos; es por ello que las investigaciones han dirigido sus esfuerzos a la preservación de gametos con el fin de crear bancos de material genético para ser usado en el futuro (Gomendio *et al.*, 2006; Tittarelli *et al.*, 2007). La recuperación espermática *postmortem*, la criopreservación y el almacenamiento de espermatozoides epidídimaes son técnicas importantes para preservar los gametos y obtener reservas de material genético en animales de interés. La recuperación de espermatozoides epidídimaes es viable y muy útil con respecto a las dificultades que implica la recolección de semen en animales silvestres. Sin embargo, existen diversos aspectos que influyen en este procedimiento como son: la viabilidad de los espermatozoides epidídimaes, que depende del tiempo transcurrido desde la muerte hasta la recuperación y procesamiento de la muestra, en relación con la calidad de los espermatozoides y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Tittarelli *et al.*, 2007; Armas, 2009). Por ello el objetivo de este trabajo es evaluar macroscópica y microscópicamente el contenido espermático del ajolote *Ambystomagrulorum* en diferentes horas *postmortem*.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Aspectos generales de *Ambystoma*

En el mundo existen alrededor de 8,384 especies de anfibios, distribuidos en todos los ambientes terrestres y de agua dulce, pero ausentes en los hábitats más fríos o secos del planeta (Frost *et al.*, 2006; AmphibiaWeb, 2021). En la actualidad a nivel mundial existe una crisis de extinción de anfibios muy preocupante ya que 1,856 especies se encuentran amenazadas, 168 especies se han extinto y un 43 % de sus poblaciones se encuentra en declive (Stuart *et al.*, 2004; Aguilar-Miguel *et al.*, 2009; AmphibiaWeb, 2021). Es por ello por lo que la comunidad científica ha planteado como respuesta a esta crisis una estrategia de conservación, la cual consiste en su reproducción *ex situ* (Gascon *et al.*, 2007).

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en riqueza de anfibios con 411 especies equivalentes al 10% de la herpetofauna mundial lo que representa una riqueza excepcional (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004; AmphibiaWeb, 2021). Los anfibios contribuyen considerablemente a que México sea considerado un país megadiverso, ya que el 70% de sus especies poseen un alto grado de endemismo (Parra-Olea *et al.*, 2014).

El género *Ambystoma* incluye 33 especies de ajolotes que se distribuyen desde el sur de Alaska, Canadá, Estados Unidos y el borde del Altiplano mexicano. México cuenta con 18 especies del género *Ambystoma*, de las cuales el 88% son endémicas y el 83% se encuentran en alguna categoría de riesgo (Frost *et al.*, 2006; Parra-Olea *et al.*, 2014; AmphibiaWeb, 2021)

En particular, *Ambystoma granulatum* es una especie endémica del Estado de México, por lo que se han iniciado investigaciones sobre su biología de reproducción *ex situ* bajo condiciones de laboratorio, como estrategia de conservación (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009). El ajolote granulado *Ambystoma granulatum* es una especie de suma importancia desde el punto de vista biológico debido a que presenta heterocronía; proceso en el que hay un cambio en el tiempo de desarrollo (Wakahara, 1996). Por otra parte, esta especie es usada como fuente de alimento, elaborando diferentes platillos, por ello se busca divulgar más sobre

esta especie y dar a conocer el valor que tiene culturalmente y lo que implica que se encuentre en riesgo (Velarde, 2012).

2.2 Taxonomía

Los anfibios son un grupo muy diverso de vertebrados distribuidos en tres Ordenes (Anura: sapos y ranas, Caudata: salamandras y Gymnophiona: cecilias) (Parra-Olea *et al.*, 2014). *Ambystoma granulosum* fue descrito por primera vez por Taylor en 1944, perteneciente al orden Caudata (Taylor, 1944) y a la familia Ambystomatidae comúnmente son conocidos como ajolotes, se caracterizan por tener cuerpo robusto, largo y una cola comprimida lateralmente, en su mayoría los adultos son terrestres en su etapa adulta y presentan pulmones bien desarrollados, mientras que las etapas larvales son acuáticas y tienen tres pares de branquias externas (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén 2010). Su descripción taxonómica es la siguiente (SEMARNAT, 2018):

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Amphibia
Orden	Caudata
Familia	Ambystomatidae
Genero	<i>Ambystoma</i>
Especie	<i>A. granulosum</i> (Taylor, 1944)

2.3 Distribución Geográfica

Esta especie se distribuye al Noreste de la ciudad de Toluca y Estado de México aproximadamente a 3 000 msnm (SEMARNAT, 2018). Se tienen registros en trece Municipios del Estado de México: Aculco, Almoloya de Juárez, Atlacomulco, Chapa de Mota, El Oro, Ixtlahuaca, Jococitlan, San Felipe del Progreso, Toluca, Villa de Allende, Villa Victoria y Zinacantepec (Figura 1) (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005)

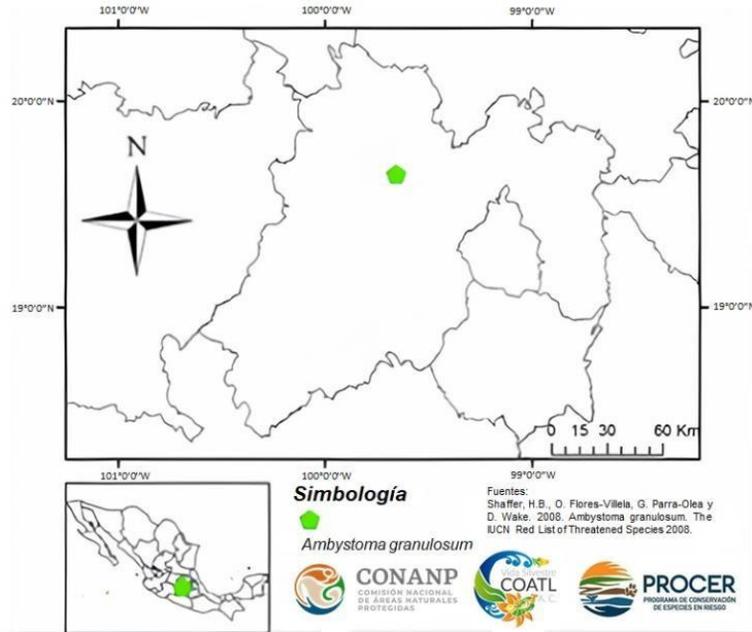


Figura 1. Distribución de la especie *Ambystoma granulosum* (Fuente: SEMARNAT, 2018)

2.4 Descripción de *Ambystoma granulosum*

El ajolote *A. granulosum*, se distingue por presentar neotenia facultativa es decir puede llegar a completar la metamorfosis a salamandra, si es sometido a diferentes situaciones de estrés. Durante su etapa de larva su aleta dorsal surge del nivel de la base de las branquias; y en los juveniles, forma una curva continua hasta el final de la cola; la parte dorsal más elevada se encuentra cerca de la base de la cola; la elevación de la parte subcaudal de la aleta suele ser menor que la dorsal, aunque en algunos ejemplares tiende a ser igual a la dorsal; la membrana es un poco más extensa en juveniles que en adulto. Hay algunos pigmentos en la aleta caudal, especialmente cerca de la punta y en la parte inferior.

Las medidas morfométricas de una larva adulta son de Longitud total de 20.7 cm \pm 23, Longitud Hocico Cloaca de 8.1cm \pm 9.2 y Longitud de la Cola 6.2 cm \pm 7.7 (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2009; SEMARNAT, 2018), presentan una coloración amarillo-olivo oscuro, con manchas dorsales negras en todo el cuerpo y cola, la parte dorsal tiene una tonalidad más oscura y en la región ventral en tono amarillo opaco, con pocas marchas en el dorso y las partes laterales. En algunas

ocasiones las larvas son ligeramente verdes con pocas o sin manchas en el cuerpo (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005; CONABIO, 2016).

2.5 Conservación de la Especie

Actualmente, en México 164 especies de anfibios están amenazadas o críticamente amenazadas (Parra *et al*, 2014). Las poblaciones de *A. granulorum* en vida silvestre han disminuido en los últimos años principalmente por presiones ambientales y antropogénicas. Por lo que se encuentra clasificada en la Norma Oficial Mexicana 059-SEMARNAT-2010 como especie bajo Protección especial (Pr) (SEMARNAT, 2010), así mismo aparece en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como especie en Peligro crítico (CR) (SEMARNAT, 2018; IUCN, 2021). Debido a esta situación, se han buscado estrategias para la restauración de su hábitat, así como la conservación de la diversidad de las especies endémicas que se encuentran en alguna categoría de riesgo o peligro de extinción, una estrategia viable es su reproducción y crianza *ex situ*. La reproducción es una importante herramienta para la comprensión de su biología y tiene como propósito la conservación de las especies, pero actualmente el número de anfibios reproducidos y criados en cautiverio es mínimo (Aguilar-Miguel y Casas-Andreu, 2005; Aguilar-Miguel *et al.*, 2009; Wildt, 2009; Ananjeva *et al.*, 2015; Jiménez *et al.*, 2017)

2.6 Reproducción en *Ambystoma* ssp.

Su reproducción es sexual y se lleva a cabo en temporada de invierno y primavera. (Armstrong y Gillespie, 1989). Durante el cortejo el macho realiza un ritual para atraer a la hembra (Mena-González y Montes de Oca, 2014). Su fecundación es interna, el macho deposita su esperma en un saco llamado espermatóforo, este consiste en una capa de esperma secretada por las glándulas cloacales del macho, posteriormente la hembra se coloca encima de él para poder recoger en su cloaca donde permanece, para que los óvulos puedan ser fecundados hasta el momento del desove (Armstrong y Gillespie, 1989). Teniendo una fecundidad del 40 al 90% (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009)

Los ajolotes maduran aproximadamente al año. Los machos adultos pueden ser identificados por la presencia de grandes glándulas bulbosas cloacales (gónadas) localizadas bilateralmente en la base de la cola (Muske, 1995). Por lo general la ovoposición consta de 100 a 600 huevos por puesta, dependiendo de la edad de la hembra. El tiempo de incubación de los huevos dependerá de la temperatura ambiental, pero normalmente puede oscilar entre los 12 y los 18 días (Mena-González y Montes de Oca, 2014).

Los ajolotes alcanzan su madurez sexual en forma larval acuática (conocido como neotenia). Usualmente esto ocurre entre el año y año medio de edad. Pueden alcanzar hasta 30 cm de longitud y vivir hasta diez o doce años en promedio (Mena-González y Montes de Oca, 2014).

2.7 Epidídimo y Conducto Deferente

El epidídimo es el primer conducto externo que sale de los testículos, está unido longitudinalmente a la superficie de los testículos, junto con éstos está encerrado en la túnica vaginal que es un órgano fibroso, compacto y externo pero adherido a la túnica albugínea del testículo y cubierto por una subdivisión de ésta. Anatómicamente el epidídimo consta de tres partes bien definidas: cabeza, cuerpo y cola (Bearden y Fuquay, 1982). El cuerpo del epidídimo se extiende a lo largo del eje longitudinal del testículo éste es más delgado y recto, que pasa de forma inmediata junto con la túnica albugínea hacia el extremo más distal del testículo, posteriormente se vuelve sobre sí misma para formar el conducto deferente (Robaire y Orgebinchrist, 2006).

La estructura anatómica más relevante desde el punto de vista reproductivo es la cola del epidídimo, ya que actúa como reservorio de espermatozoides hasta que se produce la eyaculación y desemboca en una estructura tubular recta que es el conducto deferente que también cumple funciones de almacenamiento de espermatozoides (Figura 2.) (Hewitt, 2000).

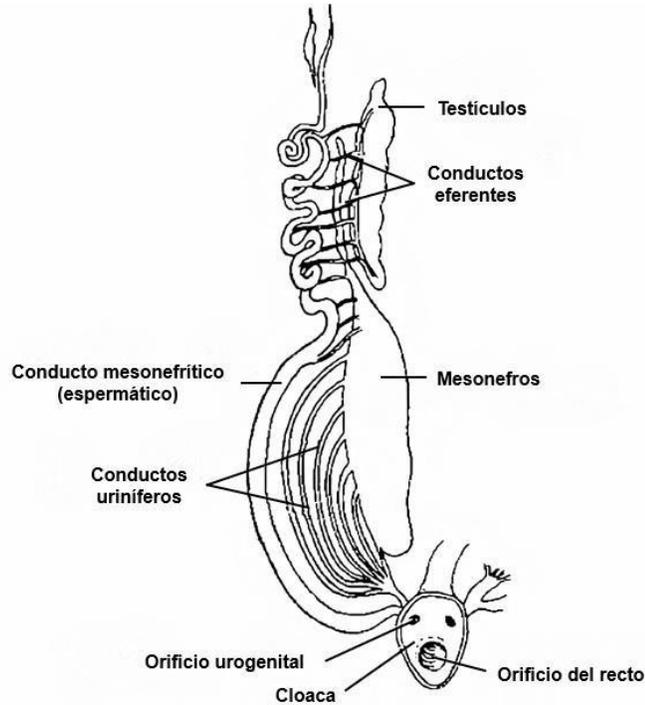


Figura 2. Anatomía general del sistema urogenital de Urodelos (Modificado de BUAP, 2017)

2.8 Espermatogénesis

El ciclo reproductor en ajolotes inicia con una espermatogénesis de tipo longitudinal, con división de las células germinales de manera sincrónica formando quistes que presentan divisiones de espermatogonias, espermatocitos primarios y espermatocitos secundarios de octubre a diciembre y la espermiogénesis de enero a marzo, finalmente se observan espermatozoides en testículos de marzo a septiembre (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009).

Por lo tanto, en primavera es la época de renovación del tejido germinal en la gónada masculina. También es la temporada de reproducción activa, y los espermatozoides almacenados en los conductos deferentes del invierno anterior se depositan en espermatóforos. En mayo y junio, surge una nueva generación de espermatogonias secundarias a partir de espermatogonias primarias que han proliferado en regiones donde los quistes viejos se rompieron y degeneraron. La meiosis comienza a finales de junio o principios de julio. La espermiogénesis comienza en julio y los espermatozoides están presentes en agosto. En el otoño y

los primeros meses de invierno, los espermatozoides se liberan en los conductos deferentes y los quistes rotos se degeneran. El peso de la gónada disminuye a medida que la salamandra reabsorbe la mayor parte del tejido en degeneración en preparación para un nuevo ciclo reproductivo (Armstrong y Malacinski, 1989)

2.9 Evaluación seminal

El análisis seminal o espermograma incluye una serie de pruebas que evalúan las funciones de la célula espermática. Como resultado del análisis seminal se puede calificar a la muestra como apta o no para su uso (Woelder, 1990). Las pruebas disponibles para la evaluación seminal macroscópica son las siguientes:

a) Color: es una percepción visual y un fenómeno fisicoquímico asociado a las innumerables combinaciones de la luz (Moratto *et al.*, 2001).

b) Valoración pH: el pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a 7.4 ± 0.2 , al igual que otros fluidos orgánicos, y cuando se reduce este pH al mismo tiempo se reduce el metabolismo energético del espermatozoide y su motilidad (Gadea, 2003).

En el caso de la evaluación microscópica se considera:

a) Motilidad: La motilidad del esperma ha sido considerada como un criterio importante en la evaluación de la fertilidad, el objetivo de la estimación de la motilidad del esperma es determinar la proporción de espermatozoides móviles y la proporción del moviendo progresivamente, es decir, moviéndose activamente hacia adelante. El apego abaxial de la pieza media de la cabeza del espermatozoide puede producir un cierto movimiento circular en espermatozoides normales. Tradicionalmente, la evaluación ha dependido de las estimaciones subjetivas de las características de la motilidad de esperma utilizando un microscopio. Este método es barato y fácil de usar; sin embargo, tiene la desventaja de que las estimaciones de la motilidad de espermatozoides pueden variar entre los examinadores, que pueden estar sesgados en un sinnúmero de maneras (Malmgren, 1997).

b) Viabilidad: El procedimiento más habitual utilizado para la valoración de la vitalidad son las técnicas de tinción que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los

colorantes vitales; por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que, si esta alterada el colorante penetrara en el interior de la célula, el método más tradicional en la tinción es con eosina-nigrosina, donde las células vivas se ven de color blanco sobre un fondo púrpura, mientras que las células muertas se tiñen de color rosa (Silva *et al.*, 1996).

c)

d) Morfología espermática: Es evaluada usando varias técnicas y tinciones, como la eosina-nigrosina, azul tripán, Giemsa, Papanicolaou y Diff. Dado que algunas de estas tinciones pueden ser imprecisas, un método alternativo consiste en fijar la muestra de espermatozoides con formol, y analizar la muestra con el microscopio de contraste de fase (Foote, 2002).

3 OBJETIVO GENERAL

Analizar macroscópicamente y microscópicamente el contenido espermático del ajolote *Ambystoma granulosum* en diferentes compartimentos gonadales y tiempos *postmortem*.

4 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el pH y color del esperma obtenido de la cola de epidídimo y conductos deferentes de *Ambystoma granulosum* en diferentes tiempos *postmortem*.
- Determinar la viabilidad espermática mediante el número de espermatozoides vivos de la cola de epidídimo y conductos deferentes del ajolote *Ambystoma granulosum* en diferentes tiempos *postmortem*.
- Evaluar la movilidad y de los espermatozoides de la cola de epidídimo y conductos deferentes del ajolote *Ambystoma granulosum* en diferentes tiempos *postmortem*.

5 METODOLOGÍA

El presente trabajo de servicio social se realizó de forma remota, a través de diferentes plataformas digitales. Las actividades realizadas comprenden la integración y análisis de una base de datos preexistente desde casa, sobre los ensayos previos de la obtención y evaluación macroscópicamente y microscópicamente del contenido espermático en diferentes compartimentos gonadales y tiempos *postmortem* del ajolote *Ambystoma granulosum* los cuales fueron realizados en el Laboratorio de Limnobiología y Acuicultura de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, situado en la planta baja del edificio W laboratorio 002, dicha base fue proporcionada por las asesoras del presente trabajo.

5.1 Descripción de los datos

Los datos obtenidos del ensayo fueron organizados en una base de datos. Dicha información corresponde al sitio de colecta, peso, largo de los órganos extraídos (epidídimo y conductos deferentes), así como los datos sobre la evaluación seminal como: viabilidad, pH, color, olor, y motilidad de los diferentes tiempos *postmortem* (0, 24, 48 y 72 h).

5.2 Análisis estadístico

Se realizó una comparación de la viabilidad de los espermias del conducto deferente y epidídimo en cada uno de los tiempos *postmortem*, por medio de un ANDEVA considerando un alfa de 0.05 (Zar, 1999).

5.3 Evaluación Seminal

Para la evaluación seminal se utilizaron ocho organismos recién muertos de ajolote de la especie *Ambystoma granulosum*, los cuales no se mantuvieron en refrigeración ni en congelación. Las muestras del material seminal *postmortem* fueron tomadas en cuatro tiempos 0, 24, 48 y 72 horas. La disección consistió en un corte en la vena yugular antes de los 30 segundos después de la insensibilización; se realizó un corte transversal al organismo con ayuda de un bisturí, posteriormente se extrajeron los testículos y los conductos deferentes, para su posterior análisis en los

tiempos de 24 y 48 horas. Los testículos y conductos deferentes fueron puestos en tubos Eppendorf de 5 ml con solución Hartmann para su conservación. Posteriormente se observaron algunas características del semen como el color, pH, movimiento y porcentaje de viabilidad, esto con ayuda de la tinción eosina-nigrosina.

6 RESULTADOS

Los valores promedio de las biometrías de *A. granulorum* para los testículos y conductos deferentes se muestran en la tabla 1; para el caso de los testículos el valor más alto de peso registrado corresponde al testículo derecho siendo de 0.58 g, y una longitud total de 27.56 mm y una longitud- ancho de 6.68 mm; mientras que el conducto deferente derecho presenta mayor peso y longitud total que el conducto izquierdo, por otra parte, la longitud- ancho es similar en los conductos.

Tabla 1. Valores promedio de las mediciones de testículos y conductos deferentes de la especie *A. granulorum*.

		Peso	Longitud total	Longitud-ancho
Testículo	Izquierdo	0.44 ± 0.19	25.89 ± 5.72	6.29 ± 2
	Derecho	0.58 ± 0.26	27.56 ± 6.28	6.68 ± 1.66
Conducto deferente	Izquierdo	0.08 ± 0.04	56.85 ± 10.39	1.17 ± 0.38
	Derecho	0.21 ± 0.34	62.64 ± 12.33	1 ± 0.41

* Las mediciones de testículos y conductos deferentes fueron registrados de ocho organismos con un peso promedio de 86.53 ± 14.99, una longitud total 23.67 ± 2.01 y una longitud hocico-cloaca 13.76 ± 3.28.

En la tabla 2 se muestran los valores promedio de las longitudes de las zonas del espermatozoide obtenidas en este estudio de *A. granulorum*, comparándolas con mediciones realizadas por Barrera- Rojas *et al.* (2015) en las especies *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma velasci*, de acuerdo a la comparación se observa que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las tres especies. La especie *A. granulorum* presenta el valor más alto de longitud de la cabeza, seguido de *A. mexicanum*, mientras que *A. velasci* tiene la longitud menor, en cuanto a la longitud de la cola *A. mexicanum* tiene una mayor longitud, seguido de *A. granulorum*. En el

caso de la longitud total del espermatozoide se observa que *A. mexicanum* tiene mayor longitud, mientras que la longitud intermedia es mayor en *A. granulorum*.

Tabla 2. Valores de las longitudes de las zonas del espermatozoide de tres especies de ajolote en etapa de reproducción ($P < 0.05$).

Parámetros (μm)	Especies de ajolote			P
	<i>A. granulorum</i>	<i>A. mexicanum</i> *	<i>A. velasci</i> *	
Longitud total	496.08 \pm 18.87	510.48 \pm 36.05	463.69 \pm 24.53	0.1207
Longitud cabeza	131.94 \pm 5.76	124.94 \pm 6.77	114 \pm 3.61	0.0002
Longitud intermedia	14.06 \pm 1.65	12.94 \pm 1.80	11.68 \pm 1.44	0.1262
Longitud de la cola	350.08 \pm 18.63	372.64 \pm 33.19	338.01 \pm 23.96	0.0255

*Valores reportados en Barrera- Rojas *et al.* (2015)

Las partes completas del espermatozoide de *A. granulorum* se observan en la figura 3, en donde se identifican 5 partes; la cabeza, es alargada y estrecha en la parte de adelante con forma de lanza, la pieza intermedia es la región que une la cabeza y el flagelo y es estrecha, posteriormente se identifica la membrana del flagelo que tiene forma de ondas y se extiende a lo largo del flagelo y por último se observa la pieza final que es delgada y no posee membrana.

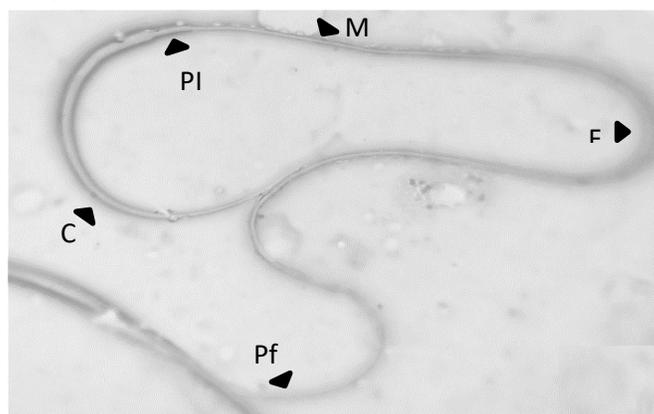


Figura 3. Partes de un espermatozoide de *A. granulorum* visto a 100X y teñido con eosina- nigrosina. (C) Cabeza, (PI) Pieza Intermedia, (MF) Membrana del Flagelo, (F) Flagelo, (Pf) Pieza final.

Las variables macroscópicas en conductos deferentes (Tabla 3) y epidídimo (Tabla 4) de *A. granulorum* tomadas en diferentes regi

ones y tiempos *postmortem*, se puede observar que el color del contenido seminal es similar en todas las regiones, tanto del conducto deferente como del epidídimo, siendo de color lechoso a las 0 h alcanzando una coloración más fuerte a las 72 h de un color amarillo; así mismo el pH fue neutro (7) en las diferentes regiones del conducto deferente y epidídimo. Para el caso del movimiento, se observó que en los conductos deferentes a las 0 horas hay un mayor movimiento de los espermatozoides y este va disminuyendo en las posteriores horas *postmortem* (24, 48 y 72 h) hasta ser nulo, por otro lado, en las regiones del epidídimo no se detectó ningún movimiento en ninguno de los tiempos *postmortem*. En la figura 4 se observan espermatozoides de *A. granulorum* a diferentes horas *postmortem*, del conducto deferente y epidídimo.

Tabla 3. Variables macroscópicas del contenido seminal del ajolote *A. granulorum* de diferentes regiones del conducto deferente (craneal, medial y caudal) en tiempos *postmortem*.

Variables	Conducto Deferente región craneal			
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Color	Lechoso	Blanco-Amarillo	Amarillo-Blanco	Amarillo
pH	7	7	7	7
Movimiento	4	1	0	0
Variables	Conducto Deferente región medial			
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Color	Lechoso	Blanco-Amarillo	Amarillo-Blanco	Amarillo
pH	7	7	7	7
Movimiento	4	1	0	0
Variables	Conducto Deferente región caudal			
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Color	Lechoso	Blanco-Amarillo	Amarillo-Blanco	Amarillo
pH	7	7	7	7
Movimiento	5	1	0	0

Tabla 4. Variables macroscópicas del contenido seminal del ajolote *A. ranulosum* en diferentes regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) en tiempos *posmortem*.

Variables	Epidídimo región de la cabeza			
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Color	Lechoso	Blanco-Amarillo	Amarillo-Blanco	Amarillo
pH	7	7	7	7
Movimiento	0	0	0	0

Epidídimo región del cuerpo				
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Color	Lechoso	Blanco-Amarillo	Amarillo-Blanco	Amarillo
pH	7	7	7	7
Movimiento	0	0	0	0

Epidídimo región de la cola				
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Color	Lechoso	Blanco-Amarillo	Amarillo-Blanco	Amarillo
pH	7	7	7	7
Movimiento	0	0	0	0

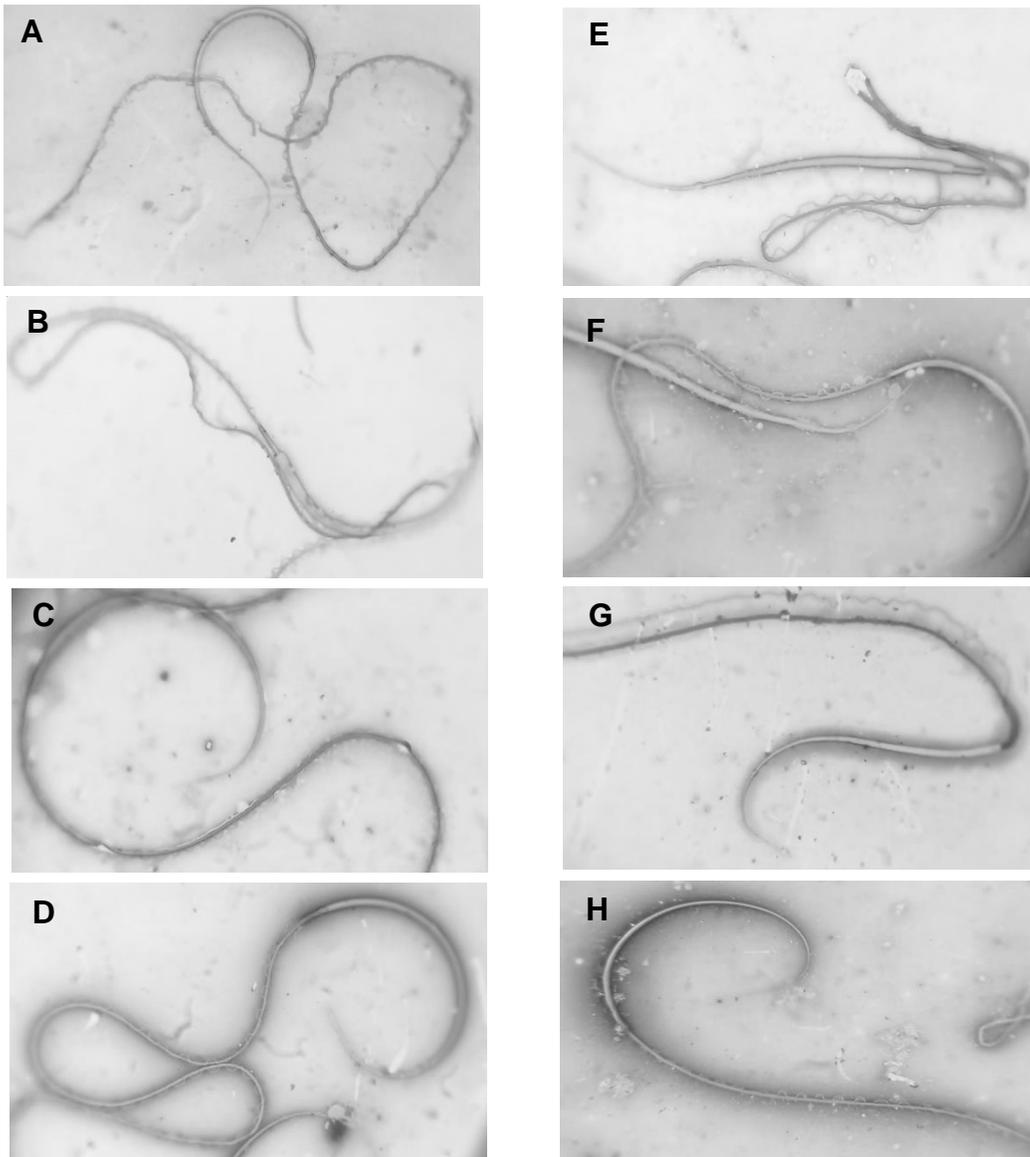


Figura 4. Espermatozoides de *A. granulorum*, teñidos con eosina-nigrosina obtenidos a diferentes horas *postmortem* observados con un microscopio óptico a 100X. A, B, C, D espermatozoides en los conductos deferentes a las 0, 24, 48 y 72 h respectivamente. E, F, G, H espermatozoides en el epidídimo a las 0, 24, 48 y 72 h respectivamente.

En cuanto a la viabilidad (Tabla 5) se observa que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en los diferentes tiempos *postmortem* y regiones, ya que a las 0 h la región que tiene mayor porcentaje de viabilidad fue el conducto deferente en la región caudal quien presento una viabilidad del 99%, mientras que el menor

porcentaje de viabilidad fue a las 48 h en el conducto deferente región craneal con el 70.66%. Para el epidídimo la región de la cola presento mayor viabilidad a las 0 h con el 98%, y menores valores en las regiones la cabeza y del cuerpo con una viabilidad promedio del 73% a las 48 y 72 h.

Tabla 5. Valores promedio de viabilidad en cada uno de los compartimientos gonadales del ajolote *A. granulorum* en diferentes horas *postmortem* (P<0.05).

	Tiempo (h)				EEM	P
	0	24	48	72		
CDCR	91.33 ^a ± 4.04	89.66 ^a ± 2.3	70.66 ^b ± 7.02	72.75 ^b ± 7.93	3.5	0.0029
CDMED	90.66 ± 8.73	86 ± 2.64	81.33 ± 5.29	80.25 ± 2.94	3.034	0.0667
CDCAU	99.00 ^a ± 1.73	88.66 ^b ± 3.21	81.33 ^c ± 0.57	80.25 ^c ± 1.5	1.123	0.0001
ECA	97.66 ^a ± 4.04	78.33 ^b ± 0.57	73.66 ^b ± 2.51	73.00 ^b ± 3.16	1.677	0.0001
ECU	97.66 ^a ± 4.04	79.33 ^b ± 1.52	77.66 ^b ± 1.52	73.00 ^b ± 3.16	1.632	0.0001
ECO	98.00 ^a ± 2	86.66 ^b ± 2.51	78.00 ^c ± 4.35	75.00 ^c ± 3.16	1.812	0.0001

CDCR=Conducto Deferente Región Craneal, CDMED= Conducto Deferente Región Medial, CDCAU= Conducto Deferente Región Caudal, ECA= Epidídimo Región de la Cabeza, ECU= Epidídimo Región del Cuerpo, ECO= Epidídimo Región de la Cola. Letras distintas en la misma fila indican diferencias (P <0.05).

En la figura 5 se muestra el comportamiento de la viabilidad espermática observándose un descenso del porcentaje de viabilidad al paso de las diferentes horas *postmortem*. Para el caso del epidídimo región de la cabeza a las 24 h se registró el porcentaje más bajo de viabilidad del 78.33%, seguido de epidídimo región del cuerpo con el 79.33%, mientras que, en el conducto deferente región craneal y el conducto deferente región caudal reportan una viabilidad del 89.66% y 88.66% respectivamente siendo estos valores los más altos a las 24 h *postmortem*. Sin embargo, a las 48 h en el conducto deferente región craneal la viabilidad bajo notoriamente con un valor de 70.66%, manteniendo está disminución hasta a las 72 h siendo del 73 % y la más baja entre todas las regiones.

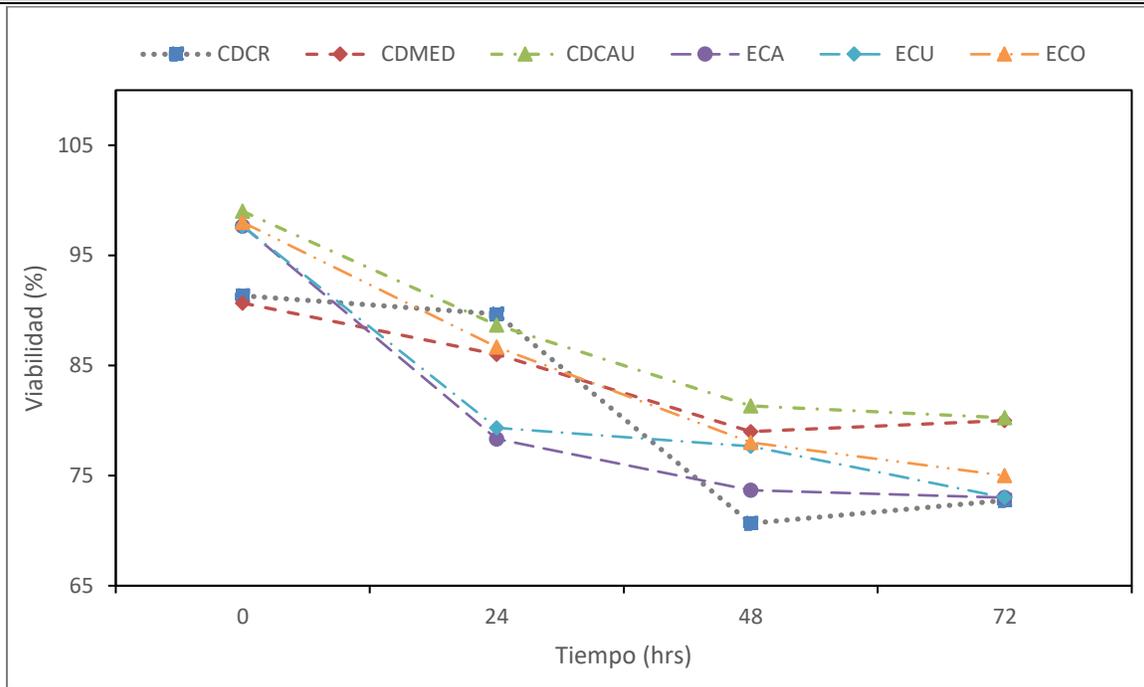


Figura 5. Valores promedio de viabilidad en diferentes tiempos *postmortem*. CDCR=Conducto Deferente región craneal, CDMED= Conducto Deferente región medial, CDCAU= Conducto Deferente región caudal, ECA= Epidídimo región de la cabeza, ECU= Epidídimo región del cuerpo, ECO= epidídimo región de la cola.

7 DISCUSIÓN

La evaluación espermática considera tanto parámetros macroscópicos como microscópicos, esto con la finalidad de lograr un buen manejo en prácticas reproductivas y que puedan ser aplicadas a organismos como el ajolote (Mena y Servín, 2014), ya que es de gran importancia buscar estrategias para su reproducción *ex situ* al ser considerada como una especie bajo "Protección Especial", y por ende el monitoreo de la calidad espermática resulta necesario para lograr el éxito reproductivo de la especie y consecuentemente favorecer su conservación (SEMARNAT, 2010 Puerta *et al.*, 2014; Medina- Robles *et al.*, 2020).

Una factor importante que ayuda a determinar el buen estado en el que se encuentran los espermatozoides es el color como lo menciona García *et al.* (2021) refiriéndose a que el color natural del esperma debe ser un gris opalescente, lo que indica normalidad, en este trabajo la coloración que se pudo observar en las dos

regiones (conductos deferentes y epidídimo) a las 0 h *postmortem* se encuentra dentro los parámetros normales, ya que se observó un color lechoso similar al considerado por los autores anteriormente mencionados; esto se debe a que cuando los espermatozoides son expulsados de la cloaca del ajolote, estos no presentan ningún tipo de anomalía y mantiene una coloración grisácea; mientras que a partir de las 24 h se observó un cambio en la coloración hacia tonalidad amarillenta, misma que se fue intensificando hasta las 72 horas, este cambio de coloración con el transcurso de las horas *postmortem* se puede atribuir a la oxidación de los polisacáridos y flavoproteínas que constituyen el espermátforo y que con el paso de las horas se van oxidando tornandose de un color amarillento (Peralta *et al.*, 2013)

El pH es otra de las variables importantes a considerar en la evaluación espermática, Valdebenito *et al.* (2009) refiere que el pH del medio es un factor determinante para la capacidad de movimiento de los espermatozoides después de su liberación, y de acuerdo a los resultados obtenidos se observa que no hubo variaciones en el pH en los diferentes tiempos *postmortem* ya que fue de 7 en las diferentes zonas que se evaluaron, similar a lo que reporta García *et al.* (2021) quienes describen que el pH del contenido espermático para ser considerado normal debe ser ligeramente alcalino con un valor de 7.2, por ende los resultados en este trabajo indican que el contenido espermático no presenta anomalías.

Por otra parte, al comparar los resultados de movilidad por zona de extracción, se observa que no hay movilidad del esperma proveniente del epidídimo, mientras que para los conductos deferentes sí, esto se le atribuye a que los espermatozoides se encuentran en la región de almacenamiento, y en el último proceso de maduración después del proceso de espermatogénesis en el testículo, por lo que la movilidad en el epidídimo disminuye, como lo menciona Ochotoren *et al.* (2021). En el caso de los conductos deferentes se encontró mayor movilidad a menor tiempo, y está disminuye al paso de las horas, ya que ocurre la oxidación de los espermatozoides en el medio, lo que concuerda con López- Hernández *et al.* (2018) ya que el tiempo de movilidad está influenciado por el hábitat y las condiciones ambientales, y las condiciones del medio propician una degradación del espermátforo.

En cuanto a la viabilidad espermática, los resultados reportados muestran que el tiempo es una variable muy importante a considerar ya que cambia dependiendo de las zonas y el tiempo, siendo mayor el porcentaje de viabilidad a las 0 h *postmortem* con valores entre 90- 99% y disminuye progresivamente hasta las 72 h con un 72-80% de viabilidad. Pacheco *et al.* (2021) realizó un trabajo sobre la criopreservación espermática en *A. mexicanum*, reportando una viabilidad del 89% a las 24 h, estos valores son muy similares a los de este trabajo ya que la viabilidad fue del 78-89%. Además, mencionan una viabilidad de entre 45-68% viabilidad post-descongelación, siendo diferente a lo registrado por Chester (2013) quien obtuvo una viabilidad *post-descongelación* del 64-86%, muy similar a Mansour *et al.* (2010) quienes en sus dos ensayos de criopreservación; obtuvo en su primer ensayo una viabilidad del 64.7% y en el segundo una de 86.7%. Lo anterior es fundamental ya que a partir de esta información se pueden generar alternativas que favorezcan los programas de repoblamiento, fertilización artificial, conservación de especies no convencionales como el ajolote.

8 CONCLUSIÓN.

Las variables como el pH, color y la viabilidad del contenido seminal en los diferentes tiempos *postmortem* indican que se encuentran dentro de los rangos de normalidad, en cuanto al movimiento de los espermatozoides es mayor en los conductos deferentes que en el epidídimo, por lo que se sugiere que podría ser utilizado posteriormente para fertilización *in vitro*, sin embargo se necesitan realizar más estudios en esta especie para comprender en su totalidad el adecuado manejo y recuperación del contenido seminal viable obtenido a diferentes horas *postmortem*, ya que esto sería una alternativa para la reproducción de diferentes especies de *Ambystoma* de manera exitosa.

9 REFERENCIAS

Aguilar-Miguel X. y Casas-Andreu G., 2005. *Ambystoma granulosum*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de ciencias, Centro de Investigación de Recursos Bióticos, UNAM. Bases de datos SNIB-CONABIO.México.

Aguilar-Miguel, X, G. B. Legorreta, y G. Casas-Andreu. 2009. *Ex situ* reproducción en *Ambystoma granulosum* y *Ambystoma lermaense* (amphibia: ambystomatidae). Acta Zoológica Mexicana. 25(3): 443-454.

AmphibiaWeb. 2021. Information on amphibian biology and conservation. [web application]. Berkeley, California: Disponible: <https://amphibiaweb.org> Consultado el 02 de noviembre de 2021.

Ananjeva, N. B., V. K. Uteshev, N. L. Orlov y E. N. Gakhova. 2015. Strategies for conservation of endangered amphibian and reptile species. Biology Bulletin, 42(5): 432-439.

Armas, R. S. M. 2009. Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninospost orquiectomía. Tesis para grado de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Peru. 27-30 p.

Armstrong, J. B, y L. L. Gillespie. 1989. Induced spawnings and artificial insemination in the axolotl. Axolotl Newsletter. 10: 1-4.

Armstrong, J. B, y G. M. Malacinski. 1989. Developmental Biology of the Axolotl. New York: Oxford University Press. 4: 36-41

Barrera- Rojas B. K., Vázquez- Silva G., González- Santos J. A., Arana- Magallón F. C. y Avalos- Rodríguez A. 2015. Morfometría y morfología del espermatozoide en tres especies de ajolote del género *Ambystoma* [Presentación: Cartel]. XXII Congreso Nacional de zoología. Oaxaca. México, Noviembre de 2015.

Bearden, H. J. y J. Fuquay. 1982. Reproducción animal aplicada. Manual Moderno. México. D.F. 135-250 p.

BUAP (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla). 2017. Conferencia 17. MORFOLOGIA DE LOS ANFIBIOS II. Sistema respiratorio. Sistema digestivo. Sistema urinario y genital. Sistema nervioso. Disponible en http://cmas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/biologia/resources/PDFContent/437/Conferencia%2017.%20Anfibios.pdf . Consultado el 06 de noviembre de 2021.

Canseco-Márquez, L, y M. G. Gutiérrez-Mayén. 2010. Salamandras: Anfibios y Reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 85-86 p.

CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2016. *Ajolote de Toluca (Ambystoma granulorum)* ciclo vida. <https://enciclovida.mx/especies/35123-ambystoma-granulosum>

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

Flores-Villela, O, y L. Canseco-Márquez. 2004. Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoologica Mexicana*.20(2): 115-144.

Foote, R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim Sci*. 80: 1-10.

Frost, D. R, T. Grant, R. Bain, A. Haas, L. C. Haddad, A. R. De Sa´R, M. Wilkinson., S. Donnellan, C. Raxworthy, J. Campbell, B. Moler, y P. Drewes. 2006. The amphibian tree of life. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist*. 26-36 p.

Gadea, J. 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2). 17-27.

García, M. J. L., Felices, A. U., & Povedano, M. C. 2021. *Manual de laboratorio para el análisis del semen*. <https://www.omniascience.com/books/index.php/scholar/catalog/book/16>

Gascon, C, J. O. Collins, R. D. Moore, D. R. Church, Mackay, y J. Mendelson. 2007. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland.

Gomendio, M, E. Roldan, J. Garde, y G. Espeso. 2006. El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación animal. *Ecosistemas*. 15(2): 50-57.

Hewitt, D. A. 2000. Fisiología y endocrinología del macho. *Manual de*

Reproduccióny Neonatología en Pequeños Animales. (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona. 79-90 p.

IUCN 2021. Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. Versión 2021-2. <<https://www.iucnredlist.org>>

Jiménez, O., J. Cruz, E. Ramírez, G. Figueroa y G. Casas. 2017. Conservación *ex-situ* de poblaciones en riesgo de ajolotes (*Ambystoma* spp.) del Estado de Puebla, México. Revista Latinoamericana del Ambiente y las Ciencias, 8(18):1-10.

Kubus. 2011. Manual práctico para profesionales: Inseminación artificial porcina. Kubus, S.A. 29-30 p.

Lascuráin, M, R. List, L. Barraza, y E.P. Díaz. 2009. Conservación de especies *ex situ*, en Capital natural de México. Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México. 2: 517-544

Llorente-Bousquets, J., y S. Ocegueda. 2008. El estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México. Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México. 1: 283-322.

López- Hernández, J. C., Osorio- Perez A., Jimenez-Felix A., Paramo-Delgadillo S., Márquez- Couturier G., Yasui G. S. y Arias- Rodríguez L. 2018. Artículo de revisión: La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. Revista Ciencias Marinas y Costeras. 67-96 p.

Malmgren, L. 1997. Assessing the quality of raw semen: a review. Theriogenology. 48: 523-530.

Mattoon, A. 2000. El declive de los anfibios. Guía de recursos. World-Watch. 10-21

Medina-Robles, V. M., Duarte-Trujillo, A. S., & Cruz-Casallas, P. E. (2020). Crioconservación seminal en peces de agua dulce: aspectos biotecnológicos, celulares y bioquímicos. *Orinoquia*, 24(2), 51–78.

Mena González H. y Montes de Oca K., 2014. Manual de Procedimientos para el Manejo y Mantenimiento de la Colonia de Axolotes del Laboratorio de Restauración Ecológica. Instituto de Biología. UNAM.

Moratto, R. G., V. A. Conforti, F. C. Azevedo, A. T. A. Jacomo, L. Silveira, M. A. B. V. Guimaraes, y R. C. Barnabe. 2001. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction*. 122: 745-751.

Muske, L. E. 1995. Pheromonal Control on Male courtship behavior in *Ambystoma mexicanum*. *Axolotl Newsletter*. 24: 11-16.

Ochotoren, A. C. S., Gómez, Y. R., de Lourdes Segura Valdéz, M., García, L. F. J., Martínez, R. L., Monsisbay, M. I., & Cabrera, T. M. R. 2021. Aportes al conocimiento de la morfología microscópica de las gónadas de anfibios y reptiles cubanos. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 11(3), 1043

Parra-Olea, G. O. Flores-Villela, y C. Mendoza-Almeralla. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 460-466.

Peralta Martínez, M. de L. Á., Martínez Morales, I., Unzueta Bustamante, M. L., Montaldo, H. H., & Castillo-Juárez, H. 2013. Morfología del sistema reproductor y del espermatóforo de *Litopenaeus vannamei*, camarón blanco del Pacífico. *Hidrobiologica*, 23(3), 313–319.

Puerta-Suárez, J., José, B., Mayorga-Torres Biol, M., Ospina-Medina, L., Berdugo-Gutiérrez Msc, J., Cardona-, W., & Phd, M. 2014. *La calidad espermática evaluada mediante metodologías no convencionales*. Medigraphic.com. Recuperado el 15 de enero de 2023

Robaire, B., H., B., y Orgebinchrist, M. 2006. The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 1071–1148.

Silva, L. D, K. Onclin, B. Lejeune, y J. P. Verstegen. 1996. Comparason of intravaginal and intrauterine inseminati3n of bitches with fresh or frozensemen. *The Veterinary*. 138: 154-157.

SEMARNAT. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. *Diario Oficial de la Federaci3n (DOF)*.

SEMARNAT. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2018. Programa de Acci3n para la Conservaci3n de las Especies *Ambystoma* spp, SEMARNAT/CONANP, M3xico (Año de edici3n 2018)

Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., y Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.

Tittarelli, C. M., M. C. Stornelli, F. Gimenez, C. A. Savignone, R. L. de la Sota., y M. A. Stornelli. 2007. Recuperación espermática epididimal como medio para preservar materia genética. *Veterinaria cuyana*. 2(1-2): 16-20.

Taylor, E. H. 1944. A new Ambystomid salamander from the Plateau Region of Mexico. *University of Kansas Science Bulletin* 30: 57–61

Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V., & Fernández, J. 2009. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41(2), 97–106.

Vargas, V. G., Sebastián, R. Z. S., y Zardoya, R. 2012. *El árbol de la vida: Anfibios*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 400-407 pp.

Velarde, T. M. 2012. Importancia ecológica y cultural de una especie endémica de ajolote (*Ambystoma dumerilii*) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. *Entobiología*. 10(2): 40-49.

Wakahara, M. 1996. Heterochrony and Neotenic Salamanders: Possible Clues for Understanding the Animal Development and Evolution. *Zoological Science*, 13(6): 765–776.

Wildt, D. 2009. Rescuing endangered animals with assisted reproductive technology. ART and animals. *Sexuality, reproduction y menopause (SRM) Journal*. 7 (2):1.

Woelder, H. 1990. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod Ani*. 1: 145-164.

Zar. J. H. 1999. *Bioestadistical Analysis*. 3th ed. Prentice Hall Inc., N.J. USA