

Efecto de la separación por gradiente en una sola capa sobre la calidad de espermatozoides criopreservados de *Cuniculus paca*

Effect of single-layer density centrifugation on the quality of cryopreserved sperm of *Cuniculus paca*

Daniela Munera C.¹, Giovanni Restrepo B.^{2*}

RESUMEN

Cuniculus paca es un roedor terrestre que habita los bosques neotrópicos de centro y Suramérica. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la separación espermática sobre la calidad de semen criopreservado de *C. paca*. Sesenta pajillas de semen congelado fueron descongeladas. Una alícuota fue sometida a separación espermática por centrifugación con gradiente de densidad de una capa (SLC) y la otra alícuota permaneció como grupo control con semen no separado. Se evaluó la movilidad y cinética espermática mediante un sistema computarizado de análisis espermático (CASA), la integridad funcional de la membrana por la prueba hipoosmótica (HOST) y la morfología espermática con la tinción con eosina-nigrosina. Se realizó el ajuste de modelos lineales y comparación de medias por Tukey. La separación SLC produjo mayor proporción de espermatozoides móviles y lineales, mientras que el control mostró valores superiores para la velocidad curvilínea ($p < 0.05$). Asimismo, la separación SLC produjo resultados superiores para la vitalidad y la integridad funcional de la membrana ($p < 0.05$). Se concluye que la separación SLC de semen criopreservado de *C. paca* permite la obtención de muestras con características superiores de calidad espermática que podría utilizarse en programas de repoblamiento a través de reproducción asistida para esta especie.

Palabras clave: *Cuniculus paca*, espermatozoides, separación seminal, calidad espermática

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

* E-mail: grestre0@unal.edu.co

Recibido: 13 de febrero de 2023

Aceptado para publicación: 5 de septiembre de 2023

Publicado: 31 de octubre de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

Cuniculus paca is a terrestrial rodent that inhabits the neotropical forests of Central and South America. The aim of this study was to evaluate the effect of sperm separation on the quality of cryopreserved semen of *C. paca*. Sixty straws of frozen semen were thawed. One aliquot was subjected to sperm separation by single-layer density gradient centrifugation (SLC) and the other aliquot remained as a control group with semen not separated. Sperm motility and kinetics were evaluated using a computerized-assisted sperm analysis (CASA) system, functional membrane integrity by hypoosmotic test (HOST), and sperm morphology by eosin-nigrosin staining. The adjustment of linear models and comparison of means by Tukey was performed. The SLC separation produced a higher proportion of motile and linear spermatozoa, while the control showed higher values for curvilinear velocity ($p < 0.05$). Likewise, the SLC separation produced superior results for the vitality and functional integrity of the membrane ($p < 0.05$). It is concluded that the SLC separation of cryopreserved semen of *C. paca* allows obtaining samples with superior sperm quality characteristics, which could be used in repopulation programmes through assisted reproduction for this species.

Key words: *Cuniculus paca*, spermatozoa, seminal separation, sperm quality

INTRODUCCIÓN

Cuniculus paca es un roedor terrestre que habita los bosques neotrópicos de centro y Suramérica, con características territoriales, solitario y de vida nocturna, que se alimenta principalmente de frutas (Ramírez y Hernández, 2012). Esta especie es conocida vulgarmente como la guagua, lapa, paca, boruga, tepezcuintle, entre otros (Asprilla-Perea *et al.*, 2011). Se encuentra en riberas de los ríos, zonas de bosques húmedos y páramos; pero también se le puede encontrar en pastizales, manglares y áreas agrícolas (Aquino *et al.*, 2009).

Es un roedor con gran importancia en aspectos económicos, ya que es una de las especies más comercializadas y codiciadas debido a la calidad de su carne (Cirignoli y Varela, 2019), siendo parte de las denominadas «carnes de monte» (Quiceno *et al.*, 2015; Gómez y Van Vliet, 2018). Asimismo, este mamífero tiene un gran valor ecológico y científico al ser dispersor de semillas, estabiliza-

dor del suelo (Silva *et al.*, 2011) y un modelo experimental en investigaciones científicas, debido especialmente a su adaptación al cautiverio (Castelo, 2015).

Debido a su importancia nutricional y ambiental, se hace necesario proteger y conservar esta especie, que, aunque su población no se considera en peligro crítico (Emmons y Reid, 2016), su número se ha reducido debido a la caza ilegal y la deforestación de su hábitat (Ferregueti *et al.*, 2018). En este sentido, los bancos de germoplasma animal se convierten en un soporte y herramienta para la conservación de material germinal (semen y embriones), bajo condiciones de ultracongelación (Martínez *et al.*, 2005). Dichos bancos contribuyen al uso de las biotecnologías reproductivas como una buena herramienta para el manejo y preservación de animales domésticos y silvestres, en especial en aquellos cuya recolección de semen es un procedimiento exigente que no siempre tiene éxito (Assumpção, 2017). En muchas ocasiones, la baja calidad del semen criopreservado limita su utilización (Ball, 2008)

por factores como el tipo de diluyente o el crioprotector (Rivera, 2020). En estas situaciones, se suelen utilizar técnicas de separación o selección seminal para mejorar la calidad del espermatozoide, al eliminar espermatozoides muertos o con alteraciones que tienden a reducir la viabilidad del semen (Johannisson *et al.*, 2009).

Al parecer, no se han reportado investigaciones previas relacionadas con la separación de espermatozoides de *Cuniculus paca*. En consecuencia, se hace necesario el desarrollo de estudios en este campo, que permitan mejorar e implementar procesos de reproducción asistida, con miras a aumentar las tasas de fertilización para la especie, permitiendo la exploración de su potencial zootécnico (Gurgel *et al.*, 2018). Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la separación espermática sobre la calidad de semen criopreservado de *Cuniculus paca*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 60 pajillas con 0.5 mL de semen criopreservado en un medio tris-yema de huevo-glicerol de *Cuniculus paca*, provenientes del banco de germoplasma del Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Las pajillas fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C durante 60 segundos, y el semen recuperado fue sometido a los procedimientos de separación y evaluación espermática que se describen a continuación:

Separación Espermática

Para este proceso se descongelaron simultáneamente tres pajillas de semen, cuyo volumen fue distribuido en dos alícuotas. La primera alícuota se utilizó para un tratamiento de separación espermática por centrifugación con gradiente de densidad de una capa (SLC). El semen descongelado se depositó

en un tubo falcón de 15 mL y se agregó en el fondo del tubo 0.5 mL de CushionFluid™ (Minitube, Alemania). El tubo se llevó a centrifugación a 600 g durante 20 min (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA). Luego, se eliminó el sobrenadante y los espermatozoides fueron suspendidos con 500 µL de Triladyl (Minitube, Tiefenbach, Alemania). La segunda alícuota no fue sometida al proceso de separación a modo de tratamiento control. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente (~20 °C).

Evaluación de la Calidad Seminal

Movilidad y cinética espermática CASA

La movilidad espermática se evaluó mediante un sistema computarizado de análisis de semen (CASA, IVOS - Hamilton Thorne, USA), en el cual se analizaron la movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batida (BCF), índice de rectitud, linealidad (LIN) y espermatozoides rápidos (RAP). Para ello, se depositó una gota de 5 µL de la muestra en un portaobjetos, la configuración de análisis del sistema fue 45 cuadros a 60 Hz a temperatura de 37 °C y la especie elegida fue cerdo, debido a la similitud en el tamaño de los espermatozoides, y a que el sistema CASA no tiene una configuración específica para *Cuniculus paca*. Sin embargo, se verificó que las partículas analizadas correspondieran a células espermáticas. Se analizó un mínimo de 500 espermatozoides por muestra.

Integridad funcional de la membrana plasmática

La evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática se realizó por la metodología modificada de la prueba hiposmótica (HOST) reportada por Neild *et al.* (1999). Para ello se mezcló 20 µL de semen con 200 µL de solución hiposmótica, y

se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se colocó 20 µL de la mezcla en un portaobjetos y se evaluó la reacción de 100 espermatozoides (enrollamiento de la cola), en al menos 5 campos de observación (400X) de un microscopio (Axiostar Plus, Zeiss, Alemania).

Vitalidad espermática

La vitalidad espermática (VE) se determinó por microscopía de fluorescencia mediante el procedimiento descrito por Gamboa *et al.* (2010), con el kit Live/Dead (Molecular Probes Inc, USA). Para ello, 50 µL de semen se depositaron en un tubo Eppendorf para 1.5 ml, se adicionó 0.3 µL de SYBR-14 y se incubó a 37 °C por 8 min. Luego, se agregó 0.3 µL de yoduro de propidio y la muestra se incubó nuevamente a 37 °C durante 8 min. Después de la incubación, la VE se analizó mediante microscopía de fluorescencia (400X) a longitudes de onda entre 550 y 595 nm (T670Q-PL-FL, AmScope, USA). Se tomó 5 µL de la muestra y se evaluaron 100 espermatozoides que fueron clasificados como vivos (fluorescencia verde) o como muertos (fluorescencia roja).

Evaluación de la morfología

La morfología espermática se evaluó mediante la metodología de Cabrera y Pantoja (2012). Sobre un portaobjetos atemperado a 37 °C en una platina térmica, se depositó una gota de semen y una gota de eosina-nigrosina (Merck KGaA, Alemania). Ambas gotas se mezclaron durante 30 s y se realizó un extendido el cual se secó sobre una platina térmica a 37 °C. Posteriormente, se evaluó la morfología individual de 100 espermatozoides a 1000X en un microscopio (Axiostar Plus, Zeiss, Alemania). Los espermatozoides se clasificaron como normales o anormales, estableciéndose las proporciones de alteraciones morfológicas de la cabeza, pieza intermedia y cola (Santos *et al.*, 2020).

Integridad del acrosoma

Para la evaluación de la integridad del acrosoma se usó la sonda fluorescente FITC-PNA (Sigma-Aldrich, USA), mediante el procedimiento descrito por Mendoza *et al.* (1992). Se realizó un extendido con 20 µL de semen sobre un portaobjetos, para su fijación se utilizó alcohol etílico al 70% dejándolos secar por 5 min a temperatura ambiente (~20 °C). Posteriormente, se adicionó 10 µL de FITC-PNA sobre el extendido, y se incubó en la oscuridad durante 30 min. Finalmente, se evaluó el acrosoma de 100 espermatozoides en un microscopio de fluorescencia (T670Q-PL-FL, AmScope, USA). Se clasificaron como intactos los acrosomas completamente fluorescentes de color verde, mientras que la ausencia de fluorescencia en la región acrosomal o la presencia de una banda fluorescente verde en el límite entre el acrosoma y la cubierta pos-acrosomal se clasificaron como acrosomas no intactos.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar. Se utilizaron 60 pajillas de semen congelado. Para cada repetición se usaron tres pajillas, por lo que cada tratamiento contó con 20 unidades experimentales. Se ajustó un modelo lineal para cada variable dependiente, donde se incluyeron los efectos fijos del tratamiento y de la muestra. Se evaluó la normalidad de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se compararon las medias por la prueba de Tukey. Se estableció un valor $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron mediante el software SAS v. 9.2 (SAS Inst. Inc., USA).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para la movilidad y cinética espermática se presentan en el Cuadro 1. Se observa que la separación espermática (SLC) influye sobre las caracte-

Cuadro 1. Movilidad y cinética de espermatozoides de *Cuniculus paca* (n=20)

Variable	Control	Centrifugación con gradiente de densidad de una capa (SLC)
Movilidad total	30.40 ± 2.63 ^b	53.30 ± 6.97 ^a
Movilidad progresiva	18.25 ± 1.40	16.25 ± 2.04
Velocidad media	54.96 ± 3.17	46.05 ± 4.49
Velocidad rectilínea	50.55 ± 2.94	43.07 ± 4.12
Velocidad curvilínea	82.14 ± 4.74 ^a	65.11 ± 6.72 ^b
Amplitud lateral de la cabeza	3.70 ± 0.19	3.29 ± 0.13
Frecuencia de batida	36.92 ± 0.70	37.47 ± 0.79
Índice de rectitud	90.8 ± 1.11	93.20 ± 0.86
Linealidad	62.05 ± 1.86 ^b	68.90 ± 1.90 ^a
Espermatozoides rápidos	18.95 ± 1.41	16.85 ± 2.13

Los resultados se presentan como media ± error estándar. Las medias con diferentes superíndices dentro de una misma fila presentaron diferencias significativas (p<0.05)

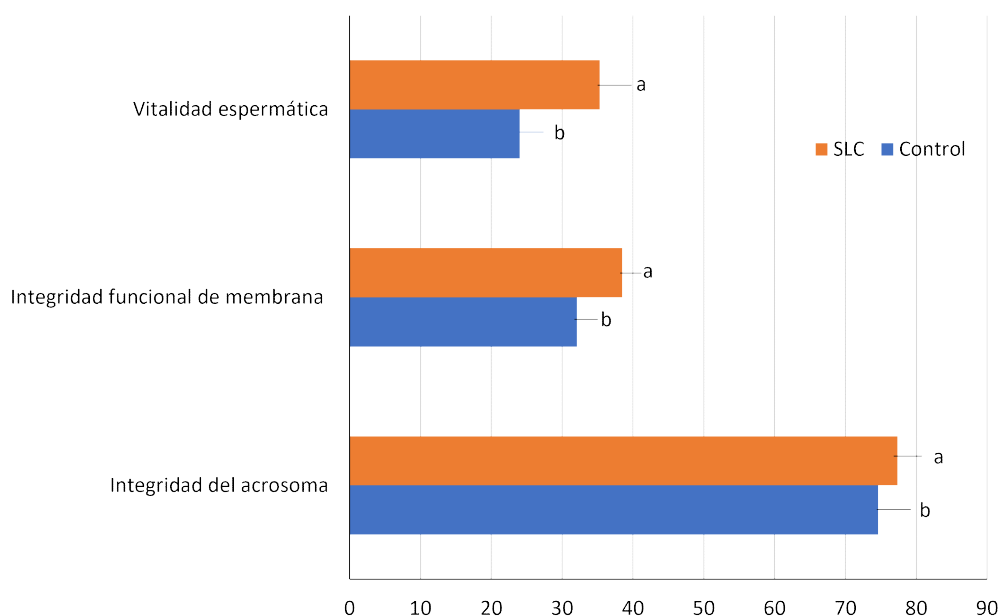


Figura 1. Evaluación de la membrana plasmática de espermatozoides de *Cuniculus paca* (n=20). SLC: Centrifugación con gradiente de densidad de una capa. Los resultados se presentan como media ± error estándar. Las medias con diferentes superíndices dentro de una misma fila indican diferencias significativas (p<0.05)

terísticas de movilidad y cinética de los espermatozoides congelados y descongelados de *C. paca*, dado que SLC produjo mayor proporción de espermatozoides móviles totales y lineales, mientras que el control mostró un valor superior para la velocidad curvilínea (p<0.05).

La Figura 1 muestra los resultados de la evaluación de los parámetros asociados con la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y acrosomal. Se encontró una mejora significativa en la proporción de espermatozoides viables con el tratamiento SLC, así como un incremento en la propor-

Cuadro 2. Evaluación morfológica de los espermatozoides de *Cuniculus paca* (n=20)

Variable	Control	Centrifugación con gradiente de densidad de una capa (SLC)
Anormalidades de cabeza	6.10 ± 0.47	6.90 ± 0.67
Anormalidades de pieza intermedia	1.90 ± 0.40	2.80 ± 0.38
Anormalidades de cola	3.15 ± 0.46	3.50 ± 0.63
Morfología normal	88.85 ± 0.96	86.80 ± 1.13

Los resultados se presentan como media ± error estándar. No se hallaron diferencias significativas ($p > 0.05$)

ción de espermatozoides con membrana funcional en comparación con el control. Por otro lado, la separación espermática no influyó sobre la proporción de espermatozoides con acrosoma estructuralmente intacto.

Los resultados para la morfología espermática del semen congelado y descongelado no indican una influencia significativa del método SLC sobre la proporción de espermatozoides de *C. paca* con alteraciones morfológicas de la cabeza, pieza intermedia y cola, o sobre el total de espermatozoides con morfología normal (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Los métodos de separación espermática se utilizan para eliminar el plasma seminal, el crioprotector, los espermatozoides indeseables y los desechos con el fin de mejorar las características de calidad del esperma (Rodríguez *et al.*, 1997). En la presente investigación se halló un incremento de la movilidad total de los espermatozoides de *C. paca* después del uso de un método de separación SLC. Otros investigadores han realizado estudios con semen fresco y criopreservado de esta especie, y otras especies del género *Cuniculus* (también denominado *Agouti*) (Hoyos *et al.*, 2001; Mollineau *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, no se pudo encontrar estudios equivalentes con la implementación de separación espermática

o el uso de sistemas computarizados para la evaluación de la movilidad y la cinética espermática.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la capacidad del método SLC para separar células móviles de las inmóviles, siendo la movilidad un parámetro que se ha asociado con la criotolerancia y la fertilidad del semen de otras especies (Davila *et al.*, 2016; Wasilewska y Fraser, 2017). Sin embargo, la progresividad de los espermatozoides no se vio influenciada por el método de separación; aunque puede considerarse que los valores para este parámetro en semen descongelado de *C. paca* fueron satisfactorios, tomando como referencia el resultado de MP del 12%, reportado en un estudio previo de Mollineau *et al.* (2010).

El efecto favorable observado en la linealidad de los espermatozoides por la separación SLC, genera interés considerando que dicho parámetro se ha asociado con la progresión de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra (Griablová *et al.*, 2017); así como con la capacitación espermática y la penetración de las barreras de fertilización que rodean al ovocito, como las capas de células del cúmulo y la zona pelúcida (Gadea, 2005). Sin embargo, la reducción observada en VCL es contraria al mejoramiento esperado en la cinética espermática posterior al desarrollo de procesos de separación con coloides (Macías-García *et al.*, 2009). Respecto al

método de separación seleccionado, se ha encontrado en estudios con semen de otras especies, que el uso de Cushion Fluid para la separación SLC, produce mejores resultados en la movilidad y cinética espermática, que otros productos para SLC y métodos alternativos de separación por centrifugación con gradientes de densidad (DGC) (Nicolás *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2015).

El método de separación permitió obtener muestras de semen con mayor proporción de espermatozoides con membrana plasmática íntegra a nivel funcional y estructural (vitalidad) (Figura 1). Resultados similares han sido reportados en bovinos (Arias *et al.*, 2017) y búfalos (Abbel-Razek *et al.*, 2017) con otros métodos de separación espermática. Dicho efecto se atribuye a la capacidad de la separación con coloides para eliminar aquellos espermatozoides muertos o con alteraciones que pueden afectar a los demás espermatozoides, reduciendo su viabilidad (Johannisson *et al.*, 2009). Sin embargo, se conoce que los espermatozoides reducen su viabilidad e integridad funcional de membrana durante la criopreservación (Kozdrowski *et al.*, 2006). En el presente estudio estos parámetros estuvieron por debajo del 40%, en comparación con estudios con semen fresco, con resultados de vitalidad de 73.7% (Mollineau *et al.*, 2008), de 66.0% (Ferraz *et al.*, 2011) y de 83.8% (Santos *et al.*, 2020); así como de integridad funcional de membrana de 42.0% (Ferraz *et al.*, 2011).

Solo los espermatozoides con acrosomas intactos normales pueden sufrir la reacción acrosómica, que es esencial para que los espermatozoides penetren en la zona pelúcida (Abbel-Razek *et al.*, 2017). Una muestra de esperma normal debe contener una alta proporción de espermatozoides con acrosomas intactos capaces de sufrir reacción acrosómica después de la incubación en condiciones de capacitación (Takahashi *et al.*, 1992). En el presente estudio se encontró un alto porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, sin diferencias entre las muestras

sometidas a separación SLC respecto al control. De forma contraria, se ha reportado que al seleccionar espermatozoides bovinos en una columna de Percoll se acelera el proceso de reacción acrosómica (Gardón *et al.*, 2001), mientras que, en equinos se reportó que el método SLC con Cushion Fluid es superior a otros métodos de separación para la obtención de espermatozoides con acrosomas intactos (Varela *et al.*, 2015).

La centrifugación utilizada en los métodos de separación puede ocasionar daños en los espermatozoides (Johannisson *et al.*, 2009). Así mismo, se conoce que los espermatozoides de los roedores son muy sensibles a las fuerzas centrífugas, que pueden causar o promover daños mecánicos, estructurales, cambios en el acrosoma, y una reducción sustancial de la motilidad (Silva *et al.*, 2011). El Cuadro 2 muestra que en el presente estudio no se presentaron alteraciones en la morfología espermática, pero tampoco hubo una mejora en la proporción de espermatozoides morfológicamente normales obtenidos a través del método de separación SLC, como se ha reportado en otros estudios (Cunha dos Santos *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio fueron mayores a los reportados por Santos *et al.* (2020) con 73% de espermatozoides normales en semen epididimal de *C. paca*. En ambos estudios, la mayor proporción de anomalías se presentó en la cabeza de los espermatozoides.

CONCLUSIONES

La centrifugación con gradiente de densidad de una capa (SLC) de semen congelado-descongelado de *Cuniculus paca* permite obtener muestras con características de calidad espermática superiores (movilidad, linealidad e integridad estructural y funcional de membrana plasmática), lo que podría favorecer su utilización en procesos de conservación de la especie mediante métodos de reproducción asistida.

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero y al personal del laboratorio de Reproducción Animal.

LITERATURA CITADA

1. **Abbel-Razek AR, Hussien H, Senosy W, Yousef M. 2017.** Effect of sperm separation methods of morphology and functions of frozen buffalo spermatozoa. *J Adv Vet Res* 7: 18-23.
2. **Aquino R, Gil D, Pezo E. 2009.** Aspectos ecológicos y sostenibilidad de la caza de los majás (*Cuniculus paca*) en la cuenca del río Itaya, Amazonía peruana. *Rev Perú Biol* 16: 67-72.
3. **Arias MH, Andara K, Briones E, Felmer R. 2017.** Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): e.Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol* 17: 126-132. doi: 10.1016/j.repbio.2017.03.002
4. **Asprilla-Perea J, López-Perea J, Viveiros-Riveros J, Jiménez-Ortega A. 2011.** Relación entre abundancia relativa y el aprovechamiento de *Cuniculus paca* (guagua, tepezcuintle) en comunidades negras de la cuenca del Atrato, Colombia. *Mastozool Neotrop* 18: 301-306.
5. **Assumpção TI. 2017.** Coleta de sêmen em animais selvagens realidades e desafios. Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA). Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.
6. **Ball BA. 2008.** Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci* 107: 257-267. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.014
7. **Cabrera P, Pantoja AC. 2012.** Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev Inv Vet Perú* 23: 192-200.
8. **Castelo T. 2015.** Obtenção e conservação de espermatozoides de cutia do semiárido Brasileiro. Tesis Doctoral. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande Do Norte. 58 p.
9. **Cirignoli S, Varela D. 2019.** *Cuniculus paca*. En: *Categorización 2019* de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. [Internet]. Disponible en: <http://cma.sarem.org.ar>
10. **Cunha dos Santos F, Morrell J, da Rosa Curcio B, Menezes Nunes M, Malschitzky E. 2017.** Cushioned and single layer centrifugation improve epididymal stallion sperm motility postcentrifugation. *J Equine Vet Sci* 57: 56-60. doi: 10.1016/j.jevs.2017.05.015
11. **Davila MP, Muñoz PM, Bolaños JM, Stout TA, Gadella BM, Tapia JA, da Silva CB, et al. 2016.** Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. *Reproduction* 152: 683-694. doi: 10.1530/REP-16-0409
12. **Emmons L, Reid F. 2016.** *Dasyprocta leporina*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T89497-102A22197762. [Internet]. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/89497102/22197762>
13. **Ferraz MS, De Menezes DJA, Pessoa GT, Cabral RM, Illera MJ, Silva AR, Carvalho MAM. 2011.** Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). *Theriogenology* 75: 459-462. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.09.013
14. **Ferreguetti AC, Tomas WM, Bergallo HG. 2018.** Density, habitat use, and daily activity patterns of the red-rumped Agouti (*Dasyprocta leporina*) in the Atlantic Forest, Brazil. *Stud Neotrop Fauna E* 53: 143-151. doi: 10.1080/01650521.2018.1434743

15. **Gadea J. 2005.** Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology* 63: 431-444. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.023
16. **Gamboa S, Rodrigues A, Henriques L, Batista C, Ramalho-Santos J. 2010.** Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 73: 950-958. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.023
17. **Gardón JC, Matás C, Gadea J. 2001.** Efecto del protocolo de preparación de espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. *An Vet* 17: 19-26.
18. **Gómez J, Van Vliet N. 2018.** Regulations on the use of fish and wild meat segregate the intrinsically un-dissociable for subsistence livelihoods in Colombia. *J Int Wild Law Policy* 21: 122-145. doi: 10.1080/13880292.2018.-1481598
19. **Grieblová A, Pintus E, Ros-Santaella J. 2017.** Integrity of head and tail plasmalemma is associated with different kinetic variables in boar sperm. *Anim Reprod Sci* 184: 218-227. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.07.020
20. **Gurgel E, Xavier GC, Da Silva AM, Rodriguez A. 2018.** Reproduction in agouti (*Dasyprocta* spp): a review of reproductive physiology for developing assisted reproductive techniques. *Anim Reprod* 15: 1181-1192. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0058
21. **Hoyos D, Lopez J, Ramirez F, Valencia F, Molina S, Sanchez J, et al. 2001.** Sperm characterization in *Agouti paca* and *Agouti taczanowskii*. *Int J Androl* 1: 37-41.
22. **Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin AM, Rodríguez H. 2009.** Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci* 116: 119-128. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.01.008
23. **Kozdrowski R, Dubiel A, Siemiencuch M. 2006.** Preliminary studies on cryopreservation of hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) semen. *Anim Reprod Sci* 93: 379-382. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2005.09.012
24. **Macías García B, Morrell JM, Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. 2009.** Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Anim Reprod Sci* 114: 193-202. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2008.08.025
25. **Martínez R, Ávila O, Pérez J, Gallego J, Onofre H. 2005.** Estructura y función del banco de germoplasma *in vitro* en Colombia. *Arch Zootec* 54: 545-550.
26. **Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. 1992.** Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil* 95: 755-763. doi: 10.1530/jrf.0.0950755
27. **Mollineau WM, Adogwa AO, Garcia WG 2008.** A preliminary technique for electro-ejaculation of agouti (*Dasyprocta leporina*). *Anim Reprod Sci* 108: 92-97. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2007.07.017
28. **Mollineau WM, Adogwa AO, Garcia GW. 2010.** Liquid and frozen storage of agouti (*Dasyprocta leporina*) semen extended with UHT Milk, unpasteurized coconut water, and pasteurized coconut water. *Vet Med Int* 2010: 702635. doi: 10.4061/2011/702635
29. **Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. 1999.** Hypoos-motic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 51: 721-727. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00021-7
30. **Nicolas M, Alvarez M, Borragán S, Martínez F, Chamorro C, Alvarez M, Paz P, et al. 2012.** Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (Maxi-freeze, Cushion Fluid Equine, and PureSperm 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. *Theriogenology* 77: 1119-1128. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.016

31. **Quiceno MP, Van Vliet N, Moreno J, Cruz D. 2015.** Diagnóstico sobre el comercio de carne de monte en las ciudades de Colombia. CIFOR 136: 1-58. doi: 10.17528/cifor/005740
32. **Ramírez O, Hernández L. 2012.** New records of tepezcluincle (*Cuniculus paca*) in Puebla, Central México. Rev Mex Biodivers 83: 872-874.
33. **Rivera MG. 2020.** Separación de los espermatozoides: cómo se hace. Revista Genética Bovina Colombiana [Internet]. Disponible en: <https://revistageneticabovina.com/biotecnologia/separacion-de-espermatozoides/>
34. **Rodríguez H, Larsson B, Pertoft H. 1997.** Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. Reprod Fert Develop 9: 297-308. doi: 10.1071/r96081
35. **Santos PA, França VM, Faino AL, Lima V, Freitas B, Satrapa R, Andrade F. 2020.** Morphology, morphometry, and membrane integrity of epididymal spermatozoa of spotted pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus 1766). Semin-Cienc Agrar 41: 181-190. doi: 10.5433/1679-0359.2020v41n1p181
36. **Silva MA, Peixoto GC, Santos EA, Castelo TS, Oliveira MF, Silva AR. 2011.** Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. Theriogenology 76: 1084-1089. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.05.014
37. **Takahashi K, Wetzels AM, Goverde HJ, Bastaans BA, Janssen HJ, Rolland R. 1992.** The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with *in vitro* fertilization. Fertil Steril 57: 889-894. doi: 10.1016/s0015-0282(16)54976-0
38. **Varela E, Duque JE, Ramírez M, Ocampo D, Montoya JD, Restrepo G. 2015.** Effect of four sperm separation methods on quality and *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved stallion spermatozoa. Rev Inv Vet Perú 26: 451-461. doi: 10.15381/rivep.v26i3.11188
39. **Wasilewska K, Fraser L. 2017.** Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. Anim Reprod Sci 185: 161-173. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.016