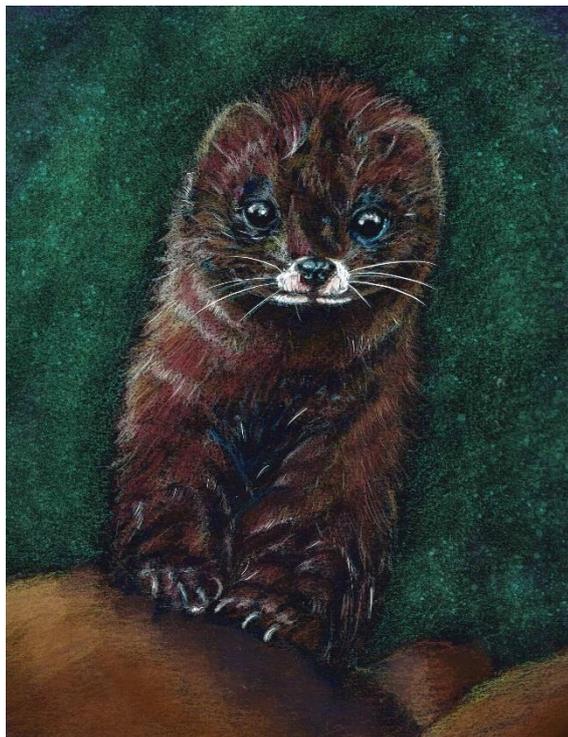




Universidad de Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN

**“Tecnologías reproductivas aplicadas a la  
conservación del visón europeo  
(*Mustela lutreola*)”**



**AUTOR DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER:**

**Sonia Ariznavarreta Alzu**

**TUTORES:**

**María del Carmen Perillán Méndez  
(Universidad de Oviedo)**

**Julián Santiago Moreno (INIA-CSIC)**

**Carmen Aranda Vázquez (FIEB)**

**Julio 2024**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

La realización de este trabajo de fin de máster ha sido posible gracias al apoyo y la colaboración de muchas personas, a quienes me gustaría expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, deseo agradecer a mis tutores, Julián Santiago Moreno y Carmen Aranda Vázquez, por su guía, paciencia y conocimientos durante todo el proceso. Sus sugerencias y constante apoyo han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Y a Carmen Perillán Méndez por contribuir a la finalización del trabajo y darme las instrucciones necesarias para que quedara lo mejor posible.

También quiero mostrar mi agradecimiento a las entidades INIA-CSIC y FIEB por haberme permitido llevar a cabo este trabajo y haberme admitido en un proceso tan novedoso como este.

A todas las personas que comprenden el grupo de investigación de Julián en el INIA (Grupo de Fisiología y Tecnologías Reproductivas en Especies Silvestres) y a aquellas que trabajan en FIEB por tener tanta paciencia conmigo y haberme acogido tan bien desde el primer momento haciendo que me sintiera como en casa.

A todos, muchas gracias por ser parte de este viaje y por contribuir a mi crecimiento personal y profesional.

## RESUMEN

---

El visón europeo (*Mustela lutreola*) es el mamífero más amenazado de Europa, encontrándose en peligro crítico de extinción. En España se estima una población de 142 ejemplares. Los problemas que presenta la cría en cautividad para proporcionar ejemplares, debido a los comportamientos anómalos de los machos criados en cautividad, ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar técnicas de reproducción asistida. En este trabajo se realizó la recogida de semen mediante electroeyaculación y masaje transrectal en 8 visones. Con el semen obtenido se efectuó la inseminación artificial a 8 hembras. Además, se hizo un estudio endocrino mediante análisis en heces de dihidrotestosterona (DHT) estrógenos y metabolitos de progesterona. Por último, se analizó, por primera vez, la morfometría de las cabezas de los espermatozoides comparando los procedentes del epidídimo con los del eyaculado. Hemos comprobado que el uso de oxitocina redujo el proceso de electroeyaculación en lo que a tiempo y estímulos se refiere y proporcionaba un esperma con mayor motilidad. Los análisis endocrinos revelaron la existencia de pseudogestación en las hembras que fueron inseminadas, posiblemente debido al uso de hCG para inducir la ovulación. Por último, los análisis morfométricos demostraron que las cabezas de los espermatozoides procedentes del epidídimo eran de menor tamaño a aquellos presentes en el eyaculado; al igual que ocurre con otras especies, estas diferencias se pueden deber a los procesos de maduración de los espermatozoides. No se obtuvieron gestaciones con la inseminación artificial.

## ABSTRACT

---

The European mink (*Mustela lutreola*) is the most endangered mammal in Europe, and it is listed as Critically Endangered. In Spain, it has been estimated a population of 142 specimens. The limitation of breeding under captive conditions, due to the anomalous behaviors of males, highlight the need to develop assisted reproduction techniques. In this work, semen collection through electroejaculation and transrectal massage was made in males. Artificial insemination was carried out on 8 females. In addition, an endocrine study was performed using fecal assay of dihydrotestosterone (DHT), estrogens and progesterone metabolites. Finally, a morphometric analysis of the sperm heads was performed for the first time, comparing those spermatozoa retrieved from the cauda epididymides with those from the ejaculate. The results showed that the use of oxytocin reduced the electroejaculation process in terms of time and stimuli and offers sperm with greater motility. Dimensions of sperm head was greater in ejaculated than epididymal sperm. Endocrine analyzes revealed the existence of pseudopregnancy in the females that were inseminated, possibly due to the use of hCG to induce ovulation. No pregnancies were obtained after artificial insemination.

# ÍNDICE

---

1	Introducción .....	1
1.1	Situación de conservación del visón europeo.....	2
1.1.1	Estrategias de Conservación.....	3
1.2	Biología reproductiva del visón europeo.....	4
1.2.1	Biología reproductiva del macho de visón europeo .....	5
1.2.2	Biología reproductiva en la hembra .....	8
1.3	Tecnologías Reproductivas.....	13
1.3.1	Recogida de material espermático, criopreservación e inseminación artificial	13
1.3.2	Recogida, transferencia y criopreservación de embriones.....	15
1.3.3	Criopreservación de ovocitos, embriones y células somáticas .....	16
1.3.4	Monitorización no invasiva de la actividad reproductiva .....	17
2	Objetivos .....	18
3	Material y Métodos .....	19
3.1	Animales.....	19
3.2	Monitorización No Invasiva en Heces.....	19
3.2.1	Dihidrotestosterona (DHT) .....	19
3.2.2	Metabolitos de Progesterona y Estrógenos .....	20
3.3	Inseminación Artificial .....	21
3.3.1	Examinación de la Vulva y Citología Vaginal en Hembras.....	21
3.3.2	Inseminación artificial.....	22
3.3.3	Recogida de semen.....	23
3.4	Viabilidad tras La Criopreservación de Tejido Testicular.....	28
3.5	Análisis espermáticos: morfometría de la cabeza espermática .....	30
3.6	Análisis Estadístico .....	31

4	Resultados .....	32
4.1	Monitoreo No Invasivo.....	32
4.1.1	DHT.....	32
4.1.2	Estrógenos .....	33
4.1.3	Metabolitos de Progesterona .....	34
4.2	Inseminación Artificial .....	35
4.2.1	Recogida semen.....	35
4.2.2	Inseminación artificial.....	35
4.3	Viabilidad tras La Criopreservación de Tejido Testicular.....	38
4.4	Análisis espermáticos: morfometría de la cabeza espermática .....	39
5	Discusión.....	40
6	Conclusiones .....	45
7	Referencias .....	46
	Anexo I.....	58
	Anexo II .....	59
	Anexo III.....	60
	Anexo IV.....	61



# 1 INTRODUCCIÓN

---

Hoy en día, la existencia de crisis de biodiversidad es algo que no deja lugar a dudas. De las especies conocidas, 44.000 se encuentran amenazadas lo que supone el 28% de las especies evaluadas; el 26% son mamíferos (*The IUCN Red List of Threatened Species*, 2024). La situación es de tal gravedad que muchos autores consideran que ya nos encontramos ante una “sexta extinción masiva”. Las cinco anteriores se produjeron hace millones de años y se conocen como la extinción del Ordovícico-Silúrico, Devónico-Carbonífero, Pérmico-Triásico, Triásico-Jurásico y Cretácico-Paleógeno. Todas ellas se produjeron debido a causas naturales (caída de meteorito, fragmentación de Pangea, glaciaciones...). Se habla de extinción masiva cuando la tasa de desaparición de especies es mucho más alta que la tasa de extinciones de fondo (desaparición de especies que ocurre de manera continua a lo largo del tiempo). La diferencia de esta nueva oleada de extinciones con las anteriores extinciones masivas, es que se deben a la actuación de una sola especie, es decir, tienen una causa antropogénica (Raup & Sepkoski, 1982; Shivanna, 2020).

En este contexto de pérdida de biodiversidad, el desarrollo de herramientas para aumentar el número de individuos de las especies que están en declive es crucial. Son necesarias tanto la cría en cautividad “tradicional” como las técnicas de reproducción asistida (por ejemplo, inseminación artificial) en aquellos casos en los que la cría tradicional no es factible, bien por problemas de endogamia, o debido a la imposibilidad o dificultad de su cría en cautividad. Un ejemplo de este último caso es el visón europeo. Aunque también ocurre en otras especies como el panda rojo (*Ailurus fulgens*) (Kappelhof & Weerman, 2020) o el leopardo de las nieves (*Panthera uncia*) (Herrick et al., 2020).

El visón europeo (*Mustela lutreola*) es una especie de mamífero carnívoro perteneciente a la familia Mustelidae y a la subfamilia Mustelinae. Sus parientes más cercanos filogenéticamente son el turón de patas negras (*Mustela nigripes*) y el hurón doméstico (*Mustela putorius furo*), especie usada normalmente como modelo en las dos especies anteriores (Skorupski, 2020).

El visón europeo es nativo de Europa. Se caracteriza por su cuerpo alargado y esbelto, con una longitud que varía entre 40 y 50 centímetros, además de una cola larga y peluda que puede alcanzar los 20 centímetros. Su pelaje es de color marrón oscuro en la parte superior y más claro en el vientre, con una característica mancha blanca en los labios superior e inferior. Esta especie también se distingue por sus pequeñas orejas redondeadas y sus ojos oscuros y brillantes (J. Purroy & M. Varela, 2016). Se trata de un animal semiacuático, lo que significa que pasa gran parte de su tiempo cerca de ríos y arroyos. Es un cazador ágil y oportunista, alimentándose principalmente de peces, anfibios, crustáceos, aves y pequeños mamíferos (*Ficha descriptiva del visón europeo*. SENDAVIVA, 2016).



*Figura 1. Ejemplar macho de visón europeo, se puede apreciar su mancha blanca característica en los labios superior e inferior. A diferencia del visón americano que únicamente lo presenta en el inferior. Imagen perteneciente a FIEB (<https://www.fiebfoundation.org/>)*

## 1.1 SITUACIÓN DE CONSERVACIÓN DEL VISÓN EUROPEO

Se trata del mamífero más amenazado de Europa, catalogada en peligro crítico de extinción por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Tiit Maran., 2011). Su área de distribución se ha visto reducida de manera drástica en los últimos años, constituyendo menos del 3% de su distribución original (Ver figura 2). Únicamente podemos encontrar esta especie en España, Francia y el delta del Danubio (Rumanía y Ucrania), aunque se cree que también existen pequeñas poblaciones en Rusia.

En España, se pueden encontrar únicamente en el norte: La Rioja, algunas zonas de País Vasco, Navarra, Castilla y León y Aragón. La última estima nacional data a la

población española en tan solo 142 ejemplares (*La población de visón europeo en España se estima en apenas 142 ejemplares*, 2024; Tiit Maran et al., 2011).

Entre sus principales amenazas, en orden de importancia, nos encontramos:

- Competencia con el visón americano (*Neogale vison*)
- Fragmentación de la población y pérdida de diversidad genética y consanguinidad
- Muerte no natural por atropellos en carreteras
- Enfermedades como el virus de la enfermedad del visón aleutiano y moquillo
- Destrucción y fragmentación del hábitat



Figura 2. Mapa de distribución del visón europeo (*Mustela lutreola*) en Europa. Este mapa ha sido realizado con datos de la lista roja de la IUCN (2021) y bajo los términos de la licencia (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>)

### 1.1.1 Estrategias de Conservación

Entre las estrategias de conservación podemos encontrar:

- Controles de la población de visón americano
- Restauración de hábitat
- Programas de cría en cautividad e implementación de las tecnologías reproductivas

Uno de los grandes problemas de las estrategias de conservación son las dificultades de la cría en cautividad, ya que los machos criados en cautividad generalmente presentan un comportamiento reproductivo poco adecuado y se muestran, en ocasiones pasivos y otras veces agresivos. Aproximadamente, el 89% de los cruces en los que intervienen



machos criados en cautividad son infructuosos (el 47% de las veces se debe a un comportamiento pasivo del macho), mientras que solo el 35% en los que intervienen machos silvestres resultan ineficaces (Kiik et al., 2013).

## 1.2 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL VISÓN EUROPEO

La información existente sobre la biología reproductiva del visón europeo es muy escasa, por lo que es necesario conocer las características de las especies cercanas filogenéticamente para poder analizar los resultados.

Los mustélidos (Familia Mustelidae) son reproductores estacionales de días largos. El fotoperiodo es el principal factor ambiental que regula el ciclo reproductivo a través de la melatonina, que es sintetizada y secretada por la glándula pineal durante los periodos de oscuridad diarios. El incremento del fotoperiodo desde el solsticio de invierno determina la disminución de la sensibilidad al feed-back negativo de los esteroides gonadales en el hipotálamo y la consecuente activación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal con el establecimiento del periodo reproductivo en la primavera. El aumento paulatino de la duración de las horas de luz diarias en enero y febrero determina la aparición de la actividad sexual en marzo en el hemisferio norte. Para que se produzca la correcta regulación del ciclo reproductivo anual se debe de dar una exposición a días cada vez más cortos (6-8 horas de luz al día) durante el otoño, seguida de la exposición a días cada vez más largos (más de 8 horas de iluminación), permitiendo la reactivación de la actividad de las gónadas en primavera. Con la llegada de los días largos en los que el fotoperiodo diario es al menos igual a 12 horas, la activación sexual se acelera: en los machos se produce crecimiento testicular y las hembras entran en periodo de celo al cabo de 3 semanas. Se ha demostrado que un cambio brusco en las condiciones de luz bloquea o incluso induce una regresión en el desarrollo sexual: reducción de tamaño testicular o atrofia folicular (Duby & Travis, 1972; Lindeberg et al., 2002).

Las especies con gestaciones cortas, como el visón europeo, comienzan su temporada de reproducción a principios de primavera (marzo-mayo) con un pico de actividad reproductiva observada en marzo-abril (Amstislavsky & Ternovskaya, 2000). En cambio, en el visón americano, especie con un periodo variable de diapausa embrionaria (Douglas et al., 1998; Fan et al., 2021), la época reproductiva únicamente



comprende desde finales de febrero a marzo y se alcanza el pico en este último mes. Hay que tener en cuenta que pese a lo que pudiera parecer por su apariencia física, el visón europeo y el americano, no se parecen en términos reproductivos. Diferenciándose en la duración de la gestación, o los periodos de celo y de cría (Amstislavsky & Ternovskaya, 2000; Sundqvist et al., 1988).

El visón europeo es una especie poliéstrica estacional, es decir, puede tener entre uno y cuatro celos, aunque una única ovulación durante una misma época reproductiva (Haage, 2016). El periodo reproductivo en cautividad se extiende de marzo a mayo, con un pico a final de abril (Amstislavsky, 2003). Pese a ser una especie solitaria, los machos y las hembras se vuelven sociables y se encuentran sólo durante la temporada de reproducción (Haage, 2016). La elección de pareja depende de las hembras; una hembra adulta de visón, cuando está en celo, puede rechazar al macho, incluso si es sexualmente maduro y está ansioso por copular. Pero la misma hembra puede aparearse inmediatamente con otro macho (Amstislavsky & Ternovskaya, 2000).

La mayoría de los mustélidos alcanzan la madurez sexual (pubertad) a los 8 – 12 meses después del nacimiento, el visón europeo la alcanza a los 9-10 meses (Amstislavsky & Ternovskaya, 2000).

### **1.2.1 Biología reproductiva del macho de visón europeo**

La información sobre el macho del visón europeo es escasa, por lo que muchas veces debemos de tener en cuenta información de especies cercanas. En el hurón doméstico (*Mustela putorius furo*), especie utilizada a menudo como modelo reproductivo del visón europeo, los testículos y las glándulas sexuales accesorias están en plena actividad de marzo a julio. Durante los meses de agosto, septiembre y octubre se produce la regresión testicular, coincidiendo con la disminución del fotoperiodo. Después de un período de inactividad, el incremento de la duración de horas de luz diarias que acontece desde el solsticio de invierno (diciembre) determina el crecimiento gradual de los testículos, el epidídimo, los conductos deferentes y, probablemente, también del pene (Allanson & Evans, 1997).

En el caso del visón americano (*Neogale vison*) ocurre lo mismo; en los meses que comprenden la época de junio a octubre no se encuentra actividad en las células de Leydig y las espermatogonias suponen las células germinales preponderantes. La



espermatogénesis se reanuda en noviembre, en este mes se pueden ver una o dos capas de espermatocitos primarios y espermatogonias activas (Sundqvist et al., 1988). A su vez, se produce un cambio en la estructura celular, durante la temporada de reproducción; se produce una elongación de las gónadas que está correlacionada con el incremento de la actividad espermatogénica y un aumento de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y testosterona (Blottner et al., 2006). Las células intersticiales de los testículos también experimentan cambios cíclicos a lo largo del año, son grandes y llenas de grasa en la época de cría, y pequeños, con poca grasa, durante el periodo de inactividad reproductiva (Allanson & Evans, 1997).

Es posible reconocer la fase de actividad sexual en la que se encuentra el animal *in vivo* por medio de la morfología de los testículos y por los niveles hormonales de testosterona y prolactina (Sundqvist et al., 1988).

En los mustélidos, los testículos experimentan un aumento de tamaño en su época reproductiva. El tamaño de los testículos comienza a incrementarse a finales de diciembre y alcanza su máximo en abril o junio dependiendo de la especie. El visón europeo lo alcanza en **abril**. Normalmente en agosto se empieza producir una regresión testicular que continúa hasta el mes de octubre (Wildt et al., 1989).

En el hurón doméstico, su longitud es alrededor de 10 mm en los meses de agosto-octubre; en esta etapa se encuentran en regresión. En febrero y marzo este tamaño empieza a incrementar considerablemente, siendo la media en febrero de alrededor de 15 mm y en marzo alrededor de 18 mm. El pico se alcanza en abril con 21 mm y en junio comienza la regresión hasta alcanzar el nivel mínimo en agosto (Neal et al., 1977).

Para evaluar la fertilidad del macho de **visón europeo** los testículos se deben medir con un pie de rey graduado en mm. Éstos deben de ir creciendo gradualmente en la primavera hasta alcanzar un tamaño aproximado de 18mm x 16 mm. Si los testículos no aumentan de tamaño, sobre todo en abril, indica un problema relacionado con la fertilidad (Foundation Lutreola, 2006). En el visón americano se considera que un testículo tiene hipoplasia cuando su medida es menor a 7 mm longitudinalmente (Sundqvist et al., 1986); esta medida no se ha establecido aún en el visón europeo, ni tampoco un seguimiento del tamaño testicular a lo largo de todo el ciclo.



Respecto a los niveles hormonales, nos centraremos en los niveles plasmáticos de testosterona y prolactina, los cuales son cíclicos a lo largo del año. En visión europeo aún no se ha establecido una medida de los niveles plasmáticos de testosterona a lo largo del ciclo, por lo que se deben tener en cuenta los datos recogidos de especies como el visón americano o el hurón doméstico.

Los niveles de testosterona plasmática en visón americano son máximos en los meses de invierno alcanzando un pico coincidente con el periodo de máximo desarrollo testicular (Sundqvist et al., 1988). Los valores son muy variables en diciembre con un rango de 0,23 a 23,39 ng/ml. En febrero, como era de esperar, los valores fueron más altos con una media de  $8,51 \pm 5,51$  ng/ml y un rango de 0,10 a 19,67 ng/ml. El límite de fertilidad ha sido establecido en 16 ng/ml. Los machos con valores inferiores a ese valor tienen un semen de peor calidad. Los visones americano con infertilidad primaria muestran niveles bajos de testosterona sérica y LH, mientras que los individuos fértiles poseen valores altos en febrero (Sundqvist et al., 1986). No obstante, estos rangos se deben considerar con cautela ya que pueden variar con el procedimiento de análisis (ELISA, RIA).

En el caso del hurón doméstico, las concentraciones de testosterona plasmática empiezan a aumentar a finales de enero. En la época de febrero a julio la media de concentración plasmática resultó ser mayor a 15 ng/ml, alcanzando picos de hasta 60 ng/ml en abril, mayo y junio, donde los valores son más altos (Neal et al., 1977). De agosto a diciembre las concentraciones plasmáticas de testosterona se mantienen a niveles basales ( $<0,5$  ng/ml) un nivel basal de 0,1 ng/ml durante el reposo (Neal et al., 1977; Fox & Marini, 2014).

Por otro lado, algunos estudios han estudiado la concentración de prolactina plasmática en visón americano; el perfil de secreción de esta hormona es paralelo al fotoperiodo, al igual que ocurre con otras especies de mamíferos, con concentraciones basales en el solsticio de invierno (diciembre) más altas en primavera y verano, es decir en los meses de abril a agosto, alcanzando su pico en el solsticio de verano (junio) (Sundqvist et al., 1988).

Teniendo en cuenta estos estudios realizados en hurón doméstico y visón americano y los periodos de su actividad reproductiva, esperaríamos concentraciones de testosterona

plasmática del visón europeo sean máximas en la época reproductiva con un posible pico en abril y niveles mínimos en los meses de agosto a noviembre.

## 1.2.2 Biología reproductiva en la hembra

### 1.2.2.1 Ciclo estral

El ciclo estral es el conjunto de modificaciones periódicas comportamentales, morfológicas, histológicas y fisiológicas que afectan a los genitales y las glándulas mamarias. Se divide en proestro, estro, metaestro y anestro. El estro corresponde al período de celo durante el cual la hembra acepta el apareamiento. El metaestro o diestro es la fase luteal caracterizada por la secreción de progesterona. El anestro corresponde a un tiempo de inactividad sexual. El proestro señala el periodo de reactivación de la actividad folicular del ovario y marca la reanudación de la actividad reproductiva.

Podemos clasificar el ciclo de los mustélidos en dos grupos. En aquellas especies que presentan un estro prolongado y si la cópula no se produce, la duración se extiende hasta 3 meses. Estas especies, como el hurón doméstico, tienen un solo celo y ovulación en su ciclo sexual anual y se denominan monoéstricas (Lidenberg, 2008). Y aquellas especies que pueden tener varios estros en su ciclo sexual, es decir, especies poliéstricas.

El caso del **visón europeo** tiene una peculiaridad, se trata de una especie **poliéstrica estacional**, las hembras pueden entrar en celo en un periodo de finales de marzo a principios de mayo (Amstislavsky et al., 2009). La duración es muy variable pudiendo prolongarse de 1 a 12 días. Si la hembra no copula con un macho puede entrar en un segundo o tercer celo entre 12 y 55 días después del primero (Amstislavsky, 2009; Fundation Lutreola, 2006).

Es posible detectar el periodo de estro en las hembras de visón europeo midiendo el tamaño de la vulva y analizando su comportamiento. Para ello, se recomienda empezar a medir la vulva el 15 de marzo; una vez que el tamaño de la vulva supera los 7 mm, la hembra ya puede ser expuesta al macho. La vulva puede alcanzar un tamaño máximo de 10 mm x 10 mm. Mientras que el tamaño de la vulva en la época de anestro es de 2 a 4

mm. En lo que se refiere al comportamiento, la hembra se vuelve menos tímida y más activa (Foundation Lutreola, 2006).



Figura 3. Vulva de visón europeo en estro.

Con relación a los niveles endocrinos, los niveles de estradiol aumentan en el estro y gestación, y se reducen cuando ha finalizado (Lindeberg, 2008). Se han reportado concentraciones de estrógenos fecales de  $36,4 \pm 1,8$  ng/g en la época del estro,  $130,2 \pm 8,3$  ng/g en la gestación,  $23,9 \pm 2,9$  ng/g en la lactancia y  $15,7 \pm 3,4$  ng/g el resto del año (Nagl et al., 2015).

Todas las especies de la familia Mustelidae presentan ovulación inducida. Este término indica que no se produce la ovulación a no ser que exista un apareamiento. El estímulo vaginal y el cérvix por el pene, durante el coito, provoca una descarga de LH y, en consecuencia, la ovulación (Lindeberg, 2008). Por lo tanto, esperaríamos que los niveles de progesterona plasmática se mantuvieran constantes en la época de inactividad reproductiva y aumenten tras la ovulación, siendo máximos en la gestación. Nagl et al (2015), realizaron una medición del metabolito fecal 20-oxo-pregnano, un metabolito de la progesterona, en el visón europeo obteniendo valores en la gestación de  $727,6 \pm 47,1$  ng/g, en la lactancia de  $372,1 \pm 18$  ng/g, en la época reproductiva (estro) de  $93,23 \pm 4,4$  ng/g. En el resto del año los valores resultaron ser de  $100,3 \pm 6,2$  ng/g.

En resumen, el ciclo anual que esperaríamos en el visón europeo según la información existente de especies cercanas y el mismo visón se muestra en la figura 4. La época de actividad sexual comprenderá los meses de marzo, abril y mayo siendo máxima en abril. En hembras, se esperaría que los niveles de progesterona se mantengan constantes en la fase de inactividad sexual al no haber ovulación y que fluctúe en función de los periodos de estro y la gestación. Mientras que, en el caso de los machos, se produciría una bajada de los niveles de testosterona y una regresión testicular que alcanzarían niveles mínimos agosto y se mantendrían en ese estado hasta noviembre; en esta fase los niveles de prolactina del visón americano alcanzan su máximo (junio-julio), así que podría darse el mismo escenario endocrino en el visón europeo. En noviembre comenzarán a activarse los órganos sexuales resultando en el crecimiento de los testículos y el aumento de los niveles de testosterona.

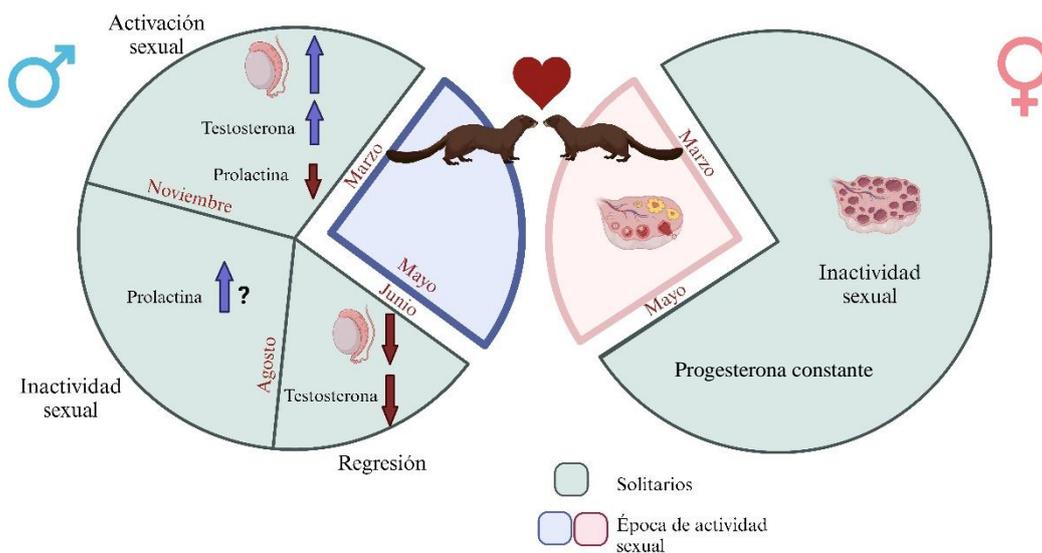


Figura 4. Resumen del ciclo reproductivo en machos y hembras que esperaríamos encontrar en relación a los niveles hormonales y cambios en los órganos sexuales. En la época de actividad sexual los testículos se encuentran en pleno funcionamiento y se reanuda la actividad folicular en hembras, en pausa el resto del año. También se expresan los cambios en los niveles hormonales de los machos según la fase en la que se encuentren, alcanzando el nivel mínimo de testosterona en agosto y máximos en la fase de actividad sexual. Imagen propia creada con [Biorender.com](https://biorender.com)

### 1.2.2.2 Apareamiento y gestación

El éxito del apareamiento depende en gran medida de la actitud del macho. El “cloqueo” del macho (sonido especial realizado para estimular a las hembras) antes del apareamiento es una condición necesaria para el desarrollo exitoso del coito. Además, los machos con mayor eficacia reproductiva expresan más signos de “flehmen”, “frotamiento” o “aproximación intencional” con las investigaciones olfativas. Estos



comportamientos inhiben la agresividad de la hembra. Cuando se ha producido la cópula, la hembra emite murmullos ligeros, suaves y agudos, similares a “chirridos”, en presencia del macho. La duración del coito puede variar entre 6 y 120 min. (Kneidinger et al., 2018). El macho se aferra a la espalda de la hembra, le muerde el cuello, mueve la pelvis hacia adelante y hacia atrás y finalmente inserta el pene después de unos minutos (Carroll et al., 1985).

En el primer día post-coito se pueden encontrar en el ovario folículos preovulatorios completamente desarrollados, fosas de ovulación recientes y cuerpos lúteos tempranos (Amstislavsky, Kizilova, et al., 2006).

El intervalo entre la cópula y la ovulación suele ser largo. En el hurón doméstico se estima que la ovulación se produce de 30 – 40 horas después del coito (Carroll et al., 1985) y libera una media de 12 ovocitos, con un rango de 5 -13 (Lindeberg, 2008). Los ovocitos del hurón doméstico son fecundados aproximadamente 12 horas después de la ovulación. Los ovocitos que no son fecundados degeneran (Lindeberg, 2008).

En el visón europeo la ovulación se produce entre 24 – 48 horas tras el coito (Amstislavsky, Kizilova, et al., 2006). Por lo tanto, el tiempo de supervivencia de los espermatozoides tiene que ser alto para que se produzca la correcta fecundación, se ha visto que en hurón, los espermatozoides permanecen viables 136 horas en el tracto femenino (Chang, 1965).

Tanto en el visón europeo como en el hurón doméstico no existen evidencias que confirmen la existencia de diapausa embrionaria, proceso común en otras especies de mustélidos en el que la gestación se encuentra detenida en estado de blastocisto, antes de la implantación durante un periodo de tiempo prolongado (Murphy & Fenelon, 2020). La evolución de los perfiles hormonales también lo confirman (Nagl et al., 2015).

En cambio, en el visón americano sí que existe diapausa embrionaria constituyendo una importante diferenciación reproductiva con el visón europeo. La implantación del embrión coincide con una fuerte luteogénesis en el ovario y el pico más alto de progesterona en la gestación (Sundqvist et al., 1988)

En mustélidos se describen 3 tipos de gestación. Especies como el **visón europeo**, poseen un tipo de gestación **corta y constante**. La gestación se prolonga 42 días

(Fundación Luterola, 2006). Los partos se producen entre abril y mayo. Nacen entre 2 y 7 crías, aunque lo común son de 3 a 6. Cuando nacen son ciegas y sin pelo (Moshonkin, 1981, 1983). Se amamantan hasta los 30 días. En septiembre, los jóvenes se independizan y a los 9-10 meses alcanzan la madurez sexual (Maran y Robinson, 1996).

El visón americano pertenece a otro tipo de gestación. En esta especie el periodo de gestación es corta y muy variable. El periodo de gestación depende en gran medida de la fecha de apareamiento; los apareamientos a final de temporada tienen un periodo de gestación más corto. La duración media es de 51 días, aunque también puede verse afectada por la temperatura, edad de la hembra o el fotoperiodo. Los partos ocurren entre la última semana de abril y mediados de mayo con una media de 5 crías (Sundqvist et al., 1988).

Por último, en especies como el armiño y la marta, el desarrollo del embrión incluye una fase obligatoria de diapausa, por lo que la gestación es más larga, de 7 a 10 meses. El pico de la temporada de reproducción en estas especies ocurre generalmente en verano, y dan a luz en la siguiente primavera (Amstislavsky & Ternovskaya, 2000).

Una de las preocupaciones que surgió tras la introducción del visón americano en Europa, era su posible hibridación con el visón europeo. Sin embargo, hoy en día no parece ser el caso. Como hemos visto, la biología reproductiva de estas dos especies se diferencia tanto en los periodos de temporada de cría como en el tipo de gestación



Figura 5. Comparación entre visón europeo (izq) y visón americano (dcha). Se puede apreciar la ausencia de mancha blanca en el labio superior del visón americano. Atribuciones imagen visón europeo: FIEB (<https://www.fiebfoundation.org/>) Atribuciones imagen visón americano. Autor: Kyle Tansley, imagen obtenida de: inaturalist (<https://spain.inaturalist.org/photos/28838764>) bajo la licencia creative commons (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

(Amstislavsky & Ternovskaya, 2000). En aquellos casos en los que se produce cópula entre las dos especies de visones, no se produce descendencia. Los machos de visón americano son de mayor tamaño y comienzan la pubertad antes que el visón europeo, por lo que pueden producirse cópulas entre estos y hembras de visón europeo. Sin embargo, el mayor problema de estas cópulas es el rechazo de las hembras a los machos de visón europeo, impidiendo su reproducción y, por tanto, desplazándolos. No obstante, estas cópulas no se han visto en la naturaleza y nunca dan lugar a nacimientos (Hammershøj, 2004).

### 1.3 TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS

Las técnicas de reproducción asistida tienen como objetivo mantener la diversidad genética, preservar la salud y promover la reproducción en especies en peligro de extinción. Algunas de las técnicas que se usan en la familia Mustelidae son: inseminación artificial, criopreservación de embriones y de semen, implementación de marcadores no invasivos y transferencia de embriones.

#### 1.3.1 Recogida de material espermático, criopreservación e inseminación artificial

La cría en cautividad de visón europeo supone un desafío debido a que la mayoría de los intentos de cópula natural muchas veces no se dan lugar debido, en la mayoría de los casos, a la falta de intención por parte del macho. Una buena alternativa para la cría en cautividad es la inseminación artificial.

La recogida de semen se suele realizar por medio de la técnica de **electroejaculación**. Consiste en estimular las estructuras nerviosas que modulan la eyaculación mediante una sonda transrectal y la aplicación de estímulos eléctricos de variable intensidad. La mayoría de los protocolos usados en mustélidos se basan en los diseñados por Wildt et al. (1989) y requieren de anestesia y varios ciclos de estímulos eléctricos (Toledano-Díaz et al., 2021). Para la puesta a punto de técnicas de obtención de semen en el visón europeo se ha utilizado como modelo el hurón doméstico (*Mustela putorius*). La combinación del masaje rectal con estímulos eléctricos parece que reduce la cantidad estímulos necesarios (Toledano-Díaz et al., 2021). En toros, se han desarrollado protocolos que reducen el número de estímulos eléctricos requeridos

mediante la aplicación de un masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias que inducen estímulos adrenérgicos que favorecerían la eyaculación (Palmer et al., 2004).

No se encontró descenso en la calidad del semen usando la electroeyaculación ni en hurón (Shump et al., 1977), ni en visón americano (Aulerich et al., 1972). Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha muestran que en el visón europeo la electroeyaculación no parece ser tan efectiva y muchos de los eyaculados son de baja calidad (Amstislavsky et al., 2008). Un estudio comparativo entre visón europeo y visón americano (Maskudov & Katchanovsky, 2003) reveló que el volumen seminal obtenido era inferior en el visón europeo (45  $\mu$ L) que en el americano (200  $\mu$ L), pero no se detectaron diferencias en la concentración (37 millones espermatozoides/mL y 20 millones espermatozoides/mL, en europeo y americano, respectivamente) ni en la motilidad que se mantuvo en rangos del 30-80%.

La obtención de espermatozoides epididimarios postmortem y su posterior congelación representa una opción útil de preservación del material genético de ejemplares de especies amenazadas después de la muerte. Diferentes técnicas han sido desarrolladas en distintas especies de mamíferos con buenos resultados de viabilidad tras la descongelación (O'Brien et al., 2019) y de fertilidad mediante su uso en inseminación artificial (Santiago-Moreno et al., 2006). Recientes estudios han apuntado que los espermatozoides epididimarios responden mejor a los procesos de criopreservación que los eyaculados. Diferentes factores, tales como la menor dimensión de la cabeza espermática en los epididimarios parece tener un papel relevante en esta mayor crioresistencia (Cerdeira Lozano et al., 2022; O'Brien et al., 2019). No existen datos en la bibliografía habitual sobre el desarrollo de estas técnicas en espermatozoides de visones, así como de sus características morfológicas.

Con relación a la inseminación artificial, la técnica más efectiva en mustélidos es la inseminación artificial intrauterina por **laparoscopia**. Mientras que la inseminación vaginal no resulta tan efectiva en el hurón doméstico. El 70,8 % de las inseminaciones intrauterinas resultaron en gestación (Howard & Wildt, 2009). Por otro lado, los trabajos utilizando la inseminación vaginal resultaron inefectivos (Kidder et al., 1998). En el turón de patas negras se consiguió un 50, 40 y 20% utilizando la inseminación artificial



intrauterina laparoscópica con semen congelado en tres años diferentes (Howard et al., 2016).

Tanto en turón como hurón la inseminación solo fue efectiva en aquellas hembras que habían sido tratadas con hCG (entre 90 – 100 UI). El momento óptimo para la inseminación son 6 horas antes de la ovulación, considerando que la ovulación se produce 30 horas después de la administración de hCG, la deposición de semen se debe hacer 24 horas después de la administración de hCG. En aquellos casos que se administró de manera simultánea a la inseminación artificial resultaron ser menos exitosos que si se administra 24 horas antes (Chang, 1965; J. G. Howard et al., 2016; Kidder et al., 1998).

Uno de los problemas de la cría en cautividad, es que la mayoría de los centros tienen pocos individuos que puedan actuar como parentales y esto resulta en problemas de endogamia y pérdida de diversidad genética. Una solución para este problema es mediante la congelación de semen y ovocitos almacenados en “criobancos de germoplasma”. De esta manera se puede preservar la variabilidad genética (Calle & Ramírez, 2022).

Han sido desarrollados métodos de congelación de semen tanto en el hurón doméstico como en el turón estepario (*Mustela eversmannii*), consiguiendo resultados de calidad espermática parecidos a los obtenidos con semen fresco (Howard et al., 2002; Howard et al., 1991). Sin embargo, con el turón patinegro (*Mustela nigripes*) no se obtuvieron tan buenos resultados (Howard et al., 2002). En hurón, el método de velocidad de congelación acelerada (de 5 a -10°C a 5°C/min, y luego de -10 a -130°C a 60°C/min) se asoció con mejores valores de viabilidad e integridad acrosómica del espermatozoide después de la descongelación, frente a un protocolo de congelación de tres pasos (de 5 a -35°C a 40°C/min, luego de -35 a -65°C a 17°C/min, y finalmente de -65 a -85°C a 3°C/min) (Toledano-Díaz et al., 2021). Resultados similares se han obtenido con otras especies de animales utilizando esta rampa de congelación, como en el morueco (Galarza et al., 2019).

### 1.3.2 Recogida, transferencia y criopreservación de embriones

La transferencia de embriones es un método común en los programas de conservación *ex situ* de especies en peligro. Es habitual en equinos y en bovinos, pero en carnívoros solo suele usarse en felinos. Cuando se usan híbridos de dos especies como

recipientes de los embriones, la tasa de éxito suele ser de 40-50% (Amstislavsky, et al., 2006).

En la familia Mustelidae la transferencia de embriones en diferentes especies (transferencia heteróloga) no ha dado lugar a crías vivas. Sin embargo, sí que se han conseguido nacimientos al transferir el embrión en receptoras híbridas o en casos de transferencias intraespecíficas en hurón doméstico y turón europeo (Amstislavsky et al., 2004). En el caso del visón europeo, los híbridos se denominan “honoriks” si provienen del cruce entre una hembra de visón europeo y macho de turón europeo. El híbrido reverso se denomina “nohorik”.

La recogida y transferencia de embriones de visón europeo a receptoras híbridas se realiza mediante el lavado quirúrgico de blastocitos del útero de donantes y su posterior transferencia quirúrgica a receptoras híbridas pseudogestantes (Amstislavsky et al., 2004). Este estado es inducido gracias al cruce con machos estériles. Se ha comprobado que los “honoriks” machos son estériles (Amstislavsky, et al., 2006). El procedimiento de transferencia implica el uso de cánulas para insertar los embriones en los cuernos uterinos de las receptoras, y cada hembra debe recibir de 5 a 8 embriones debido a que se ha demostrado que si solo se transfieren dos embriones los resultados son mucho peores (Amstislavsky et al., 2004; Amstislavsky et al., 2006)

### **1.3.3 Criopreservación de ovocitos, embriones y células somáticas**

Los ovocitos inmaduros son sensibles a los procedimientos de congelación. Actualmente, no existen protocolos estandarizados para congelar y descongelar ovocitos en la mayoría de las especies. Sin embargo, sí que es posible congelar los complejos cúmulo-ovocitos (COCs) en algunas especies caninas o bovinas, por ejemplo (Hardin et al., 2014; Somoskői et al., 2023). Un estudio reciente ha conseguido congelar estos complejos con éxito en el visón europeo. Esta posibilidad permite el desarrollo de tecnologías de reproducción asistida para la conservación del visón europeo como fecundación *in vitro* o ICSI (Calle & Ramírez, 2022).

Otra alternativa es la preservación de células somáticas mesenquimales. Este tipo de células se pueden reprogramar para obtener células madre pluripotentes inducidas a partir de las cuales se pueden conseguir gametos. Se pueden aislar células mesenquimales

*in vitro* de visón europeos a partir de tejidos como la médula ósea, la mucosa oral, el tejido cutáneo dérmico, el oviducto, endometrio, tejido estromal testicular y tejido adiposo subcutáneo y ovárico (Calle & Ramírez, 2022).

### 1.3.4 Monitorización no invasiva de la actividad reproductiva

En muchas ocasiones el seguimiento del ciclo reproductivo de los individuos conlleva el manejo de los animales, pudiendo llegar a ser perjudicial para los programas de conservación *ex situ* debido al estrés provocado.

El análisis de metabolitos hormonales en heces permite realizar el monitoreo de parámetros hormonales sin alterarles más de lo necesario. Algunas de las aplicaciones podrían ser identificación de problemas reproductivos, diagnóstico de gestación o detección del estado de celo (Nagl et al., 2015). Se utiliza como apoyo en programas de cría de mustélidos como la nutria de mar o el turón de patas negras. En ambas especies se consiguió correlacionar los niveles de estradiol fecales con las distintas fases del ciclo reproductivo (Larson et al., 2003; Young et al., 2001).

En el caso del visón europeo, no se ha podido desarrollar un marcador hormonal para identificar la fase del ciclo en la que se encuentran las hembras, aunque sí que hay aproximaciones. A día de hoy, el método más efectivo para detectar el estro es la citología vaginal, ya que no se ha encontrado relación entre los niveles de estradiol y los cambios correspondientes en las células vaginales (Nagl et al., 2015). Aun así, los picos de metabolitos de progesterona fecal se pueden correlacionar con la supuesta entrada en celo, la ausencia de cópula y la gestación. Metabolitos de 20-oxo-pregnano se pueden usar para detectar la gestación, ya que aumentan a partir de la tercera semana (Nagl et al., 2015; Ortiz-Jiménez et al., 2024). Un hallazgo importante es que parece que la manipulación correspondiente a la detección del celo por citología vaginal no supone un efecto negativo por estrés que pueda afectar a la cría en cautividad (Ortiz-Jiménez et al., 2024).

En el caso de los machos, niveles altos de metabolitos de testosterona fecal se relacionan con semen de calidad en nutrias de río (Bateman et al., 2009); en visón europeo aún no se han evaluado los niveles de testosterona fecal.

## 2 OBJETIVOS

---

Como ya hemos mencionado, la dificultad en la cría en cautividad del visón europeo supone un gran hándicap en la recuperación de la especie. A día de hoy, los motivos por los que los machos criados en cautividad se comportan de manera diferente a los de campo son una incógnita que se encuentra bajo estudio. Aumentar la información conocida de esta especie es crucial para responder a las preguntas que se plantean.

El objetivo general del proyecto es profundizar en los conocimientos de biología reproductiva del visón europeo, escasa actualmente, y optimizar técnicas de reproducción asistida para poder afrontar los problemas de la reproducción *ex situ* que presentan y mejorar los resultados de la cría en cautividad.

Los objetivos específicos de este estudio son:

- Evaluar la actividad reproductiva mediante métodos no invasivos: análisis de metabolitos hormonales en heces. Así como su aplicación como elemento auxiliar a la hora de realizar inseminación artificial.
- Optimizar la técnica de obtención seminal mediante masaje transrectal y electroeyaculación.
- Implementar un procedimiento eficaz de inseminación artificial vaginal.
- Realizar un primer estudio de las características morfométricas de los espermatozoides.

## 3 MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 3.1 ANIMALES

Los animales utilizados para este estudio se encuentran ubicados en el Centro de Cría en cautividad y Estudio del visón europeo de la Fundación para la Investigación en Etología y Biodiversidad (FIEB), Casarrubios del Monte, Toledo, España. El centro dispone de 15 machos y 13 hembras.

Para realizar la inseminación artificial, las hembras fueron seleccionadas según el valor genético y la edad, utilizándose aquellas de menor relevancia genética y de edades distintas. Para la recogida de semen se utilizaron los machos que mejor se adaptaban a las hembras escogidas.

Por otro lado, se recogieron muestras del epidídimo de 8 individuos fallecidos. Se utilizaron los testículos de un individuo fallecido durante la realización de este estudio para criopreservar y detectar viabilidad tras congelación lenta. Los testículos fueron transportados junto con el saco escrotal en una nevera a 5°C.

### 3.2 MONITORIZACIÓN NO INVASIVA EN HECES

Se recogieron heces de todos los animales instalados en FIEB (15 machos y 13 hembras). El periodo de recogida comenzó en enero, produciéndose una vez cada quince días, y finalizó en abril.

Los protocolos de extracción de metabolitos hormonales en heces de este estudio están basados en el protocolo de extracción utilizado por Palme et al. (2013). En la extracción de dihidroxitestosterona (DHT) se utilizaron heces húmedas mientras que en la extracción de metabolitos de progesterona y estrógenos se utilizaron heces secas. Según Palme, no hay diferencia entre los dos protocolos, pero, si las heces contienen restos no digeridos, es preferible secar las heces antes de comenzar la extracción.

#### 3.2.1 Dihidroxitestosterona (DHT)

Este análisis se realizó con heces procedentes de machos, un total de 82 muestras de heces, siendo recogidas cada 15 días, empezando el 15 de enero de 2024 y terminando el 1 de abril de 2024. Los pasos a seguir para la extracción fueron:

- 1) Homogenización de las heces mediante un mortero en bolsas individuales hasta que queden bien trituradas.
- 2) Pesaje de 0,5 g en balanza de precisión y añadirlas a un tubo de ensayo Falcon de 15 ml.
- 3) Resuspensión en 5 ml de metanol (80%) y agitación 30 min. Para asegurar una correcta homogenización se realizó una agitación mediante vórtex cada 10 min.
- 4) Centrifugación a 3000 rpm durante 15 min.
- 5) Separación del sobrenadante y almacenamiento a -20°C.

Una vez realizada la extracción, se procedió a preparar y diluir la muestra para su análisis:

- 6) Transferencia de 50 µl del sobrenadante a un tubo de polipropileno y evaporación a 37°C bajo corriente de aire.
- 7) Resuspender con 200 µL de buffer fosfato (dilución de la muestra, 1:4).

Tras diluir la muestra se realiza una prueba ELISA mediante el kit comercial: Abebio® sheep DHT ELISA KIT (número de catálogo: AE47271SH). No se ha observado reacción cruzada con análogos de la DHT que puedan interferir. El protocolo del test ELISA se realizó siguiendo las indicaciones del kit. Se utilizó el programa recomendado por el kit, CurveExpert 1.4 (Hyams, 2010) para convertir los valores de absorbancia en concentraciones de DHT (ng/ml); para ello se utilizó una función un modelo de regresión Morgan-Mecer-Flodin (MMF). Por último, se convirtieron los resultados obtenidos a ng/g.

### 3.2.2 Metabolitos de Progesterona y Estrógenos

En el caso de las hembras hemos utilizado 82 muestras de heces pertenecientes a 6 animales (Soliedra, Saja, Sáseta, Revilla, Pineda y Singra). A tres de ellas se les realizó inseminación artificial y las restantes tuvieron cópula natural. Se recogieron muestras antes de la cópula/inseminación cada 15 días empezando el 15 de enero. Y dos veces a la semana tras producirse la “fecundación”.

Las muestras obtenidas se secaron en estufa a 50°C durante 24 horas. Una vez secas:

- 1) Trituramos las muestras para homogenización de la distribución hormonal y añadimos 200 mg en tubos de vidrio 12 x 100.
- 2) En cada tubo se añaden 2 mL de metanol 80%.
- 3) Sellado de los tubos con parafilm y agitación durante 30min.
- 4) Centrifugación a 4°C durante 15 min a 4500 r.p.m
- 5) Recogida del sobrenadante y almacenamiento en el congelador a -20 °C.

- 6) Transferencia de 10 µl del sobrenadante a un tubo de polipropileno y evaporación a 37°C bajo corriente de aire.
- 7) Resuspender con 100 µL de buffer fosfato (dilución de la muestra, 1:10).

Con las muestras ya diluidas, se procedió a realizar una prueba ELISA de estrógenos y otra de metabolitos de progesterona. Para ellos usamos dos kits comerciales; para los metabolitos de progesterona usamos el kit: DetectX® Progesterone metabolites Enzyme Immunoassay Kit (número de catálogo: K068-H1). Para el análisis de estrógenos usamos el kit: FineTest® ES(Estrogen) ELISA Kit (código: EU0202), no existe reacción cruzada obvia con análogos. Los protocolos de los test ELISA se realizaron siguiendo las indicaciones de los kit. Para realizar la conversión de los valores de absorbancia a ng/g se utilizó el mismo procedimiento que con la DHT.

### 3.3 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

#### 3.3.1 Examinación de la Vulva y Citología Vaginal en Hembras

Durante el mes de marzo y abril, se examinó periódicamente la vulva de las hembras para determinar si se encontraban en estro.

Se definen 5 estadios según el tamaño de la vulva. Un valor de 1 se determina cuando es prácticamente imposible distinguir la vulva, mientras que, en un valor de 5, la vulva tendría un tamaño mayor o igual a 7 mm y un color rosado, lo que indicaría que la hembra está lista para el coito (Foundation Lutreola, 2006).

A modo de confirmación, se realizaron citologías vaginales cuando la hembra se encontraba en el nivel 3, 4 o 5. La citología se realizó a través de un frotis vaginal que se tiñó con la tinción Diff-Quick®, una variante comercial de la tinción de Romanowsk. Esta tinción se basa en tres soluciones (se bañaron las muestras 20'' en cada una): una solución fijadora, tinción I eosinófila y tinción II

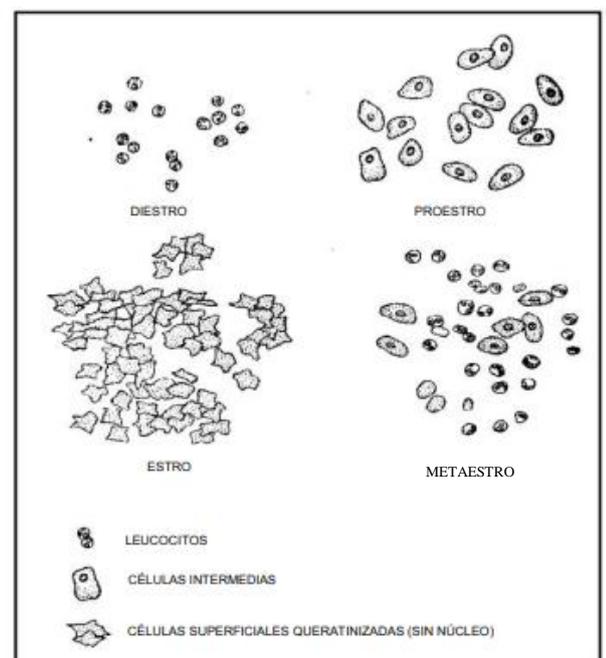


Figura 6. Guía para determinar el estado del ciclo estral en el que se encuentra la hembra. En la fase de estro no se distinguirán apenas leucocitos y células intermedias. Fuente: Foundation Lutreola, 2006

basófila. Una vez realizada la tinción, se procedió a realizar un conteo de las células epiteliales cornificadas (Figura 6). Cuando este tipo de células alcanza el 80%, se considera que la hembra se encuentra en fase de estro (Foundation Lutreola, 2006). En este momento, se procedía a administrar hCG para realizar inseminación artificial a las 24h.

### 3.3.2 Inseminación artificial

La inducción de la ovulación se realizó mediante la administración de 90 UI intramuscular (i. m.) de hCG (Veterin Corion).

El día de la inseminación, el animal fue anestesiado por medio de cámara de inducción con isoflurano.

La inseminación artificial (IA) se realizó mediante endoscopia (broncoscopio flexible de ST-Endoscopia 8L 60 cm, Ø 5.2 mm, canal 2.6 mm) utilizando cánula cónica 2 lumen (ST-Endoscopia NS/NL 22353897) .

El visón se colocaba en posición decúbito esternal, con la pelvis levantada. El endoscopio se introducía a través de la vagina y se depositaba el semen a través del catéter al visualizar el cuello uterino. La inyección de aire con jeringa de 20 ml puede ser necesaria para separar las paredes vaginales y permitir una mejor visualización de las estructuras genitales y una mayor comodidad. La inseminación fue intravaginal profunda, pero no llegó a ser transcervical.



Figura 7. Ejemplo de inseminación artificial (izq) y posición cúbito supino para evitar el reflujó seminal (dcha).

Tras la deposición del semen, se mantuvo a las hembras en posición cúbito supino con los miembros inferiores elevados durante 5 minutos para evitar el posible reflujo del líquido seminal. En la Tabla 1 se describen las hembras inseminadas.

HEMBRA	FECHA	EDAD(años)	PESO(g)	DESCENDENCIA	
				ANTERIOR	SEMEN
Revilla	03/04/2024	2	-	SI	Otazu
Pineda	03/04/2024	4	-	SI	Otazu
Saja	12/04/2024	1	638	NO	Serón
Querabs	12/04/2024	3	775	NO	Serón
Navas	12/04/2024	6	592	SI	Sigur
Ondarroa	12/04/2024	5	675	SI	Sigur
Oria	30/04/2024	5	663	SI	Roger
Quintanilla	30/04/2024	3	662	SI	Sotés

Tabla 1. Datos de interés de las hembras a inseminar, así como el macho del que procede el líquido seminal.

### 3.3.3 Recogida de semen

En el mismo día en que se realizaba la IA, se procedía a la recogida de semen mediante electroyaculación y masaje transrectal (Toledano-Díaz et al., 2021).

La inducción anestésica se realizaba mediante cámara de inducción (Figura 8) con isoflurano. Posteriormente, se administraba medetomidina 0,08 mg/kg i.m. (0,08 ml Domtor); la administración de este anestésico agonista alfa-adrenérgico favorece la contracción del tracto genital y, por tanto, la eyaculación. Tras la anestesia se procedía a pesar al animal y medir el diámetro de ambos testículos mediante un calibrador vernier.



Figura 8. Cámara de isoflurano utilizada para realizar la inducción anestésica del animal.

Tras la anestesia, se procedió a la exteriorización del pene y lavado con una solución TCG (Tris 313.7 mM, ácido cítrico 104.7 mM y glucosa 30.3 mM; 345 mOsm/kg; pH 6.8). Previamente a la aplicación de la electroeyaculación, se realizaba un enema con 10 ml de suero fisiológico a 37°C. Se utilizó un electro eyaculador PTE Model 304 electroejaculador (P-T Electronics, Sandy, OR, USA), con una sonda de 4 mm de diámetro que se introducía vía rectal con el visón dispuesto en decúbito supino (Figura 9) Para



Figura 9. Ejemplo de colocación del tubo colector y sonda rectal (izq), y vista más general del procedimiento (dcha).

mejorar la conductividad, el electrodo se recubría con gel de ecografía (carboximetilcelulosa).

Al no obtenerse muestras de buena calidad y requerirse gran cantidad de estímulos eléctricos en los primeros procedimientos, tras dos procedimientos realizados se decidió administrar 0,02 mL Facilpart® (0,24 UI de oxitocina) tras la inyección de la medetomidina.

Se emplearon dos protocolos en función de la respuesta del animal a los estímulos eléctricos, con diferentes ciclos y series de estimulación eléctrica. Esta respuesta era valorada por el veterinario al cargo en función de las contracciones de los miembros posteriores. La diferencia entre los protocolos radica en el voltaje utilizado y en las repeticiones de las series. En los animales con una mala respuesta se aplica hasta un máximo de 10 V. En todos los casos, las estimulación eléctrica se alternaba con un periodo de suave masaje transrectal aplicado con el propio electrodo; este masaje se definen en las tablas como TUMASG, en referencia al método de masaje transrectal



desarrollado por el Grupo de Fisiología y Tecnologías Reproductivas del INIA\_CSIC en otras especies (Santiago-Moreno et al., 2013).

### Protocolo 1

<i>Serie 1</i>
10 estímulos 2V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 3V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 4V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 4V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 4V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 4V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 4V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
3 minutos descanso
<i>Serie 2</i>
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
3 minutos descanso
<i>Serie 3 (se repite 4 veces)</i>
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
3 minutos descanso
<i>Serie 4</i>
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG



10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG

## Protocolo 2

<i>Serie 1</i>
10 estímulos 2V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 3V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 4V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 5V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 6V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
<i>Serie 2</i>
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 7V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
3 minutos descanso
<i>Serie 3 (se repite 2 veces)</i>
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 8V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
3 minutos descanso

<i>Serie 4 (se repite 2 veces)</i>
10 estímulos 10V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 10V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 10V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 10V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 10V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 10V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG
10 estímulos 10V de 4 segundos separados por 2 segundos – 10 segundos TUMASG

Finalizados los ciclos, si no se ha obtenido muestra o ésta fue deficiente, se realizaba un sondaje uretral (con catéter intravenoso) y se ejercía una pequeña presión sobre la vejiga. Esta maniobra permite obtener muestra seminal que, aunque contaminada con orina, tras su lavado, permitía la obtención de espermatozoides funcionales de buena calidad. El lavado consiste en una dilución 1:1 (v:v) con una solución TTG (TES 210.6 mM, Tris 95.8 mM, glucosa 10.1 mM), centrifugación a 4000 rpm (~1000 g). El pellet era, finalmente, reconstituido con 200 µL TTG+20% yema huevo.

	DURACIÓN(min)	OXITOCINA(UI)	PROTOCOLO
Rubén	37	NO	2
Ricardo	62	NO	1
Otazu	55	NO	2
Serón	42	0,24	1
Sigur	22	0,24	2
Roger	40	0,24	1
Soto	40	0,24	1
Sotés	30	0,24	1

Tabla 2. Resumen del procedimiento usado en cada macho: duración total de la intervención, uso de oxitocina y protocolo utilizado.

### 3.4 VIABILIDAD TRAS LA CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO TESTICULAR

Se criopreservó mediante el procedimiento de congelación lenta (Peris-Frau et al., 2023) tejido testicular del visón identificado como Pont, que fue hallado muerto en las instalaciones de FIEB por causa de una neumonía.

Los testículos se procesaron separando el epidídimo del resto del testículo y se sumergen en medio de mantenimiento (Medium 199). Se eliminaba la túnica albugínea mediante bisturí. Se cortaron piezas de 1 x 0,5 x 0,1 cm. Una vez cortadas las piezas, se mantienen en una placa Petri con el medio de mantenimiento y se procede a la preparación de los medios necesarios para la congelación y disgregación celular. Se reservaban dos de los fragmentos tisulares para realizar disgregación celular, mientras que el resto se congelaba.

Los medios necesarios para la congelación lenta son medio de lavado y de congelación.

El medio de lavado contiene:

- 6 ml de suero fetal bovino (SFB)
- 24 ml de medio basal avanzado (DMEM/F12)

El medio de congelación se compone de:

- 2,4 ml de SFB
- 7,2 ml de DMEM/F12
- 2,4 ml de dimetilsulfóxido (DMSO)

Con los medios ya preparados, se añaden 5 ml de medio de lavado en 3 placas Petri pequeñas y 5 ml de medio de congelación en otra placa del mismo tamaño. A continuación, se añadía hielo en una placa de Petri grande y se cerraba; esta placa se utilizaría como soporte para realizar el resto del procedimiento sobre frío.

Se realizaban tres lavados consecutivos de 30 s con medio de lavado, y una vez se alcanzaba la última placa de lavado, se disponían en la placa con medio de congelación y se mantenían durante 5 min. En este tiempo se añadía 1 ml de medio de congelación por criotubo. En cada criotubo se disponían 3 fragmentos, una vez pasados los 5 min, y se colocaban en un contenedor CoolCell®. El contenedor se transfería a un congelador a -80°C durante 24 horas. Esta unidad está diseñada para proporcionar una velocidad de



congelación de 1°C/min. Pasadas las 24 horas, se retiran de la unidad y se sumergen en nitrógeno líquido donde se almacenan (-196°C).

Para la descongelación, los criotubos se sometían a un baño de 37°C durante 1 minuto (Chatdarong et al., 2016).

Acto seguido se recogía todo el tejido del criotubo y se pasaba, de manera progresiva, por 3 baños de DMEM F-12 al 20% de SFB con concentraciones decrecientes de DMSO (para eliminar los crioprotectores):

- Placa con DMEM F-12(20% SFB) - DMSO 1M, 5 minutos a T ambiente.
- Placa con DMEM F-12(20% SFB) - DMSO 0,5M, 5 minutos a T ambiente.
- Placa con DMEM F-12(20% SFB) - sin DMSO, 5 minutos a T ambiente (Oblette et al., 2019).

Tanto en el tejido fresco, como en el tejido descongelado se le realizó disgregación celular para poder determinar la viabilidad. Los medios necesarios son: DEMEM F-12 al 10% SFB (0,5 ml SFB + 5,5 ml DMEM F-12), colagenasa IV (2 ml DMEM F-12 y 14 mg de colagenasa IV) y tripsina/EDTA al 0,25%. El protocolo de disgregación y evaluación se describe a continuación.

Se pone una placa de Petri pequeña con el medio colagenasa IV en una placa calefactora a 37°C.

Los trozos de tejido fresco o procedentes de los criotubos se pasan a esta placa durante 40 min para disgregarlo. Con ayuda de tijeras y bisturí se disgrega el tejido tanto como sea posible. Cada 5 min se mezcla con una punta de pipeta recortada, a medida que se avanza en el procedimiento, se va usando puntas cada vez menos recortadas hasta dejarla sin recortar.

Se pasan los 2 ml de medio de colagenasa a un tubo eppendorf de 2 ml. Se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 5 min y se elimina el sobrenadante, se resuspende en 1 ml de DMEM F-12, se vuelve a centrifugar a 4000 r.p.m. durante 5 min y se elimina el sobrenadante. El pellet se resuspende en 1 ml de tripsina /EDTA al 0,25 % y se deja actuar 5 min a 37%. Una vez pasado el tiempo se para la reacción con 1 ml de DMEM F-12 al 10 %, se centrifuga de nuevo a 4000 r.p.m durante 5 min, se elimina el sobrenadante y se resuspende en 50 µl de DMEM F-12 al 10%. Se ponen 10 µl en un eppenndorf de 1,5 ml.

Se añaden 2 µl de SYBR-14, y se incuba 5 min en la nevera. A continuación, se añade 1 µl de ioduro de propidio y se vuelve a incubar 5 min en nevera.

Por último, se añaden 5 µl en un portaobjetos y se miran al microscopio de fluorescencia con el objetivo de contar 100 células redondas (espermatogonias, espermocitos y espermátidas) y 100 espermatozoides (se incluyen en este grupo espermátidas elongadas y espermatozoides).

### 3.5 ANÁLISIS ESPERMÁTICOS: MORFOMETRÍA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA

Se realizaron frotis del material espermático obtenido mediante electroeyaculación, según el procedimiento descrito previamente, así como de espermatozoides epididimarios obtenidos postmortem en 8 ejemplares, según la técnica de cortes/flushing descrita por Santiago-Moreno et al, (2009). Se tiñeron con la tinción comercial Hemacolor® siguiendo el siguiente protocolo: 1º- Solución fijadora 2 minutos, 2º- Solución 1 (*red*) 2 minutos, 3º- Solución 2 (*blue*) 2 minutos. Se utilizó el sistema computarizado de imagen CASA-Morph, utilizando el módulo Morfometría del programa Sperm Class Analysis (Microptic S.L., Barcelona, España) para estudiar la longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza del espermatozoide (Esteso et al., 2015).



Figura 10. Ejemplo de análisis morfológico de un espermatozoide de visión.



### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar el efecto del tratamiento con oxitocina antes de realizar el proceso de electroeyaculación, en la eficacia del procedimiento se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis; se evaluó su efecto en el tiempo hasta primera eyaculación, número de estímulos eléctricos, número de fracciones de eyaculados, volumen del eyaculado y motilidad de los espermatozoides. A su vez, se realizó el mismo análisis para determinar si había diferencias en el área, longitud, perímetro y anchura de la cabeza de los espermatozoides del epidídimo y seminales. El test no paramétrico de Wilcoxon se utilizó para determinar las diferencias significativas entre las concentraciones de DHT entre el periodo reproductivo y el resto del año. Para estos análisis se utilizó el programa STATISTICA para Windows V.12.0 Software (StatSoft, Tulsa, OK, EEUU). El nivel de significancia se estableció en un  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 MONITOREO NO INVASIVO

#### 4.1.1 DHT

Los niveles hormonales no siguieron ningún patrón definido a lo largo de los meses de estudio. Varias muestras se salieron de la curva de estandarización por lo que fue difícil calcular su nivel de concentración por encima de 80 ng/g. En la figura 11 se muestran los diferentes niveles hormonales a lo largo del tiempo de cada animal. Los valores exactos de las concentraciones se pueden observar en el Anexo I. No hay evidencias para afirmar que existen diferencias significativas entre los niveles en la época reproductiva y los niveles en el resto de año ( $p=0,88$ ).

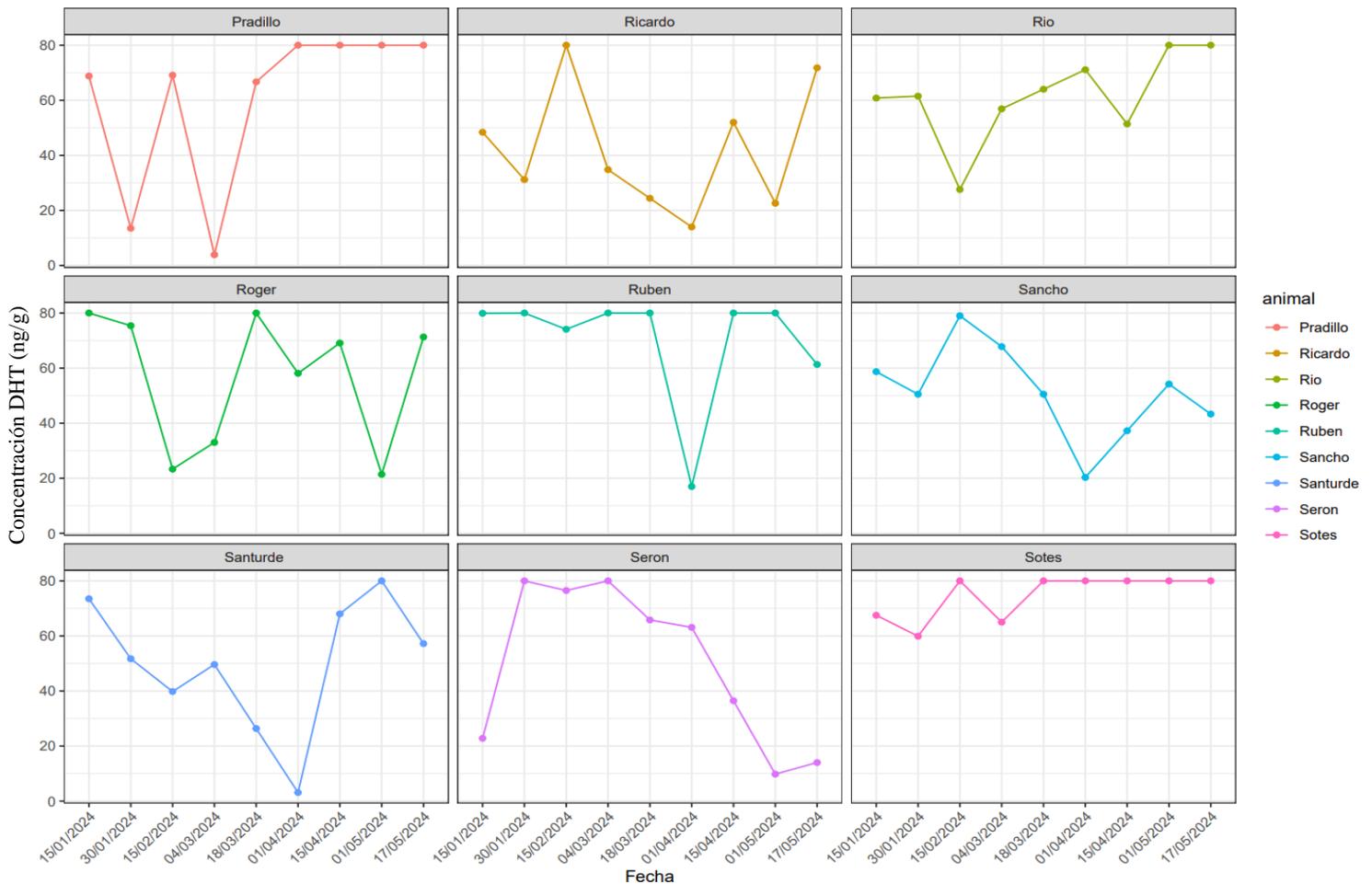


Figura 11. Concentraciones en ng/g de DHT fecales de cada animal a lo largo del año. Con inicio en 15 de enero y fin el 17 de mayo.

### 4.1.2 Estrógenos

Los niveles de concentración de estrógenos fecales (ng/g) fueron variables (rango: 3 ng/g -10 ng/g) (Anexo II). La duración media entre picos de máxima concentración fue de  $35,33 \pm 6,3$  días. Durante el periodo de supuesta gestación/pseudogestación, los niveles de estrógenos mostraban una disminución respecto al pico de concentración previo (figura 12).



Figura 12. Variación de los niveles de estrógenos fecales a lo largo del tiempo. En morado se marca el periodo de supuesta gestación en aquellas hembras a las que se realizó inseminación artificial (la flecha roja marca el día de la IA), los periodos marcados en azul corresponden a los periodos de gestación con copula “natural” que terminó en gestación (la flecha roja indica el día de la cópula).

### 4.1.3 Metabolitos de Progesterona

Las concentraciones de metabolitos de progesterona aumentaron tras el día de la cópula ó IA (Figura 13). Los valores con concentraciones superiores a 900 ng/g quedan fuera del rango lineal de la curva de calibrado por lo que no podemos asegurar su exactitud. Aun así, se puede confirmar es que en esas fechas la concentración en esas muestras es superior a 900 ng/g. También se puede afirmar que, aun sin conocer el valor exacto en esos puntos, sí se observan diferencias entre ellos (dadas por las diferentes intensidades en la absorbancia) y por lo tanto se pueden definir los perfiles de variación de concentración de metabolitos con el tiempo. Los valores exactos se describen en el Anexo III.

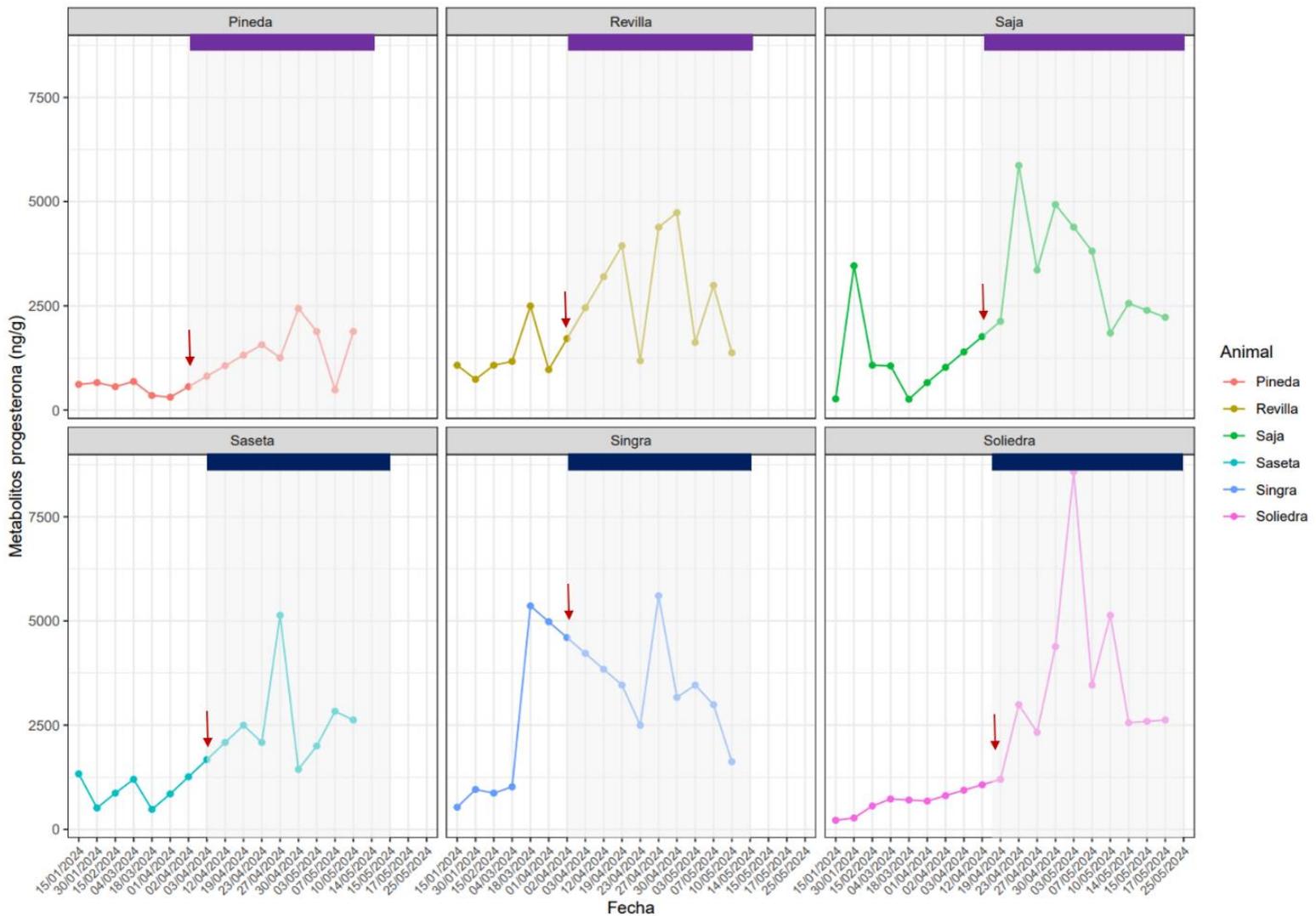


Figura 13. Variación de los niveles de metabolitos de progesterona fecal a lo largo del tiempo. En morado se marca el periodo de supuesta gestación en aquellas hembras a las que se realizó inseminación artificial (la flecha roja marca el día de la IA), los periodos marcados en azul corresponden a los periodos de gestación con cópula “natural” que terminó en gestación (la flecha roja indica el día de la cópula).



## 4.2 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

### 4.2.1 Recogida semen

Hemos obtenido eyaculado de 7 de los 8 macho utilizados. En la tabla 3 se describe el tiempo transcurrido hasta la primera eyaculación, así como la motilidad obtenida, número de estímulos, número de eyaculados y volumen del eyaculado. La administración de oxitocina antes de comenzar con el procedimiento redujo el tiempo necesario hasta la primera eyaculación ( $p=0,02$ ), así como el número de estímulos ( $p=0,02$ ). A su vez, tanto el número de eyaculados como la motilidad de los espermatozoides se incrementaron con la administración previa de oxitocina ( $p=0,03$  y  $p=0,05$ , respectivamente) (Figura 14).

### 4.2.2 Inseminación artificial

Tanto en Revilla, Pineda, Saja, Ondarroa, Navas, Oria, Quintanilla y Querabs no se obtuvieron gestaciones/partos. Sin embargo, tanto en Saja como en Ondarroa se observaron comportamientos propios de una hembra gestante. No se consiguió observar un segundo celo después de la IA.

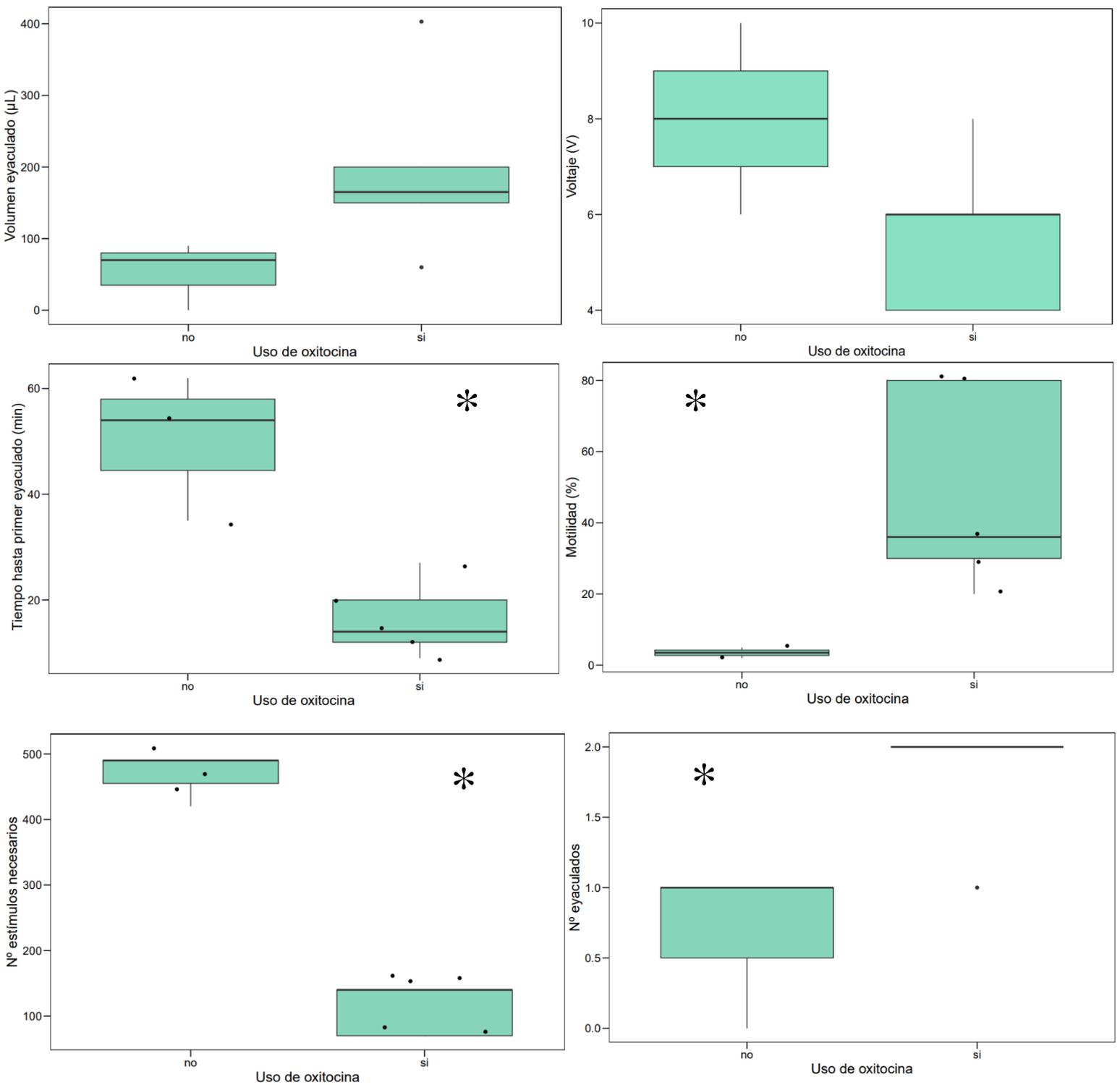


Figura 14. Representación de las diferencias entre el uso de oxitocina o no en aquellas variables significativas (volumen del eyaculado, voltaje máximo en primer eyaculado, tiempo hasta primer eyaculado, motilidad, número de estímulos y número de eyaculados). El asterisco muestra relaciones significativas.



MACHO	PESO (g)	TAMAÑO DCHO (mm)	TAMAÑO IZQ (mm)	OXITOCINA	EYACULADOS	TIEMPO(min)	N ESTÍMULOS	VOLTAJE	VOLUMEN (μl)	MOTILIDAD(%)
Rubén	865	17,8 x 11,4	18,1 x 10,9	NO	1	35	490	6	10 + 80*	2
Ricardo	828	-	18 x 10,4	NO	0	62	490	8	-	-
Otazu	730	17,9 x 10,1	17,6 x 9,7	NO	1	54	420	10	10 + 60*	5
Serón	1065	19 x 10,6	19,3 x 12,8	SI	2	14	70	4	15 + 150*	20
Sigur	1005	18,1 x 10,7	19,4 x 10,3	SI	2	27	140	8	203 + 200*	80
Roger	724	16,2 x 11,7	16 x 9,6	SI	2	9	140	6	50 + 100*	36
Soto	797	18,3 x 10,5	20 x 11,9	SI	1	12	140	6	10 + 50*	30
Sotés	839	20,8 x 10,5	19,5 x 11,1	SI	2	20	70	4	200 *	80

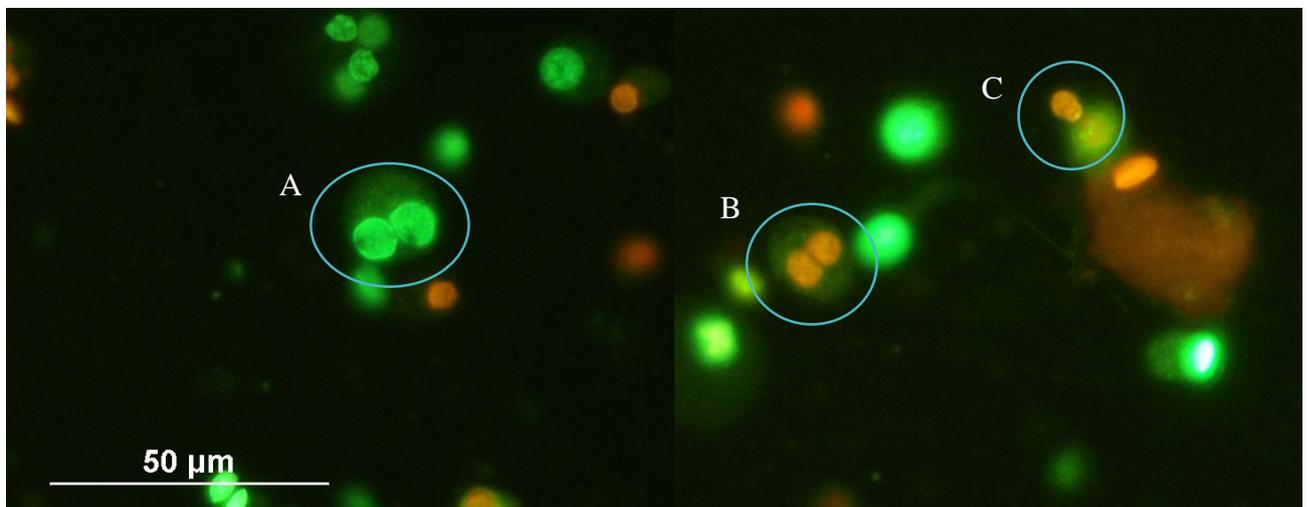
Tabla 3. Resultados obtenidos, al pesar al macho, medir los testículos y en la electroeyaculación: erección, uso de oxitocina, tiempo y número de estímulos necesarios hasta el primer eyaculado; voltaje en primer eyaculado, volumen total (\*indica que se obtuvo semen contaminado con orina) y, por último, motilidad de los espermatozoides del eyaculado

### 4.3 VIABILIDAD TRAS LA CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO TESTICULAR

Tras la disgregación, en el tejido fresco se apreciaba un 68% de células redondas vivas y un 67% de espermatozoides vivos (Tabla 4). Tras la descongelación, los porcentajes se redujeron, observándose con un 26% de células redondas vivas y un 36% de espermatozoides vivos. Por lo tanto, se perdió un 61.76% de células redondas y un 46.27% de espermatozoides tras la congelación.

	% cel. Redondas vivas	% cel. Redondas muertas	% spz vivos	% spz muertos
Tej. Fresco	68	32	67	33
Tras congelación	26	74	36	64

*Tabla 4. Porcentajes de células redondas (espermatogonias, espermatocitos y espermatidas) y espermatozoides (espermatidas enlongadas y espermatozoides) vivos y muertos en tejido fresco y tras congelación lenta.*



*Figura 15. Ejemplo de células redondas vivas (fluorescencia verde) (A) y células redondas muertas (fluorescencia roja) (B) en división, así como un espermatozoide muerto (fluorescencia roja) (C) en tejido testicular de visión europeo.*

#### 4.4 ANÁLISIS ESPERMÁTICOS: MORFOMETRÍA DE LA CABEZA ESPERMÁTICA

Los resultados mostraron un efecto del origen de los espermatozoides ( $p \leq 0.02$ ) (eyaculados vs epididimarios) en las dimensiones de su cabeza, siendo menor tamaño en los epididimarios que en los eyaculados. El área de la cabeza de los espermatozoides eyaculados era superior que los epididimarios ( $33,49 \pm 1,37$  vs  $29,77 \pm 1,55$ ,  $p = 0.02$ ). La anchura de la cabeza de espermatozoides eyaculados también era superior que las de los epididimarios ( $5,23 \pm 0,10$  vs  $4,80 \pm 0,11$ ,  $p = 0.01$ ).

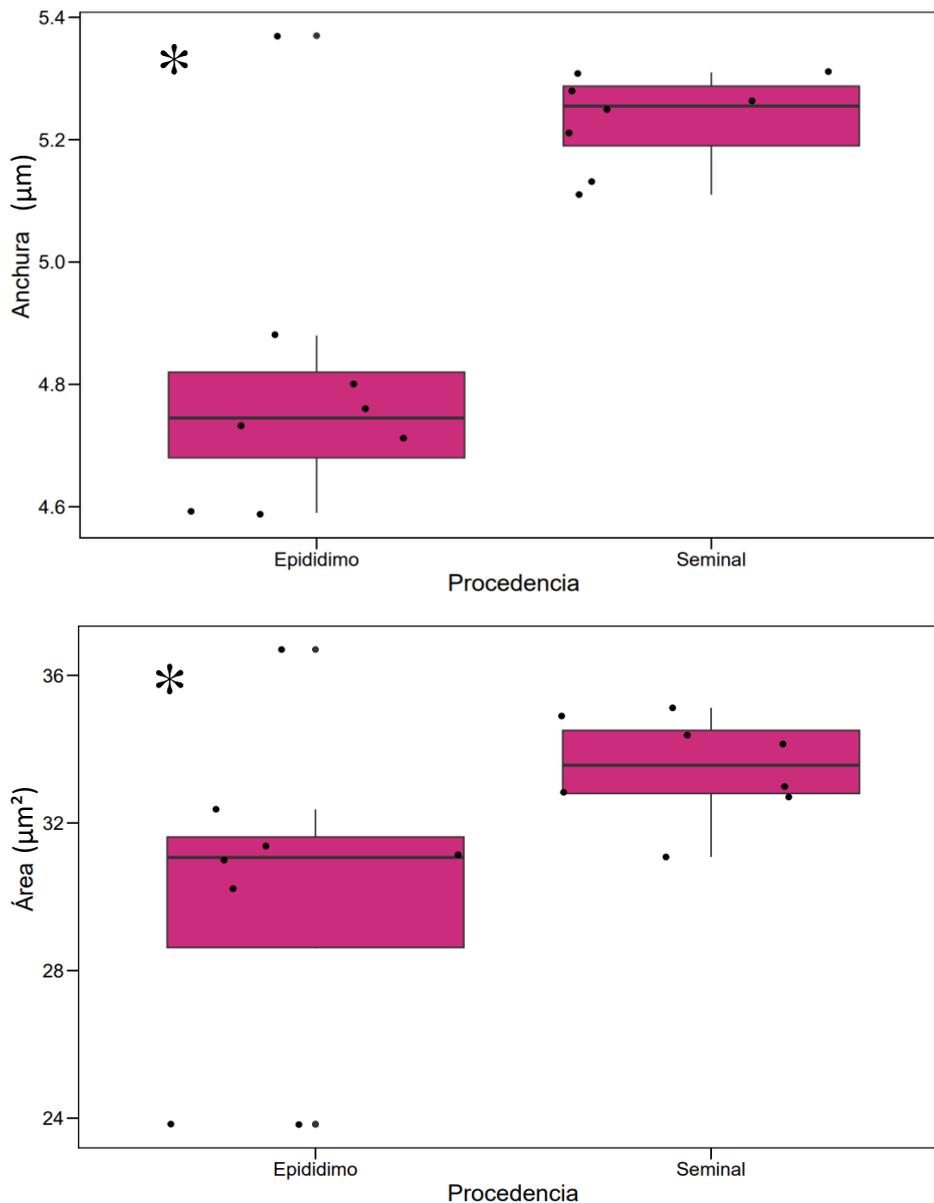


Figura 16. Diferencias en la anchura (arriba) y el área (abajo) medidas en  $\mu\text{m}$ . Se puede apreciar la notable diferencia de tamaño entre los dos tipos de espermatozoides. Los asteriscos marcan diferencias significativas.

## 5 DISCUSIÓN

---

La duración media entre picos de máxima concentración de estrógenos fue de 35 días, que sugiere sería la duración del intervalo entre celos del visón europeo en las condiciones de estudio. Este periodo había sido definido en 12-55 días en trabajos previos (Amstislavsky, 2009; Fundación Lutreola, 2006), y podía dar una estimación de la duración del ciclo sexual en esta especie. Las concentraciones de metabolitos de progesterona aumentaron tras el día de la cópula ó IA, mientras que disminuían las concentraciones de estrógenos. El aumento de la concentración de metabolitos de progesterona junto con la ausencia de un segundo celo tras la cópula y el comportamiento similar al de una gestante (ej. ejemplar Saja) ponen de manifiesto la primera evidencia clara de pseudogestación en el visón europeo. Teniendo en cuenta que los niveles de metabolitos de progesterona fecales se incrementaron tras el día de la IA, dicho incremento sugiere que la administración de hCG permitió la inducción de la ovulación. Estudios en el hurón doméstico indican que la administración de hCG produce pseudogestación en el 95% de los casos (Jekl & Hauptman, 2017). El cuerpo o cuerpos lúteos generados tras la ovulación serían responsables de la subida y mantenimiento de estos niveles elevados de metabolitos de progesterona.

La pseudogestación normalmente ocurre cuando se da una cópula que no concluye con una gestación. En este periodo, la hembra se comporta como si estuviera gestante, produciéndose el desarrollo de las glándulas mamarias y la preparación del endometrio uterino para la supuesta implantación del embrión. La pseudogestación es común en aquellos animales que tienen ovulación inducida, como los mustélidos, pero también en otros animales cuya ovulación es independiente del coito, como el conejo, rata o ratón (Macomber, 1932). En hurón doméstico la duración de la fase luteal en la pseudogestación es idéntica a la duración de la gestación (40-42 días). Entre el día 35 y 40 se produce la lisis de los cuerpos lúteos y se alcanza el estado de anestro el día 45 tras la ovulación (Jekl & Hauptman, 2017). Se han documentado periodos de pseudogestación en “honoriks” (híbridos de turón y visón europeo) cuando se cruzan hembras fértiles con machos estériles (Amstislavsky et al., 2004; Amstislavsky et al., 2006).



La baja tasa de éxito reproductivo de los machos criados en cautividad supone un hándicap enorme en la recuperación de esta especie (Kiik et al., 2013). Por ello, es de suma importancia la incorporación de técnicas reproductivas que permitan aumentar esta tasa y liberar animales con una mejor calidad genética al medio. La inseminación artificial es una técnica usada en multitud de especies amenazadas con problemas similares al visón europeo, un ejemplo es el oso panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) (Masui et al., 1989) o el turón de patas negras (*Mustela nigripes*) (J. G. Howard et al., 2016). La obtención de semen de buena calidad es crucial para que esta técnica se lleve a cabo con éxito.

La electroeyaculación es uno de los procedimientos más utilizados para recoger semen en especies silvestres, sin embargo, puede llegar a ser estresante y doloroso para los animales (Brindley, 1981). El uso de un buen protocolo anestésico y de masaje transrectal podría reducir los efectos negativos, disminuyendo el tiempo del procedimiento y el número de estímulos necesarios (Abril-Sánchez et al., 2019; Santiago-Moreno et al., 2011). Sin embargo, el visón europeo es una especie que no suele responder bien a este procedimiento, requiriéndose un largo periodo de aplicación de gran número de estímulos eléctricos. Teniendo en cuenta este hecho, en el presente estudio se decidió aplicar oxitocina antes de iniciar el procedimiento de electroeyaculación.

Las hormonas oxitocina y prostaglandina-F<sub>2</sub>-alfa (PGF<sub>2</sub>α) se liberan en los procesos de eyaculación “natural” (Veronesi et al., 2010) y su función es estimular las contracciones del epidídimo actuando directamente sobre las células del músculo liso favoreciendo el transporte de espermatozoides en los conductos deferentes (Corona et al., 2012; Nicholson et al., 1999). Con el fin de reducir el número de estímulos eléctricos y/o tiempo necesario para la obtención de muestras seminales con la electroeyaculación o la aplicación de masaje transrectal guiado de las glándulas sexuales accesorias (TUMASG), se ha utilizado la oxitocina en rumiantes domésticos y silvestres (Ungerfeld et al., 2016). En machos cabríos la inyección de oxitocina combinada con PGF<sub>2</sub>α acorta el proceso y reduce el número de estímulos y voltaje necesarios para obtener el primer eyaculado (Ungerfeld et al., 2018), mientras que en ovejas, la oxitocina por sí sola también resultó ser una práctica efectiva que redujo el estrés del animal (de Moura Fernandes et al., 2021). En nuestro estudio, la inyección intramuscular de 0,24 UI de oxitocina demostró tener un resultado positivo, suponiendo una reducción de la duración

del procedimiento y del número de estímulos eléctricos. Por lo que la oxitocina podría ser un buen recurso para mejorar esta práctica y reducir en lo posible el malestar del animal. En lo que respecta a los parámetros seminales, el uso de oxitocina resultó en un aumento tanto en la motilidad de los espermatozoides del eyaculado como en el número de eyaculados. Pese a que en muchos estudios se comprobó que la administración de oxitocina no altera los parámetros seminales (de Moura Fernandes et al., 2021; Ungerfeld et al., 2018) incluida la motilidad (Luna Palomera et al., 2021); en algunos estudios sí que se observó un aumento de la concentración de espermatozoides (Gillis et al., 2023). En otro estudio realizado con ovejas, la inyección de oxitocina aumentó tanto la concentración de espermatozoides como su motilidad, sin embargo, estos resultados solo se observaron en el primer eyaculado (a los 10 minutos tras la administración, según aumentaban el tiempo los parámetros seminales descendían) (Bokzurt et al., 2007).

Uno de los motivos por los que las inseminaciones no terminaron en éxito puede ser debido a un fallo a la hora de decidir el momento de la IA. Los resultados de los niveles de estrógenos fecales indican que a los ejemplares de visón identificados como Revilla y Pineda se les realizó la inseminación artificial de manera tardía, cuando los niveles de estrógenos ya habían disminuido. En las cubriciones naturales, se puede apreciar que acontecían, en todos los casos, con la presencia de altos niveles de estrógenos ( $\approx 6$  ng/g) y/o con niveles ascendentes. El estradiol controla el desarrollo de la vulva, los cambios en los tipos de células vaginales, el desarrollo del útero y la receptividad sexual; por lo que un aumento de los niveles de esta hormona supone la entrada en estro (Lindeberg, 2008). Los niveles bajos detectados en el momento de la IA de Revilla y Pineda sugieren que los animales ya se encontraban en un periodo de estro tardío, con unos folículos con una menor capacidad de síntesis de estradiol, y que el ovocito ya estaría envejecido en el momento de inducirse la ovulación con hCG. Por otro lado, los niveles de estrógenos de Saja en el momento de la IA eran altos, lo que indica que este animal sí que se encontraba en un momento favorable para que se produjera gestación.

Mientras que la inseminación artificial por vía vaginal no ha proporcionado buenos resultados en hurón (Kidder et al., 1998), la técnica más efectiva es la inseminación intrauterina por laparoscopia (J. G. Howard & Wildt, 2009). En aquellos casos en los que el semen se deposita en los cuernos uterinos, se suelen conseguir gestaciones tanto en turones como hurones (J. G. Howard et al., 2016; Kidder et al., 1998; Strickler, 2010). En



nuestro caso, la inseminación fue de tipo vaginal profunda, pero no se consiguió atravesar el cuello uterino en ningún caso. Elegimos esta técnica porque es mucho menos invasiva, respecto a la vía intrauterina laparoscópica que ya supone una intervención quirúrgica aunque sea de mínima invasión (J. G. Howard et al., 2016; Wildt et al., 1989). De estos datos podemos deducir que la colocación del material espermático en útero (cuerpo o cuernos uterinos) es clave para realizar una IA exitosa. Posiblemente la inseminación transcervical por vía vaginal sea posible, pero siendo necesario atravesar el cuello uterino y consiguiendo así depositar el líquido seminal en el útero. Para ello, se debería utilizar un endoscopio con un diámetro lo suficientemente pequeño que permita poder abordar el cérvix con un catéter de inseminación.

Otro hallazgo importante del presente estudio es la caracterización morfométrica de la cabeza espermática en el visón europeo, siendo la primera vez que se describe en esta especie. La cabeza de los espermatozoides del epidídimo presenta unas menores dimensiones que los eyaculados. Esta relación también ha sido descrita en muchas especies de rumiantes, carnívoros y aves (Bezerra et al., 2023; Santiago-Moreno et al., 2023; Wysokińska et al., 2021). Los espermatozoides no son células estáticas, se producen cambios en su morfología desde su formación hasta su salida en el eyaculado. Los cambios en la dimensión de la cabeza pueden derivarse de cambios sustanciales en la compactación de la cromatina durante su trayecto desde los conductos seminíferos hasta que llegan a las vías deferentes (Martins et al., 2021). Por otro lado, en el epidídimo se produce una reabsorción de agua y se crea un microambiente hipertónico que favorece la maduración y modifica las dimensiones del espermatozoide (Santiago-Moreno et al., 2020).

Conocer las medidas morfométricas de los espermatozoides es importante para poder aplicar las técnicas de criopreservación que mejor responderían en cada caso, así como para evaluar los efectos deletéreos del proceso de criopreservación. Además, ciertos contaminantes medioambientales pueden ejercer un efecto en la compactación de la cromatina de células germinales, pudiéndose afectar el tamaño de la cabeza espermática (Santiago-Moreno et al., 2016). Por otro lado, también se ha comprobado que los espermatozoides procedentes del epidídimo presentan una mayor resistencia a la criopreservación que los del eyaculado (Cerdeira et al., 2022; O'Brien et al., 2019), posiblemente debido a diferencias físicas y químicas en la membrana como en los ácidos



grasos insaturados, fosfolípidos y colesterol que afectan a la fluidez de la membrana plasmática (O'Brien et al., 2019). También podría ser debido al menor área de la cabeza, ya que se ha comprobado que el tamaño de la cabeza afecta tanto a la permeabilidad de la membrana plasmática como al flujo de volumen de agua durante el proceso de congelación-descongelación, afectando a su capacidad de supervivencia (Santiago-Moreno et al., 2023). Por otro lado, estudios en los que han intentado clasificar los espermatozoides como “buenos congeladores” o “malos congeladores” en función de las características morfométricas de la cabeza, han apuntado que aquellos que resisten bien a la congelación son, en la mayoría de los casos, más pequeños y alargados (Esteso et al., 2006; Peña et al., 2005). Aunque estos trabajos no se realizaron con espermatozoides del epidídimo, sino que estudiaban sub-poblaciones espermáticas de eyaculados, sí que podrían explicar, en parte, la buena resistencia a la congelación de los espermatozoides epididimarios en base a sus menores dimensiones.

Por último, en este estudio hemos analizado la viabilidad del tejido testicular de esta especie a la congelación resultando en una pérdida de un 61,76% de células redondas, que corresponderían a espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas, y un 46,27% de espermátidas elongadas y espermatozoides tras la congelación lenta. Sin embargo, únicamente se ha utilizado tejido testicular de un único individuo, por lo que este dato solo es una aproximación a tener en cuenta. En el futuro deberán hacerse más evaluaciones para poder determinar qué técnicas de congelación son las que mejor resiste este tejido.

## 6 CONCLUSIONES

---

Las conclusiones de este estudio son:

1. Es posible utilizar análisis no invasivos (hormonas fecales) como método auxiliar a la hora de realizar IA. La evaluación de estrógenos fecales permite determinar el momento más idóneo para realizar IA.
2. La evolución de metabolitos de progesterona después de la IA confirmaron la existencia de pseudogestación en el visón europeo.
3. El uso de oxitocina antes de comenzar el proceso de electroeyaculación y masaje transrectal permite optimizar el proceso, permitiendo un menor número de estímulos eléctricos y una disminución del tiempo requerido para obtener los eyaculados. A su vez, mejora la motilidad espermática e incrementa el número de eyaculados.
4. Para una IA efectiva a través de la vagina sería necesario un abordaje endoscópico con equipo de menor diámetro para poder acceder al cérvix y aplicar la inseminación de forma transcervical.
5. Se ha descrito por primera vez las características morfométricas de espermatozoides de visón europeo, los cuales presentaban menores dimensiones en los de origen epididimario que en los eyaculados.

## 7 REFERENCIAS

---

- Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., & Ungerfeld, R. (2019). Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*, 205, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.023>
- Allanson, M., & Evans, C. A. L. (1997). The reproductive processes of certain mammals. III.—The reproductive cycle of the male ferret. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 110(767), 295-312. <https://doi.org/10.1098/rspb.1932.0026>
- Amstislavsky S, Aalto J, Jarvinen M, Lindeberg H, Valtonen M, Zudova G, Ternovskaya Y. Embryo transfer in the European mink and related species. pp. 27-39. En: Congreso Internacional sobre la conservación del vison europeo. 5-8 noviembre 2003, Logroño, España. Proceedings book
- Amstislavsky, S. (2009). *Reproductive biology and embryo technology in Mustelidae*. Kuopion yliopisto.
- Amstislavsky, S., Aalto, J., Järvinen, M., Lindeberg, H., Valtonen, M., Zudova, G., & Ternovskaya, Y. (2004). Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients. *Theriogenology*, 62(3-4), 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.011>
- Amstislavsky, S., Kizilova, E., Ternovskaya, Y., Zudova, G., Lindeberg, H., Aalto, J., & Valtonen, M. (2006). Embryo development and embryo transfer in the European mink (*Mustela lutreola*), an endangered mustelid species. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(4), 459. <https://doi.org/10.1071/RD05135>
- Amstislavsky, S., Lindeberg, H., Aalto, J., Järvinen, M., Valtonen, M., Kizilova, E., Zudova, G., & Ternovskaya, Y. (2006). Embryo cryopreservation and transfer in *Mustelidae*: Approaches to ex situ conservation of the endangered European mink. *International Journal of Refrigeration*, 29(3), 396-402. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2005.07.013>
- Amstislavsky, S., Lindeberg, H., Aalto, J., & Kennedy, M. (2008). Conservation of the European Mink (*Mustela lutreola*): Focus on Reproduction and Reproductive



- Technologies. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(4), 502-513. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00950.x>
- Amstislavsky, S., Lindeberg, H., Ternovskaya, Y., Zavjalov, E., Zudova, G., Klochkov, D., & Gerlinskaya, L. (2009). Reproduction in the European Mink, *Mustela lutreola*: Oestrous Cyclicity and Early Pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 489-498. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01216.x>
- Amstislavsky, S., & Ternovskaya, Y. (2000). *Reproduction in mustelids*.
- Aulerich, R. J., Ringer, R. K., & Sloan, C. S. (1972). Electro-Ejaculation of Mink (*Mustela Vison*). *Journal of Animal Science*, 34(2), 230-233. <https://doi.org/10.2527/jas1972.342230x>
- Bateman, H. L., Bond, J. B., Campbell, M., Barrie, M., Riggs, G., Snyder, B., & Swanson, W. F. (2009). Characterization of basal seminal traits and reproductive endocrine profiles in North American river otters and Asian small-clawed otters. *Zoo Biology*, 28(2), 107-126. <https://doi.org/10.1002/zoo.20206>
- Bezerra, L. G. P., Silva, A. M., Jurema, A. P., Dantas, M. R. T., Pereira, A. G., Oliveira, M. F., Comizzoli, P., & Silva, A. R. (2023). Changes in Sperm Morphology, Morphometry, and Motility from the Epididymis to the Vas Deferens in Rheas (*Rhea americana*, Linnaeus, 1758). *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 13(9), 1483. <https://doi.org/10.3390/ani13091483>
- Blottner, S., Schön, J., & Jewgenow, K. (2006). Seasonally activated spermatogenesis is correlated with increased testicular production of testosterone and epidermal growth factor in mink (*Mustela vison*). *Theriogenology*, 66(6-7), 1593-1598. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.041>
- BOZKURT, T., TÜRK, G., & GÜR, S. (2007). Effects of Exogenous Oxytocin on Serologic and Seminal Steroids and Semen Characteristics in Rams. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 31(5), 303-309. <https://doi.org/>
- Brindley, G. S. (1981). Electroejaculation: Its technique, neurological implications and uses. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 44(1), 9-18.
- Calle, A., & Ramírez, M. Á. (2022). Cryobanking European Mink (*Mustela lutreola*) Mesenchymal Stem Cells and Oocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/ijms23169319>



- Carroll, R. S., Erskine, M. S., Doherty, P. C., Lundell, L. A., & Baum, M. J. (1985). Coital Stimuli Controlling Luteinizing Hormone Secretion and Ovulation in the Female Ferret. *Biology of Reproduction*, 32(4), 925-933. <https://doi.org/10.1095/biolreprod32.4.925>
- Cerdeira, J., Castaño, C., Sánchez-Calabuig, M., & Santiago-Moreno, J. (2022). Epididymal Spermatozoa Show Higher Cryoresistance to Vitrification Process Than Ejaculated Spermatozoa in Dogs. *Biopreservation and Biobanking*, 21. <https://doi.org/10.1089/bio.2022.0101>
- Chang, M. C. (1965). Fertilizing life of ferret sperm in the female tract. *Journal of Experimental Zoology*, 158(1), 87-99. <https://doi.org/10.1002/jez.1401580109>
- Chatdarong, K., Thuwanut, P., & Morrell, J. M. (2016). The development of cat testicular sperm cryopreservation protocols: Effects of tissue fragments or sperm cell suspension. *Theriogenology*, 85(2), 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.030>
- Corona, G., Jannini, E. A., Vignozzi, L., Rastrelli, G., & Maggi, M. (2012). The hormonal control of ejaculation. *Nature Reviews Urology*, 9(9), 508-519. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.147>
- de Moura Fernandes, D. A., de Souza, C. V., Alvarez Balaro, M. F., Rodrigues Santos, J. D., Barbosa dos Santos, V. M., Campos Pereira da Costa, M. M., da Silva Carvalho, A. B., Rios Rodrigues, A. L., Ungerfeld, R., & Brandão, F. Z. (2021). Response of rams to electroejaculation following the administration of oxytocin and cloprostenol with or without GnRH. *Theriogenology*, 173, 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.019>
- Douglas, D. A., Houde, A., Song, J. H., Farookhi, R., Concannon, P. W., & Murphy, B. D. (1998). Luteotropic hormone receptors in the ovary of the mink (*Mustela vison*) during delayed implantation and early-postimplantation gestation. *Biology of Reproduction*, 59(3), 571-578. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.3.571>
- Duby, R. T., & Travis, H. F. (1972). Photoperiodic control of fur growth and reproduction in the mink (*Mustela vison*). *Journal of Experimental Zoology*, 182(2), 217-225. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820206>
- Esteso, M. C., Rodríguez, E., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Pradiee, J., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2015). Descriptive analysis of sperm head



- morphometry in Iberian ibex (*Capra pyrenaica*): Optimum sampling procedure and staining methods using Sperm-Class Analyzer®. *Animal Reproduction Science*, 155, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.014>
- Esteso, M. C., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., Quintero-Moreno, A. A., & Garde, J. J. (2006). Functional Significance of the Sperm Head Morphometric Size and Shape for Determining Freezability in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Sperm Samples. *Journal of Andrology*, 27(5), 662-670. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000489>
- Fan, B., Han, Y., Yang, Y., Zhao, X., Tang, Y., Li, X., Diao, Y., & Xu, B. (2021). Transcriptomic analysis of ovarian signaling at the emergence of the embryo from obligate diapause in the American mink (*Neovison vison*). *Animal Reproduction Science*, 232, 106823. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106823>
- Ficha descriptiva del visón europeo. SENDAVIVA*. (2016, diciembre 2). [Text]. Nuevos enfoques en la conservación del visón europeo en España. <http://lifeluttreolaspain-des.tragsatec.es/educacion-sensibilizacion/ficha-descriptiva-del-vison-europeo-sendaviva>
- Foundation Lutreola. (2006). *European Mink Captive Breeding and Husbandry (Protocol European Union Life Coop Project)*.
- Fox, J. G., & Marini, R. P. (2014). *Biology and Diseases of the Ferret*. John Wiley & Sons.
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2019). Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, 91, 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.007>
- Gillis, J. D., Holt, W. V., Yon, L., Myers, G. E., Schnellbacher, R., Holly, R., Love, D., & Penfold, L. M. (2023). Effects of exogenous oxytocin on the semen characteristics of the Indonesian wild cattle, banteng (*Bos javanicus*), collected by electroejaculation: Implications for semen collection techniques and genome resource banking. *Theriogenology Wild*, 3, 100044. <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2023.100044>
- Hammershøj, M. (2004). *Population ecology of free-ranging American mink Mustela vison in Denmark*. National Environmental Research Institute.



- Hardin, P. T., Farmer, S. E., Sarmiento-Guzmán, J. A., Diaz, F. A., Adams, T. L., Bailey, C. L., & Bondioli, K. R. (2014). 223 CRYOPRESERVATION OF IMMATURE BOVINE CUMULUS–OOCYTE COMPLEXES BY SLOW RATE FREEZING AND VITRIFICATION. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 225-225. <https://doi.org/10.1071/RDv26n1Ab223>
- Herrick, J. R., Iske, C. J., Santymire, R. M., Lynch, C., Alonge, M., Krisher, R. L., & Morris, C. L. (2020). Factors affecting reproductive traits in male snow leopards (Uncia uncia). *Reproduction and Fertility*, 1(1), 35-49. <https://doi.org/10.1530/RAF-20-0013>
- 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>
- Howard, J. G., Lynch, C., Santymire, R. M., Marinari, P. E., & Wildt, D. E. (2016). Recovery of gene diversity using long-term cryopreserved spermatozoa and artificial insemination in the endangered black-footed ferret. *Animal Conservation*, 19(2), 102-111. <https://doi.org/10.1111/acv.12229>
- Howard, J. G., & Wildt, D. E. (2009). Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology*, 71(1), 130-148. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.046>
- Howard, J., Marinari, P., & Wildt, D. (2002). *Black-footed ferret: Model for assisted reproductive technologies contributing to in situ conservation* (pp. 249-266). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511615016.020>
- Hyams, D. G. (2010). *CurveExpert software*. <http://www.curveexpert.net>
- J. Purroy, F., & M. Varela, J. (2016). *Mamíferos de España* (3<sup>a</sup> edición). Lynx Edicions.
- Jekl, V., & Hauptman, K. (2017). Reproductive Medicine in Ferrets. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 20(2), 629-663. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2016.11.016>
- Kappelhof, J., & Weerman, J. (2020). The development of the Red panda *Ailurus fulgens* EEP: From a failing captive population to a stable population that provides



- effective support to in situ conservation. *International Zoo Yearbook*, 54(1), 102-112. <https://doi.org/10.1111/izy.12278>
- Kidder, J. D., Foote, R. H., & Richmond, M. E. (1998). Transcervical artificial insemination in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Zoo Biology*, 17(5), 393-404. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1998\)17:5<393::AID-ZOO4>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1998)17:5<393::AID-ZOO4>3.0.CO;2-9)
- Kiik, K., Maran, T., Nagl, A., Ashford, K., & Tammaru, T. (2013). The causes of the low breeding success of european mink (*Mustela lutreola*) in captivity: Abnormal Mating Behaviour in European Mink. *Zoo Biology*, 32(4), 387-393. <https://doi.org/10.1002/zoo.21062>
- Kneidinger, N., Nagl, A., Kiik, K., Schwarzenberger, F., & Maran, T. (2018). The individual courtship behaviour of male European mink (*Mustela lutreola*) is a good indicator for their breeding success. *Applied Animal Behaviour Science*, 205, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.05.007>
- La población de visón europeo en España se estima en apenas 142 ejemplares.* (2024, marzo 4). Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. <https://www.miteco.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/2024/marzo/la-poblacion-de-vison-europeo-en-espana-se-estima-en-apenas-142-.html>
- Larson, S., Casson, C. J., & Wasser, S. (2003). Noninvasive reproductive steroid hormone estimates from fecal samples of captive female sea otters (*Enhydra lutris*). *General and Comparative Endocrinology*, 134(1), 18-25. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00239-9)
- Lindeberg, H. (2008). Reproduction of the Female Ferret (*Mustela putorius furo*). *Reproduction in Domestic Animals*, 43(s2), 150-156. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01155.x>
- Lindeberg, H., Amstislavsky, S., Järvinen, M., Aalto, J., & Valtonen, M. (2002). Surgical transfer of in vivo produced farmed European polecat (*Mustela putorius*) embryos. *Theriogenology*, 57(9), 2167-2177. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00907-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00907-X)
- Luna Palomera, C., Macías Cruz, U., Sánchez Dávila, F., Peralta Torres, J. A., & Ojeda Robertos, N. (2021). Características seminales y niveles de testosterona en



- carneros Pelibuey tratados con oxitocina exógena. *Archivos de zootecnia*, 70(271), 311-317.
- MACOMBER, D. (1932). Pseudopregnancy. *Journal of the American Medical Association*, 98(4), 304-306. <https://doi.org/10.1001/jama.1932.02730300034008>
- Martins, M. C., Gonçalves, L. M., Nonato, A., Nassif Travençolo, B. A., Alves, B. G., & Beletti, M. E. (2021). Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. *Theriogenology*, 161, 200-209. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.004>
- Maskudov G, Katchanovsky V. European mink germplasm cryobank: now or never. Pp. 335-336. En: Congreso Internacional sobre la conservación del vison europeo. 5-8 noviembre 2003, Logroño, España. Proceedings book
- Masui, M., Hiramatsu, H., Nose, N., Nakazato, R., Sagawa, Y., Tajima, H., & Saito, K. (1989). Successful artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) at ueno zoo. *Zoo Biology*, 8(1), 17-26. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430080104>
- Murphy, B. D., & Fenelon, J. C. (2020). Models of embryonic diapause in Carnivora. *Bioscientifica Proceedings*, 10. <https://doi.org/10.1530/biosciprocs.10.006>
- Nagl, A., Kneidinger, N., Kiik, K., Lindeberg, H., Maran, T., & Schwarzenberger, F. (2015). Noninvasive monitoring of female reproductive hormone metabolites in the endangered European mink (*Mustela lutreola*). *Theriogenology*, 84(9), 1472-1481. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.023>
- Neal, J., Murphy, B. D., Moger, W. H., & Oliphant, L. W. (1977). Reproduction in the Male Ferret: Gonadal Activity During the Annual Cycle; Recrudescence and Maturation. *Biology of Reproduction*, 17(3), 380-385. <https://doi.org/10.1095/biolreprod17.3.380>
- Nicholson, H. D., Parrkinson, T. J., & Lapwood, K. R. (1999). Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. *Reproduction*, 117(2), 299-305. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170299>
- Oblotte, A., Rondeaux, J., Dumont, L., Delessard, M., Saulnier, J., Rives, A., Rives, N., & Rondanino, C. (2019). DNA methylation and histone post-translational modifications in the mouse germline following in-vitro maturation of fresh or



- cryopreserved prepubertal testicular tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, 39(3), 383-401. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.05.007>
- O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., López-Sebastián, A., Martínez-Nevado, 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>
- Ortiz-Jiménez, L., Vivas, I., & Barja, I. (2024). Is reproductive management for oestrus detection a stressful routine for female European mink (*Mustela lutreola*)? *Journal of Vertebrate Biology*, 73(23082), 23082.1-15. <https://doi.org/10.25225/jvb.23082>
- Palme, R., Touma, C., Arias, N., Dominchin, M. F., & Lepschy, M. (2013). *Steroid extraction: Get the best out of faecal samples*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/25726>
- Palmer, C. W., Amundson, S. D., Brito, L. F. C., Waldner, C. L., & Barth, A. D. (2004). Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Animal Reproduction Science*, 80(3), 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.07.003>
- Peña, F. J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-Martínez, I., Tapia, J. A., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2005). Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology*, 26(6), 716-723. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05030>
- Peris-Frau, P., Benito-Blanco, J., Martínez-Nevado, E., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., Pequeño, B., Martínez-Madrid, B., Estes, M. C., & Santiago-Moreno, J. (2023). DNA integrity and viability of testicular cells from diverse wild species after slow freezing or vitrification. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1114695>
- Raup, D. M., & Sepkoski, J. J. (1982). Mass Extinctions in the Marine Fossil Record. *Science*, 215(4539), 1501-1503. <https://doi.org/10.1126/science.215.4539.1501>



- Santiago-Moreno J, Martínez-Fresneda L, Martínez Madrid B, Toledano Díaz A, Castaño C, López Sebastián A. Fisiología del Semen. Pp 63-69 En: Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. Rodolfo Ungerfeld (2020) EDRA, Grupo ASIS, Zaragoza, Spain.
- Santiago-Moreno, J., Astorga, R. J., Luque, I., Coloma, M. A., Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., Gómez-Guillamon, F., Salas-Vega, R., & López-Sebastián, A. (2009). Influence of recovery method and microbial contamination on the response to freezing–thawing in ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 59(3), 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.09.012>
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, 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>
- Santiago-Moreno, J., Estes, M. C., Villaverde-Morcillo, S., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., López-Sebastián, A., Goya, A. L., & Martínez, J. G. (2016). Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 882. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188660>
- Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., Bóveda, P., O'Brien, E., Peris-Frau, P., Pequeño, B., Martínez-Madrid, B., & Estes, M. C. (2023). Review: Sperm cryopreservation in wild small ruminants: morphometric, endocrine and molecular basis of cryoresistance. *animal*, 17, 100741. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100741>
- Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., Gómez-Brunet, A., & López-Sebastián, A. (2006). Birth of live Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) derived from artificial insemination with epididymal spermatozoa retrieved after death. *Theriogenology*, 66(2), 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.012>
- Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Sookhthezary, A., Gómez-Guillamón, F., de la Vega, R. S., Pulido-Pastor, A., & López-Sebastián, A. (2011). Effects of



- anesthetic protocols on electroejaculation variables of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Research in Veterinary Science*, 90(1), 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.011>
- Shivanna, K. R. (2020). The Sixth Mass Extinction Crisis and its Impact on Biodiversity and Human Welfare. *Resonance*, 25(1), 93-109. <https://doi.org/10.1007/s12045-019-0924-z>
- Shump, A. U., Shump, K. A., Aulerich, R. J., & Ringer, R. K. (1977). Effect of electroejaculation frequency on semen characteristics in the ferret (*Mustela putorius*) (a). *Theriogenology*, 7(2), 83-87. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(77\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(77)80006-X)
- Skorupski, J. (2020). Fifty Years of Research on European Mink *Mustela lutreola* L., 1761 Genetics: Where Are We Now in Studies on One of the Most Endangered Mammals? *Genes*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/genes11111332>
- Somoskői, B., Bordás, L., Uno, F., Kispál, D., Müller, L., Török, D., & Cseh, S. (2023). Effects of different cryopreservation methods on canine isolated preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 258, 107361. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107361>
- Strickler, T. L. (2010). *Improving Assisted Reproductive Technologies in the Endangered Black-Footed Ferret: Artificial Insemination and Sperm Cryopreservation* [The Ohio State University]. [https://etd.ohiolink.edu/acprod/odb\\_etd/etd/r/1501/10?clear=10&p10\\_accession\\_num=osu1267057806](https://etd.ohiolink.edu/acprod/odb_etd/etd/r/1501/10?clear=10&p10_accession_num=osu1267057806)
- Sundqvist, C., Ellis, L. C., & Bartke, A. (1988). Reproductive Endocrinology of the Mink (*Mustela vison*). *Endocrine Reviews*, 9(2), 247-266. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-2-247>
- Sundqvist, C., Toppari, J., Parvinen, M., Fagerström, R., & Lukola, A. (1986). Elimination of infertile male mink from breeding using sperm test, testicular palpation, testosterone test and fine-needle aspiration biopsy of the testis. *Animal Reproduction Science*, 11, 295-305. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(86\)90132-6](https://doi.org/10.1016/0378-4320(86)90132-6)
- The IUCN Red List of Threatened Species*. (2024). IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/en>



- Tiit Maran (Foundation Lutreola, T. Z., Farming), D. S. (Russian R. I. of G. M. and F., Kranz, A., Farming), A. S. (Russian R. I. of G. M. and F., Government), S. P. (Catalonia, Gomez (TRAGSATEC), A., Pödra (TRAGSATEC), M., Mammifères), S. A. (Société F. pour l' É. et la P. des, & Liège), R. L. (Université de. (2011). IUCN Red List of Threatened Species: *Mustela lutreola*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., Bóveda, P., López-Sebastián, A., Martínez-Nevado, E., Villaverde-Morcillo, S., Estes, M. C., & Santiago-Moreno, J. (2021). Cryopreservation of ferret (*Mustela putorius furo*) sperm collected by rectal massage and electroejaculation: Comparison of a decelerating and an accelerating freezing rate protocol. *Veterinary Medicine and Science*, 7(1), 256-263. <https://doi.org/10.1002/vms3.362>
- Ungerfeld, R., Abril-Sánchez, S., Toledano-Díaz, A., Beracochea, F., Castaño, C., Giriboni, J., & Santiago-Moreno, J. (2016). Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Animal Reproduction Science*, 173, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.002>
- Ungerfeld, R., Casuriaga, D., Giriboni, J., Freitas-de-Melo, A., Silveira, P., & Brandão, F. Z. (2018). Administration of cloprostenol and oxytocin before electroejaculation in goat bucks reduces the needed amount of electrical stimulation without affecting seminal quality. *Theriogenology*, 107, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.034>
- Veronesi, M. C., Tosi, U., Villani, M., Govoni, N., Faustini, M., Kindahl, H., Madej, A., & Carluccio, A. (2010). Oxytocin, vasopressin, prostaglandin F<sub>2α</sub>, luteinizing hormone, testosterone, estrone sulfate, and cortisol plasma concentrations after sexual stimulation in stallions. *Theriogenology*, 73(4), 460-467. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.028>
- Wildt, D. E., Bush, M., Morton, C., Morton, F., & Howard, J. G. (1989). Semen characteristics and testosterone profiles in ferrets kept in a long-day photoperiod, and the influence of hCG timing and sperm dilution medium on pregnancy rate after laparoscopic insemination. *Reproduction*, 86(1), 349-358. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0860349>



- Wysokińska, A., Wójcik, E., & Chłopik, A. (2021). Evaluation of the Morphometry of Sperm from the Epididymides of Dogs Using Different Staining Methods. *Animals*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ani11010227>
- Young, K. m., Brown, J. l., & Goodrowe, K. l. (2001). Characterization of reproductive cycles and adrenal activity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) by fecal hormone analysis. *Zoo Biology*, 20(6), 517-536. <https://doi.org/10.1002/zoo.10001>

## ANEXO I

[DHT] (ng/g)

	15/01/2024	30/01/2024	15/02/2024	04/03/2024	18/03/2024	01/04/2024	15/04/2024	01/05/2024	17/05/2024
<b>Ricardo</b>	48,4	31,2	>80	34,8		14	52	22,6	71,8
<b>Seron</b>	22,8	>80		76,5	>80	65,8	63,1	9,8	14
<b>Roger</b>	>80		75,4	23,3	33	>80	58,1	69,1	21,4
<b>Santurde</b>	73,5	51,7	39,8	49,6		3,1	68	>80	57,2
<b>Ruben</b>	79,9	>80		74,1	>80	>80	17	>80	>80
<b>Rio</b>	60,8	61,5		27,6	56,9		71,1	51,4	>80
<b>Sotes</b>	67,5	59,9	>80		65	>80	>80		>80
<b>Sancho</b>	58,7	50,5	79	67,8	50,5	20,3		54,2	43,3
<b>Pradillo</b>	68,8	13,5	69,1	3,9	66,7	>80	>80	>80	>80

Tabla 5. Concentración en ng/g de los niveles de dihidrotestosterona fecales, en rojo se muestran aquellos valores que se encuentran marcados en rojo son los que se salieron de la curva de calibrado. Únicamente se puede asegurar que sus valores se encuentran por encima de 80 ng/g.



## ANEXO II

### [ESTROGENOS] (ng/g)

	15/01/2024	30/01/2024	15/02/2024	04/03/2024	18/03/2024	01/04/2024	19/04/2024	23/04/2024	27/04/2024	30/04/2024	03/05/2024	07/05/2024	10/05/2024	14/05/2024	17/05/2024
<b>Soliedra</b>	10,9	4,3	4,1	7,0		3,5	6,5	3,9	3,6	4,9	4,8	3,6	5,4	3,3	3,2
<b>Saja</b>	5,6	5,7	6,0	7,4	3,8	2,9	6,7	3,9	4,1	5,8	4,3	3,3	5,1	3,6	3,5
<b>Sáseta</b>	10,0	4,5	4,9	6,7	3,4	3,5	5,1	3,6	3,6	4,3	3,9	4,1	3,5	-	-
<b>Pineda</b>	7,3	3,8	3,3	6,6	5,0	3,6		3,7	4,6	4,0	4,6	4,8	3,4	-	-
<b>Revilla</b>	7,2	4,2	4,7	8,4	5,0	5,1	4,9	3,0	5,1	4,4	3,6	5,2	3,0	-	-
<b>Singra</b>	5,0	5,8	5,5	5,8	7,5		4,1	4,1	5,3	4,0	4,7	4,9	3,2	-	-

Tabla 6. Concentraciones de estrógenos fecales en ng/g a lo largo del tiempo.

## ANEXO III

[METABOLITOS P4] (ng/g)

	15/01/2024	30/01/2024	15/02/2024	04/03/2024	18/03/2024	01/04/2024	19/04/2024	23/04/2024	27/04/2024	30/04/2024	03/05/2024	07/05/2024	10/05/2024	14/05/2024	17/05/2024
<b>Soliedra</b>	218	272,0	560,0	729,0		678,0	1200,0	2991,0	2327,0	4386,0	8575,0	3461,0	5137,0	2558,0	2623,0
<b>Saja</b>	268	3461,0	1075,0	1060,0	260,0	658,0	2130,0	5867,0	3357,0	4928,0	4386,0	3811,0	1847,0	2558,0	2224,0
<b>Sáseta</b>	1332	513,0	869,0	1200,0	479,0	850,0	2497,0	2085,0	5137,0	1441,0	2000,0	2833,0	2623,0	-	-
<b>Pineda</b>	615	658,0	560,0	685,0	349,0	309,0		1567,0	1254,0	2438,0	1883,0	483,0	1883,0	-	-
<b>Revilla</b>	1075	736,0	1075,0	1167,0	2497,0	969,0	3942,0	1183,0	4386,0	4735,0	1623,0	2991,0	1374,0	-	-
<b>Singra</b>	531	957,0	869,0	1020,0	5361,0		3461,0	2497,0	5604,0	3165,0	3461,0	2991,0	1623,0	-	-

Tabla 7. Concentraciones de metabolitos de progesterona fecales en ng/g a lo largo del tiempo. En rojo se muestran aquellos valores que se encuentran marcados en rojo son los que se salieron de la curva de calibrado. Podemos asegurar que se encuentran por encima de 900 ng/g.

## ANEXO IV

Animal	Procedencia	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Anchura ( $\mu\text{m}$ )	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )
Otazu	Seminal	6,59 $\pm$ 0,043	5,13 $\pm$ 0,03	31,08 $\pm$ 0,46	16,92 $\pm$ 0,098
Ricardo	Seminal	6,93 $\pm$ 0,053	5,11 $\pm$ 0,037	32,99 $\pm$ 0,42	17,38 $\pm$ 0,118
Roger	Seminal	7,07 $\pm$ 0,031	5,21 $\pm$ 0,021	32,7 $\pm$ 0,36	17,68 $\pm$ 0,074
Ruben	Seminal	7,18 $\pm$ 0,067	5,26 $\pm$ 0,038	35,12 $\pm$ 0,46	18,1 $\pm$ 0,14
Seron	Seminal	6,94 $\pm$ 0,042	5,28 $\pm$ 0,051	34,9 $\pm$ 0,46	17,48 $\pm$ 0,11
Sotes	Seminal	6,95 $\pm$ 0,026	5,31 $\pm$ 0,027	34,14 $\pm$ 0,37	17,55 $\pm$ 0,073
Soto	Seminal	6,93 $\pm$ 0,022	5,25 $\pm$ 0,018	32,83 $\pm$ 0,23	17,42 $\pm$ 0,046
Sigur	Seminal	6,98 $\pm$ 0,038	5,31 $\pm$ 0,028	34,38 $\pm$ 0,40	17,64 $\pm$ 0,088
Lugo izq	Epidídimo	7,01 $\pm$ 0,21	4,8 $\pm$ 0,07	31,14 $\pm$ 2,38	16,76 $\pm$ 0,35
Murgui dcho	Epidídimo	6,59 $\pm$ 0,05	4,73 $\pm$ 0,031	30,99 $\pm$ 0,52	16,5 $\pm$ 0,097
Pont	Epidídimo	7,18 $\pm$ 0,05	5,37 $\pm$ 0,059	36,7 $\pm$ 0,14	17,98 $\pm$ 0,04
Vison	Epidídimo	6,65 $\pm$ 0,14	4,59 $\pm$ 0,11	30,22 $\pm$ 1,54	16,43 $\pm$ 0,32
Cubillo dcho	Epidídimo	6,09 $\pm$ 0,3	4,71 $\pm$ 0,26	23,83 $\pm$ 1,95	18,3 $\pm$ 0,79
Cubillo izq	Epidídimo	6,24 $\pm$ 0,53	4,59 $\pm$ 0,32	23,84 $\pm$ 3,25	18,46 $\pm$ 1,37
VisonTD	Epidídimo	6,72 $\pm$ 0,09	4,76 $\pm$ 0,04	31,37 $\pm$ 0,57	16,76 $\pm$ 0,17
VisonTI	Epidídimo	6,93 $\pm$ 0,05	4,88 $\pm$ 0,03	32,37 $\pm$ 0,48	16,87 $\pm$ 0,11
<b>Media epidídimo</b>		6,65 $\pm$ 0,03	4,8 $\pm$ 0,11	29,77 $\pm$ 1,55	17,22 $\pm$ 0,30
<b>Media seminal</b>		6,93 $\pm$ 0,06	5,23 $\pm$ 0,10	33,49 $\pm$ 1,37	17,51 $\pm$ 0,12

Tabla 8. Medidas morfométricas de la cabeza del espermatozoide (media  $\pm$  error estándar).