

Manual para la Asignatura:

**Práctica de Profundización en Reproducción Animal:
Fauna Silvestre en Cautiverio**

Elaboró

José Antonio Sandoval Zárate

**Departamento de Reproducción
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México**

Manual de Prácticas de Reproducción Asistida en Fauna Silvestre en Cautiverio

Contenido

- Introducción
- Objetivo general

- Determinación de hormonas mediante el uso de técnicas no invasivas
- Calculo y elaboración de soluciones
- Ensayo ligado a enzimas (ELISA)
- Desarrollo de la Técnica de EIA
- Preparación de muestras
- Fecales
- Urinarias
- Prueba de Jaffe para determinación de creatinina (Cr)
- Sanguíneas
- Interpretación del ELISA

- Técnicas de reproducción asistida
- Principales diferencias anatómicas-reproductivas de las especies silvestres
- Evaluación y criopreservación de muestras seminales
- Técnicas de colección de semen
- Análisis Espermatobioscopico
- Criopreservación de Gametos

- Elaboración de programas reproductivos

- Bibliografía

Introducción

El manejo reproductivo en animales silvestre en cautiverio es una herramienta de gran ayuda dentro de las instituciones zoológicas. Actualmente los centros que albergan ejemplares silvestres, no solo tienen que preocuparse de reproducir a especies que no han tenido éxito reproductivo en muchos años, sino que también deben de tomar medidas para controlar la reproducción de las especies que no presentan problemas en el área, y que en consecuencia pueden causar sobrepoblación de los exhibidores, poniendo en riesgo el bienestar de los ejemplares al encontrarse hacinados.

Los encargados de la reproducción en dichas entidades deberán de poner atención en todas las áreas relacionadas a la reproducción como son: Anatomía, Fisiología, Endocrinología, Nutrición, Patologías, Manejo y Etología, entre otros.

Para lograr la finalidad planteada, se deberá contar con bases sólidas sobre la fisiología reproductiva permitirá elaborar estrategias que conduzcan el éxito reproductivo de los ejemplares en cautiverio, contribuyendo con los objetivos de los zoológicos modernos (Conservación, Educación, Investigación y Recreación).

Objetivo general

Conocer algunas de las técnicas de reproducción asistida que se emplean en animales de fauna silvestre en cautiverio, para que los alumnos adquieran las herramientas necesarias para su desarrollo profesional en el campo de reproducción de fauna silvestre en cautiverio.

1. Determinación de hormonas mediante el uso de técnicas no invasivas

Objetivo de la unidad

Comprender las técnicas de monitoreo endocrinológico no invasivo, que servirán como herramienta diagnóstica en ejemplares de fauna silvestre.

Cálculo y elaboración de soluciones

Objetivo

El alumno conocerá los reactivos para elaborará las soluciones de trabajo necesarias para los ensayos endocrinológicos, de acuerdo a los lineamientos establecidos en el Laboratorio de Reproducción.

Actividades

Identificar el uso práctico de cada uno de los reactivos a elaborar, mismos que serán utilizados durante las prácticas subsecuentes.

Realizar las ecuaciones necesarias a fin de determinar las concentraciones requeridas para cada dilución

Habilidades y destrezas a adquirir

Desarrollo de la habilidad práctica para determinar los volúmenes requeridos que integrarán cada solución de trabajo, y su elaboración.

Desarrollo de la práctica

Identificar los reactivos necesarios para la preparación de las soluciones que se emplearán a lo largo de las prácticas de determinaciones hormonales, así como el uso del equipo utilizado para su elaboración (ejemplo: balanza, potenciómetro, agitadores).

El alumno preparará las siguientes soluciones:

1. Solución para fijación de anticuerpos (Buffer de Pegado)

(Buffer de bicarbonato de sodio a una concentración de 0.05 M y pH 9.6)

Reactivos necesarios para preparar 1000ml

- Na_2CO_3 1.59 g
- NaHCO_3 2.93 g
- Agua bidestilada 1000 ml

NOTA: Una vez elaborada la solución se deberá revisar el pH a temperatura ambiente y se almacena a 4°C.

2. Solución de Lavado (EIA WASH)

Reactivos necesarios para preparar 1000ml

(La solución inicial tendrá las siguientes características: 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, Stock concentrado a 10X)

- 1.5 M NaCl 87.66 g
- 0.5% Tween 20 5.0 ml
- Agua bidestilada 1000 ml

La solución de trabajo deberá de tener una concentración 1X, por lo que se deberá de realizar el siguiente procedimiento:

- 100 ml de la solución stock a 10X
- 900 ml de agua destilada
- Almacenar a temperatura ambiente

3. Solución de parado (STOP)

Solución: Ácido hidrofúorico con NaOH 0.006 M

- Ácido hidrofúorico (48%) 6.24 g 48% líquido HF
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1.2 ml NaOH 5.0 M ó 6.0 ml de NaOH 1.0 M
- Agua destilada 1000 ml

El alumno calculará las diluciones de trabajo:

Las soluciones de trabajo se componen de un diluyente y de una solución inicial, la mayoría de las ocasiones las soluciones iniciales tienen una dilución previa, razón por la cual debe ser considerada al momento de formularla la solución de trabajo.

Debido a lo anterior es necesario realizar cálculos de diluciones, a fin de preparar las soluciones que se utilizarán en el ensayo.

Para determinar el volumen requerido se deberá utilizar la siguiente fórmula.

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Donde

C_i = Concentración Inicial

V_i = Volumen Inicial

C_f = Concentración Final

V_f = Volumen Final

Cada laboratorio ha adecuado las soluciones de trabajo a las condiciones particulares de cada uno de ellos.

Ejemplo: Se requiere una solución cuya concentración es de 1:10,000 en un volumen de 4,000 microlitros, considerando que la solución stock se encuentra en una concentración de 1:20.

Entonces:

- El volumen inicial es desconocido
- La concentración inicial será: 1:20
- El volumen final: 4,000 microlitros
- La concentración final: 1:10,000

Sustituyendo:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$1:20 \cdot X = 1:10,000 \cdot 4,000 \text{ microlitros}$$

Despeje

$$X = \frac{(1:10,000) \cdot 4,000}{(1:20)}$$

$$X = \frac{(1/10,000) \cdot 4,000}{(1/20)} \quad \Bigg| \quad X = \frac{0.0001 \cdot 4,000}{0.05} \quad \Bigg| \quad X = \frac{0.4}{0.05} \quad \Bigg| \quad X = 8 \text{ microlitros}$$

Es decir, 8 microlitros serán tomados de la solución stock y serán colocados en 3,992 microlitros del diluyente, para obtener un total de 4,000 microlitros que serán utilizados como solución de trabajo.

Ensayo ligado a enzimas (ELISA)

Objetivo:

El alumno conocerá el fundamento de la técnica de ELISA, la cual será utilizada para realizar cuantificación de hormonas esteroides.

Antecedentes y fundamente del ensayo

El ensayo ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) es una técnica cuantitativa basada en la unión antígeno (Ag) – anticuerpo (Ac). Consiste que uno de los compuestos anteriores se encuentra ligado a una enzima, la cual cataliza al sustrato produciendo una coloración, lo que permite realizar la medición de la concentración con ayuda de un espectrofotómetro, para los casos de ELISA cuantitativo. Los anticuerpos utilizados pueden ser monoclonales o policlonales, los cuales reconocen una o más de dos epitopos respectivamente, ha sido usado como reactivos analíticos específicos para la cuantificación de antígenos de algún agente patógeno, proteínas, hormonas o fármacos. Esta prueba puede realizarse a partir de diferentes muestras como son: extractos de tejidos, suero, orina, heces, pelo, etc., lo que lo convierte en ensayos de gran utilidad para estudios no invasivos como orina y heces, ya que en fauna silvestre resulta poco práctico tener acceso a una muestra de suero sanguíneo. Dentro de sus cualidades está la versatilidad, la sensibilidad y el fácil acceso.

De acuerdo a la forma en cómo se realiza la reacción Ag-Ac, el ELISA se clasifica en Directo, Indirecto, Sandwich y Competitivo.

Generalmente el ELISA **Directo** se utiliza para la determinación de antígenos, mientras que el **Indirecto** es utilizado para determinar anticuerpos.

En el caso del **ELISA competitivo**, consiste en recubrir una placa de microtitulación (fase sólida) con un anticuerpo que es específico para el antígeno que se va a medir. La base de la técnica reside en una competencia entre una forma conjugada con una enzima prepreparada del antígeno de concentración conocida contra la muestra desconocida, para los sitios de unión previamente dispuestos en la placa ELISA. El antígeno no conjugado dentro de la muestra interfiere con la capacidad del antígeno conjugado con la enzima para unirse al anticuerpo. Por lo tanto, la lectura está inversamente asociada con la cantidad de antígeno, es decir, mientras menos color mayor cantidad de Ag. (Fig 1)



Fig1. Placa de ELISA competitivo, sobre la flecha se observa la curva de calibración (9 puntos), de cómo el color inicialmente es más intenso y se atenúa hacia el lado derecho, donde la concentración de la curva va aumentando.

Actividades

Realizar la cuantificación de hormonas esteroides a partir de diferentes tipos de muestras.

Habilidades y destrezas a adquirir

El alumno tendrá los conocimientos básicos para desarrollar e interpretar correctamente una ELISA, considerando cada una de las partes que lo integran para finalmente poder emitir un diagnóstico.

Desarrollo de la práctica

Dada su diversidad de usos, puede ser utilizada para la determinación de hormonas, las cuales van desde esteroides hasta hormonas proteicas. En el último caso se tiene como limitante que al ser analitos específicos de especie hay que diseñar anticuerpos para cada uno de los géneros taxonómicos, razón por la cual la mayor utilidad recae sobre las hormonas esteroides.

Para entender el desarrollo de la prueba inicialmente se explicarán los elementos que conforman la prueba, para después explicar su desarrollo.

El ELISA está conformado por los siguientes elementos:

- Fase solida:
 - Usualmente es una microplaca de 96 pozos, distribuidos en 12 columnas y 8 filas (Fig. 2)

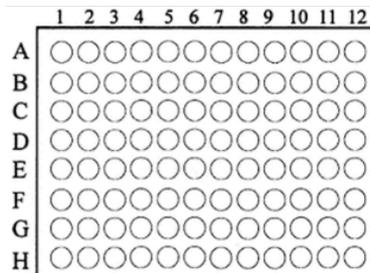


Fig 2 Ejemplo de una microplaca de titulación que sirve de fase sólida dentro de una prueba de ELISA

- Fijado o absorción del Anticuerpo
 - El fijado o absorción del anticuerpo es comúnmente llamado pegado, el cual es un resultado de la interacción hidrofóbica entre la estructura no polar de la proteína y la composición del plástico del que está compuesto la fase sólida.
 - La unión de anticuerpos u hormonas se realiza con facilidad gracias a la capacidad que tienen las proteínas de adsorberse a un pH 9.0 a la superficie de plásticos tratados. La unión del inmunorreactivo a la fase sólida se realiza por medio de adsorción física directa, de la **inmovilización covalente**, o por sistemas combinados.
- Anticuerpo (Ac)
 - Los anticuerpos utilizados para EIA pueden ser de tipo policlonales o monoclonales.
 - Los Ab policlonales son el resultado de una estimulación antigénica producida en ejemplares vivos, los cuales reconocen varias porciones del ag.
 - Los monoclonales son producidos en cultivos celulares, sin embargo estos inicialmente fueron generados a partir de la inmunización en seres vivos. Tienen una mayor especificidad ya que solo reconocen una porción en específico del ag, en comparación con los policlonales (fig 3).

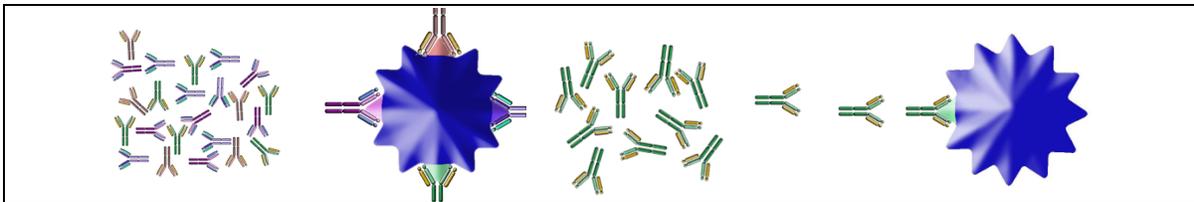


Fig 3. Del lado izquierdo se representan Ac policlonales y su unión en diferentes epítomos de un Ag. Lado Derecho se representa un anticuerpo monoclonal, unido a una región específica.

- Incubación.
 - La incubación es el tiempo necesario para que se logre una reacción entre el anticuerpo y la fase sólida o bien para que se dé la reacción antígeno (Ag) - Ac.
 - Cuando se realiza una incubación inicial, es decir, la adhesión del anticuerpo a la fase sólida, la cual se da por enlaces covalentes, se requiere de un buffer con una molaridad de 0.05 M y pH 9.6, el cual fue descrito en la parte inicial del presente escrito.
 - Es recomendable que los buffers utilizados durante la reacción entre el antígeno y el anticuerpo cuenten con características similares a las condiciones fisiológicas de un organismo, es decir:
 - pH 7.2
 - Temperatura 37°C (15 a 25°C)
 - Molaridad 0.15M de NaCl

Nota: cuando se requiera que tener una mayor sensibilidad del ensayo, las características de incubación pueden ser modificadas, principalmente la temperatura

- Tiempo de equilibrio dependerá de la incubación que se esté realizando.
 - En los casos donde se fija el anticuerpo a la fase sólida el tiempo será de 18 a 24 hrs, mientras que la reacción antígeno anticuerpo tendrá una duración promedio entre 1 a 3 horas, sin embargo existen protocolos que requieren incubación de hasta 24 horas y temperaturas bajas de 4°C.
- Lavado
 - El lavado se utiliza en varios momentos del desarrollo de la prueba y tiene como finalidad eliminar los excesos de los reactivos utilizados, tal es el caso de anticuerpos, antígenos, controles de calidad y controles para la calibración de los equipos. Para ello se utilizan soluciones salinas que contienen un detergente no iónico débil, el uso de estos detergentes es evitar ser agresivos con las proteínas que ya han sido fijadas.

- Antígeno (Ag)
 - Son proteínas, carbohidratos u hormonas que reacciona con un anticuerpo específico, la inoculación de estas sustancia dentro de un organismo vivo puede generar los anticuerpo, en ocasiones deberán de estar acompañados de sustancias que estimulen al sistema inmune para la producción de anticuerpos.
- Enzima conjugada:
 - Es el complejo formado entre una enzima adherida a una proteína, en este caso a un Ab o Ag. Esta sustancia que reacciona como catalizador provocando una acción específica, la cual dará una coloración que será la forma de cuantificar (ELISA cuantitativo) o calificar (ELISA cualitativo) la reacción que se está llevando a cabo.
- Controles de Calidad (CC):
 - Los CC son muestras especiales que son suficientemente estables y homogéneas para dar el mismo resultado, y que están disponibles en cantidad suficiente para repetir los análisis a lo largo del tiempo, estas CC servirán para confirmar los resultados sean homólogos y el ensayo funcione de manera adecuada.
- Sustrato
 - Compuesto químico que al reaccionar con la enzima produce un color determinado. Los más comúnmente utilizados son el 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) más conocido como ABTS y 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB).
- Cromóforo:
 - Sustancia química que al ser excitado produce un color, en el caso de esta prueba es como resultado de la interacción entre el sustrato y la enzima.
- Parado de la Reacción:
 - Acción por la cual, con el uso de un ácido, se detienen la acción del sustrato, por lo que el cambio de color se hace más lento, permitiendo su interpretación.
- Lectura:
 - Para la técnica donde solo se requiere una determinación cualitativa la lectura se realiza por la presencia o ausencia de color y dependerá de los puntos establecidos previamente, considerando a las características de la prueba.
 - En los casos donde se requiere una interpretación cuantitativa, la lectura se hace con ayuda de un espectrofotómetro, utilizando una longitud de onda específica de acuerdo a la coloración obtenida (Cuadro 1).

Cuadro 1 Longitudes de onda recomendadas de acuerdo a la coloración obtenida

Color	Longitud de Onda
Amarillo	450
Verde	414
Café	450
Azul	650
Amarillo	420
Morado	588

Desarrollo de la Técnica de EIA

El alumno aplicará los conocimientos adquiridos previamente para realizar la cuantificación de hormonas, aplicando la técnica de EIA.

Actividades

El alumno realizará la cuantificación de hormonas esteroides a partir de diferentes tipos de matrices.

Habilidades y destrezas a adquirir

El alumno adquirirá las habilidades necesarias para poder desarrollar e interpretar la cuantificación de hormonas por el método de EIA.

Desarrollo de la práctica

La técnica de ELISA.

- Etapa 1
 - Fijación del anticuerpo.
 - Para fijar el anticuerpo se requiere hacer una dilución el Ab con el Buffer de pegado. La concentración varía dependiendo del tipo de placa (fase solida) a utilizar y la hormona que será utilizada.
 - Ejemplo:
 - P4=1/8,000
 - E1G= 1/15,000
 - Cortisol= 1/12,000
 - Los anticuerpos utilizados se diluirán a fin de colocar una concentración conocida dentro de cada pozo, previo a esto ser harán pruebas para determinar la concentración mínima necesaria que reaccionará con la enzima conjugada, con ello optimizar los reactivos. Para lograr lo anteriormente expuesto se podrá hacer uso de la fórmula: $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$

Ejemplo de elaboración de anticuerpo.

Se requiere una dilución 1/15,000 para cubrir una placa de 96 pozos con 100uL cada pozillo, es decir se requiere un volumen de 96000 ul, al que habrá que considerar un 5% de volumen de trasvase o desperdicio para un volumen total de 10080uL. Considerando que el anticuerpo se encuentra diluido 1/100 tenemos que:

Entonces:

- El volumen inicial es desconocido
- La concentración inicial será: 1:100
- El volumen final: 10080 microlitros
- La concentración final: 1:15,0000

Sustituyendo:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$1:100 \cdot X = 1:15,000 \cdot 10,080 \text{ microlitros}$$

Despeje

$$X = \frac{(1:15,000) \cdot 10,080}{(1:100)}$$

$$X = \frac{(1/15,000) \cdot 10,080}{(1/100)} \quad \left| \quad X = \frac{0.000066 \cdot 10,080}{0.01} \quad \left| \quad X = \frac{0.672}{0.01} \quad \left| \quad X = 67.2 \text{ microlitros} \right. \right.$$

Es decir, 67.2 microlitros serán tomados de la solución inicial y serán colocados en 10012.8 microlitros del diluyente, para obtener un total de 10080 microlitros que serán utilizados para adicionar 100uL a cada pocillo.

NOTA: Las concentraciones pueden variar de acuerdo a las características del anticuerpo utilizado, ya que algunos tienen una interacción más débil con la fase sólida, en comparación con otros, además de los equipos utilizados para su interpretación dentro del laboratorio.

- Para el llenado de los pozos se colocan 50 o 100 ul (microlitros) de coating buffer en cada pozo, en las coordenadas A1 y B1 se colocará solamente dicho buffer, lo que servirá como valor de referencia blanco. En tanto, que en el resto de los pozos de A2 a H12 se colocará la solución de anticuerpos elaborada previamente.

- Incubación: se deberá dejar incubar por un lapso mínimo de 18 horas a 4°C.
- Etapa 2
 - Después de las 18 horas de incubación se retira el exceso de solución decantando la placa.
 - Lavado 1: Se lava la placa con solución de lavado, existen protocolos que requieren de 1 a 5 lavados, en nuestro caso se realizan dos veces el procedimiento.
 - Colocar en los pozos 50 o 100 microlitros de las muestras a las que se realizará la determinación hormonal, ubicándolas de la siguiente forma:
 - UNE (Unión No específica): Pozos A1 y B1
 - B0 (Unión Máxima): Pozos A2 y B2
 - Curva Estándar: La curva estándar son valores conocidos de la hormona los cuales serán comparados con las muestras desconocidas. Estos pueden ser desde 5 hasta 11, dependiendo de los protocolos elaborados. Se colocan a partir de A3 con su respectiva replica, es decir, la misma sustancia en la coordenada de inferir (B3).
 - Preparación de Curvas Estándar
 - Las curvas de calibración son muestras cuyo valor de hormona has sido determinado por las personas que están desarrollando la técnica, dichos valores permitirán compara el resultado de la muestra desconocida, con la muestra conocido permitiendo asignarles un valor cuantitativo.
 - El proceso para el desarrollo puede hacerse de varias formas, el más práctico es colocar una concentración de hormona conocida en un tubo de vidrio, esperar a que este se liquidó en el cual está suspendido se evapore y resuspenderlo a un volumen conocido, en nuestro caso, colocamos 50ng en un tubo se añaden PBS (Solución Buffer de Fosfatos) para obtener una concentración de 50ng/ml. A partir de esta solución se hacen diluciones dobles seriadas para obtener las siguientes cantidades.
 - Ejemplo Curva de Calibración (Cuadro 2)

Cuadro 2 Ejemplo de concentraciones utilizadas en una curva de calibración

Punto de Curva	Concentración ng/ml
B0	0.000
1	0.024
2	0.048
3	0.097
4	0.195
5	0.390
6	0.781
7	1.562
8	3.125
9	6.250
10	12.50
11	25.00

- Al término de la curva de calibración se colocan por duplicado las muestras de las cuales se desea hacer la determinación.
 - Los controles de calidad se colocan al final de las muestras, los cuales también deberán de ir en duplicado.
 - Colocación de la Enzima Conjugada: una vez que los pozos han sido recubiertos de acuerdo al paso anterior, con ayuda de una pipeta multica canal se coloca el conjugado a todos los pozos (de A1 a H12), el cual es hormona marcada que competirá con la muestra a fin de ocupar los lugares disponibles. Este tipo de EIA es por competencia (Figura 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UNE	B0	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10
B	UNE	B0	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10
C	Mp	Mp.	Mp.	Mp								
D	Mp	Mp.	Mp.	Mp								
E	Mp	Mp.	Mp.	Mp								
F	Mp	Mp.	Mp.	Mp								
G	Mp	Mp.	Mp.	Mp	Mc	Mc						
H	Mp	Mp.	Mp.	Mp	Mc	Mc						

Fig 4 Representación esquemática del montaje para la placa ELISA. Donde UNE es la unión no específica, B0 es la unión máxima antígeno anticuerpo, ST Curva estándar, Mp. Muestra problema. Mc. Muestra control.

- Incubación 2: Se realizará por un periodo de 2 horas a una temperatura entre los 20-22°C, preferentemente cubierto de la luz.
- Lavado 2: Se decanta el contenido y se lava dos veces la placa con solución de lavado.
- Añadir el Sustrato: El sustrato utilizado puede ser ABTS o TMB, del cual se añaden 100ul por pozo desde el A1 al H12
 - Preparación del TMB
 - El TMB es uno de los muchos sustratos que pueden ser utilizados para realizar el revelado de la reacción y poder cuantificar las cantidades de hormona presente en una muestra. Consta de dos elementos: Citrato de Fosfato que es un buffer ácido el cual contiene perborato de sodio que permite la reacción oxidación-reducción y la Tetrametilbenzadina un cromógeno que es el cambiador de color
 - Se diluyen el contenido de una capsula de citrato fosfato (CF) en 100ml de agua bidestilada.
 - Tomar 10 ml de la solución (CF).
 - Añadir una pastilla de TMB y dejar que se diluya en la solución de citrato fosfato, lo cual toma un tiempo promedio de 5 min.
 - Añadir a todos los pozos.

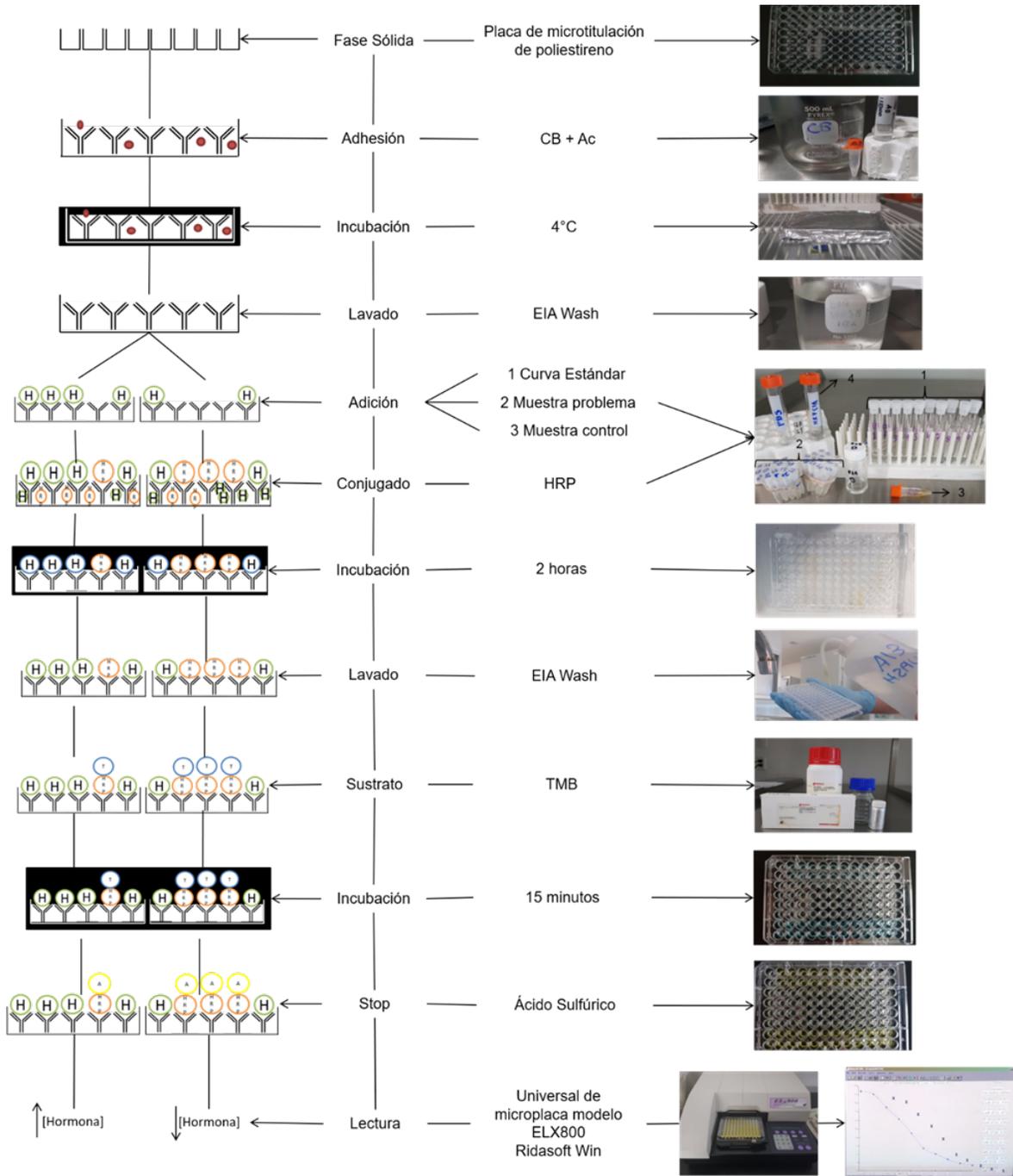
NOTA: El sustrato deberá de prepararse minutos antes de ser añadido a la placa, ya que de lo contrario se quela, haciendo que la reacción con la enzima sea débil.

Es importante no tener contacto directo con la solución de TMB, ya que el acúmulo de esta sustancia en el organismo puede tener efectos nocivos en el personal.

- Incubación 3: Una vez que se adiciona el sustrato, se deja incubar por un lapso de 30 min a una temperatura entre los 20-22°C, en un lugar donde no permita la entrada de la luz para que la reacción sea homogénea.
- Parado de la reacción: una vez transcurrido el tiempo de incubación 3, se coloca ácido sulfúrico (H₂SO₄).
- Lectura de la placa: con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm
- Con los resultados obtenidos se realiza la interpretación de resultados para emitir un diagnóstico.

Los pasos mencionados previamente se resumen en la figura 5

Fig 5. Pasos para el desarrollo de una Prueba de ELISA de Competencia



Preparación de muestras

El alumno identificará las muestras que potencialmente pueden ser utilizadas para la extracción y cuantificación de hormonas esteroides por la técnica de ELISA, así como método de expresión de las mismas.

Para determinar las concentraciones hormonales a partir de muestras de orina o heces es necesario conocer el metabolismo de las hormonas para poder determinar las hormonas a cuantificar en este tipo de muestras.

Fecales

Las muestras fecales deberán ser sometidas a un proceso de extracción hormonal, la cual se logra a partir de alcoholes.

El proceso de extracción:

- Realizará un desecado de la muestra, para ello la muestra será sometida a una temperatura entre 65 y 75 °C, durante un tiempo entre 4 y 5 horas, hasta que el peso de la muestra sea constante.
- Una vez seca la muestra se pesarán de 0.3 a 0.5 grs
- Se realiza dilución volumen:masa a una proporción 1:10, es decir, por cada 0.1gr de heces secas se le adicionará un 1 ml de solución de extracción, que consiste en una solución de etanol al 90%, es decir en un volumen de 1 ml, 900 uL serán de etanol y 100uL de H₂O destilada.
- La mezcla previa será agitada por 1 minuto con ayuda de un vortex
- Una vez homogenizada, se coloca en un agitador para tubos de hematología, donde permanecerá en agitación por al menos 8 hrs.
- Posteriormente, los tubo serán centrifugados a 5,000 rpm/min durante 10 min.
- El sobrenadante obtenido será extraído con ayuda de una pipeta (pasteur o micropipeta) para ser colocado en criotubos, los cuales serán almacenados hasta el momento de su cuantificación hormonal.
- Previo a la cuantificación hormonal se realizará una dilución del extracto a fin de que sea cuantificable dentro de las curvas de calibración preestablecidas.
- Dichas diluciones serán desde 1:10 o 1:100.

Dado que la cuantificación hormonal se realiza a partir una muestra obtenida en gramos, la expresión final de la cuantificación se realizará en ng de hormona/mg heces.

Urinarias

Las muestras urinarias remitidas al laboratorio de endocrinología deberán ser almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Lo anterior con la intención de inhibir la proliferación bacteriana, de los organismos que se encuentren presentes por el método de colección, el cual generalmente es por obtención directa del piso.

Con el uso de esta técnica generalmente se cuantifican metabolitos de hormonas esteroides principalmente estrógenos conjugados (E1G) y pregnandiol (PdG)

Al igual que en el caso de las heces, se elaborarán diluciones de la muestra las cuales podrán iniciar de 1/10 o mayores.

Para poder realizar la cuantificación de hormonas es necesario realizar diluciones se puede partir desde 1:10 hasta 1:1000, según sea el caso

Prueba de Jaffe para determinación de creatinina (Cr)

El uso de la prueba de Jaffe tiene dos funciones. Dado que las muestras de orina en la mayoría de las ocasiones son colectadas del piso, será necesario corroborar que estas son idóneas para realizar cuantificaciones hormonales, es por ello que se deberá cuantificar la concentración de Cr urinaria. Por otra parte, este ensayo sirve para determinar la función renal y con ello conocer el grado de filtrado renal para inferir el filtrado de la hormona. Por otra parte, se obtendrá un parámetro de referencia para emitir un resultado con base en una relación creatinina/hormona, es por ello que todas las muestras cuyo valor sea inferior a 0.100 mgCr/mL serán no diagnósticas, dado que son muestra demasiado diluidas, dando como resultado niveles sobre estimados al momento de ser calculados.

Desarrollo de la prueba de Jaffé

- La muestra de orina será diluida en una proporción 1:100
- Se colocaran 100 microlitros en una microplaca con 96 pozos de:
 - Agua, por cuadruplicado, en los pozos 1A, 1B, 1C y 1D
 - Estándar de Cr (1mg/ml), por cuadruplicado, en los pozos 1E, 1F, 1G y 1H
 - Muestra, por duplicado o triplicado, a partir del 2A y hasta el 12H
- Colocar 50 microlitros de Hidroxido de Sodio (NaOH) 1N, en todas las muestras.
- Colocar 50 microlitros de Acido Picrico, en todas las muestras.
- Dejar incubar por 15 min a temperatura ambiente.
- Leer a en un lector de placas a una longitud de 490nm.

El fundamento de la prueba se basa en la reacción de la creatinina con el Acido pícrico, que en un medio alcalino forma pricatos, tornando la solución a una coloración naranja.

Una vez que se obtienen las densidades ópticas (DO) de las muestras se hace un blanqueo de los resultados, es decir, el promedio la DO del agua se resta al resultado de todas las muestras. Posteriormente, el promedio de las DO de las muestras es dividido entre la DO del estándar, dando por resultado los miligramos de Cr /ml

Sanguíneas

Las muestras sanguíneas remitidas al laboratorio para la determinación endocrinológica deberán ser centrifugadas a 5000rpm/10 min para extraer el suero o plasmas, según sea el caso. En las situaciones donde se remiten plasma preferentemente deberá ser con heparina, ya que en las muestras con EDTA, dan un valor inferior al detectado en suero o plasma con heparina.

Previo al proceso de centrifugado, las muestras deberán reposar para que las células rojas se retraigan y obtener un suero sin hemólisis. Una vez recuperado el suero, este se trasvasará a crioviales para su almacenamiento hasta el momento de su proceso.

El suero o plasma podrá ser cuantificado sin ser diluido, en caso de que se sospeche que la cuantificación sea mayor a la curva de calibración se podrán hacer diluciones dobles seriadas, es decir; 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128,... hasta encontrar una dilución idónea que se encuentre dentro de la curva de calibración y permita su cuantificación.

Interpretación del ELISA

Con los datos obtenidos con ayuda de algún software que actualmente existen en el mercado se procede hacer el análisis e interpretación de las muestras, inicialmente se debe observar que la representación gráfica de la curva de calibración muestres una pendiente alrededor de los 45°. (Fig 6) Posteriormente determinar los puntos de corte, donde la reacción es menos específica, ya que los valores obtenidos en esos puntos serán poco específicos, de ser así la muestra tendrá que ser sometida a una nueva cuantificación, ya sea diluyéndola o concentrándola (Fig 7).

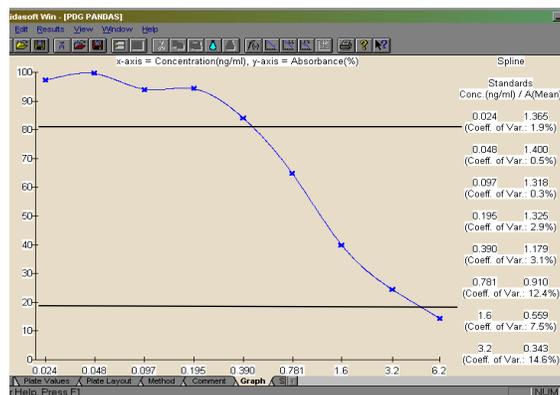


Fig 6. Representación gráfica de las densidades ópticas obtenidas de una curva de calibración, las líneas negras muestran los puntos de corte.

Samples							
ID	Absorbance (Mean) (CV) (%)			calculated ng/ml	*	=	ng/ml
Ocelote181018	0.127	7.8	15.0	2.19	10.00		21.94
19	0.141	10.5	16.6	1.95	10.00		19.45
20	0.125	22.6	14.8	2.23	10.00		22.33
21	0.117	41.1	13.8	2.40	10.00		24.02
22	0.138	28.2	16.3	1.99	10.00		19.95
23	0.085	0.8	10.0	3.39	10.00		33.87
24	0.136	38.0	16.1	2.03	10.00		20.29
SD	0.118	52.7	13.9	2.38	10.00		23.80
Hipoptamo	0.450	2.4	53.1	0.306	10.00		3.06
Camella181018	0.194	18.4	21.7	1.38	10.00		13.76
181018	0.318	32.5	37.5	0.494	10.00		4.94
					10.00		4.94

Fig 7. Resultados de las concentraciones obtenidas mediante un ELISA de competencia, analizadas por el programa RIDAWIN

Dependiendo del tipo de muestra que se esté utilizando se hará el ajuste necesario para su adecuada expresión y emisión de resultados.

Cuando la matriz inicial es suero y se utilice una dilución el resultado solo se multiplicará por el factor de dilución, es decir, si el suero fue diluido 1/5 y el resultado fue de 21.94 ng/mL el resultado real será de (21.94 x 5) 109.7ng/mL, existen programas que ya calculan el factor de dilución, por lo que es importante tener presente esta adecuación a fin de no sobre estimar los resultados.

En el caso de la muestra corresponda a heces, generalmente se utilizan proporciones de heces y soluciones, como se explicó previamente, para realizar la extracción, es por ello que este factor se deberá de considerar al momento de realizar el ajuste final, es decir, si se utilizó una proporción 1:10, el resultado final será (21.94x10) 219.ng/g de heces. En este punto es importante mencionar que la expresión final no se realiza en ng o pg/mL, si no que se expresa en g de heces, dado que la porción de muestra utilizada fue cuantificada en masa, en lugar de volumen.

Finalmente, en el caso de las hormonas cuantificadas a partir de orina se deberá de realizar un ajuste con base en la concentración de creatinina, la cual servirá de valor de referencia. Como ya se mencionó se realizarán la cuantificación de creatinina y hormonas, una vez obtenidos ambos resultados se dividirá la concentración hormonal entre la concentración de creatinina.

$$\frac{\text{ng de hormona/mL}}{\text{mg de creatinina/mL}}$$

Al tener dos unidades iguales que se dividen, se eliminan, quedando:

$$\frac{\text{ng de hormona}}{\text{mg de creatinina}}$$

Suponiendo que se obtienen 21.94 ng de estrógenos conjugados/mL y 0.350mgCr/mL, se obtendrían 62.68ng de E1G/mgCr

2. Técnicas de reproducción asistida

Principales diferencias anatómicas-reproductivas de las especies silvestres

Los diferentes géneros taxonómicos presentan diferencias anatómicas considerables, es por ello que para realizar propuestas de reproducción asistida es importante conocer la conformación del tracto reproductor.

Objetivo

Identificar las principales técnicas de reproducción asistida con potencial de implementación en las especies de fauna silvestre en cautiverio, así como conocer los aspectos reproductivos de cada género taxonómico que podrán contribuir al éxito reproductivo.

Actividades

Identificar las características del tracto reproductor a partir de animales que causen baja.

Habilidades y destrezas a adquirir

El alumno podrá identificar las estructuras anatómicas que serán evaluadas al momento de realizar una inspección del tracto reproductor, con lo que podrá analizar la factibilidad de implementar alguna de las técnicas de reproducción asistida.

Desarrollo de la práctica

- Cuando un ejemplar cause baja se realizará la exploración del tracto reproductor externo, se aplicará el protocolo de evaluación reproductiva a fin de que el alumno pueda familiarizarse con una evaluación en vivo.
- Se tomarán citologías del tracto reproductor.
- Una vez que el equipo de anatomo-patología haya extraído los órganos de cavidad abdominal, se procederá a ubicar el tracto reproductor *insitu* de esta forma se evaluarán los pros y contras para la implementación de una biotecnología reproductiva.

En el cuadro 3 se ejemplifican algunos de los tractos reproductores.

Cuadro 3. Tracto reproductor de algunos géneros taxonómicos

Nombre común/ Científico	Imagen	Nombre común/ Científico	Imagen
Macho, adulto, Gran kudú <i>Tragelaphus strepsiceros</i>		Hembra, juvenil, Jirafa/ <i>Giraffa camelopardalis</i>	
Macho, Piton reticulado/ <i>Malayopython reticulatus</i>		Hembra, Tortuga de aldabra/ <i>Aldabrachelys gigantea</i>	

Evaluación y criopreservación de muestras seminales

Una de las actividades más comunes de fauna silvestre en cautiverio es la criopreservación de muestras seminales, la finalidad de dicha práctica radica en mantener un banco genómico, que permita tener una diversidad genética de la especie en el caso de caer en una crisis en su conservación.

Actividades:

El alumno realizará la evaluación de muestras seminales y la criopreservación de gametos considerando las particularidades del género taxonómico del cual procede.

Habilidades y destrezas a adquirir

Realizar la evaluación seminal e implementará el protocolo de criopreservación de acuerdo al género taxonómico, asimismo conocerá las características principales que deberán tener los diluyentes que serán utilizados para el procedimiento.

Desarrollo de la práctica

Cuando se obtiene una muestra seminal al laboratorio, se le deberán de realizar el análisis espermatozoides correspondiente. Para ello de manera inicial se deberá de identificar el género taxonómico del cual proviene, dado que existen algunas especies que requieren un procesamiento previo a la evaluación, tal es el caso de primates, en los cuales habrá que hacer una licuefacción de la muestra a fin de que sea factible la evaluación de la misma.

En el caso de primates, la licuefacción se logra mediante la inclusión de la muestra en tripsina o en medio de cultivo a temperatura de 35 a 37°C, experimentalmente se ha usado PSA, sin embargo, no se ha estandarizado la concentración a la cual se deberá de hacer la inclusión para que esta se lleve a cabo de forma eficiente.

La concentración de tripsina utilizada para la licuefacción preferentemente no deberá exceder por arriba del 1%, aunque algunos estudios han reportado hasta el 5% de inclusión.

Una vez que se ha licuado el coágulo seminal se deberá de realizar el examen de la muestra seminal apegados a los criterios que se establecen en el manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el uso de esta clasificación permitirá homogenizar los criterios de evaluación, haciendo una evaluación objetiva.

Técnicas de colección de semen

La recuperación de gametos puede realizarse por medio de diversas técnicas, entre las que se encuentran:

- **Electroyaculación:** Consiste en proporcionar estímulos eléctricos en la región lumbo-sacra, sitio donde se encuentran los nervios que inervan la región genital, al excitar dichos nervios se promueve la eyaculación. Sin embargo, como el estímulo es muy amplio en esa región también se promueve la micción, por lo que en ocasiones se pueden obtener muestras contaminadas.

Para el desarrollo de la técnica es necesario que el ejemplar se encuentre anestesiado, momento en el cual se procederá a realizar la evaluación clínica y reproductiva. Cabe mencionar que su uso de esta técnica se debe a diversas causas, principalmente hay que considerar que muchos de los ejemplares son carnívoros de gran tamaño que pueden poner en riesgo al personal que los maneja, por otro parte, en contraste, hay ejemplares herbívoros que el constante manejo, sin un adecuado condicionamiento operante, podría derivar en una miopatía por captura predisponiéndolo a la muerte.

- **Procedimiento:**
 - **Contención química del ejemplar:**

- Se deberán usar de manera preferente anestésicos que proporcionen poca relajación muscular, ya que de lo contrario la probabilidad de obtener una muestra contaminada con orina es muy alta.
- **Importante:** Previo a la electroeyaculación el ejemplar deberá de estar completamente estabilizado de las constantes fisiológicas, de lo contrario el procedimiento se suspenderá.

Nota: Las evaluaciones deberán de hacerse en el menor tiempo posible, con la intención de que el ejemplar permanezca el menor tiempo posible anestesiado. Todo procedimiento anestésico tiene un grado de riesgo.

- Evaluación del aparato reproductor
 - Morfometría del aparato reproductor
 - Medición de testículos: este parámetro es importante, dado que existen especies que presentan una inhibición de actividad reproductiva por diversos factores entre los principales se encuentran:
 - Falta de estímulo por presencia de una hembra
 - Estatus social
 - Temporada reproductiva, aunque este parámetro está bien delimitado de manera bibliográfica para la algunas de las especies, aún existen un gran número que no tienen información y que las condiciones de cautiverio pueden hacer que varíen de forma drástica, dado que se han modificado las condiciones naturales de su microhábitat.
 - Inspección del pene: deberá de estar íntegro y sin laceraciones. (Fig 8)



Fig 8. Evaluación del pene de un Rinoceronte blanco

- Inspección de mucosa del pene y prepucio
 - Coloración: la mayoría de los ejemplares presentan una coloración rosácea, sin embargo, existen ejemplares en los cuales se observe una pigmentación.
 - Integridad: tanto la mucosa como el prepucio deberán presentar una continuidad en su estructura, ya que, de lo contrario, podría ser indicador de una alteración, la cual podría ser de tipo metabólica, infecciosa o de manejo.
 - Humedad: para evitar laceraciones y daño al pene, es recomendable que haya una correcta humectación, además que reflejara de manera indirecta el grado de hidratación del ejemplar.
 - Elasticidad: una adecuada elasticidad permitirá un correcto envaine y desenvaine.

- Toma de impronta de la mucosa del pene
 - La mucosa vaginal y la del pene tienen el mismo origen, por lo tanto, la morfología celular que se puede encontrar es similar, si bien, el realizar este tipo de muestreo no es tan común es importante llevar un registro, ya que podría aportar información importante, relacionada con el desarrollo y estado de salud de los ejemplares (Fig 9).

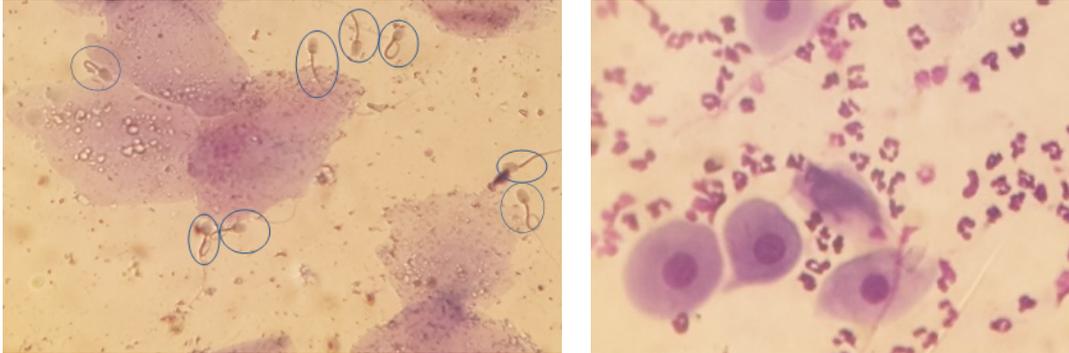


Fig.9 Impronta de la mucosa del pene. Lado izquierdo el ejemplar mostro presencia de espermatozoides, posiblemente por masturbación por esterotipia, dado que se encontraba separado de la hembra. Lado Derecho, se observan gran cantidad de neutrófilos, asociados a la presencia de esmegma.

- Ultrasonografía:
 - Glándulas, principalmente próstata
 - El monitoreo de las glándulas accesorias, permitirá identificar de manera oportuna, si están predispuestos a una hipertrofia de la misma.
 - Testículos.
 - Se deberá de observar un parénquima integró lo que servirá como indicador indirecto de uno adecuado funcionamiento (Fig 10).

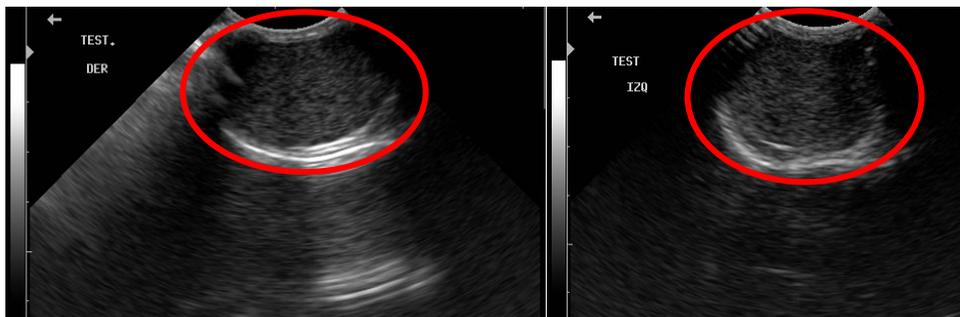


Fig 10 Estudio de ultrasonografía de testículos de Canguro rojo, dentro del círculo rojo se observa el parénquima se observa íntegro y con una adecuada continuidad

- **Aplicación de estímulos eléctricos.** Es recomendable usar un electroeyaculador de voltaje regulado, ya que los equipos de voltaje fijo suelen ser poco eficientes. (Fig 11)



Fig 11 Electroeyaculador de voltaje regulado



Fig 12 Titi cabeza de león anestesiado y monitoreado para el procedimiento de electroeyaculación

- Obtención del eyaculado El desarrollo para dicha técnica consiste en introducir una sonda por el recto hasta llegar a la región lumbo-sacra (Fig 12). Con un generador de impulsos eléctricos (electroeyaculador), desde donde se podrá regular el voltaje requerido para estimular los nervios de la zona que es estimulada. La duración de los impulsos deberá de tener una frecuencia entre 3 a 5 segundos de estímulos por 3 a 5 de descanso en series de 15 a 20 (Fig. 13).



Fig. 13 Colecta de muestra por electroeyaculación. Lado izquierdo inicio del proceso en un Venado temazate, lado derecho momento de la eyaculación en un Titi cabeza de león.

- Recolección manual: Este procedimiento es poco utilizado en fauna silvestre, dado que los individuos requieren un entrenamiento, el cual puede lograrse mediante condicionamiento operante. Asimismo, se ve limitado, dado que en los carnívoros representa un alto riesgo para los manejadores al verse expuestos a los temperamentos de los ejemplares, sin embargo, en las especies que se practica dicha técnica se llegan a obtener muestras seminales de buena calidad, ya que la obtención se apega a procesos muy parecidos a la fisiología.

- De acuerdo al género taxonómico con el que se trabaje se deberá de focalizar el tipo, intensidad y duración del estímulo.
- En las especies cuyo tipo de pene es vascular el estímulo se tendrá que dirigir a la región del glande, en las especies donde es fibroelastico ese deberá de usar a través de masaje de gónadas o una combinación de ambos.
- Recuperación postmortem: Esta técnica es muy utilizada en todos los ejemplares que causan baja, cuya intención es mantener el potencial genético del ejemplar, el cual podrá ser utilizado por la implementación de inseminación artificial.
 - Para el desarrollo del procedimiento se deberán de recolectar los testículos lo más pronto posible posterior al deceso del ejemplar, dado que a mayor tiempo posmortem la viabilidad de los espermatozoides se compromete. Una vez obtenidos los testículos, se pesan y se miden a lo largo y ancho, para posteriormente determinar el volumen testicular, mediante la fórmula de Lambert, la cual dice:
 - $0.71 (\text{Ancho al cuadrado} \times \text{largo}) = \text{volumen testicular}$
 - Se disecciona la cola del epidídimo para separarla del cuerpo los testículos. (Fig 14)
 - En taxones de talla grande se hace un lavado de la parte final de la cola, es decir, se expone la sección donde se introducirá con catéter para administrar un medio para de cultivo celular o diluyente para manejo de muestras seminales y posteriormente se recupera la solución introducida, la cual contendrá los espermatozoides.
 - Cuando el ejemplar es de talla pequeñas, una vez expuesto el epidídimo, con ayuda de una aguja o un cateter se inyecta un medio de cultivo celular como es HAM 10, Hepes o Tris, para posteriormente realizar 2 o 3 cortes a lo largo y ancho de la estructura a fin de recuperar el medio inyectado previamente. Es importante que se hayan disecado la mayor cantidad de vasos sanguíneos para evitar la contaminación de los espermatozoides con restos de sangre, dado que comprometerían la viabilidad de los gametos.



Fig 14 Epididimo de mono japonés

Análisis Espermatozoscópico

La evaluación seminal consta de una parte macroscópica y otra microscópica

Evaluación Macroscópica

Volumen.

En el caso de mamíferos de talla mediana o grande la medición de este parámetro no tiene mayor complicación, dado que los volúmenes que se obtienen son superiores a 0.5 mL, sin embargo en caso de mamíferos de talla pequeña o anfibios, aves y reptiles, la medición se torna un tanto complicada, dado que, los eyaculados difícilmente sobrepasan los 100 microlitros, Para poder

realizar la medición en estos organismos se hace una colecta con micropipetas calibradas a 10 microlitos para ir colectando el eyaculado, de esta forma se mide el parámetro en cuestión.

En el caso de primates se tendrá que medir el tiempo de licuefacción, este parámetro tiene relevancia en primates, dado que el eyaculado se solidifica al momento de ser expulsado por acciones de proteínas presentes en él, principalmente semenogelina II. La cantidad de esta proteína dará el grado de dureza, así como el tiempo de licuefacción del mismo, que puede ir de minutos a días. Motivo por el cual se han utilizado métodos para la licuefacción del coagulo seminal. Entre ellos el uso de tripsina al 0.05%. Las especies con mayor dureza en el coagulo son los primates del nuevo mundo, dentro de los grandes simios los más complejos para la licuefacción son los chimpancés (Fig 15).



Fig. 15 Muestra de eyaculado de chimpancé, obtenida de manera voluntaria mediante conducta redirigida.

Color y pH.

La coloración y pH del eyaculado al igual que otros parámetros están influenciados por la especie y la técnica de colecta, entre otros. Es así que, en el caso de reptiles y aves, el eyaculado puede estar contaminado con excretas, o productos de desecho como almizcle (sustancia de marcaje y/o defensa) razón por la cual la coloración podría verse diferente al clásico color blanco aperlado. En los casos donde se utiliza la electroeyaculación, frecuentemente las muestras se contaminan con orina, dando una tonalidad amarillenta. Influyendo directamente sobre el pH.

Evaluación Microscópica

Concentración.

Para la determinación de la concentración se utiliza la técnica de la cámara de hematocitometro, bajo los siguientes pasos:

- Dilución del eyaculado de una concentración de 1:200
- Se llenan las cámaras del hematocitometro, que está compuesta de dos cámaras una superior y una inferior.
- Contabilizar 5 de los 25 cuadrantes de cada cámara (Fig 16)
- Promediar ambos cámaras y el resultado obtenido se expresaría de la siguiente forma:

Numero de espermatozoides contabilizados x 10^7

El x 10^7 se obtiene de la dilución utilizada (1/200), por el número de cuadrantes contabilizados (1/5), en un volumen total de la cámara, el cual es de 1/10,000 de mililitro:

$$\frac{1}{200} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{10,000} = \frac{1}{10,000,000}$$

Si al momento de realizar el conteo de ambas cámaras, hay una diferencia mayor al 10%, el conteo deberá de repetirse.

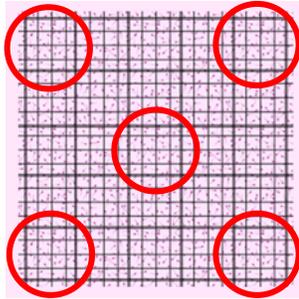


Fig. 16 representación de una de las de los cuadrantes de una cámara de Neubauer (hematocitometro), en rojo se indican los cuadrantes que serán explorados y donde se cuantificarán los espermatozoides.

Ejemplo: En una muestra de carnívoro del cual se obtuvieron 2 mL, se contabilizó en la cámara superior 52 espermatozoides y en la cámara inferior 47.
Con estos datos se saca un promedio lo que resulta

$$52+47 = 99$$

$$99/2=49.5$$

Lo que significa que se obtiene una concentración de 49.5×10^7
Expresado en otra forma obtenemos 495×10^6
Es decir: 495 millones de espermatozoides por mililitro
Que multiplicado por el volumen total se obtienen
990 millones de espermatozoides totales

Movilidad:

La movilidad es una de las características que se debe de evaluar una vez obtenido el eyaculado o una vez que el coagulo se va licuando, dado que se va perdiendo por el enfriamiento de la muestra o por la reacción a la luz y en algunos casos por la contaminación de la muestra.

La movilidad se clasifica en:

- Movilidad Progresiva Rápida: Los espermatozoides se mueven de forma rápida en una dirección ascendente ya sea lineal o en círculos grandes.
- Movilidad Progresiva Lenta: Los espermatozoides se mueven de forma lenta en una dirección ascendente ya sea lineal o en círculos grandes o pequeños.
- Movilidad No Progresiva: Los espermatozoides se mueven en su mismo lugar sin avance, en algunas ocasiones se mueven en círculos pequeños
- No Moviles: No se mueven.

Morfología y Viabilidad:

Para conocer la morfología de la muestra seminal se pueden utilizar diferentes tinciones, tal es el caso de Papanicolaou y Shorr, aunque la más utilizada es Eosina-Nigrosina. La razón por la cual ésta es de mayor uso, se basa en su practicidad, la cual no requiere más allá de 2 min para su elaboración, en el cuadro 4 se muestran algunos ejemplos de la morfología espermática de algunas especies.

Procedimiento para tinción con eosina-nigrosina:

- En un portaobjetos colocar:
 - una gota de 10 microlitros de la muestra seminal
 - una gota de 10 microlitros de la tinción Eosina-Nigrosina
- Mezclar
- Realizar un barrido sobre el porta objetos
- Montar la laminilla

- Observar al microscopio

Con el uso de esta tinción se puede observar de manera práctica y fácil la morfología de las células y la integridad de las mismas. Es decir, se podrá evaluar si los espermatocitos están vivos o muertos. El fundamento de esto último se basa en que las células vivas mantienen íntegra la membrana plasmática del espermatozoide, no permitiendo el paso de la tinción. Sin embargo, cuando las células mueren, dicha integridad se pierde y los espermatozoides se tiñen (Fig 17).

Cuadro 4. Ejemplo de morfología espermática de algunas especies de Fauna Silvestre.

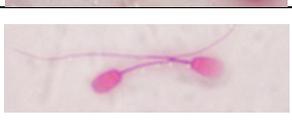
Nombre común/ Científico	Imagen	Nombre común/ Científico	Imagen
Binturong <i>Arctictis binturong</i>		Titi/ <i>Saguinus oedipus</i>	
Pavo real / <i>Pavo cristatus</i>		Ualabi/ <i>Macropus rufogriseus</i>	
Canguro rojo <i>Macropus rufus</i>		Cebra / <i>Equus quagga</i>	
Venado temazate/ <i>Mazama temama</i>		Oso pardo/ <i>Ursus arctos</i>	



Fig 17 Espermatozoides de Venado temazate teñidos con Eosina nigrosina para evaluar viabilidad espermática. Las flechas rojas indican los espermatozoides muertos, las azules los vivos

Criopreservación de Gametos

Para la criopreservación de espermatozoides existen diversas técnicas a ser implementadas, cuya elección dependerá del tipo de diluyente a utilizar y el proceso de congelación, este último puede ser en pajillas o en pellets.

Los diluyentes se basan en elementos que aporten nutrientes, antibióticos y estabilizantes celulares, además de crioprotectores.

Algunos ejemplos de los reactivos más utilizados como diluyente de muestra seminal se expresan en el cuadro 4

Cuadro 4 componente principales de un diluyente seminal

Nutrientes	Estabilizadores	Crioprotectores	Antibióticos
Glucosa Lactosa	Hepes Tris	Glicerol Etilenglicol Dimetilsulfoxido	Penicilina

La fórmula utilizada comúnmente es:

Reactivo	Cantidad
Glucosa	0.0908 grs.
Trizma base	2.4228 grs.
Ácido Cítrico	1.1478 grs.
Antibiótico (Penicilina)	10 ml (10,000 UI)
Agua Bidestilada	100 ml
Yema de Huevo	20%
Glicerol	3-5%

Por otro lado, existen diluyentes comerciales que no describen la composición de la que se encuentran elaborados, por lo cual se siguen los protocolos tal y como lo indica el fabricante.

Pasos para la congelación

- La dilución de la muestra seminal se realiza en proporciones iguales, es decir, una parte del eyaculado por una parte del dilutor, obteniendo una proporción 1:1
- Una vez diluido pasa al periodo de equilibrio el cual consta en mantener la solución a una temperatura de 4°C por un periodo de dos horas.

NOTA: Transcurrido el periodo de equilibrio se pueden tomar dos rutas para la congelación, la más común es el uso de pajillas de 0.5 o 0.25 ml y la otra es por la elaboración de pellets

Elaboración de pajillas

- El eyaculado es introducido en las pajillas, ya sea en 0.5 o 0.25 ml.
- Son selladas con el uso de alcohol polivinílico, en algunos casos se puede usar calor o esferas.
- Las pajillas son introducidas en un recipiente de unice, donde previamente se colocó nitrógeno líquido, las muestras deberán de estar a una altura entre 5 y 8 cm sobre el nivel del nitrógeno, para que solo tengan contacto con los vapores, y permanecerán ahí por un tiempo entre 10 a 15 min. (Fig.18)
- Una vez transcurrido el tiempo en vapores de nitrógeno líquido, se pondrán directamente en el líquido, el cual alcanza una temperatura de -196°C
- Una vez que se encuentran en contacto directo con el nitrógeno serán trasvasadas a los termos correspondientes.

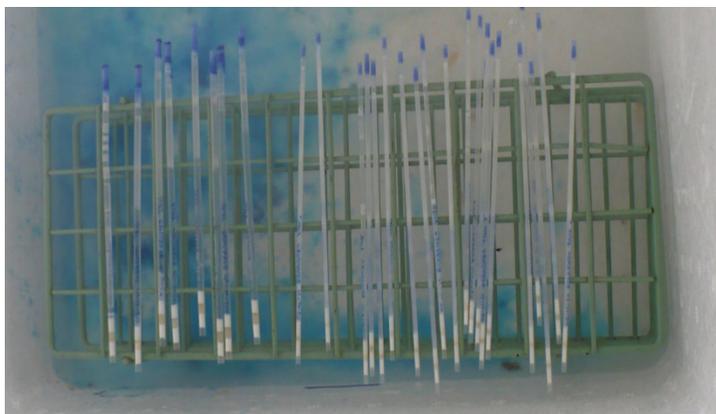


Fig.18 Pajillas dentro de un contenedor de unicel, al momento de realizar el proceso de cristalización

Elaboración de Pellets

- Sobre un bloque de hielo seco se realizan perforaciones con ayuda de una placa metálica con puntas, los punzones de la placa generalmente están graduados para hacer concavidades con un volumen de 0.5 ml.
- En cada orificio se colocará, con ayuda de una micropipeta, el eyaculado diluido y previamente mantenido a una temperatura de equilibrio, es importante que la punta no toque el hielo seco, ya que se puede congelar comprometiendo la viabilidad de la muestra (Fig.19).
- Una vez que la muestra se encuentra congelada, lo cual ocurre cuando la pastilla o pellet y se ve escarchado, aproximadamente 5 a 10 minutos, se procederá a colocarlos en un recipiente, el cual puede ser: un gobelet, un tubo falcon o eppendorf, en los dos últimos casos se recomienda que cuente con nitrógeno líquido en su interior.
- Posteriormente los contenedores donde se encuentran los pellets serán almacenados en los termos de nitrógeno líquido.

NOTA: Es importante que los contenedores: tubos, gobelets, bastones, incluso canastillas se encuentre bien identificados, así como actualizar el registro cada vez que se introduzcan muestras a los termos, lo anterior para evitar extravió, confusión de muestras y reducir el manejo de las muestras, a fin de garantizar su viabilidad.

Ocasionalmente se pueden adicionar al diluyente colorantes para hacer más fácil la identificación de la muestra.



Fig. 19 Colocación de la muestra seminal y diluyente sobre hielo seco para la elaboración de pellets

3. Elaboración de programas reproductivos

Las instituciones zoológicas deben de contar con un plan anual de trabajo para cada una de las especies que alberga, a lo que se le conoce como Plan de colección, en el cual se describen las acciones que cada área deberá de realizar en beneficio de los ejemplares, con dicho esquema de trabajo permite evaluar y priorizar los recursos a fin de optimizar los gastos corrientes. Es por ello que el desarrollo de un plan reproductivo sirve de guía para la toma de decisiones en materia de reproducción bajo las múltiples situaciones en las cuales se pueden enfrentar, en donde además deberá de considerar el promover o inhibir la reproducción, manteniendo un control y planeación poblacional dentro de las colecciones zoológicas

Objetivo de la Unidad

El alumno conocerá y desarrollará un programa de reproducción asistida para ejemplares de fauna silvestre en cautiverio.

Actividades

El alumno realizará un programa reproductivo, donde se indicarán las acciones de reproducción que serán implementadas en una especie determinada.

Habilidades y destrezas a adquirir

El alumno será capaz de elaborar un programa reproductivo apegado a las características de la especie, contribuyendo a los programas de conservación, además de realizar la evaluación de proyectos con la finalidad de determinar su viabilidad al momento de ser implementados.

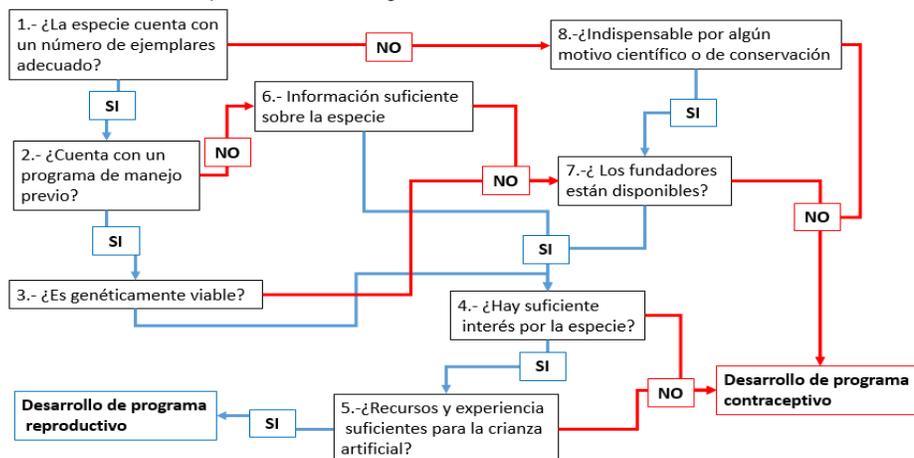
Desarrollo de la práctica

El alumno deberá determinar de manera objetiva las especies que requieren un plan de manejo reproductivo, considerando diversos factores, entre los que se encuentran: Estatus de conservación, número de ejemplares disponibles, información bibliográfica, infraestructura, recursos humanos y materiales, así como los pros y contras de las propuestas realizadas.

Identificación de especies prioritarias.

- Cada entidad zoológica tiene diversas formas de priorizar a las especies de mayor valor reproductivo, es por ello que los alumnos deberán de generar un criterio de selección de especie, apegado a los objetivos de cada institución, para ello podrá apoyarse en un flujograma de toma de decisiones (Fig. 20).

Fig 20 cuadro de toma de decisiones para la elaboración de un programa reproductivo, Adaptado de "2009 Regional Collection Plan" de la AZA.



Documentación bibliográfica sobre los aspectos reproductivos de la especie

- Se determinarán los principales aspectos reproductivos de la especie, como son: la pubertad (hembras y machos), estacionalidad en caso de presentarla, duración de la gestación, número de crías por camada, poligamia, monogamia, duración de la vida reproductiva, conductas reproductivas observables, consideraciones importantes para la aplicación de biotecnologías reproductivas, esquemas de contracepción a ser utilizados, instalaciones requeridas.

Albergue:

- De acuerdo a la biología de la especie y los aspectos reproductivos, como se deberá determinar la la carga animal presente, con el objetivo de establecer si el programa reproductivo estará enfocado a la concepción o a la contracepción.
- En caso de requerir un manejo particular, los alumnos deberán proponer las adecuaciones pertinentes para optimizar el trabajo reproductivo y no poner en riesgo a los operadores.

Evaluación reproductiva de los ejemplares

- Individual
 - Consiste en conocer la integridad viabilidad reproductiva de los ejemplares, para ello se deberá de proponer un esquema de evaluación metódica que será implementado, tanto en hembras como en machos, considerando las características anatómicas y los riesgos potenciales, tanto para el ejemplar como para los manejadores.
- Social
 - El alumno deberá proponer una metodología para evaluar el potencial reproductivo de los ejemplares dentro de un grupo social o dentro de la formación potencial de una pareja, lo anterior con la finalidad de poder inferir a los ejemplares candidatos a implementar acciones reproductivas y apegado a la consulta bibliográfica e interacciones sociales que se puedan registrar.

Implementación de técnicas de reproducción asistida.

- El alumno deberá mencionar que técnicas de reproducción asistida podrán ser implementadas, así como la metodología para su ejecución
 - Ejemplo: se desarrollará un monitoreo Etológico-Reproductivo, el cual consta de 3 fases.
 - 1) Monitoreo ad libitum, se registrarán todas las conductas en intervalos de 15 minutos, durante varios momentos al día para generar un catálogo conductual.
 - 2) se Implementará un monitoreo conductual formal (focal, barrido, continuo o combinado) en determinado horario y lapso de tiempo. Con la finalidad de identificar el estatus jerárquico de los ejemplares.
 - 3) analizar los datos a fin de conocer el mejor candidato para implementar acciones reproductivas, ya que de acuerdo a la bibliografía deberá de presentar mejores condiciones reproductivas.

Cronograma de actividades.

Para hacer más eficiente las acciones es recomendable proponer un cronograma de actividades que permita saber qué acciones se van a realizar y en cuanto tiempo se podrán obtener resultados (cuadro 5).

Cuadro 5: propuestas de cronograma para el desarrollo de actividades reproductivas dentro de un plan de manejo reproductivo

Actividad	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Monitoreo Etológico				X	X	X						
Monitoreo Hormonal			X	X	X	X	X	X				
Inseminación Artificial									X			

Costos de implementación del plan de manejo

- Toda entidad zoológica tiene diversos fines, entre ellos el intercambio de ejemplares lo que permite mantener ejemplares reproductivamente viables, disminuyendo su consanguinidad. Así mismo cada uno de ellos tiene éxito reproductivo en diferentes especies, las cuales llegan a ser

material de gran utilidad para poder intercambiarlas o venderlas para la adquisición de nuevos ejemplares. Es por ello que uno de los puntos que deben ser considerados para implementación de plan de manejos reproductivos son los ejemplares que potencialmente rendirán mayores beneficios a la institución zoológica. Dado que la implementación de reproducción en fauna silvestre es de las áreas de mayor costo.

Evaluación del Plan de manejo

- Al finalizar cada etapa reproductiva, se deberán de emitir un informe con los logros obtenidos de las especies que han sido estudiadas con la intención de evaluar las metas cumplidas, así como detectar las áreas de oportunidad que pueden surgir, de igual forma se deberán de aportar correcciones que permitan mejorar los alcances propuestos. En este punto el alumno deberá de marcar cuales serían los puntos críticos que serán evaluados para considerarlo como un éxito o fracaso.

Corrección del Plan de manejo

- En una situación hipotética, se deberán marcar las correcciones realizadas a los planes de manejo, ya que las características de los grupos o individuos que se estén trabajando son dinámicas. Por anterior, hay que estar adaptando las condiciones de acuerdo los logros planteados previamente. Ninguno plan de manejo reproductivo deberá de permanecer más de dos años sin una evaluación del mismo. De lo contrario el éxito del plan de manejo se verá comprometido.

Bibliografía consultada.

- Artículos 27, 78 y 78 bis de la Ley general de vida silvestre, Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de julio de 2000, Última reforma publicada DOF 26-01-2015.
- Bertocchi, M., Bigliardi, E., Pelizzone, I., Vetere, A., Manfredi, S., Cattarossi, D., Di Ianni, F. (2021). Monitoring of the reproductive cycle in captive-bred female Boa constrictor: preliminary ultrasound observations. *Animals*, 11(11), 3069.
- Cools, T., Wilson, K. S., Li, D., Vancsok, C., Mulo, B., Leclerc, A., Wauters, J. (2024). Development and validation of a versatile non-invasive urinary steroidomics method for wildlife biomonitoring. *Talanta*, 273, 125924.
- Córdova-Izquierdo, A., Olascoaga Elizarraraz, A., Sandoval Zárate, J. A., Soto Mendoza, S., Rivera Rebolledo, J. A., Ruiz Lang, G., Villa-Mancera A. E., Olivares Pérez, J., Sánchez Aparicio, P., Juárez Mosqueda M. L. and Guerra Liera, J. E. (2015) Characterization of fecal testosterone profiles in volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) kept in captivity. *Journal of Science*, 5, 6, 349-353.
- Crowther J. R. (2002). *The ELISA Guidebook*, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- De Flamingh, A., Ishida, Y., Pečnerová, P., Vilchis, S., Siegismund, H. R., Van Aarde, R. J., Roca, A. L. (2023). Combining methods for non-invasive fecal DNA enables whole genome and metagenomic analyses in wildlife biology. *Frontiers in Genetics*, 13, 1021004.
- Gramieri J. Riger P. (2009) REGIONAL COLLECTION PLAN, 1ra Edición. San Antonio Zoological Gardens and Aquarium.
- de Mori, B., Mercugliano, E., Biasseti, P., Pollastri, I., Spiriti, M. M., Florio, D., Hildebrandt, T. B. (2024). The ethical assessment of Assisted Reproductive Technologies (ART) in wildlife conservation. *Biological Conservation*, 290, 110423.
- Heymann, E., Heistermann M., Löttker P. and Huck M. (2004) Monitoreo no-invasivo de animales silvestres –análisis genéticos y endocrinológicos a base de muestras fecales en “pichicos barba blanca” (*Saguinus mystax*, Callitrichidae, Primates) en la Estación Biológica Quebrada Blanca (EBQB), Perú. *Memorias del VI Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna silvestre en Amazonia y Latinoamérica*. Perú p.78-84.
- Lequin r. M. 2005 Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clinical Chemistry* 51:12, 2415
- Molinia, Frank; La Falci, Susana; Myers, Vaughan and McLane, Duncan. (2007) Non-invasive monitoring of stoat reproductive hormones. New Zealand. Science & Technical Publishing.
- Moresco, Anneke, and Dalen W. Agnew. (2013). Reproductive health surveillance in zoo and wildlife medicine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44.4s
- SEMARNAT [NOM] Norma Oficial Mexicana. [30 dic 2010]. NOM- 059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México: -Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Peres R, Munita B L, et all. (2013). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch Med Vet*, Vol. 46, pp 31-38.
- Roldán, E. and Garde, J. (2004). *Biología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción*. [ebook] Madrid, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos: Los Retos Medioambientales del Siglo XXI, pp.307-333.
- Schwarzenberger, F. (2007). The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int. Zoo Yb*, 41, 52–74.
- William J. 2005 *Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* en Burns R. *Immunochemical Protocols*. 3ra. Edición, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey
- World Health Organization (2010) *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, 5ta Edición, Switzerland.
- <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4917/2/Anexo%20.%20Presentaci%C3%B3n%20Pueba%20de%20ELISA.pdf>
- <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf>