



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Manejo Reproductivo Básico en **Fauna Silvestre** bajo Cuidado Profesional

José Antonio Sandoval Zárata
Adriana Cecilia Sánchez Espinosa



Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Leonardo Lomelí Vanegas
Rector

Dra. Patricia Dolores Dávila Aranda
Secretaria General

Mtro. Hugo Alejandro Concha Cantú
Abogado General

Mtro. Tomás Humberto Rubio Pérez
Secretario Administrativo

Dra. Diana Tamara Martínez Ruiz
Secretaria de Desarrollo Institucional

Lic. Raúl Arcenio Aguilar Tamayo
Secretario de Prevención, Atención y Seguridad Universitaria

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar
Director

Dr. Jorge Hernández Espinosa
Secretario General

LC Enrique López Martínez
Secretario Administrativo

Dr. José Ángel G. Gutiérrez Pabello
Secretario de Vinculación y Proyectos Especiales

Dr. Enrique Jesús Delgado Suárez
Departamento de Publicaciones

MVZ Enrique Basurto Argueta
Departamento de Diseño Gráfico y Editorial

Manejo Reproductivo Básico en **Fauna Silvestre** bajo Cuidado Profesional



José Antonio Sandoval Zárate
Adriana Cecilia Sánchez Espinosa



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

Primera edición, 23 de abril de 2024.

D.R.© 2024, Universidad Nacional Autónoma de México.
Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México.

ISBN: 978-607-30-8940-1

Esta edición y sus características son propiedad de la UNAM.
Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio, sin la
autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

El Comité Editorial de la FMVZ reconoce la colaboración que rea-
lizó el Dr. Salvador Romo García del Laboratorio de Reproducción
del Departamento de Ciencias Pecuarias de la Facultad de Estudios
Superiores Cuautitlán - Universidad Nacional Autónoma de México.

Hecho en México.

Contenido

Presentación.....	7
Abreviaturas.....	8
Objetivo general.....	10
UNIDAD 1. Determinación de hormonas mediante el uso de técnicas no invasivas.....	11
1.1 Introducción.....	12
1.2 Objetivo.....	13
1.3 Actividades.....	13
1.3.1 Cálculo y elaboración de soluciones.....	13
1.3.1.1 Objetivo de la actividad.....	13
1.3.1.2 Actividades.....	13
1.3.1.3 Habilidades y destrezas.....	14
1.3.1.4 Desarrollo de la práctica.....	14
1.3.2 Ensayo ligado a enzimas (ELISA).....	18
1.3.2.1 Objetivo de la actividad.....	18
1.3.2.2 Actividades.....	20
1.3.2.3 Habilidades y destrezas.....	20
1.3.2.4 Desarrollo de la práctica.....	21
1.3.2.4.1 Desarrollo de la técnica de ELISA.....	28
1.3.3 Preparación de muestras e interpretación de resultados.....	37
1.3.3.1 Objetivo de la actividad.....	37
1.3.3.2 Actividades.....	37
1.3.3.3 Habilidades y destrezas.....	37
1.3.3.4 Desarrollo de la práctica.....	37
1.4 Evaluación.....	46

UNIDAD 2. Técnicas de reproducción asistida	47
2.1 Introducción.....	48
2.2 Objetivo.....	49
2.3 Actividades	49
2.3.1 Principales diferencias anatómicas reproductivas de las especies silvestres.....	49
2.3.1.1 Objetivo de la actividad.....	49
2.3.1.2 Actividades.....	50
2.3.1.3 Habilidades y destrezas	50
2.3.1.4 Desarrollo de la práctica	50
2.3.2 Evaluación y criopreservación de muestras seminales.....	51
2.3.2.1 Objetivo de la actividad.....	51
2.3.2.2 Actividades.....	53
2.3.2.3 Habilidades y destrezas	53
2.3.2.4 Desarrollo de la práctica	53
2.3.2.4.1 Técnicas de colección de semen	54
2.3.2.4.2 Análisis Espermatobioscopico.....	64
2.3.2.4.3 Criopreservación de Gametos.....	72
2.4 Evaluación	76
UNIDAD 3. Elaboración de programas reproductivos	77
3.1 Introducción.....	78
3.2 Objetivo	79
3.3 Actividades	79
3.4 Habilidades y destrezas.....	79
3.5 Desarrollo de la práctica	80
3.6 Evaluación.....	85
Referencias bibliográficas	86

Presentación

El manejo reproductivo en animales silvestres bajo cuidado profesional 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 tomar medidas para controlar la reproducción de los organismos que no presentan problemas en el área, pero que en consecuencia pueden causar una sobrecarga animal de los exhibidores poniendo en riesgo el bienestar de los ejemplares debido a una condición de sobrepoblación.

Los médicos veterinarios encargados de la reproducción en los zoológicos deberán poner atención en todos los campos de conocimiento relacionados con la reproducción como son: anatomía, fisiología, endocrinología, nutrición, patología, manejo y etología, entre otros.

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
ABTS	azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
Ac	Anticuerpo/Antibody
Ag	Antígeno
B0	(B-cero) Unión Máxima
CF	Citrato fosfato
Cr	Creatinina
DO	Densidades Ópticas
E1G	Estrógenos Conjugados
EIA	Enzimoimmunoanálisis o Ensayo Ligado a Enzimas
ELISA	Ensayo Ligado a Enzimas (por sus siglas en inglés)
gr	gramos
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
M	Molar
mg	miligramo
mg/ml	miligramos sobre mililitro
mgCr	miligramos de Creatinina
min	minutos
ml	mililitros
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
ng/ml	nanogramos sobre mililitro
Nm	Nanómetro
P4	Progesterona
pg	picogramos
pH	Potencial de hidrógeno
rpm/ml	Revoluciones sobre mililitro
TMB	Tetramethylbenzidine
µL	microlitros
UNE	Unión No Especifica
UMA	Unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre

El hecho de lograr buenos resultados dependerá del conocimiento científico que tenga el veterinario, del dominio de temas y de contar con bases sólidas sobre las áreas fundamentales en torno a la reproducción animal. Esto permitirá elaborar estrategias que conduzcan el éxito reproductivo de los ejemplares bajo cuidado profesional y contribuir con los objetivos de los zoológicos modernos, los cuales son: *Conservación, Educación, Investigación y Recreación*, sin pasar por alto el bienestar y la ética.

Objetivo general

Conocer algunas técnicas de reproducción asistida utilizadas en el conjunto de especies animales de fauna silvestre bajo cuidado profesional, con la finalidad de que los alumnos adquieran las herramientas básicas y necesarias para su desarrollo profesional así como tener el conocimiento de la fisiología reproductiva de fauna silvestre bajo cuidado profesional.

Unidad 1



Determinación de
hormonas mediante
el uso de técnicas
no invasivas 

Unidad 1

Determinación de hormonas mediante el uso de técnicas no invasivas

1.1 Introducción

El análisis de esteroides fecales de las hormonas esteroideas adrenocorticales y reproductivas se ha convertido en una técnica establecida, ampliamente aceptada para el análisis de especies de fauna silvestre bajo cuidado profesional y en libertad. Debido a las diferencias específicas de las especies en el metabolismo de los esteroides. La monitorización no invasiva en las especies de fauna silvestres bajo cuidado profesional es de gran ayuda, ya que permite la recolección longitudinal de muestras facilitando la realización de estudios de fisiología, endocrinología, reproducción y estrés con diversos factores sociales o ambientales para determinar cómo afectan a la salud animal (Schwarzenberger, 2007).

1.2 Objetivo

Comprender las técnicas de monitoreo endocrinológico no invasivo comúnmente utilizadas como herramientas de diagnóstico en diversos ejemplares de fauna silvestre.

1.3 Actividades

1.3.1 Cálculo y elaboración de soluciones

1.3.1.1 Objetivo de la actividad

Conocer los reactivos para elaborar las soluciones de trabajo necesarias para los ensayos endocrinológicos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM).

1.3.1.2 Actividades

Se identificará el uso práctico de cada uno de los reactivos elaborados durante la práctica, mismos que servirán y se utilizarán en las prácticas subsecuentes.

Se realizarán las ecuaciones necesarias para la determinación de las concentraciones requeridas en cada dilución.

1.3.1.3 Habilidades y destrezas

Desarrollo de la habilidad práctica para determinar los volúmenes requeridos en las soluciones de trabajo así como la habilidad para la elaboración de soluciones.

1.3.1.4 Desarrollo de la práctica

Se hace la elección de los reactivos que se necesitarán para preparar las soluciones que se emplearán a lo largo de todas las prácticas que requieran de determinaciones hormonales, así como del equipo que se utilizará para la práctica (por ejemplo: balanza, potenciómetro, agitadores, entre otros).

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 1000 ml

▶ Na_2CO_3	1.59 gr
▶ NaHCO_3	2.93 gr
▶ Agua bidestilada	1000 ml

NOTA: Elaborada la solución se revisa el pH a temperatura ambiente y se almacena a 4°C.

2. Solución de lavado: EIA WASH

Reactivos necesarios para preparar 1000 ml.

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 tener una concentración
1X, para lo cual se realizará 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 hidrófluórico con NaOH 0.006 M

- ▶ Ácido hidrófluórico (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

Cálculo para elaborar de las diluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo se componen de un diluyente y de una solución inicial. La mayoría de las veces se tiene una dilución previa para las soluciones iniciales, lo cual debe considerarse al momento de formular la solución de trabajo.

Lo anterior hace necesario realizar cálculos de diluciones, a fin de preparar las soluciones que se utilizarán en el ensayo.

Para determinar el volumen requerido se utiliza 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 hace sus cálculos y adecuaciones de las soluciones de trabajo según las condiciones propias de cada laboratorio.

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

Entonces:

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

Sustituyendo:

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

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

Despeje

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

$$X = \frac{(1:10,000) \cdot 4,000}{(1:20)} \quad \left| \quad X = \frac{0.0001 \cdot 4,000}{0.05} \quad \left| \quad X = \frac{0.4}{0.05} \quad \left| \quad X = 8 \mu\text{L} \right. \right.$$

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

1.3.2 Ensayo ligado a enzimas (ELISA)

1.3.2.1 Objetivo de la actividad

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

Antecedentes y fundamento 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) (Lequin, 2005). La técnica consiste en que uno de los compuestos anteriores se encuentra ligado a una enzima, la cual cataliza al sustrato produciendo una coloración, permitiendo 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 uno o más de dos epítopos respectivamente, estos han sido usados como reactivos analíticos específicos para la cuantificación de antígenos de algún agente patógeno, proteínas, hormonas o fármacos. La prueba puede realizarse a partir de diferentes muestras como son: extractos de tejidos, suero, orina, heces, pelo, etcétera. De ahí, que la técnica de ELISA se haya convertido en una prueba de gran utilidad para estudios no invasivos como orina y heces, y en fauna silvestre representa una gran ventaja ya que resulta poco

práctico tener acceso a una muestra de suero sanguíneo. Otras de sus cualidades son la versatilidad, la sensibilidad y el fácil acceso (William, 2005).

De acuerdo con la forma en cómo se realiza la reacción Ag-Ac, la técnica de 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 de la prueba de **ELISA competitivo**, ésta 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 pre-preparada 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. ([Figura 1](#)).



Figura 1. Placa de ELISA competitivo. Sobre la flecha se observa la curva de calibración (9 puntos) así como el color, que inicialmente de muy intenso se va atenuando (hacia el lado derecho), donde la concentración de la curva va aumentando.

1.3.2.2 Actividades

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

1.3.2.3 Habilidades y destrezas

El alumno tendrá los conocimientos básicos para desarrollar correctamente el proceso de una prueba de ELISA, considerando cada una de las partes que integran la prueba y al final podrá emitir un diagnóstico.

1.3.2.4 Desarrollo de la práctica

Por la diversidad de usos que ofrece la prueba de ELISA, puede también utilizarse para la determinación de hormonas esteroides y hormonas proteicas. En el caso de hormonas proteicas se tiene una limitante, que al ser analitos específicos por especie hay que diseñar anticuerpos para cada uno de los géneros taxonómicos. Por tal razón, la mayor utilidad de la prueba es para la determinación de hormonas esteroides.

Para entender el desarrollo de la prueba inicialmente se explicarán los elementos que conforman la prueba y posteriormente se explicará su desarrollo.

La prueba de ELISA está conformada por los siguientes elementos (Tomado y adaptado de Crowther, 2002):

- ▶ Fase solida
 - Usualmente consta de una microplaca de 96 pozos, distribuidos en 12 columnas y 8 filas ([Figura 2](#)).
- ▶ 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.
 - Ab policlonales son el resultado de una estimulación antigénica producida en ejemplares vivos, los cuales reconocen varias porciones del ag.
 - Ab monoclonales son producidos en cultivos celulares, sin embargo, inicialmente se generaron 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 (**figura 3**).

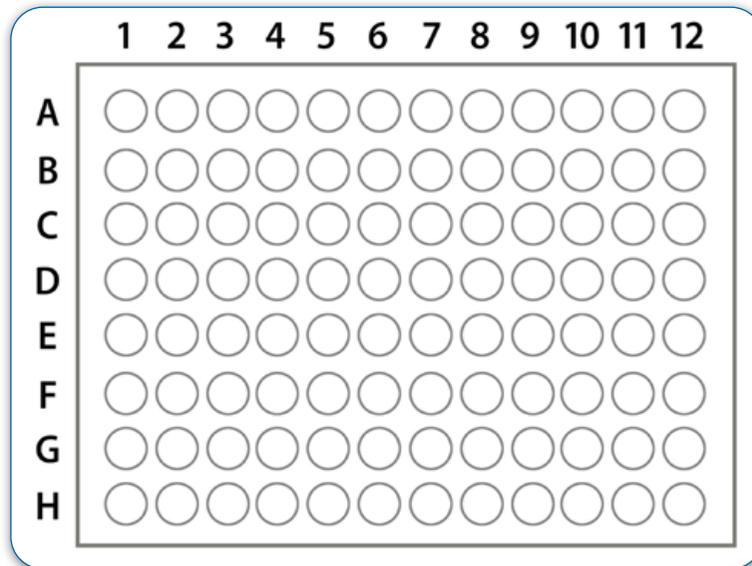


Figura 2. Ejemplo de microplaca de titulación de fase sólida.

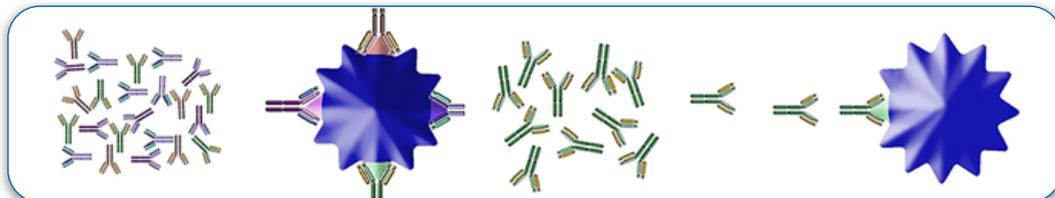


Figura 3. Lado izquierdo representa Ac policlonales y su unión en diferentes epítopos de un Ag. Lado Derecho se representa un anticuerpo monoclonal, unido a una región específica.

▸ Incubación

- La incubación es el tiempo necesario para lograr una reacción entre el anticuerpo y la fase sólida; o bien, para dar lugar a la reacción de antígeno - anticuerpo (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 buffer con una molaridad de 0.05 M y pH 9.6 (técnica descrita al principio del texto).
- 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 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 horas, mientras que la reacción antígeno anticuerpo tendrá una duración entre 1 a 3 horas en promedio; 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 sustancias dentro de un organismo vivo puede generar los anticuerpos, 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), mejor 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 el 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 que requiere una determinación cualitativa, la lectura se realiza por la presencia o ausencia de color y dependerá de los puntos ya establecidos, considerando 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 con la coloración obtenida (Cuadro 1).

Cuadro 1. Longitudes de onda recomendadas, con base en la coloración (Adaptado de Crowther, 2002).

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

1.3.2.4.1 Desarrollo de la técnica de ELISA

El alumno aplicará los conocimientos adquiridos para la realización de la cuantificación de hormonas mediante el empleo de la técnica de ELISA.

Descripción de la técnica

► Etapa 1

■ Fijación del anticuerpo.

- Para fijar el anticuerpo se requiere hacer una dilución del Ab con el Buffer de pegado. La concentración varía dependiendo del tipo de placa (fase sólida) 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, antes se harán pruebas para determinar la concentración mínima necesaria que reaccionará con la enzima conjugada, con ello optimizar los reactivos.

- Para lograr lo anterior se usará la fórmula:

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

Ejemplo del proceso de dilución del anticuerpo.

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

- ▶ El volumen inicial es desconocido
- ▶ La concentración inicial será: 1:100
- ▶ El volumen final: 10080 µL
- ▶ La concentración final: 1:15,000

Sustituyendo la fórmula:

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

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

Despejando:

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

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

Es decir: 67.2 μL se tomarán de la solución inicial para colocarse en 10012.8 μL del diluyente, y así obtener un total de 10080 μL que se utilizarán para adicionar 100 μL en cada pocillo.

NOTA: Las concentraciones pueden variar según las características del anticuerpo utilizado, ya que algunos presentan una interacción más débil con la fase sólida en comparación con otros, además de considerar los equipos utilizados para la interpretación de las pruebas.

- Para el llenado de los pozos se colocan 50 o 100 μL 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: un mínimo de 18 horas a 4 °C.
- ▶ Etapa 2
- Después de 18 horas de incubación se retira el exceso de solución decantando la placa.
 - Lavado 1: según ciertos protocolos de referencia recomiendan hacer de 1 a 5 lavados con la solución de lavado, en este caso se realizará dos veces el procedimiento.

- Colocar en los pozos 50 o 100 μL de las muestras para la realización de la determinación hormonal, 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. Pueden ser desde 5 hasta 11, dependerá de la elaboración del protocolo. Se colocan a partir de A3 con su respectiva réplica, es decir, la misma sustancia en la coordenada de inferir (B3).
 - Preparación de Curvas Estándar o de calibración
 - Las curvas de calibración son muestras cuyo valor de hormona es determinado la persona del laboratorio encargada de desarrollar la técnica, dichos valores permitirán comparar el resultado de la muestra desconocida, con la muestra conocida y permitirá asignar un valor cuantitativo.
 - El proceso para el desarrollo de la técnica puede hacerse de varias formas, el más práctico consiste en colocar una concentración de hormona conocida en un tubo de vidrio, esperar a que se evapore y resuspender a un volumen conocido, para el propósito de este manual, empleamos 50 ng añadiendo en un

tubo PBS (Solución Buffer de Fosfatos) para obtener una concentración de 50 ng/ml. A partir de esta solución se hacen diluciones dobles seriadas para obtener las siguientes cantidades.

- | El **cuadro 2** muestra un ejemplo de la curva de calibración.

Cuadro 2. Concentraciones utilizadas en la 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 se proporcionan en duplicado.

- Colocación de la enzima conjugada: con los pozos recubiertos conforme se describió en el paso anterior y con ayuda de una pipeta multicanal, a todos los pozos se les coloca el conjugado (de A1 a H12). El conjugado se trata de hormona marcada que competirá con la muestra a fin de ocupar los lugares disponibles. Este tipo de enzimoanálisis (EIA) se lleva a cabo 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	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp
D	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp
E	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp
F	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp
G	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mc	Mc
H	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mp	Mc	Mc

Figura 4. Representación esquemática del montaje para la placa ELISA.

UNE: unión no específica

B0: 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: puede ser ABTS o TMB, del cual se añaden 100 µL 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 un cromógeno la tetrametilbenzadina que es el cambiador de color.
 - Se diluyen el contenido de una cápsula de citrato fosfato (CF) en 100 ml 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 minutos.
 - Añadir a todos los pozos.

NOTA: El sustrato se prepara antes de añadirlo en la placa, de lo contrario se quela, provocando una reacción débil de la enzima.

Importante! Evitar el contacto directo con la solución de TMB. El acúmulo de esta sustancia en el organismo puede tener efectos nocivos en el personal.

- Incubación 3: adicionado el sustrato, se deja incubar durante 30 min entre 20-22 °C de temperatura, en un lugar que impida la entrada de luz y lograr 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 450 nm.
- Interpretación de resultados.
- Elaboración del diagnóstico.

En la [figura 5](#) se puede apreciar el resumen del proceso completo, descrito líneas arriba.

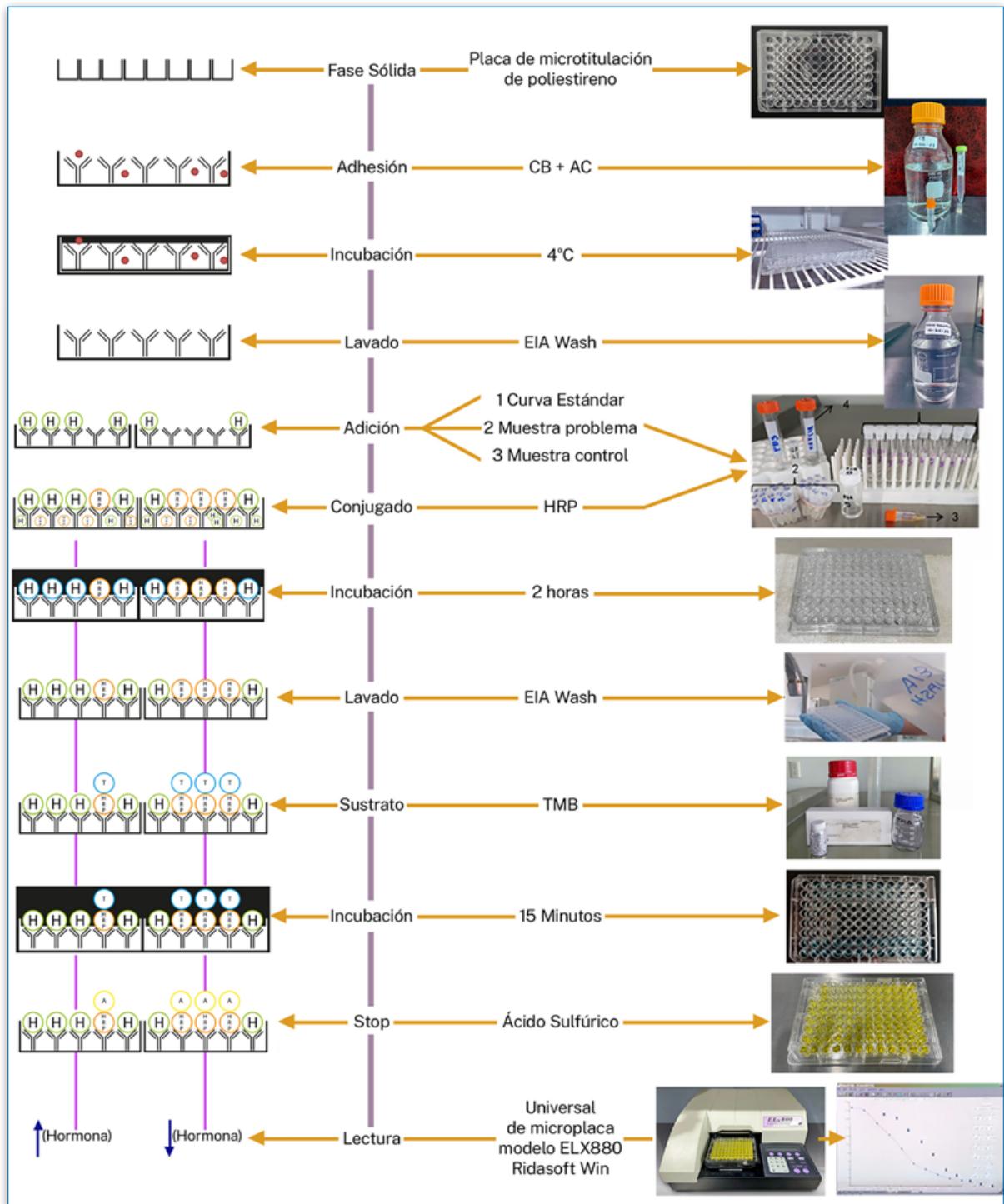


Figura 5. Prueba de ELISA de Competencia. Obsérvese el procedimiento completo, se esquematiza cada uno de los pasos.

1.3.3 Preparación de muestras e interpretación de resultados.

1.3.3.1 Objetivo de la actividad

El alumno identificará las muestras que potencialmente pueden ser utilizadas para la extracción y cuantificación de hormonas esteroides mediante la técnica de ELISA, asimismo, podrá identificar el método de expresión de las mismas.

1.3.3.2 Actividades

Realizar el proceso correspondiente para la extracción de hormonas esteroides, considerando las características de la muestra de origen, así como la hormona que se desea cuantificar.

1.3.3.3 Habilidades y destrezas

Los estudiantes adquirirán las habilidades que se requieren poner en práctica durante el procesamiento de las muestras, en las que se hará la cuantificación de hormonas.

1.3.3.4 Desarrollo de la práctica

Para determinar las concentraciones hormonales a partir de muestras de orina o heces es necesario conocer el metabolismo hormonal que permitirá la cuantificación hormonal de las muestras.

● Muestras fecales

Este tipo de muestras pasan por un proceso de extracción hormonal, el cual se logra a partir de alcoholes y/o solventes (Molinia, 2007).

Para el presente estudio se implementó utilizar utiliza el proceso de extracción de acuerdo con la técnica descrita en Cordova-Izquierdo, 2015.

- Se realiza un desecado de la muestra, para ello la muestra se pasa a una temperatura entre de 65 y 75°C, durante un tiempo que va de 4 a 5 horas, hasta que el peso de la muestra sea constante.
- Secada la muestra se separa una cantidad de 0.3 a 0.5 gramos.
- Se realiza una dilución volumen: masa, en una proporción de 1:10, es decir, por cada 0.1 g de heces secas se adiciona 1 ml de solución de extracción, que consiste en una solución de etanol al 90 por ciento.
- Entonces, en un volumen de 1 ml, 900 µL serán de etanol y 100 µL de H₂O destilada.
- Con ayuda de un vortex la mezcla previa es agitada durante un minuto.
- Homogenizada la muestra se coloca en un agitador, empleando para tal fin tubos de hematología, ahí permanece en agitación durante al menos 8 horas.
- Se centrifugan los tubos a 5,000 rpm/min durante 10 minutos.

- ▶ El sobrenadante obtenido se extrae con ayuda de una pipeta (pasteur o micropipeta) y se coloca en criotubos, los cuales se almacenan hasta que se vaya a realizar la cuantificación hormonal.
- ▶ Antes de la cuantificación hormonal se realiza una dilución del extracto a fin de que sea cuantificable dentro de las curvas de calibración preestablecidas.
- ▶ Se hacen diluciones 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.

● Muestras de orina

Las muestras de orina que se reciben en el laboratorio de endocrinología deberán almacenarse congeladas (-20°C) hasta el momento de su procesamiento (Heistermann, 1996). Lo anterior con la intención de inhibir la proliferación bacteriana de los organismos que pudieran estar presentes desde el método de colección, ya que por lo general, la obtención de muestra se hace directa del piso.

El uso de esta técnica generalmente se utiliza para cuantificar metabolitos de hormonas esteroides principalmente estrógenos conjugados (E1G) y pregnandiol (PdG).

Al igual que con las muestras fecales, se elaborarán diluciones de la muestra las cuales podrán iniciar de 1/10 o mayores.

Para poder realizar la cuantificación de hormonas se requerirá hacer diluciones que pueden partir desde 1:10 hasta 1:1000, según sea el caso.

Prueba o reacción de Jaffé para determinación de creatinina (Cr)

El uso de la prueba de Jaffé tiene dos funciones: cuantificar Cr y determinar función renal. Esto es, debido a que las muestras de orina, la mayoría de las veces son colectadas del piso, será necesario corroborar que estas son idóneas para realizar cuantificaciones hormonales. Por ello se deberá cuantificar la concentración de Cr urinaria. Por otra parte, el ensayo sirve para determinar la función renal y así conocer el grado de filtrando renal para inferir el filtrado de la hormona.

Adicionalmente, se podrá obtener un parámetro de referencia para emitir un resultado con base en una relación creatinina/hormona. Por esto es que todas las muestras cuyo valor sea inferior a 0.100 mgCr/mL serán no diagnósticas, dado que son muestras demasiado diluidas, arrojando resultados cuyos niveles son sobreestimados al momento de hacer el cálculo.

Desarrollo de la prueba de Jaffé

- ▶ La muestra de orina será diluida en una proporción 1:100
- ▶ Se colocarán 100 μL en una microplaca con 96 pozos de:
 - Agua, por cuádruplicado, en los pozos 1A, 1B, 1C y 1D
 - Estándar de Cr (1mg/ml), por cuádruplicado, en los pozos 1E, 1F, 1G y 1H
 - Muestra, por duplicado o triplicado, a partir del 2A y hasta el 12H
- ▶ Colocar 50 μL de Hidroxido de Sodio (NaOH) 1N, en todas las muestras
- ▶ Colocar 50 μL de Ácido Picrico en todas las muestras
- ▶ Dejar incubar por 15 min a temperatura ambiente
- ▶ Leer 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 ácido pícrico, que en un medio alcalino forma picratos, 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 de 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 estándar, que dará como resultado los miligramos de Cr /ml.

● Muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas remitidas al laboratorio para la determinación endocrinológica deberán ser centrifugadas a 5000 rpm/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 se obtenga 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:

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 de la prueba de ELISA

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

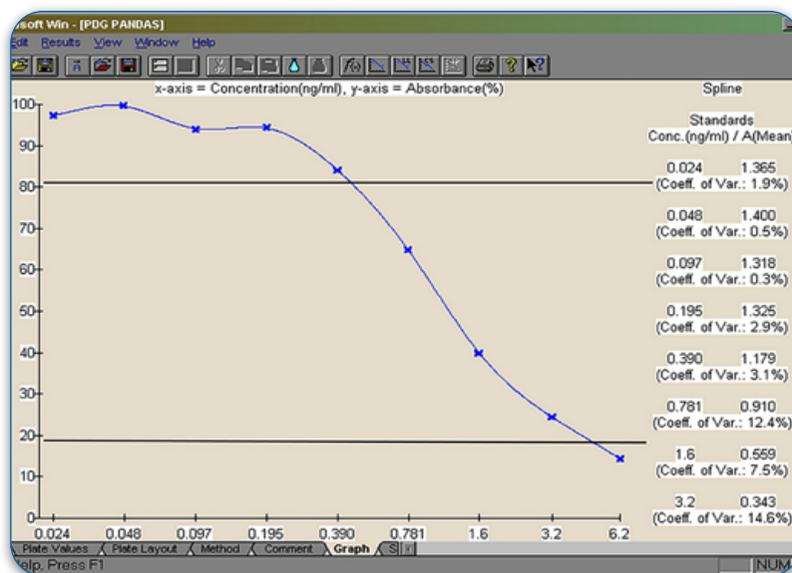


Figura 6. Representación gráfica de las densidades ópticas obtenidas de una curva de calibración, las líneas negras muestran los puntos de corte.

Samples							
ID	Absorbance (Mean) (CV) (%)			calculated ng/ml	*	=	ng
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
S/D	0.118	52.7	13.9	2.38	10.00		23.80
Hiptamo	0.450	2.4	53.1	0.306	10.00		3.06
Camella161018	0.184	18.4	21.7	1.38	10.00		13.76
181018	0.318	32.5	37.5	0.494	10.00		4.94

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

Según el tipo de muestra utilizada se hará el ajuste que se necesite para una 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) 109.7 ng/mL, existen programas que pueden calcular el factor de dilución, por lo que es importante tener esto presente a fin de no sobreestimar los resultados.

En el caso de muestras de 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 (21.94×10) 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.

ng de hormona/mL

mg de creatinina/mL

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

ng de hormona

mg de creatinina

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

1.4 Evaluación

El alumno deberá de realizar la cuantificación e interpretación de un determinado número de muestras, para lo cual deberá de elaborar los reactivos necesarios, así como procesar las muestras que le sean asignadas. Con base en lo anterior se emitirá un resultado.

Unidad 2



Técnicas de reproducción asistida

Unidad 2

Técnicas de reproducción asistida

2.1 Introducción

Las técnicas reproductivas se han usado desde hace muchos años en animales domésticos y en seres humanos. Procedimientos como la inseminación artificial y la conservación de semen mediante refrigeración o congelación se han empleado rutinariamente en la industria ganadera desde hace más de 50 años (Roldan y Garde, 2004). En organismos de fauna silvestre, las biotecnologías reproductivas han aportado soluciones innovadoras para facilitar el manejo genético dentro de poblaciones de especies en peligro de extinción, como los bancos de recursos genéticos cuyo desarrollo ha permitido el almacenamiento de semen, de óvulos, de embriones congelados y de otros tejidos. La ventaja principal que ofrecen los bancos de recursos genéticos es el hecho de mantener la variabilidad

genética de una especie de manera casi indefinida. Lo anterior facilita el intercambio de genes entre poblaciones diferentes y permite la generación de nuevos individuos con mayor variabilidad genética

2.2 Objetivo

Conocer y desarrollar las principales técnicas de reproducción asistida implementadas en la actualidad en algunas de las especies animales de la fauna silvestre.

2.3 Actividades

2.3.1 Principales diferencias anatómicas reproductivas de las especies silvestres

Los diversos géneros taxonómicos presentan diferencias anatómicas considerables, por ello cuando se realizan propuestas de reproducción asistida es importante conocer la conformación del tracto reproductor.

2.3.1.1 Objetivo de la actividad

Identificar las principales técnicas de reproducción asistida con potencial de implementación en las especies de fauna silvestre bajo cuidado profesional.

Conocer los aspectos reproductivos de cada género taxonómico que pueden contribuir al éxito reproductivo.

2.3.1.2 Actividades

A partir de ejemplares que causan baja y posterior al proceso de rigor de su necropsia, se solicita autorización para coleccionar el tracto reproductor en el cual se hará la identificación de sus características anatómicas.

2.3.1.3 Habilidades y destrezas

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

2.3.1.4 Desarrollo de la práctica

- ▶ Cuando un ejemplar cause baja se hará el procedimiento para la colecta del tracto reproductor y entonces la exploración del tracto reproductor externo, aplicando para tal propósito el protocolo de evaluación reproductiva, con el fin de que el alumno comience a acostumbrarse a la práctica de una evaluación en vivo.
- ▶ Se tomarán citologías del tracto reproductor.

- ▶ Una vez que el equipo de anatomopatología haya extraído los órganos de la cavidad abdominal, *in situ* se hará la localización del tracto reproductor y se evaluarán los argumentos a favor y los argumentos que refuten la implementación de una biotecnología reproductiva.

En el **cuadro 3** se muestran algunos ejemplos de tractos reproductores provenientes de especies silvestres.

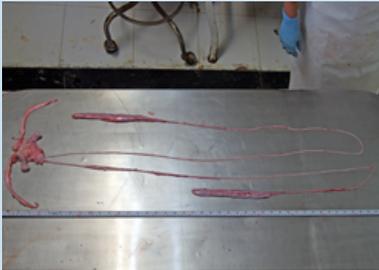
2.3.2 Evaluación y criopreservación de muestras seminales

Entre las actividades de manejo reproductivo más comunes en animales de fauna silvestre bajo cuidado profesional es la criopreservación de muestras seminales. Es una técnica cuya finalidad radica en permitir mantener un banco genómico y de esa manera preservar la diversidad genética de la especie, ante una eventual crisis representaría el medio de poder mantener su conservación.

2.3.2.1 Objetivo de la actividad

Conocer el proceso para la evaluación de muestras seminales, con base en el procedimiento propuesto por la *Organización Mundial de la Salud*, a fin de determinar la calidad espermática de las muestras remitidas al laboratorio para su criopreservación, para su análisis e inferir su viabilidad posdescongelación.

Cuadro 3. Tracto reproductor de animales silvestres según su género taxonómico.

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>	

2.3.2.2 Actividades

El alumno realizará la evaluación de muestras seminales y la criopreservación de gametos considerando las particularidades del animal según su género taxonómico.

2.3.2.3 Habilidades y destrezas

Que los estudiantes logren exitosamente hacer la evaluación seminal, apliquen el implemento de un protocolo de criopreservación de acuerdo con el género taxonómico del animal; así como que hagan el reconocimiento o identificación de las características principales que deberán contener los diluyentes utilizados durante el procedimiento.

2.3.2.4 Desarrollo de la práctica

Cuando llega una muestra seminal al laboratorio, deberá pasar por el análisis espermatozoides correspondiente. Por principio se identificará el género taxonómico del animal, considerando que existen especies que requieren un procesamiento previo a la evaluación. Por ejemplo, en el caso de muestras provenientes de primates habrá que hacer una licuefacción, lo que determinará la factibilidad de poder evaluar la muestra.

La licuefacción de muestras provenientes de primates se logra mediante su inclusión 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 debe hacer la inclusión para asegurar un proceso eficiente.

La concentración de tripsina utilizada para la licuefacción no debe estar por arriba del 1%, aun cuando existen estudios con reportes de hasta 5% de inclusión.

Después de que se ha licuado el coágulo seminal se deberá de realizar el examen de la muestra seminal, en apego a los criterios establecidos en el Manual de la *Organización Mundial de la Salud* (OMS, 2010). La utilización de esta clasificación permite homogenizar los criterios permitiendo así una evaluación objetiva.

2.3.2.4.1 Técnicas de colección de semen

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

- ▶ **Electroeyaculación:** consiste en proporcionar estímulos eléctricos en la región lumbosacra, donde se encuentran los nervios que inervan la región genital, excitando estos nervios se promueve la eyaculación. Sin embargo, el estímulo en esa región es muy amplio promoviendo también la micción, con lo cual, en ocasiones se obtienen muestras contaminadas.

El desarrollo de esta técnica implica necesariamente anestesiarse al animal para poder realizar la evaluación clínica y reproductiva. Cabe señalar que la utilidad de esta técnica está justificada porque muchos de los ejemplares son carnívoros de gran tamaño que implican un riesgo al personal que los maneja, en contraste, en ejemplares herbívoros el constante manejo — sin un adecuado condicionamiento operante — puede derivar en una miopatía por captura predisponiendo una causa de muerte del animal (Warner, 1974).

■ Procedimiento:

■ Contención química del ejemplar:

- | Se deberán usar anestésicos que proporcionen poca relajación muscular, de lo contrario la probabilidad de obtener una muestra contaminada con orina es muy alta.
- | **Importante!** Antes de la electroeyaculación, las constantes fisiológicas del animal estarán completamente estabilizadas, de lo contrario el procedimiento tendrá que ser suspendido.

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.

- I Evaluación del aparato reproductor
 - I Morfometría del aparato reproductor
 - I Medición de testículos: la importancia de este parámetro radica en que hay especies con inhibición de actividad reproductiva, atribuible a factores diversos como son:
 -) La presencia de una hembra que estimule su líbido
 -) Estatus social
 -) Temporada reproductiva, aunque en la bibliografía está documentado que este parámetro está delimitado; no obstante, en algunas especies silvestres no se tiene información contundentes y que las condiciones bajo cuidado profesional pueden probablemente causar efectos que hagan variar de forma drástica el efecto estacional (pues las condiciones naturales de su microhábitat nunca serán como en la vida silvestre).
 - I Inspección del pene: a la revisión deberá estar íntegro y sin laceraciones ([Figura 8](#)).



Figura 8. Rinoceronte blanco. Evaluación física y anatómica del pene.

- Inspección de mucosa del pene y prepucio.
 - | Coloración: en la mayoría de los animales la coloración es rosácea; sin embargo, existen ejemplares que presentan pigmentación.
 - | Integridad: tanto la mucosa del pene como la del prepucio deberán presentar una continuidad en su estructura, de lo contrario, podría tratarse de una alteración — podría ser de tipo metabólica, infecciosa o por manejo —.
 - | Humedad: para evitar laceraciones y daños del pene, debe haber una correcta humectación, además de que esto refleja de manera indirecta el grado de hidratación que mantiene esta zona.
 - | Elasticidad: si ésta es adecuada habrá 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 es similar; aunque este tipo de muestreo no se realiza comúnmente, es importante llevar un registro, porque aporta información importante relacionada con el desarrollo y estado de salud de los ejemplares (**Figura 9**).

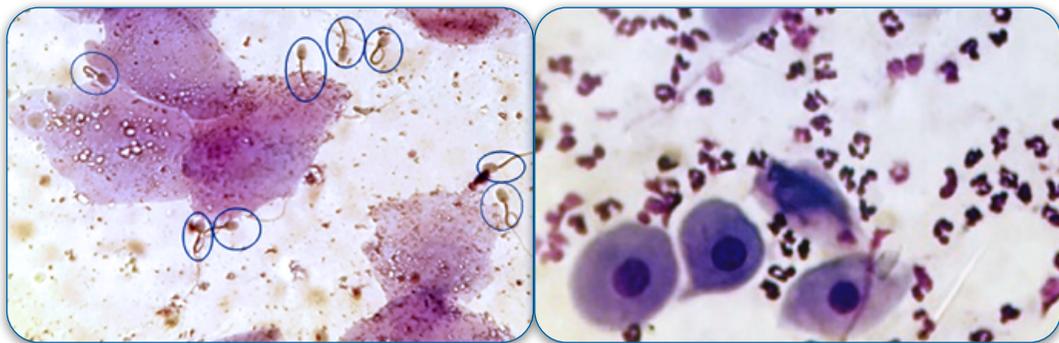


Figura 9. Impronta de la mucosa del pene.

Lado izquierdo: hay presencia de espermatozoides, posiblemente debido a masturbación por esterotipia (en este caso el animal se encontraba separado de la hembra).

Lado derecho: gran cantidad de neutrófilos debido a la presencia de esmegma.

- Ultrasonografía:
 - ┆ Glándulas, principalmente próstata
 - ┆ Monitoreo de las glándulas accesorias: permitirá identificar de manera oportuna algún tipo de predisposición a una hipertrofia.

I Testículos.

- › Se debe observar un parénquima íntegro, lo que servirá como indicador indirecto del adecuado funcionamiento (**Figura 10**).
- › Aplicación de estímulos eléctricos. Es recomendable usar un electroeyaculador de voltaje regulado, debido a que los equipos de voltaje fijo son poco eficientes (**Figura 11**).

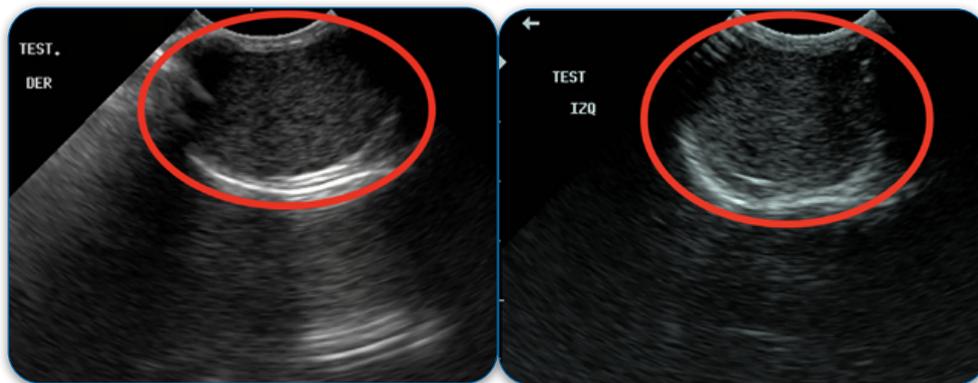


Figura 10. Estudio de ultrasonografía de testículos de un canguro rojo, dentro del círculo rojo se observa íntegro el parénquima y con una adecuada continuidad.



Figura 11. Electroeyaculador de voltaje regulado.

- I Obtención del eyaculado. El desarrollo de la técnica consiste en introducir una sonda por el recto hasta llegar a la región lumbo-sacra (**Figura 12**) y empleando un generador de impulsos eléctricos (electroeyaculador), con el cual se regulará el voltaje requerido para estimular los nervios de la zona. La duración de los impulsos tendrán una frecuencia de entre 3 a 5 segundos de estímulos por 3 a 5 de descanso en series de 5 a 10 (**Figura 13**).



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



Figura 13. Colecta de muestra por electroeyaculación. Lado izquierdo: en venado temazate al inicio del proceso. Lado derecho: en un titi cabeza de león en el momento de la eyaculación.

- **Recolección manual:** Este procedimiento es poco utilizado en fauna silvestre, dado que los animales requieren un entrenamiento, el cual puede lograrse mediante condicionamiento operante. De cualquier manera es un método limitado, dado que durante el manejo de animales carnívoros existe un alto riesgo para los manejadores al verse expuestos al temperamento del ejemplar en cuestión; sin embargo, en las especies que se practica la técnica se obtienen muestras seminales de buena calidad, debido a que es un proceso muy parecido a la fisiología natural del animal.

- | De acuerdo con el 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 con pene fibroelástico se deberá usar el masaje de gónadas o una combinación de ambos.
- | En el caso de ofidios se podrá realizar un masaje de la región craneal-lateral a la cloaca (Mengden, 1980).
- | **Recuperación *post mortem*:** 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 (Peres, 2013).
- | El desarrollo del procedimiento consiste en recolectar los testículos lo más pronto posible posterior al deceso del ejemplar, esto debido a que entre mayor sea el tiempo *post mortem* la viabilidad de los espermatozoides estará muy comprometida. Una vez que se obtienen los testículos, se pesan y miden a lo largo y ancho, posteriormente se determina el volumen testicular utilizando la fórmula de Lambert:

$$0.71 (\text{Ancho al cuadrado} \times \text{largo}) = \text{volumen testicular}$$

- l Se disecciona la cola del epidídimo y se separa del cuerpo los testículos (Figura 14).



Figura 14. Epidídimo de mono japonés.

- l 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 un catéter para administrar un medio para hacer el cultivo celular o diluyente para el manejo de muestras seminales y posteriormente se recupera la solución introducida, la cual contiene a los espermatozoides.
- l Cuando el ejemplar es de talla pequeña, una vez expuesto el epidídimo, con ayuda de una aguja o un catéter se inyecta un medio de cul-

tivo celular como el HAM 10, Hepes o Tris, y después realizar de 2 a 3 cortes a lo largo y ancho de la estructura a fin de recuperar el medio inyectado previamente. Es importante haber disecado la mayor cantidad de vasos sanguíneos para evitar la contaminación de los espermatozoides con restos de sangre, que pueden comprometer la viabilidad de los gametos.

2.3.2.4.2 Análisis Espermatobioscópico

La evaluación seminal consta de una parte macroscópica y otra microscópica.

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

Volumen

En el caso de mamíferos de talla mediana o grande determinar el volumen no tiene mayor complicación, dado que por lo general se obtienen cantidades 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 μ L, Para poder realizar la medición en estos organismos se hace una colecta del eyaculado con micropipetas calibradas a 10 μ L.

En el caso de primates se tendrá que medir el tiempo de licuefacción, este parámetro tiene relevancia en primates, ya que el eyaculado se solidifica al momento de ser expulsado debido a la acción de proteínas presentes en el eyaculado, principalmente la semenogelina II. La cantidad de esta proteína determina el grado de dureza, así como el tiempo de licuefacción del eyaculado (puede suceder en minutos o en días). Por tal motivo se han utilizado métodos para la licuefacción del coágulo seminal, entre ellos el uso de tripsina al 0.05 por ciento. Las especies con mayor dureza en el coágulo son los primates del nuevo mundo, de entre los grandes simios, los chimpancés resultan ser los más complejos para la licuefacción ([Figura 15](#)).

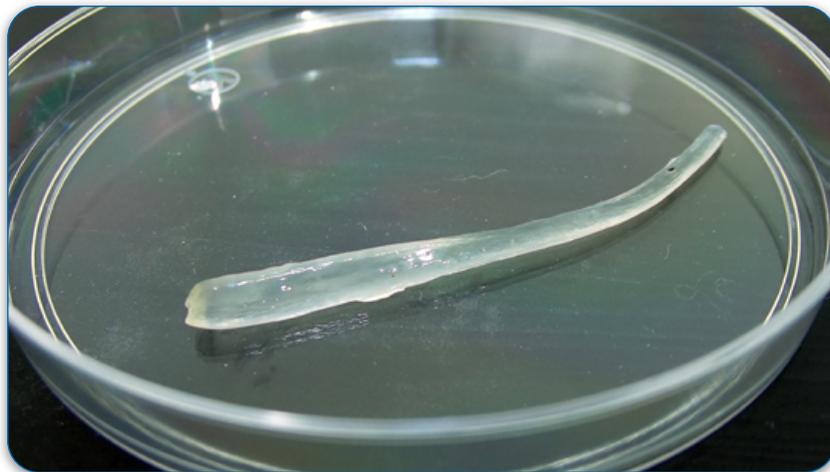


Figura 15. Muestra de eyaculado de chimpancé, mediante conducta redirigida se obtuvo de manera voluntaria.

Color y pH

La coloración y pH del eyaculado al igual que otros parámetros están influenciados por la especie, la técnica de colecta, entre otros. En el caso de reptiles y aves, el eyaculado puede estar contaminado con excretas o con productos de desecho como almizcle (sustancia de marcaje y/o defensa), por tal razón la coloración podría observarse 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 al semen y en consecuencia se afecta también el pH.

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

Concentración

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

- ▶ Dilución del eyaculado de una concentración de 1:200
- ▶ Se llenan las cámaras del hematocitometro, la cual está compuesta por dos cámaras: una superior y una inferior.
- ▶ Se contabilizan 5 de los 25 cuadrantes de cada cámara (Figura 16)

- Se hace un promedio de lo observado en ambas cámaras y el resultado obtenido se expresa de la siguiente forma:

Número de espermatozoides contabilizados $\times 10^7$

El $\times 10^7$ 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 repetirse.

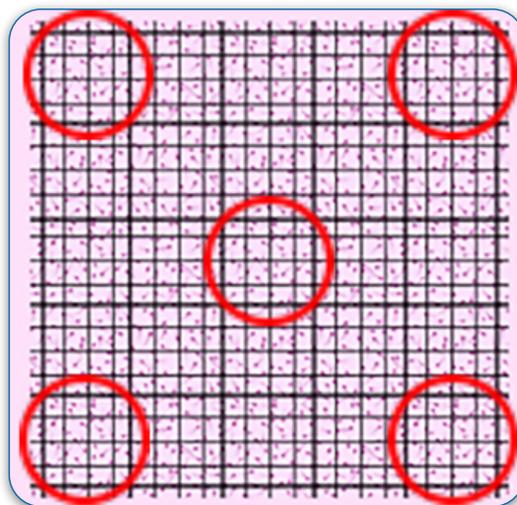


Figura 16. Representación de uno de los cuadrantes de una cámara de Neubauer (hematocitometro). En rojo se indican los cuadrantes que serán explorados para cuantificar los espermatozoides.

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, el promedio obtenido es:

$$52 + 47 = 99$$

$$99/2 = 49.5$$

Esto significa que se obtiene una concentración de 49.5×10^7

Expresado de otra forma, se obtiene 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 evalúa una vez que se obtiene el eyaculado o cuando el coágulo se va licuando, dado que la movilidad se va perdiendo a causa del enfriamiento de la muestra o por la reacción a la luz (en algunos casos se debe a 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 móviles: los espermatozoides presentan nulo movimiento.

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 la tinción eosina-nigrosina. Su mayor uso se debe a su practicidad, ya que no requiere más de 2 minutos para su elaboración. El [cuadro 4](#) muestra algunos ejemplos de la morfología espermática de algunas especies.

Procedimiento para tinción con eosina-nigrosina:

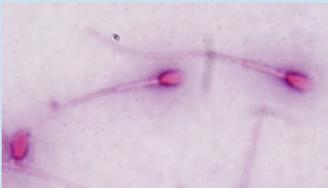
- ▶ En un portaobjetos colocar:
 - una gota de 10 μ L de la muestra seminal
 - una gota de 10 μ L de la tinción eosina-nigrosina
- ▶ Mezclar
- ▶ Realizar un barrido sobre el portaobjetos
- ▶ Montar la laminilla
- ▶ Observar al microscopio

El uso de esta tinción permite observar de manera práctica y fácil la morfología de las células y la integridad de las mismas. Es decir, se podrá evaluar si los espermatozoides 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 (**Figura 17**).



Figura 17. Espermatozoides de venado temazate. Tinción eosina-nigrosina para evaluar viabilidad espermática. Flecha roja indica espermatozoides muertos. Flechas azules señalan espermatozoides vivos.

Cuadro 4. 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>		Ualabí/ <i>Macropus rufogriseus</i>	
Canguro rojo / <i>Macropus rufus</i>		Cebra / <i>Equus quagga</i>	
Venado temazate/ Mazama temama		Oso pardo/ <i>Ursus arctos</i>	

2.3.2.4.3 Criopreservación de Gametos

Para la criopreservación de espermatozoides existen diversas técnicas, la elección de alguna técnica depende del tipo de diluyente que se utilizará y del proceso de congelación, este último puede ser en pajillas o en pellets.

Los diluyentes contienen elementos que aportan nutrientes, antibióticos y estabilizantes celulares, además de crioprotectores.

Algunos ejemplos de los reactivos más utilizados como diluyente de muestra seminal se pueden revisar en el **cuadro 4**.

Cuadro 4. Principales componentes de un diluyente seminal.

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

Comúnmente la fórmula utilizada es:

Reactivo	Cantidad
Glucosa	0.0908 g
Trizma base	2.4228 g
Ácido Cítrico	1.1478 g
Antibiótico (Penicilina)	10 ml (10,000 UI)

Reactivo	Cantidad
Agua Bidestilada	100 ml
Yema de Huevo	20 %
Glicerol	3-5 %

Cabe mencionar que existen diluyentes comerciales que no siempre describen su composición de elaboración, lo cual obliga a seguir el protocolo tal cual 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, lo que arroja una proporción de 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: usar pajillas de 0.5 o 0.25 ml (lo más común) o elaborar pellets.

Elaboración de pajillas

- El eyaculado se introduce en las pajillas (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 unicel, donde previamente se colocó nitrógeno líquido, las muestras deberán de estar a una altura entre 5 y 8 cm sobre el nivel del nitrógeno, con la finalidad de que solo tengan contacto con los vapores y ahí permanecerán de 10 a 15 minutos (**Figura 18**).
- ▶ Trascurrido el tiempo en vapores de nitrógeno líquido, se pondrán directamente en el líquido, el cual alcanza una temperatura de -196°C .
- ▶ Una vez que las pajillas están en contacto directo con el nitrógeno serán trasvasadas a los termos correspondientes.

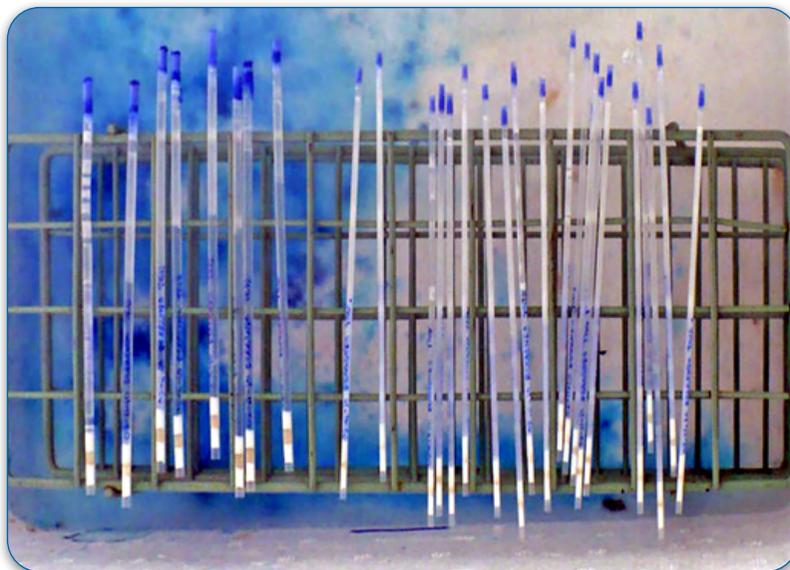


Figura 18. Pajillas dentro de un contenedor de unicel, durante el proceso de cristalización.

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 a 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 (**Figura 19**).
- Cuando la muestra se encuentra congelada lo cual ocurre en aproximadamente 5 a 10 minutos (ocurre cuando se observa escarchado la pastilla o el pellet), se colocan en un recipiente, este 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 que tienen los pellets se almacenan en los termos de nitrógeno líquido.

NOTA IMPORTANTE: Los contenedores que tienen a los tubos, gobelets, bastones, incluso canastillas, deberán estar muy bien identificados y habrá que actualizar el registro cada vez que se introduzcan muestras nuevas en los termos. Ello evitará extravíos, confusión de muestras y reducir el manejo de las muestras, a fin de garantizar la viabilidad del semen. A veces se podrá adicionar al diluyente algún tipo de colorante para hacer más fácil la identificación de la muestra.



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

2.4 Evaluación

El alumno extraerá gametos a partir de animales que han causado baja, además realizará la espermatobioscopia y la criopreservación de la muestra obtenida.

Unidad 3

Elaboración de programas reproductivos

Unidad 3

Elaboración de programas reproductivos

3.1 Introducción

Las instituciones zoológicas deben contar con un plan anual de trabajo para cada una de las especies que alberga, a esto se le conoce como *Plan de Colección*, en él se describen las acciones que en cada área se realizarán procurando siempre el beneficio de los ejemplares. Este esquema de trabajo permitirá evaluar y priorizar los recursos a fin de optimizar los gastos corrientes. Por ello el desarrollo de un plan reproductivo servirá de guía para la toma de decisiones respecto de los programas de reproducción contemplando las múltiples situaciones que pueden enfrentarse. Los programas de reproducción deberán considerar también el hecho de promover o de inhibir la reproducción, manteniendo un control y planeación poblacional dentro de las colecciones zoológicas (Ley General de Vida Silvestre, 2015 y NOM-059-SEMARNAT-2010).

3.2 Objetivo

El alumno conocerá y desarrollará un programa de reproducción asistida para ejemplares de fauna silvestre bajo cuidado profesional.

3.3 Actividades

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

3.4 Habilidades y destrezas

El alumno será capaz de elaborar un programa reproductivo acorde con las características de la especie, contribuyendo así a mantener los programas de conservación. Adicionalmente, adquirirá la habilidad de hacer la evaluación de proyectos que tienen como finalidad determinar su viabilidad antes de su implementación.

3.5 Desarrollo de la práctica

El alumno determinará 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 las ventajas y desventajas 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 generar un criterio de selección de especie, coherente con los objetivos de cada institución, para lo cual podrá apoyarse en un flujo-grama de toma de decisiones ([Figura 20](#)).

DOCUMENTACIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE LOS ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LA ESPECIE.

- ▶ Se determinan los principales aspectos reproductivos de la especie, como son: la pubertad (de hembras y de machos), estacionalidad reproductiva según la especie, duración de la gestación, número de crías por camada, poligamia, monogamia, duración de la vida reproductiva, conductas reproductivas observables, consideraciones

importantes antes de la aplicación de biotecnologías reproductivas, esquemas de contracepción y el tipo de instalaciones requeridas.

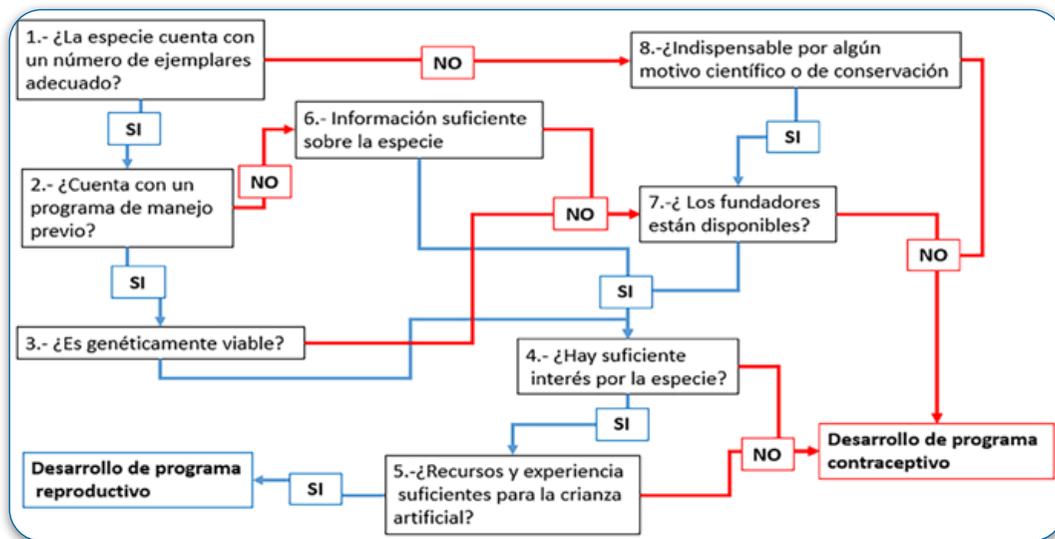


Figura 20. Flujograma de toma de decisiones para la elaboración de un programa reproductivo (Adaptado de Gramieri y Riger, 2009).

ALBERGUE

- Tomando en cuenta la biología de la especie y los aspectos reproductivos se determinará la carga animal, con el objetivo de establecer si el programa reproductivo estará enfocado a la concepción o a la contracepción.
- De requerirse un manejo en particular para la especie animal, los alumnos harán propuestas de las adecuaciones pertinentes que permitan optimizar el trabajo reproductivo y con ello evitar poner en riesgo a los operadores.

EVALUACIÓN REPRODUCTIVA DE LOS EJEMPLARES

▶ Individual

- Consiste en conocer la integridad de la viabilidad reproductiva de los ejemplares, proponiendo para este fin un esquema de evaluación metódico que pueda aplicarse tanto en hembras como en machos, y que considere las características anatómicas del espécimen así como los riesgos potenciales, tanto para el ejemplar como para los manejadores.

▶ Social

- El alumno propondrá una metodología para evaluar el potencial reproductivo de los ejemplares dentro de un grupo social o de la formación potencial de una pareja, cuya finalidad radica en inferir a los ejemplares candidatos para el implemento de acciones reproductivas, con base en la consulta bibliográfica y en el registro de las interacciones sociales de los ejemplares en cuestión.

IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

- ▶ El alumno indicará las técnicas de reproducción asistida que pueden utilizarse, mencionando también la metodología para su ejecución.
 - Ejemplo del desarrollo de un monitoreo etológico-reproductivo que consta de 3 fases:

- 1) Monitoreo *ad libitum*, que consiste en registrar todas las conductas en intervalos de 15 minutos, durante varios momentos del día para generar un catálogo conductual.
- 2) Implemento de un monitoreo conductual formal (focal, barrido, continuo o combinado) en determinado horario y lapso de tiempo. La finalidad es identificar el estatus jerárquico de los ejemplares.
- 3) Análisis de datos a fin de determinar el candidato idóneo para el implemento de acciones reproductivas, y que según documenta la bibliografía es un candidato que presenta las mejores condiciones reproductivas.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Para garantizar la eficiencia de las acciones, lo recomendable es hacer un cronograma de actividades que permita saber la ejecución de tales acciones y el tiempo implicado para obtener resultados ([cuadro 5](#)).

Cuadro 5. Cronograma de actividades con la propuesta para el desarrollo de actividades de un plan de manejo reproductivo.

Actividades	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Actividad 1		X										
Actividad 2				X	X	X						
Actividad 3			X	X	X	X	X	X				
Actividad ...									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 así su consanguinidad. Cada uno tendrá un éxito reproductivo según las diferentes especies, conformando así el material que podrá ser intercambiado o vendido para la adquisición de nuevos ejemplares.

Por lo anterior, un punto primordial durante la implementación del plan de manejo reproductivo es la consideración de los ejemplares con el potencial representativo de mayor beneficio para la institución zoológica; más aún porque la implementación de reproducción en fauna silvestre conlleva costos elevados de inversión.

EVALUACIÓN DEL PLAN DE MANEJO

- ▶ Al finalizar cada etapa reproductiva, se debe redactar un informe que incluya los logros obtenidos en las especies estudiadas con la intención de evaluar las metas cumplidas, así como detectar las áreas de oportunidad que permitan la aplicación de mejoras y de igual forma se aportarán correcciones dirigidos a lograr los alcances propuestos. En este rubro el alumno señalará los puntos críticos que serán evaluados para ser considerados como un éxito o un fracaso.

CORRECCIÓN DEL PLAN DE MANEJO

- ▶ Bajo la premisa de una situación hipotética, se marcarán las correcciones realizadas a los planes de manejo, considerando que las características de los grupos o individuos son dinámicas. Por lo anterior, se requiere adaptar las condiciones de acuerdo con los logros planteados originalmente. Ningún plan de manejo reproductivo podrá permanecer más de dos años sin hacer la evaluación del mismo. De lo contrario queda comprometido el éxito del plan de manejo.

3.6 Evaluación

El alumno desarrollará un plan de manejo reproductivo considerando cada uno de los aspectos antes descritos, de conformidad con las condiciones de trabajo de una UMA. Para los cual justificará la elección de la especie que propone y argumentará el porqué del orden de actividades propuestas. Asimismo, deberá enlistar los insumos requeridos, resultados esperados y tiempos para el desarrollo de cada actividad planteada.

Por otra parte, hará el análisis de plan de manejo reproductivo elaborado previamente y señalará una crítica constructiva al respecto, esto le permitirá hacer las adecuaciones pertinentes del manejo reproductivo y hacerlo más eficiente.

Referencias bibliográficas

- 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.
- 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.
- Gramieri J. Riger P. (2009) *Regional Collection Plan*, San Antonio Zoological Gardens and Aquarium.
- Heistermann, M., Mohle, U., Vervaecke H. et al. (1996). Application of Urinary and Fecal Steroid Measurements for Monitoring Ovarian Function and Pregnancy in the Bonobo (*Pan paniscus*) and Evaluation of Perineal Swelling Patterns in Relation to Endocrine Events'. *Biology of reproduction*, 55, 844-853.

- Lequin R. M. 2005 Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clinical Chemistry* 51:12, 2415.
- Mengden G.A, Platz C.G., Hubbard R y Quinn H. 1980. Insemination in Snakes. En: Murphy, J.B. (Ed.) *Reproductive biology and diseases of captive reptiles*. Oxford, Ohio, USA: Society for the study of amphibians and reptiles. Pp 71-78.
- Molinia, Frank; La Falci, Susana; Myers, Vaughan and McLane, Duncan. (2007) *Non-invasive monitoring of stoat reproductive hormones*. New Zealand. Science & Technical Publishing.
- 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). *Biotecnología 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 fecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int. Zoo Yb*, 41, 52-74.
- 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.

Warner,H.,MartinD.E.,KeelingM.E.,1974,Electroejaculation of the Great Apes, Annals Of Biomedical Engineering 2, 419-432.

WilliamJ.2005CompetitiveEnzyme-LinkedImmunesorbent 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.

Créditos técnicos avalados por los autores:

Diseño y formación editorial: LDCV Rosalinda Meza Contreras.

Diseño de portada: LSCA Edgar Emmanuel Herrera López.

Responsable editorial: MVZ Laura E. Martínez Alvarez.

Webmaster: LCG. Marco A. Domínguez Guadarrama.

Manejo Reproductivo Básico
en **Fauna Silvestre**
bajo Cuidado Profesional 


Fecha de aparición: 6 de mayo de 2024.

Se terminó: 2 de mayo de 2024.

Editada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Departamento de Diseño Gráfico y Editorial

de la Secretaría de Vinculación y Proyectos Especiales:

Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria,

Coyoacán, 04510, México, Ciudad de México.

Formación y composición tipográfica

en tipo Public Sans y Montserrat.

Medio electrónico: internet

Tamaño: 8.5 MB

Formato: PDF