



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00070

Matrícula: 2173801415

Evaluación membranal de espermatozoides de águila real (*Aquila chrysaetos*) conservados *in vitro* en diferentes condiciones de viscosidad.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 17:00 horas del día 12 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ
DR. JUAN JOSE PEREZ RIVERO CRUZ Y CELIS
M. EN C. FELIX DOMINGO SANCHEZ GODOY
M. EN C. FERNANDO GUAL SILL

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: SOFIA SARAHI LANDA GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



SOFIA SARAHI LANDA GARCIA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRY. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

VOCAL

DR. JUAN JOSE PEREZ RIVERO CRUZ Y CELIS

VOCAL

M. EN C. FELIX DOMINGO SANCHEZ GODOY

SECRETARIO

M. EN C. FERNANDO GUAL SILL



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

T E S I S

(Idónea comunicación de resultados)

EVALUACIÓN MEMBRANAL DE ESPERMATOZOIDES DE ÁGUILA REAL (*Aquila chrysaetos*) CONSERVADOS *IN* *VITRO* EN DIFERENTES CONDICIONES DE VISCOSIDAD

QUÉ PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL.

PRESENTA

M.V.Z SOFÍA SARAHI LANDA GARCÍA

DIRECTOR:

DR. JOSÉ ANTONIO HERRERA BARRAGÁN

CO-DIRECTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL LEÓN GALVÁN

ASESOR:

DR. ADRIÁN GUZMÁN SÁNCHEZ

CDMX, México.

Diciembre, 2019

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco

Departamento de Producción Agrícola y Animal – DCBS

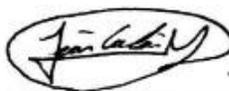


CO-DIRECTOR

Dr. Miguel Ángel León Galván

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Departamento de Biología – DCBS



ASESOR

Dr. Adrián Guzmán Sánchez

Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco

Departamento de Producción Agrícola y Animal – DCBS



JURADO DEL EXAMEN

Presidente

Dr. Alejandro Avalos Rodríguez

UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Profesor titular "C"

Correo electrónico: avalosr@correo.xoc.uam.mx / aavalosrodriguez@gmail.com

Secretario

M. en C. Fernando Gual Sill

UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Profesor titular "C"

Correo electrónico: f.gual.sill@gmail.com

Vocal

M. en C. Félix Domingo Sánchez Godoy

UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Profesor de Tiempo Completo.

Correo electrónico: spuma91@hotmail.com

Vocal

Dr. Juan José Pérez-Rivero Cruz y Celis

UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Profesor titular "C"

Correo electrónico: jperezr@correo.xoc.uam.mx / jjperez1_1999@yahoo.com

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, pertenece al padrón de posgrados de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó una beca a la estudiante del posgrado de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal a Sofía Sarahi Landa García con número (CVU/Becario): 869206/638375

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada:

**“EVALUACIÓN MEMBRANAL DE ESPERMATOZOIDES DE ÁGUILA REAL
(*Aquila chrysaetos*) CONSERVADOS *IN VITRO* EN DIFERENTES CONDICIONES
DE VISCOSIDAD”**

Con fecha 12 de diciembre de 2019.

JURADO DEL EXAMEN

Presidente

Dr. Alejandro Avalos Rodríguez
UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Profesor titular “C”

Secretario

M. en C. Fernando Gual Sill
UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Profesor titular “C”

Vocal

M. en C. Félix Domingo Sánchez Godoy
UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Profesor de Tiempo Completo.

Vocal

Dr. Juan José Pérez-Rivero Cruz y Celis
UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Profesor titular “C”

AGRADECIMIENTOS

Por brindarme su apoyo en el periodo de muestreo de sus ejemplares para la elaboración y culminación de la tesis que lleva por nombre **“EVALUACIÓN MEMBRANAL DE ESPERMATOZOIDES DE ÁGUILA REAL (*Aquila chrysaetos*) CONSERVADOS IN VITRO EN DIFERENTES CONDICIONES DE VISCOSIDAD”**

Parque Reino Animal

DGVS-ZOO-P-0074-03-MEX*

Aguilario Club América

DGVS-PIMVS-CR-IN-1847-CDMX/18*

Aviario DILAJESH

DGVS-CR-IN-0917-MEX/06*

Centro de Educación Ambiental Cultural y Recreativo (C.E.A.R.)

INE/CITES/DGVS-CR-IN-AV-OO35-AGS./00*

*Registro otorgado por la secretaria del medio y ambiente y recursos naturales
(SEMARNAT-DGVS)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – México, por el apoyo económico brindado para poder llevar a cabo esta tesis y los estudios de posgrado de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal.

Al Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. Dra. Ana María Rosales Torres, por permitirme realizar el proceso experimental necesario de esta tesis.

Agradezco a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por permitirme cursar el posgrado y darme las herramientas para desarrollarme en el área de la investigación.

Mi más sincera gratitud al Dr. José Antonio Herrera Barragán por la confianza que me brindo para realizar este trabajo de tesis, por el apoyo que en todo momento me otorgó, además de sus buenos consejos y enseñanzas tanto en el ámbito académico como personal.

Gracias al Dr. Miguel Ángel León Galván y al Dr. Adrián Guzmán Sánchez por la colaboración para dirigir este trabajo, por la asesoría que me brindaron y aceptar ser miembros de mi comité.

A mi compañero y amigo de laboratorio José Manuel Huitrón por el apoyo brindado desde el inicio de este proyecto, ayudándome con buena actitud cada vez que lo necesité y hacer más grata mi estancia.

DEDICATORIA

De manera muy especial con amor y respeto, dedico esta tesis a mis padres Víctor Manuel Landa Razo y Sofía García Jacobo quienes siempre me han dado su amor y apoyo incondicional y me impulsan a mejorar cada día en todos los aspectos de mi vida.

A mis hermanos Cynthia Ivonne y Víctor Manuel quienes siempre me han demostrado amor, han creído en mí y han estado conmigo en cada paso que doy.

A mi sobrino Víctor Emanuel que siempre me recibe con un abrazo y una sonrisa.

Con mucho cariño a mi tutor, el Dr. José Antonio Herrera Barragán quien me brindó de manera incondicional la oportunidad de realizar el posgrado. Quien, además, siempre ha sido un ejemplo a seguir.

A mis amigos de generación y cubículo a quienes aprecio y admiro, hicieron gratos estos dos años del posgrado:

José Manuel (Jr.), Andrés, Itzel, Sonia, Rodrigo y Mónica

Índice

1. INTRODUCCIÓN	2
I) Aspectos Biológicos	3
1.1 Aves rapaces	3
1.2. Águila real.....	3
II) Protección	5
1.3. Legislación para el manejo de aves rapaces	5
III) Reproducción natural.....	5
1.4. Biología reproductiva del águila real y reproducción en cautiverio.....	5
1.5. Fisiología reproductiva	7
1.6. Aparato reproductor del macho	9
1.7. Espermatogénesis	10
1.8. Morfología espermática	12
1.9. Maduración espermática	13
1.10. Capacitación espermática.....	14
1.11. Reacción acrosomal.....	14
1.12. Fertilización	16
IV) Reproducción asistida	17
1.13. Obtención seminal	18
1.14. Conservación seminal <i>In vitro</i>	18
1.17. Criopreservación	20
1.18. Crioprotectores.....	21
1.19. Evaluación seminal.....	24
1.20. Viscosidad seminal.....	24
1.21. Evaluación de la reacción acrosomal	25
1.22. Evaluación de carbohidratos membranales	26
2. ANTECEDENTES.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	30
6. HIPÓTESIS	31
7. OBJETIVOS	31
7.1. General.....	31

7.2. Particulares	31
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
8.1. Diseño experimental.....	32
8.2. Aves utilizadas.....	33
8.3 Uso de animales.....	35
8.4. Condicionamiento	36
8.5. Recolección de muestra	39
8.6. Determinación de densidades	41
8.7. Determinación de la viscosidad	41
8.8. Diseño de medios con distinta viscosidad.....	41
8.9. Conservación seminal.....	42
8.10. Criopreservación.....	42
8.11. Evaluación espermática básica.....	43
8.11.1. Volumen y concentración.....	43
8.11.2 Movilidad, viabilidad y morfología.....	43
8.12. Indicadores de capacitación y reacción acrosomal.	43
8.13. Presencia y distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico.....	45
8.14. Análisis estadístico.....	46
9. RESULTADOS.....	47
9.1 Viscosidad de eyaculados y de medios para la conservación <i>in vitro</i>	48
EVALUACIÓN SEMINAL BÁSICA POST DESCONGELACIÓN.....	49
9.3. Parámetros de evaluación seminal básica post descongelación	50
DETERMINACIÓN CON CTC.....	52
POST DESCONGELACIÓN.....	52
9.4. Espermatozoides con diferente condición fisiológica.....	53
9.4.1 Espermatozoides no capacitados.....	53
9.4.2 Espermatozoides capacitados.....	54
9.4.3 Espermatozoides con reacción acrosomal espontánea.....	55
9.5. Espermatozoides vivos vs. Parámetros determinados con CTC	56
Determinación con FICT-WGA.....	57
POST DESCONGELACIÓN.....	57
9.6. Espermatozoides con diferentes patrones de fluorescencia de acuerdo a la distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico.....	58

9.6.1 Espermatozoides con patrón A.....	58
9.6.2 Espermatozoides con patrón B.....	59
9.6.3 Espermatozoides con patrón C.....	60
10. DISCUSIÓN.....	61
10.1 Condicionamiento y recolección de muestras.....	62
10.2 Parámetros seminales en fresco.....	63
10.3 Efecto de la viscosidad en eyaculados.....	64
10.4 Parámetros seminales básicos post descongelación.....	65
10.5 Espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal.	68
10.5 Espermatozoides con patrones de fluorescencia determinados con WGA-FITC.	69
11. CONCLUSIONES.....	71
12. LITERATURA CITADA	72

RESUMEN

Una característica poco estudiada para la realización de los medios de conservación seminal de aves, en particular por congelación, es la viscosidad. Se considera que la viscosidad natural del semen está relacionada con la conservación espermática. Por lo cual, el objetivo fue determinar el efecto de la viscosidad del medio de conservación seminal, en la capacidad de reacción acrosomal y presencia y distribución de carbohidratos membranales de espermatozoides de águila real conservados *in vitro*. Se trabajó con 20 eyaculados de ejemplares adultos de águila real, que se diluyeron en medios de conservación seminal con viscosidad modificada adicionados con ficoll en diferentes porcentajes (0%, 10%, 30% y 45%). En cada condición se determinaron parámetros espermáticos básicos, a partir de la fluorescencia con CTC se determinaron parámetros de no capacitación, capacitación y reacción acrosomal espontánea, y a partir de la fluorescencia con la lectina FICT-WGA, la presencia y distribución de carbohidratos membranales. Las evaluaciones post descongelación mostraron que el porcentaje de espermatozoides vivos no mostró diferencia estadística ($P > 0.02$) entre los grupos, pero si una tendencia a aumentar conforme la viscosidad era mayor. Para la evaluación con CTC se observó que en los grupos con mayor viscosidad aumentaba el porcentaje de espermatozoides capacitados, mientras que los espermatozoides con reacción acrosomal espontánea disminuían. Para la evaluación con la lectina WGA se observó que el porcentaje de espermatozoides con patrón B aumentaban cuando la viscosidad del medio era mayor, sin embargo, los espermatozoides con patrón C se mantuvieron en porcentajes similares en todos los grupos, sin mostrar diferencia estadística ($P > 0.5$). Se concluye que, el medio con inclusión de ficoll al 10% fue más eficiente para la conservación de espermatozoides de águila real, al mantener estable la integridad estructural de la membrana en los diferentes parámetros evaluados. Sin embargo, también se comprueba que la presencia y distribución de los carbohidratos N-acetilglucosamina y ácido siálico son alterados por el efecto de la viscosidad en el medio, logrando mantener los porcentajes de espermatozoides con estados fisiológico similares.

Palabras clave: Águila, clortetraciclina, criopreservación, ficoll, N-acetilglucosamina, reproducción, viscosidad.

ABSTRACT

When the freezing is used as a mean of seminal preservation, the viscosity is one characteristic not very well studied. It is considered that the natural semen's viscosity is related to the sperm conservation. Therefore, the main goal was to determine the effect of the viscosity of the seminal conservation medium on the acrosomal reaction capacity, and presence and distribution of membrane carbohydrates of Golden eagle' spermatozoa, preserved in vitro. We worked with 20 ejaculates samples of adult Golden Eagles, which were diluted in seminal conservation media with modified viscosity, added with ficoll in different percentages (0%,10%,30% and 45%). In each condition, basic sperm parameters were determined; from fluorescence with CTC parameters of "not training", "training" and "spontaneous acrosomal reaction. From fluorescence with FICT-WGA the presence and distribution of membrane carbohydrates were determined. The evaluations post-thaw showed the percentage of live sperm didn't show statistical difference between groups ($P>0.02$), but it showed a tendency to increase as the viscosity was higher. In the CTC evaluation was observed that in the groups with higher viscosity, the percentage of trained sperm tend to increase, while the sperm with spontaneous acrosomal reaction were decreased. Finally, the evaluation with the WGA lectin, it was observed that the percentage of spermatozoa with B pattern increased when the viscosity of the medium was higher, however, the spermatozoa with C pattern, remain in similar percentage in all groups, without showing statistical difference ($P>0.5$). It is concluded that the 10% ficoll inclusion medium was more efficient for the conservation of Golden Eagle spermatozoa by maintaining the structural integrity of the membrane stable in the different parameters evaluated. However, it is also proven that the presence and distribution of the carbohydrates N-acetylglucosamine and sialic acid are altered by the effect of viscosity in the medium, managing to maintain the percentages of sperm with similar physiological states.

Key words: Eagle, clortetraciline, criopreservation, ficoll, N-acetilglucosamine, reproduction, viscosity

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad al menos el 10% de las 300 especies que pertenecen al orden Falconiforme se encuentran amenazadas a nivel mundial (Dogliero & col., 2016). En México existen 1096 especies de aves, de las cuales 88 son aves rapaces (CONANP/SEMARNAT, 2014). El águila real (*Aquila chrysaetos*) es, en general, catalogada como de menor preocupación por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Villaverde-Morcillo & col., 2015; BirdLife International, 2016); Sin embargo, en México, el águila real es una de las 65 especies de aves rapaces que se encuentra en categoría de riesgo de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2010. En la CITES se encuentra en el apéndice II (CITES, 2015; Diario Oficial de la Federación, 2010). Actualmente se desconoce el número de individuos residentes en nuestro país, pero se han documentado al menos 50 nidos de águila real en estado silvestre, y más de 60 individuos en cautiverio, mientras que la población mundial estimada es de 250 mil individuos (CONABIO, 2011). La cría en cautiverio, principalmente de especies que se encuentran en peligro de extinción como algunas águilas y halcones, está lejos de ser exitosa (Blanco & col., 2002; Dogliero & col., 2016). Esto se debe al poco conocimiento que se tiene sobre los parámetros reproductivos normales de las especies silvestres, aunado a posibles consecuencias por el estrés en cautiverio. Este estrés ocasiona la incompatibilidad entre machos y hembras, la agresividad entre ejemplares, incapacidad a copular de forma natural y presencia de asincronías (Blanco & col., 2002; Dogliero & col., 2016). Por lo anterior se han realizado esfuerzos para incorporar la inseminación artificial (IA) en los programas de conservación aviar, sin embargo, se han encontrado problemas para llevarlo a cabo. Los principales problemas son la mala recolección de muestras por presencia de contaminantes, y la ineficiencia en el manejo y transporte del semen (Blanco & col., 2002; Blanco & col., 2009; Dogliero & col., 2016). Entendiendo que el conocimiento de las características seminales de las especies es crucial para desarrollar programas de conservación con un mejor porcentaje de éxito (Dogliero & col., 2016; Villaverde-Morcillo & col., 2015). Un parámetro al que no se le ha dado importancia, para la realización de medios de conservación de semen en aves, es la viscosidad. Estudios en mamíferos han concluido que esta característica

puede jugar un papel importante para la conservación de la viabilidad y capacidad fertilizante de los espermatozoides (Hirai & col., 1997).

I) Aspectos Biológicos

1.1 Aves rapaces

Las aves de presa o rapaces se pueden dividir en dos grupos, falconiformes y strigiformes. De las 307 especies del orden falconiformes, conocidas como las rapaces diurnas, 31 (10%) se encuentran en la lista de especies amenazadas a nivel mundial (Blanco & col., 2002). En conjunto, estas aves juegan un importante papel dentro de la cadena alimenticia; al ser consumidores secundarios, fungen como controladores de la población silvestre de consumidores primarios, evitando que se conviertan en plaga y causen, en algunos de los ecosistemas, un desequilibrio ecológico. Por su constitución morfológica y capacidad sensorial, están especializadas al régimen carnívoro (Méndez & col., 2006), ya que poseen pico y garras curvas y afiladas, así como visión binocular, que les ayudan a capturar sus presas (Eccardi, 2008).

Históricamente, México es un país vinculado desde sus orígenes con las aves rapaces en formas y usos muy variados (Tavizón, 1999). Desde tiempos prehispánicos, donde se adoraban por su imponente porte que inspiró para la creación del escudo nacional mexicano que se plasmó en la bandera, otorgándole una identidad a la nación (SEMARNAT, 2008).

1.2. Águila real

El águila real (*Aquila chrysaetos*) es una especie de gran valor histórico, cultural y de conservación en México (SEMARNAT, 2008; CONANP, 2008, Comité de expertos de Águila Real y FMCN 2012; Campos-Rodríguez & col., 2018), que se encuentra catalogada como una de las 22 especies prioritarias de fauna silvestre (CONABIO, 2011). El águila real es un ave rapaz de orden falconiforme de gran tamaño, su longitud total alcanza hasta 1 metro, y su envergadura puede llegar a 2.84 m. Presentan dimorfismo sexual en cuanto al peso y la talla, son de coloración marrón oscuro con



Figura 1. *Aquila chrysaetos*

algunas plumas más claras en la parte de la cabeza y el cuello (Figura 1) (Eccardi, 2008; SEMARNAT, 2008). A nivel mundial, el águila real tiene una amplia distribución en las regiones Neártica y Paleártica, entre los 70° N y 20° S de latitud (BirdLife International, 2016), más que cualquier otra especie de águila. En México, históricamente ocupaban 50% del territorio, pero se ha ido diezmando debido a la persecución de la que han sido objeto (Eccardi, 2008). A pesar de esto, se distribuye desde la península de Baja California y de Sonora a Coahuila, hasta Querétaro e Hidalgo (SEMARNAT, 2008; Campos-Rodríguez & col., 2016; 2018).

Existen seis subespecies conocidas y todas varían ligeramente en tamaño y en coloración (Eccardi, 2008). El águila real vive en climas diversos desde los desérticos y subtropicales, semiáridos, estepario tropical y climas fríos de alta montaña y se le puede encontrar desde el nivel del mar hasta los 3,000 m de altura. Su hábitat es variado e incluye zonas áridas, semiáridas y montañosas con bosques templados de pino-encino, coníferas de encino y matorral espinoso. La población mundial estimada es de 250 mil individuos. En México, actualmente se desconoce el número de individuos residentes, pero se han documentado al menos 50 nidos de águila real en estado silvestre, y más de 60 individuos en cautiverio (CONABIO, 2011). Entre 2012 y 2018 la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) ha registrado 124 parejas reproductivas en nuestro país y al menos 31 áreas naturales protegidas (ANP) con observaciones confirmadas de la especie (Campos y Rodríguez & col., 2018). La importancia ecológica de esta especie radica en que es un depredador tope en los ecosistemas donde habita, siendo una especie bandera y sombrilla (SEMARNAT, 2008; CONANP, 2008; Campos-Rodríguez & col., 2018).

II) Protección

1.3. Legislación para el manejo de aves rapaces

En la actualidad, el interés por el uso y aprovechamiento de las aves rapaces en México es relativamente limitado, aunque algunas especies como el halcón Harris su presencia en cautiverio es más común. A nivel mundial, se han hecho intentos por proteger las diferentes poblaciones de aves de presa. Para el caso específico del águila real, a nivel internacional la CITES, la contempla en el apéndice II, y en México la norma oficial NOM-059-ECOL-2010 considera al águila real, como una especie protegida (CITES, 2015; Diario Oficial de la Federación, 2010).

Actualmente las aves rapaces son comercializadas a nivel mundial, y México no ha sido la excepción, donde la comercialización legal se hace con ejemplares producidos en diferentes criaderos del país que están regulados por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), quien reporta tasas de aprovechamientos para promover un manejo sustentable. Cabe mencionar que también existe el tráfico ilegal de aves rapaces, que es considerado como una de las actividades ilícitas más lucrativas en México (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, 2014).

III) Reproducción natural

1.4. Biología reproductiva del águila real y reproducción en cautiverio

La época de cría se da entre los meses de febrero y marzo, el tamaño de la puesta es generalmente de 2 y ocasionalmente de 3 huevos, sin embargo, únicamente suele sobrevivir un pollo, y su periodo de incubación es de 43 a 45 días (Eccardi, 2008; SEMARNAT, 2008). Una vez eclosionados los pollos tardan de 72 a 84 días en el nido antes de emprender su primer vuelo, el cual ocurre a mediados de julio o en agosto, en su área de distribución natural en México (SEMARNAT, 2008). La edad de los integrantes de las parejas de águila real es relevante por su relación con el éxito de la anidación y productividad, ya que las parejas de adultos presentan un mayor éxito

reproductivo que parejas jóvenes (Margalida & col., 2008; Campos-Rodríguez & col., 2018). Campo-Rodríguez & col., (2018) determinaron el estatus de ocupación, número de nidos, éxito de la anidación y productividad de anidamiento en tres áreas de anidación de águila real localizadas en el suroeste de Zacatecas. Se concluye que el éxito promedio de anidación de 58.33%, la productividad promedio de anidación fue de 0.50 volantones/nido (1 volantón/nido en los nidos exitosos) y el promedio de nidos observados en las tres áreas de anidación fue de 3.33 nidos/área. Varios autores como Kropil & Majda (1996), Rodríguez-Estrella & Rivera-Rodríguez (2005) y Tavizón (2014), coinciden en señalar que los bajos valores de productividad de anidación cercanos o menores a 0.5 volantones corresponden a parejas o territorios de anidación asociados a la presencia de perturbaciones. Se ha reportado que la baja productividad es ocasionada por el saqueo de nidos por parte del ser humano o inclusive ataques de cuervos en un 55% de los casos (Kropil & Majda, 1996). Recientemente, algunos autores coinciden en señalar que la pérdida del hábitat ocasionada por la agricultura y la minería también constituyen una amenaza para la especie (De León-Girón 2017; Campos-Rodríguez & col., 2018).

En México se desarrollan programas de conservación en las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) y Predios o Instalaciones que Manejan Vida Silvestre (PIMVS) donde se reproducen con fines de aprovechamiento, principalmente para uso de cetrería y control biológico. Para la reproducción de rapaces en cautiverio son utilizadas principalmente dos estrategias de crianza, la cópula o monta natural y la inseminación artificial (Fox, 2003).

Las técnicas de reproducción asistida en aves (TRAA) han contribuido a la conservación de muchas especies de aves, sin embargo, entre ellas puede encontrarse alta variabilidad en los resultados obtenidos al utilizar los mismos métodos de conservación seminal. Si bien hay una distancia filogenética grande entre especies domésticas y silvestres, los métodos de reproducción asistida tienen aspectos básicos que podrían ser aplicados a diferentes especies. Sin embargo, es necesario conocer las particularidades de cada especie para hacer las adaptaciones necesarias a los métodos generales de reproducción, ya que los mismos métodos de conservación

seminal, principalmente se pueden ver diferencias marcadas entre aves domésticas (gallo y pavo) y aves rapaces (águila y halcón) (Herrera & col., 2017).

1.5. Fisiología reproductiva

El sistema neuroendocrino es el encargado de la regulación de la reproducción, a través de la acción de hormonas hipotalámicas (Gonadotrofinas (GnRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona liberadora de tirotropina (TRH) y hormonas hipofisarias, (hormona luteinizante (LH), hormonas folículo estimulante (FSH)) que ejercen su acción en los órganos sexuales. Sin embargo, se debe considerar la estacionalidad reproductiva, principalmente entender las diferencias que se presentan entre los mamíferos y las aves, ya que los procesos biológicos y químicos que se han estudiado, ha sido tomando a los mamíferos como modelo, pero no quiere decir que ocurra en las demás especies de la misma manera. (Stevenson & Ball, 2011). Del mismo modo que en algunos mamíferos, el fotoperiodo es un importante factor en la reproducción de las aves, a través de fotoreceptores que se vinculan al reloj circadiano que modera la longitud de los días (Stevenson & Ball, 2011). Existe una integración de señales del fotoperiodo que ocasiona cambios en la fisiología, morfología y en la conducta del ave que son necesarios para el cortejo y la cópula, iniciando con la activación del sistema neuroendocrino (Stevenson & Ball, 2011; Pérez & col. 2018).

Como ha sido estudiado, el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG) es el encargado de la regulación de la reproducción, a través de la GnRH que va a promover la liberación de las hormonas FSH y LH, que son las encargadas de unirse a sus receptores en las gónadas para promover las características sexuales primarias (gametogénesis y producción de hormonas sexuales) y secundarias (comportamiento reproductivo y reproducción (Pérez & col. 2018). En el macho, la LH actúa sobre las células de Leydig para inducir la síntesis de testosterona que regula la espermatogénesis, también promueve la manifestación de conductas territoriales y en general conductas reproductivas como la monta (Rodríguez, 2013). Mientras que la FSH actúa sobre las células de Sertoli para promover la espermatogénesis (Guzmán & col., 2017).

Es importante señalar que en las aves se considera al hipotálamo medio basal (MBH) como el responsable de la reproducción estacional a través de las células endimarias (ECs) que rodean al tercer ventrículo, ya que en ellas se lleva a cabo la conversión de tiroxina (T4) a triyodotironina (T3) (biomolécula activa de las hormonas TH) (Ikegami & Yoshimura, 2016). La T3 induce cambios morfológicos en las terminales de las neuronas GnRH y de la glía de la eminencia media (ME). La GnRH provoca la liberación de las gonadotrofinas (LH y FSH) para que se lleve a cabo la síntesis de testosterona en las células de Leydig y la espermatogénesis en las células de Sertoli y con ello se vea un incremento en el tamaño del testículo (Figura 2) (Ikegami & Yoshimura, 2016). Sin embargo, durante otoño-invierno, al no haber un estímulo lumínico de larga duración y encontrar temperaturas más bajas, se lleva a cabo la regresión testicular porque se pierde la conexión de las neuronas GnRH con la ME.

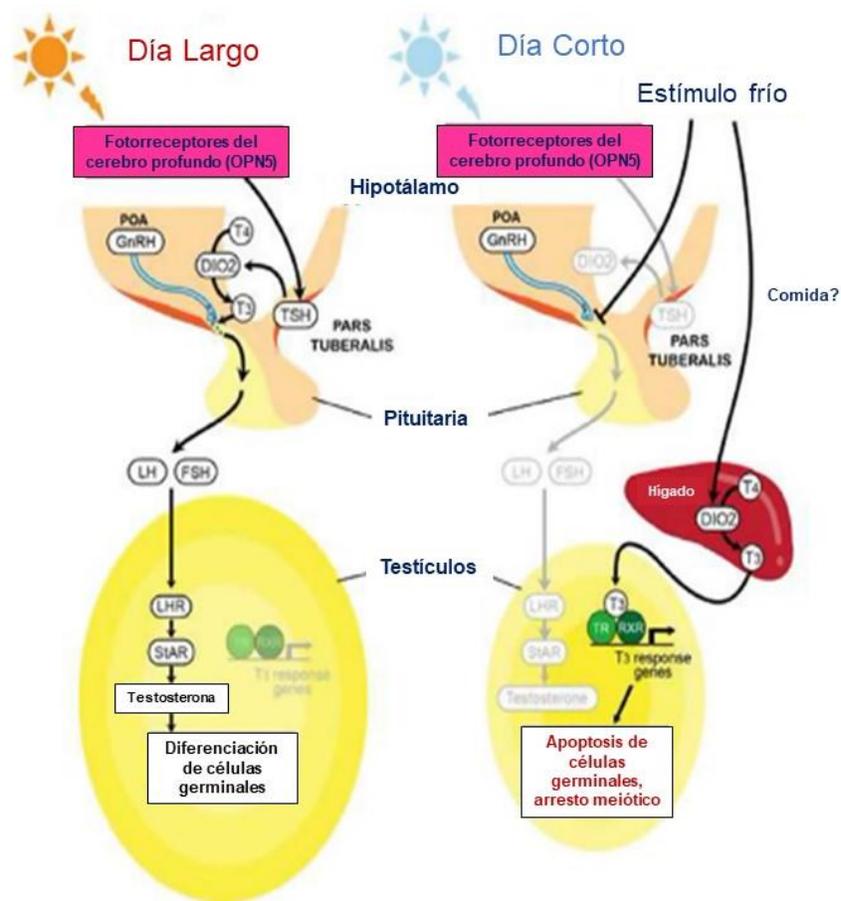


Figura 2. Mecanismo estacional de desarrollo y regresión testicular en aves con reacción a cambios de fotoperiodo circadiano/circanual (Ikegami & Yoshimura, 2016).

1.6. Aparato reproductor del macho

El aparato reproductor del macho está constituido por tres unidades morfo funcionales: los testículos, los conductos deferentes y el órgano copulador o papila eréctil. Los testículos se encuentran localizados en el centro de la cavidad corporal, en la región celíaca, ventrales a los riñones y se sostienen por ligamentos de la superficie dorsal, adyacentes a las glándulas adrenales, contienen tejido intersticial que incluye células de Leydig secretoras de andrógenos (Herrera & col., 2013). Debido a su localización, en las aves a diferencia de los mamíferos, los testículos deben funcionar a altas temperaturas (43°C) (Moyle & col., 2011). Al igual que en los mamíferos, los testículos están rodeados por la túnica vaginal interna y externa, además de la túnica albugínea, que es la encargada de anastomosar los túbulos seminíferos (Herrera & col., 2005; Moyle & col., 2011). El sistema reproductor del macho en aves, no presentan glándulas sexuales accesorias como vesículas seminales, próstata, glándulas de Cowper y glándulas uretrales, tampoco cuentan con alguna estructura comparable a la ampolla de los mamíferos (Herrera & col., 2013).

Los espermatozoides son transportados a lo largo del interior de una serie de conductos que conforman el testículo y conducto deferente siendo suspendidos en secreciones de estas estructuras que les prevén sustratos y amortiguadores que posteriormente son reabsorbidos (Tabla 1) (Herrera & col., 2013). El semen de las aves, como el de las demás especies, se conforma de dos componentes principales: espermatozoides y fluido seminal, a su vez, este último ya se conforma de varios componentes de naturaleza proteica, de carbohidratos, iones inorgánicos y ácido glutámico (Rodríguez, 2013). Como en cualquier programa de reproducción, la calidad y cantidad de semen puede ser uno de los factores limitantes para las técnicas de reproducción en aves, por lo tanto, la morfología, la movilidad y la concentración espermática son parámetros importantes en la calidad del semen que se deben considerar (Herrera & col., 2005; García-Herreros, 2016)

De acuerdo con el estudio de Villaverde-Morcillo & col. en el 2015, el eyaculado del águila real tiene un volumen medio de 31.8µl y una concentración media de 467.7X10⁶ espermatozoides/ml, a diferencia del eyaculado de gallo que se sabe tiene una

concentración de $3-7 \times 10^9$ espermatozoides/ml, con un volumen de entre 0.2 a 0.5 ml, con una cantidad de proteína de 1.8-2.8 g/100 ml y un pH de 7.2 – 7.6.

Tabla 1. Concentraciones de los componentes más abundantes en el plasma seminal de gallos (*Gallus gallus*).

Componente	Plasma seminal de Gallos (mM)
Glucosa	0.18
Cl ⁻	46
Na ⁺	145
K ⁺	13
Ca ⁺	1.4
Glutamato	75
Lactato	3.7
Piruvato	0.3
Alfa-cetoglutarato	0.4
Carnitina	3.2
Acetil carnitina	0.5-2.0
Proteína (gl-1)	8

(Tomado de: Etches, 1996)

1.7. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo que incluye la proliferación mitótica de las espermatogonias, la división meiótica de los espermatocitos primarios a espermátida redonda, y la diferenciación morfológica de la espermátida redonda a espermatozoide. Estos procesos se llevan a cabo en estrecha relación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli, y están bajo control de las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Peralta & Miazzo, 2002; Asano & Tajima, 2017). A pesar de que la espermatogénesis está extensamente estudiada en los mamíferos, existen pocos reportes de este proceso en las aves (Asano & Tajima, 2017). Lo que se sabe, es que la espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos del testículo y promueve el desarrollo de las espermatogonias que se transforman en espermatozoides; de este

proceso depende la calidad y la producción espermática constante (Peralta & Miazzo, 2002). Posterior a la proliferación de espermatogonias, comienzan dos fases meióticas diferentes para dividirse a espermátidas redondas con un conjunto de cromosomas haploides. El espermatocito primario es una célula pre-meiótica que es caracterizada por una estructura nuclear conspicua. El espermatocito secundario es producido de la primera división meiótica, y tienen una vida relativamente corta comparada con los espermatocitos primarios (0.15 días vs 3.86 días) porque inmediatamente ocurre otra división meiótica que produce la espermátida redonda (Asano & Tajima, 2017). La espermiogénesis es la última fase del proceso de espermatogénesis, y durante este periodo, la espermátida haploide y redonda es sometida a diferenciación morfológica para dar lugar al espermatozoide. La transformación de la espermátida redonda a espermatozoide ocurre cuando se mueven hacia el lado adluminal de los túbulos seminíferos, y la característica dinámica dentro de los túbulos es generada por las células de Sertoli, que son las únicas células somáticas no germinales presentes en el epitelio seminífero. Se ha llegado a considerar que la espermatogénesis en las aves se divide en 12 pasos, basados en la biogénesis de la estructura espermática y la progresión de la condensación nuclear (Figura 3). Basándose en la progresión de la biogénesis acrosomal, se pueden considerar cuatro fases: La fase de Golgi, la fase de tapa capucha, la fase acrosomal y la fase de maduración. El complejo de Golgi contiene numerosos gránulos proacrosómicos que luego se derivan de la red trans-Golgi y se unen para formar una gran vesícula acrosomal. La vesícula acrosomal se yuxtaponen cerca o en contacto con el núcleo (Asano & Tajima, 2017). El complejo centriolar compuesto de centriolos proximales y distales emerge cerca del acrosoma en desarrollo, casi al contacto con el núcleo, y se convierte en un flagelo (Asano & Tajima, 2017).

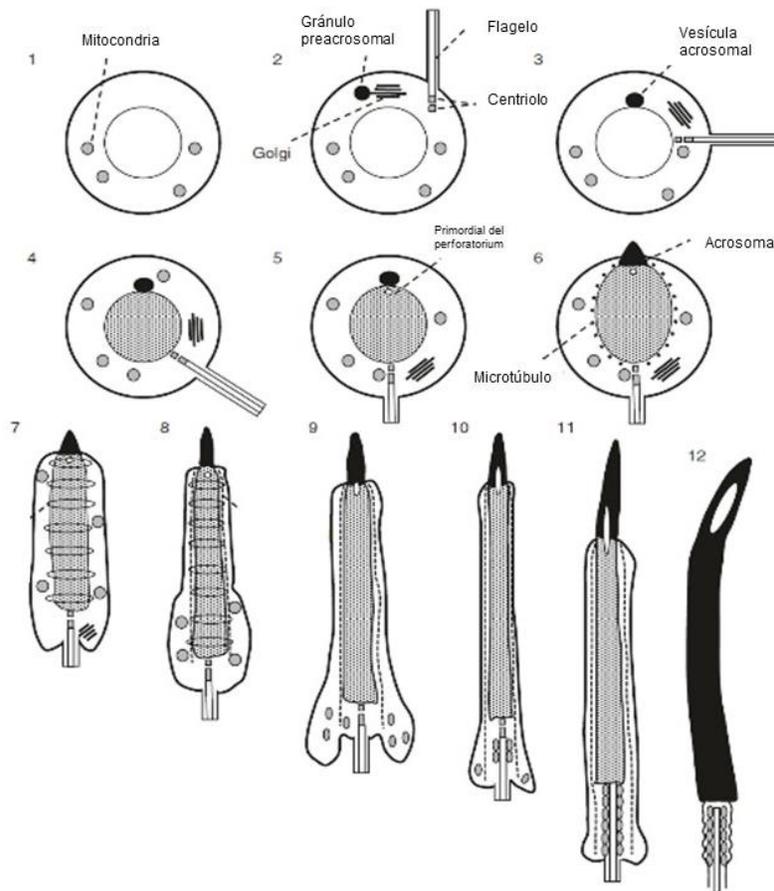


Figura 3. Diagrama esquemático que muestra la espermiogénesis de aves, que consiste en 12 pasos, que se categorizan en 4 fases: Fase de Golgi (1-3), Fase de tapa o capucha (4-6), Fase acrosomal (7-9) y la fase de maduración (10-12) (Asano & Tajima, 2017).

1.8. Morfología espermática

Los espermatozoides de las aves son de forma alargada con longitud de 80 a 90 μm y se subdividen en cabeza, pieza media y cola (Herrera & col., 2005), aunque algunos autores lo subdividen en acrosoma, núcleo y flagelo como se muestra en la figura 4 (Asano & Tajima, 2017). La cabeza es curva filamentososa y mide de 12 a 13 μm , se corona por el acrosoma de 2 μm de largo (Long, 2006). Esta región contiene enzimas proteolíticas que son requeridas durante la fertilización. La parte media tiene 4 μm de largo y contiene mitocondrias, y en el resto de la cola, con una longitud de aproximadamente 100 μm se extienden fibras centrales, relacionadas con el centriolo proximal y distal. El flagelo se divide en pieza media, pieza principal y pieza final, todos los cuales están dedicados a impulsar espermatozoide hacia el sitio de fertilización en oviducto (Asano & Tajima, 2017). Existen estudios limitados sobre la producción de

ATP en los espermatozoides de las aves, algunos estudios realizados en gallos, sugieren que la síntesis de ATP mitocondrial juega un rol importante en el mantenimiento de la motilidad espermática en lugar de la glucólisis. Sin embargo, el camino metabólico para la producción de ATP es poco entendido en comparación con el de los mamíferos (Asano & Tajima, 2017). En su parte más ancha, el espermatozoide mide cerca de 0.5 μm . Posee una membrana plasmática en la superficie, donde se encuentran glicoproteínas y glicolípidos con residuos de carbohidratos como N-acetilglucosamina, que puede estar unido a proteínas con función de receptores, así como fosfolípidos como el glicofosfatidil-inositol, que son precursores de segundos mensajeros. Los espermatozoides tienen una membrana acrosomal derivada del aparato de Golgi, y está situada en la cabeza (Long, 2006).

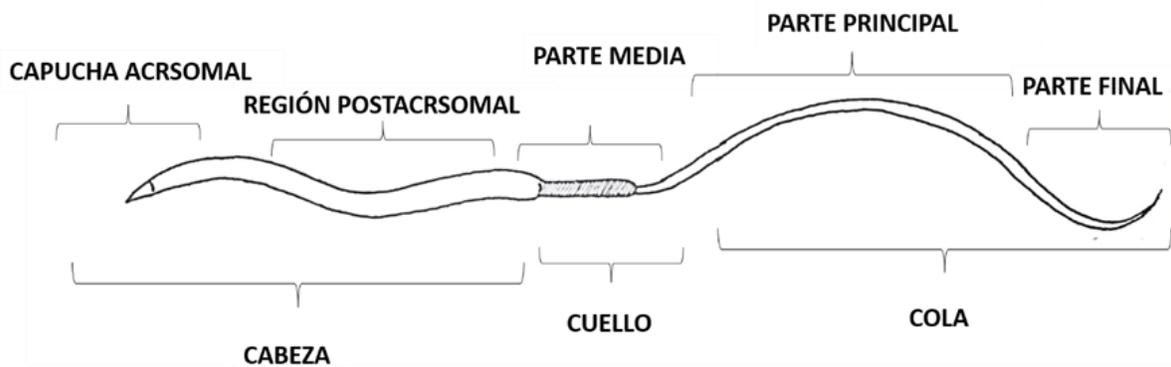


Figura 4. Estructura espermática del ave (Huitrón, 2019)

1.9. Maduración espermática

En los mamíferos, después de la espermiación, los espermatozoides maduran durante su tránsito en el epidídimo, este proceso es conocido como maduración epididimal. Dicho proceso involucra modificación estructural, cambios en la composición de lípidos y carbohidratos de la membrana plasmática, y el desarrollo de la motilidad flagelar, que se sabe es un pre-requisito para la habilidad fertilizante de los espermatozoides de mamíferos. Sin embargo, en las aves, no se considera una maduración epididimal, debido a la regresión del epidídimo (Peralta & Miazzo, 2002), de hecho, existen estudios que mencionan que los espermatozoides, adquieren gradualmente la habilidad necesaria para la fertilización durante su trayecto en el aparato reproductor

del macho antes de la eyaculación (Asano & Tajima, 2017) A diferencia de los mamíferos, se sabe que, en las aves, el proceso de maduración espermática se lleva a cabo en los conductos deferentes, donde obtienen una mayor movilidad durante su tránsito (Ahammad & col., 2013). Además de que, en dichos conductos, adquieren su forma definitiva, ya que sufren cambios morfológicos debido al plasma seminal que en ellos se elabora, así como también, los conductos deferentes funcionan como almacenadores espermáticos (Ricaurte, 2006).

1.10. Capacitación espermática

El periodo de capacitación espermática en las aves no se tiene bien descrito (Lemoine & col, 2011). Se ha considerado que el proceso de capacitación se produce *In vivo* en el tracto reproductor de la hembra, por lo que ocurre en periodos muy cortos (Lemoine & col, 2011). Sin embargo, algunos autores mencionan que, en las aves, al momento de obtener eyaculados, los espermatozoides ya están capacitados y con capacidad fertilizante (Lemoine & col, 2009). El proceso de capacitación implica diferentes mecanismos celulares que dan lugar a modificaciones de la membrana del espermatozoide, provocando el proceso de hiper-activación (Lemoine, 2009). Es importante mencionar que, existen factores descapacitantes en el aparato reproductor de la hembra. Estos factores descapacitantes son moléculas que se originan en las secreciones de la unión útero vaginal, que van a funcionar protegiendo a los espermatozoides durante su periodo de almacenamiento (Camarillo & col., 2019).

1.11. Reacción acrosomal

Se trata de la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática, la apertura de la región apical del acrosoma y posterior liberación de los contenidos acrosómicos que ayudan a hidrolizar la membrana perivitelina (MPV) del ovocito, para auxiliar al espermatozoide a penetrarla y realizar la fertilización (Lemoine, 2008; Nishio & Matsuda, 2017). El contenido acrosómico incluye una mezcla de enzimas, como acrosina y hialuronidasa (Nishio & Matsuda, 2017), estas enzimas hidrolíticas se derivan del aparato de Golgi durante la espermatogénesis; por su origen, estructura, y función celular el acrosoma es comparable a un ribosoma. Cuando el espermatozoide

entra en contacto con la membrana perivitelina, existe una liberación espermática de enzimas, principalmente hialuronidasa y acrosina, lo cual sugiere que la membrana perivitelina tiene receptores especializados para la inducción de la reacción acrosomal (RA). Para inducirla la RA se requiere Ca^{2+} extracelular, mediante el contacto de los espermatozoides con la MPV para promover la elevación intracelular de AMPc y una disminución del pH intracelular, con esto se genera una hiperactivación en el espermatozoide para inducir la reacción acrosomal (Arenas & col., 2010). De acuerdo al trabajo realizado por González, (2019) a lo largo del tracto reproductor del macho ocurren procesos de maduración que implican cambios morfofisiológicos relacionados a la adquisición de la capacidad fertilizante en los espermatozoides, determinando que los procesos de capacitación y reacción acrosomal pueden inducirse en los espermatozoides que se obtienen de los diferentes segmentos del aparato reproductor del macho (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros espermáticos de capacitación y reacción acrosomal *In vitro* de gallo (*Gallus gallus*) en presencia de MPV determinado con CTC.

Región	Tratamiento	Espermatozoides (%)		
		Intactos	Capacitados	Reaccionados
Testicular (n=25)	Control	62.57 ^a	24.14	14.57 ^a
	MPV	19.57 ^b	30.57	45.00 ^b
	EE	5.39	3.10	4.36
Craneal (n=25)	Control	54.71 ^a	28.43	19.00 ^a
	MPV	22.28 ^b	33.57	43.57 ^b
	EE	3.71	3.60	4.60
Conducto deferente (n=25)	Media Control	59.43 ^a	26.14	18.71 ^a
	Media MPV	21.57 ^b	25.29	52.29 ^b
	Media EE	3.68	2.70	3.23
Caudal (n=25)	Control	45.43 ^a	31.57	28.00 ^a
	MPV	16.14 ^b	27.00	57.29 ^b
	EE	5.46	2.22	3.28
Eyaculado (n=25)	Control	66.71 ^a	18.14 ^a	16.14 ^a
	MPV	12.57 ^b	26.86 ^b	60.57 ^b
	EE	2.58	2.72	3.20

(Tomado de: González, 2019)

1.12. Fertilización

Cuando la cápsula folicular que rodea al folículo en desarrollo (F3) se rompe en la región denominada “estigma”, que es la zona no vascularizada que se encuentra opuesto al pedículo folicular, el óvulo es liberado con el folículo sin células de la granulosa (Nishio & Matsuda, 2017). Los ovocitos de las aves se rodean únicamente con la membrana perivitelina. Los espermatozoides se transportan al extremo superior del oviducto, migrando una gran distancia de la vagina al infundíbulo, por lo que algunos estudios reportan que la migración de los espermatozoides eyaculados a través del oviducto de las gallinas avanza a una gran velocidad. El ovocito capturado, en el infundíbulo, se encuentra con los espermatozoides para que se lleve a cabo la fertilización (Nishio & Matsuda, 2017). El proceso de fertilización comienza por la unión de los espermatozoides y la penetración de la membrana perivitelina (MPV), que puede considerarse análoga a la zona pelúcida (ZP) en el ovocito de los mamíferos (Waclawek & col., 1998). Una vez que el espermatozoide ingresa al citoplasma del ovocito da paso a la fusión del pronúcleo del espermatozoide con el pronúcleo del ovocito (Figura 5). Este proceso se completa en un periodo corto, aproximadamente 15 minutos en la gallina (Nishio & Matsuda, 2017). Sin embargo, también se ha observado que después de la cópula, los espermatozoides de las aves, en particular de las gallinas, pueden permanecer en el oviducto de la hembra hasta 3 semanas antes de llegar al infundíbulo (Lemoine & col., 2009). El contacto o abordaje de la región acrosómica del espermatozoide con la MPV del huevo desencadena la reacción acrosomal (Nishio & Matsuda, 2017). En la MPV se localizan glicoproteínas ZP1, ZP3, ZP4, ZPD, estas glicoproteínas funcionan como factores de reconocimiento gamético e inductoras de la reacción acrosomal. En las aves se han descrito principalmente moléculas como N-acetilglucosamina, ácido siálico, manosa y glucosa como glicoproteínas de reconocimiento gamético (Okumura & col., 2004). Los espermatozoides constan de una zona rica en carbohidratos llamada “Glicocálix”. El glicocálix funciona principalmente para mediar eventos de reconocimiento específico (Peláez & Long, 2006). Los carbohidratos presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides, pueden modificarse a través de su paso por el tracto reproductor de la hembra (Peláez & Long, 2006). Se sabe que el espermatozoide de gallo contiene

en el glicocálix, residuos de ácido siálico que se requiere para el paso del espermatozoide a través de la vagina, y también ha sido implicado en el secuestro de espermatozoides en los túbulos de almacenamiento de esperma en el tracto reproductor de la hembra. La α -glucosa, α -manosa y N-acetilglucosamina, son necesarios para la interacción espermatozoide-huevo (Peláez & col., 2011).

La pérdida o alteración de las glicoproteínas de superficie durante el almacenamiento del semen puede afectar la capacidad de los espermatozoides de atravesar el tracto reproductor de la hembra, además de alterar el reconocimiento para unirse al óvulo (Peláez & Long, 2008).

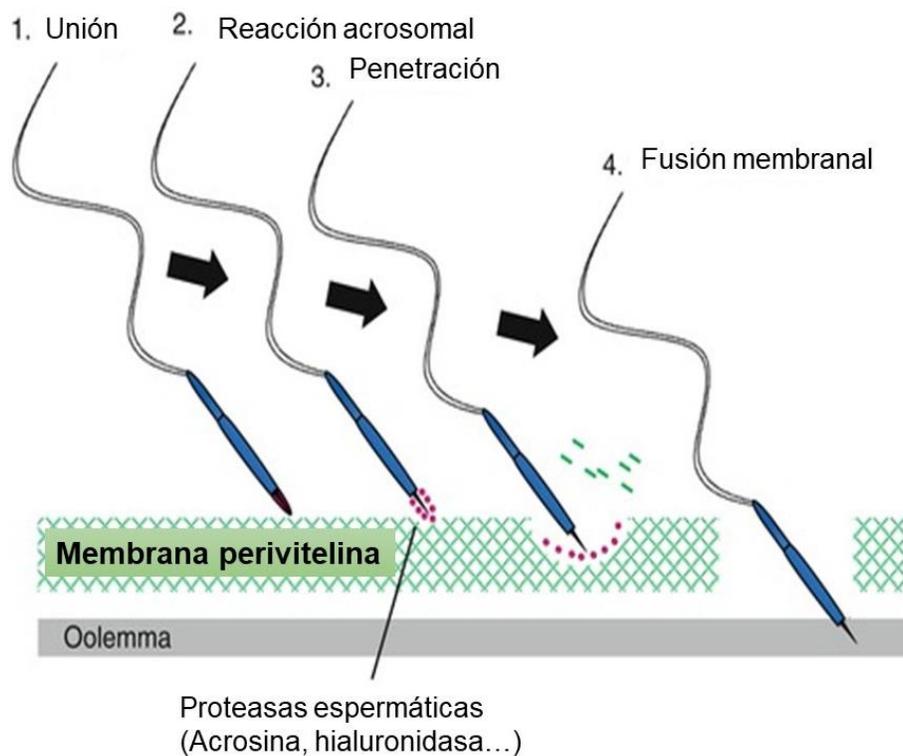


Figura 5. Unión del espermatozoide y penetración de la membrana perivitelina del huevo con degradación proteolítica (Nishio & Matsuda, 2017).

IV) Reproducción asistida

La reproducción asistida (RA) comprende una serie de metodologías (inducción de estros, obtención seminal, criopreservación de células, inseminación artificial, fertilización *in vitro*, transferencia de embriones, clonación, etc.) para obtener el éxito reproductivo. Al obtener buenos resultados en animales domésticos, la RA desde 1980

se usa ampliamente en zoológicos y colecciones animales ya que ciertos organismos en cautiverio presentan problemas en su reproducción, disminuyendo su población y aumentando la probabilidad de extinción (Sánchez & col., 2011).

1.13. Obtención seminal

La técnica de masaje dorso-ventral hasta la fecha es la más utilizada, tanto en la producción avícola como en las aves silvestres (Herrera & col., 2013). Esta técnica es un método no invasivo para la colecta de eyaculados y ha demostrado ser de gran ayuda para la inseminación artificial en pavos y gallo. Sin embargo, su única desventaja radica en que el masaje también estimula el coprodeo y urodeo, ocasionando que ciertos porcentajes de los eyaculados se contaminen con heces, ácidos úricos o ambos (Duchi & col., 2009). Dicha técnica fue desarrollada por Burrows & Quinn (1937), para la extracción y recolección de semen de gallo.

1.14. Conservación seminal *In vitro*

El almacenamiento del semen es una práctica frecuente que involucra la dilución del semen en diluyentes que tienen algún amortiguador. Existen dos maneras de conservar *In vitro* el semen: La conservación en fresco, a baja temperatura (5°C aproximadamente) y la criopreservación, en la cual se somete las muestras a temperaturas congelantes (-196°C), para ser utilizado en la IA. El principio de ambas técnicas se basa en la disminución de la temperatura fisiológica de los espermatozoides de 41°C a 4°C para ocasionar la disminución de la actividad metabólica, que a su vez aumenta la vida de los espermatozoides (Barbas & Mascarenhas, 2009). Se ha demostrado que dependiendo de los ingredientes utilizados para hacer un diluyente o crioprotector y las condiciones físico-químicas que estos produzcan, tendrán diferente capacidad de conservación (Sexton, 1988). La finalidad, tanto del diluyente como del crioprotector es maximizar la viabilidad de los espermatozoides para su posterior uso (Barbas & Mascarenhas, 2009).

Los diluyentes se utilizan para aumentar el volumen del eyaculado, mantener la viabilidad de los espermatozoides, maximizar el número de hembras inseminadas (Herrera & col., 2005) y para facilitar el análisis de los espermatozoides en un

eyaculado. Existen dos diluyentes que son los comúnmente utilizados en la conservación de semen de aves: Beltsville poultry semen extender (BPSE) y la solución Lake, que han sido utilizados en diferentes especies de aves como en buitres (Umapathy & col., 2005), en gallos (Herrera & col., 2005; Lemoine & col., 2008; Sexton, 1977, 1978, 1980), en pavos (Bakst, 1980), faisanes y aguilillas de cola roja (Herrera & col., 2005) (Tabla 3).

Los diluyentes seminales deben contar con un amortiguador y una osmolaridad adecuadas que protejan en su momento a las células espermáticas de sufrir daños y aumentan el volumen de la muestra (Barbas & Mascarenhas, 2009). Al proveer una presión osmótica similar (330- 400 mOsm) y pH (7.0-7.5) al plasma seminal, así también ser una fuente de energía debido a sus sustratos como carbohidratos (glucosa o fructosa) u otros componentes como citrato, glutamato y acetato, promueven la inmediata supervivencia del espermatozoide (Slanina & col., 2015; Iaffaldano & col., 2016). Estudios recientes en aves se ha demostrado que la reacción acrosomal puede ser inducida *In vivo* por diferentes compuestos salinos, calcio o compuestos derivados del huevo, por esta razón debe prestarse mucha atención a los reactivos utilizados para el diluyente que se ocupará para conservar el semen en fresco o criopreservado. Un aspecto importante es que la movilidad de los espermatozoides es muy sensible a los factores que componen el plasma seminal y a las modificaciones que los diluyentes sintéticos le ocasionan (Lemoine & col., 2008).

Con respecto a la osmolaridad, el semen de aves puede tolerar de 250 a 460 mOsm kg⁻¹ H₂O, ya que a menor osmolaridad los espermatozoides se deforman en la región de la cabeza y presentan cuellos doblados, mientras que a mayor osmolaridad se deshidratan, por lo que en ambos casos disminuye su capacidad fertilizante (Donoghue & Wishart, 2000).

Tabla 3. Composición original de los dos diluyentes más comúnmente utilizados en aves domésticas (Calderón, 2015).

Composición (g/L)	Lake	BPSE
	8.0	5.0
	19.2	8.67
	5.0	-
	0.8	-
	-	4.3
	-	0.64
	-	0.34
	-	12.70
	-	0.65
	-	1.95
	7.1	8.6**
	340	380
	Lake and Ravie , 1984	Sexton, 1977

*N-TRIS (Hidroximetil) metil-2-aminoetano de ácido sulfónico

** Determinado en condiciones de laboratorio

1.17. Criopreservación

La criopreservación es un método a través del cual se preservan células, tejidos, órganos, bajo condiciones de muy baja temperatura entre -20°C y -180°C . Para ello, se requiere suspender el material biológico en medios (crioprotectores) que eviten el daño debido a la formación de cristales durante la congelación, así como compuestos que mantengan las condiciones fisiológicas lo más parecido al ambiente en el que se encontrarían en el organismo. La criopreservación involucra la suspensión del semen en diluyentes con sustancias crioprotectoras, esta técnica permite su almacenamiento de manera “indefinida” en nitrógeno líquido, permitiendo la creación de un banco de genes, con un fácil manejo posterior (Herrera et al., 2005). Debido a que es un método para mantener material biológico y germoplasma utilizando la tecnología, se requiere una alta adaptabilidad de las células para soportar los cambios osmóticos y el estrés térmico (Blesbois, 2007). Entre las principales características de los espermatozoides

que se tienen que tomar en cuenta para aplicar un método de criopreservación y que este sea exitoso son: la permeabilidad de la membrana a medios acuosos y a los crioprotectores permeables, tiempos de exposición requeridos a los crioprotectores y la resistencia a cambios osmóticos (Blanco & col., 2009). Para lograrlo se usan sustancias que mantienen las condiciones fisiológicas necesarias para los espermatozoides y otras que protegen la membrana plasmática reduciendo el efecto de la excesiva concentración de solutos y para evitar o disminuir la formación de cristales intra y extracelulares durante la congelación y descongelación (Holt, 2000; Iaffaldano & col., 2016).

1.18. Crioprotectores

Son sustancias químicas que sirven para reducir los daños físicos y químicos en los espermatozoides, cuando estos son congelados. Estas sustancias protegen la membrana plasmática de los espermatozoides para disminuir el efecto de la excesiva concentración extracelular de solutos y evitar o reducir la formación de cristales intra y extra celulares (Herrera & col., 2005; Kuzlu & Taskin, 2017).

Se ha reportado que el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA), son efectivos para proteger a los espermatozoides de gallo de diversos grados de daño por congelación (Asano & Tajima, 2017).

Entre estos tres agentes crioprotectores, el glicerol se ha usado más ampliamente para congelar el semen de gallo porque tiene las tasas más altas de fertilidad después del descongelamiento. Sin embargo, se ha descrito que la concentración de glicerol debe disminuirse por debajo de 0.163 M antes de la inseminación para obtener huevos fértiles, debido al efecto anticonceptivo del glicerol (Lake & col., 1981). Durante el estudio realizado por Ushiyama & col. (2016), no se entendió completamente por qué la capacidad de fertilización de los espermatozoides de gallo disminuyó después de la congelación. Sin embargo, un estudio biológico celular reciente demostró en el espermatozoide de gallo que el procedimiento de congelación y descongelación causa un cambio apoptótico temprano, caracterizado por la translocación externa de fosfatidilserina (PS) a la superficie del esperma (Ushiyama & col., 2016).

Por otro lado, la fertilidad post descongelación tiende a ser menor cuando se usa DMSO y DMA en comparación con el método del glicerol, aunque, a diferencia del glicerol, estos dos agentes crioprotectores no es necesario eliminarlos antes de la inseminación artificial (Asano & Tajima, 2017).

Los crioprotectores se dividen en dos grupos, los que atraviesan la membrana celular (intracelulares) y los que actúan desde el exterior de la célula (extracelulares). En el caso de los crioprotectores intracelulares ocasionan una reorganización de las proteínas y lípidos, causando una mayor fluidez membranal y deshidratación a bajas temperaturas, que a su vez evita la formación de hielo generando una mayor tasa de supervivencia espermática tras el descongelamiento (Blanco & col., 2010). Dentro de este tipo de crioprotectores tenemos el glicerol, DMSO y DMA (Herrera & col., 2005; Blesbois, 2007; Barbas & Mascarenhas, 2009; Purdy & col., 2009).

El glicerol es un alcohol de tres grupos hidroxilos, posee un coeficiente alto de viscosidad y tiene una masa molar de 92.09 g/mol. Este es el crioprotector más común para el semen de pavos y gallos, se le atribuyen efectos contraceptivos, ya que se ha visto que disminuye la movilidad espermática e irrita la mucosa vaginal de la hembra (Hammerstedt & Graham 1992), por lo que la concentración óptima durante el proceso de criopreservación debe determinarse detalladamente, debido a su potencial toxicidad. En respuesta a la adición del glicerol al medio isotónico en el que están las células espermáticas, tiene lugar un primer ajuste del volumen celular debido a una rápida salida de agua intracelular, seguida por un lento retorno al volumen original a medida que penetra el crioprotector. Cuando el agua extracelular se congela ocurre un segundo ajuste de volumen, motivado por la salida de agua del interior de la célula, en respuesta a las altas concentraciones de sales extracelulares (Hammerstedt & col., 1990). Además de los efectos osmóticos, el glicerol actúa directamente sobre la membrana espermática aumentando su fluidez y el metabolismo celular induciendo una hiperactivación espermática prematura, lo que compromete la capacidad fertilizante espermática (Parks & Graham, 1992). Para el desarrollo de cualquier protocolo de criopreservación seminal donde se quiera usar este crioprotector, deben determinarse los rangos de disminución de la temperatura óptimos.

Los efectos tóxicos del glicerol como el aumento de la fluidez del moco oviductal y la irritación de este conducto en la hembra (Long & Kulkarni, 2004) han impulsado el estudio y empleo de otros crioprotectores como el DMSO y DMA.

El DMSO es un líquido orgánico que contiene sulfóxido, posee una masa molar de 78.13 g/mol que es menor a la del glicerol; es usado como disolvente orgánico industrial, como criopreservante y como medicamento ya que reduce el dolor y la inflamación. El DMSO tiene la capacidad de atravesar membranas orgánicas portando consigo otras sustancias en disolución sin dañar aparentemente la integridad de la membrana, por lo que se le usa en criopreservación de gametos, su toxicidad es muy baja y es una sustancia muy estable a bajas y altas temperaturas (Ramírez & Luza, 1967).

El DMA está clasificado como un crioprotector permeable, intracelular, contiene un grupo amida que le confiere alta solubilidad por lo que es considerado un muy buen solvente. El DMA presenta peso molecular de 87,12 g/mol y dos grupos metil hidrofílico, que pueden crear enlaces de hidrógeno con el agua, lo cual le proporciona su capacidad como crioprotector (Iaffaldano & col., 2012), ingresando al citoplasma, por medio del gradiente de concentración, el fluido intracelular puede ser enfriado a temperaturas entre -5 a -15°C, sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a la disminución del punto de congelación por medio de la reducción de las interacciones entre las moléculas de agua (Pardo-Carrasco & col., 2015). De acuerdo con Ball & Vo (2001) el efecto crioprotector de las amidas se atribuye a su bajo peso molecular, a su viscosidad, los cuales incrementan la permeabilidad de la membrana, reduciendo el estrés osmótico y por tanto el daño celular. El DMA posee el más alto coeficiente de permeabilidad ($14,7 \times 10^{-5}$ cm/s), cuando se le compara con DMSO ($1,3 \times 10^{-5}$ cm/seg) y glicerol ($0,58 \times 10^{-5}$ cm/seg) (Naccache y Sha'afi, 1973). Por lo tanto, el DMA reduce la formación de cristales de hielo intracelular e incrementa la permeabilidad de la membrana decreciendo el daño osmótico (Canorio & col., 2015)

Los crioprotectores extracelulares son hidrófilos, no tóxicos y ayudan a estabilizar la concentración de solutos internos bajo ambientes de estrés osmótico (Blanco & col., 2010), también evitan la formación de hielo como, por ejemplo, la clara de huevo, glucosa, lactosa, sacarosa y rafinosa. Estos azúcares interactúan con los fosfolípidos

de la membrana plasmática, aumentando la sobrevivencia de los espermatozoides a la criopreservación (Barbas & Mascarenhas, 2009).

1.19. Evaluación seminal

El objetivo de la evaluación seminal es el de predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Para esto se analiza el volumen del eyaculado, concentración espermática, viabilidad y morfología esto mediante microscopía óptica y con tinciones básicas como la de eosina-nigrosina (E-N) (1% eosina y 5% nigrosina). La tinción E-N nos permite evaluar la viabilidad, ya que es una sustancia de bajo peso molecular que es permeable a la membrana celular, por lo que, si la célula perdiera la integridad de la membrana, la tinción puede penetrarla y teñir el núcleo de un color azul o violeta, esto indica la presencia de un espermatozoide muerto (Bakst & col., 1994). Sin embargo, si la célula aún conserva su integridad membranal, la tinción no puede penetrarla, considerando entonces, que se tratará de un espermatozoide vivo. Los indicadores anteriores, evaluados en conjunto, generan el Índice de Calidad Espermática (Bakst & col., 1994).

La evaluación *in vitro* del semen es una herramienta para valorar de manera cuantitativa la condición espermática de los eyaculados, al conocer también características como la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal y distribución de receptores de reconocimiento gamético en espermatozoides recién eyaculados y post criopreservación, esto permite optimizar los protocolos de criopreservación y crear bancos de semen funcionales.

1.20. Viscosidad seminal

La viscosidad es la propiedad de los fluidos que caracteriza su resistencia a fluir, debida al rozamiento entre sus moléculas (Real Academia de la Lengua Española 2019). Esta característica depende de la concentración espermática y presencia de carbohidratos, lípidos y proteínas que se encuentran en el eyaculado, donde al encontrarse en altas concentraciones resultan en viscosidades más altas y viceversa (Rateb, 2016). La disminución de la movilidad espermática ha sido asociada a una viscosidad alta, y se ha planteado que esta característica puede tener un papel en la

viabilidad espermática en algunas especies de mamíferos (Casaretto & col., 2012; Hirai & col., 1997). De acuerdo al estudio realizado por Hirai & col., (1997), en el que modificaron la viscosidad de los medios de conservación para semen de toro utilizando ficoll, determinaron una disminución en la movilidad de los espermatozoides en los medios con viscosidad más alta, asociándolo a un aumento en la viabilidad espermática.

El ficoll es un polímero sintético altamente soluble (por su alto contenido de grupos hidroxilo), relativamente inerte, estable a pH neutro y alcalino, con un peso molecular de 400 kDa. El ficoll tiene una viscosidad alta pero menor que la de la sacarosa, por lo que no altera la presión osmótica del medio (Kulikova & col., 2014; Álvarez, 2016). El ficoll se ha utilizado, generalmente, para la separación de poblaciones celulares en sangre a través de la separación por gradientes de densidad. Gracias a sus propiedades, también se comenzó a utilizar para la modificación de algunos medios de conservación espermática de mamíferos, ya que actúa como un agente crioprotector (CPA) no permeable, afectando la viscosidad de la solución de vitrificación y preservando las células al reducir el estrés mecánico, recubriendo las células, protegiendo la membrana celular y también evitando la cristalización durante la congelación/descongelación (Kulikova & col., 2014).

Para la evaluación de la viscosidad, se requiere un viscosímetro y un refractómetro, debido a que es necesario obtener el grado de opacidad de la muestra y realizar un análisis para determinar la densidad de que presenta.

1.21. Evaluación de la reacción acrosomal

Existen evidencias que señalan que la reacción acrosomal *In vivo* comienza con la acción de la progesterona sobre los espermatozoides. Este estímulo provoca una entrada de Ca^{2+} al espermatozoide. La entrada de calcio en el espermatozoide ocasiona una desviación de las ATPasas, además de un aumento del sodio intracelular con una salida de hidrógeno, y en consecuencia un aumento del pH intra acrosomal. Adicionalmente se presentan una serie de modificaciones en los lípidos de la membrana, así como la formación de segundos mensajeros que se incorporan a una cascada de acontecimientos que ocurren durante la reacción acrosomal (Arenas & col.,

2010). La reacción acrosomal en espermatozoides de aves pueden ser inducida muy rápidamente *in vitro* en un medio salino simple que contenga Ca^{2+} y MPV (Lemoine & col., 2009).

La clortetraciclina (CTC) es un antibiótico con un componente fluorescente que se utiliza para determinar la capacitación espermática y la reacción acrosomal *In vitro* de diferentes especies (Calderón, 2015). La técnica está basada en la transferencia de CTC a través de la membrana plasmática del espermatozoide penetrando en los compartimentos intercelulares, que contienen altos niveles de calcio libre (Ca^{2+}), donde se ioniza un anión y se une al calcio, produciendo como resultado la fluorescencia (Tsein, 1989). En estudios donde se determina la reacción acrosomal en aves (Ochoa & col., 2014), con el uso de clortetraciclina, se ha observado que se liberan o se modifican algunas proteínas o glicoproteínas periféricas, que se encuentran unidas a la membrana plasmática a través de interacciones electrostáticas. Además, hay una redistribución de algunas proteínas o glicoproteínas integrales permitiendo establecer diferentes patrones de tinción durante el proceso de capacitación y reacción acrosomal. En el caso de los espermatozoides sin reacción acrosomal se observan con una fluorescencia uniforme en su morfología. Para los espermatozoides capacitados la región ecuatorial se tiñe y la región acrosomal presenta ligera fluorescencia formando un puente apical, indicando que el acrosoma está intacto y finalmente, en los espermatozoides con reacción acrosomal la presencia de una banda distintiva en la región ecuatorial se acompaña de un incremento en la fluorescencia (Cruz, 2016).

1.22. Evaluación de carbohidratos membranales

Las lectinas son glicoproteínas de origen vegetal que se unen específicamente a azúcares ubicados en la estructura celular y, por ello, se han utilizado como marcadores específicos de glicoconjugados localizados, tanto en el acrosoma intacto como en la matriz acrosomal, para definir que la membrana plasmática del espermatozoide está íntegra estructuralmente. Cuando las lectinas son conjugadas con FITC, y expuestas al láser de un microscopio de fluorescencia, emiten un color verde iridiscente. La lectina *Triticum vulgaris aglutinina* (WGA) permite reconocer

terminales N-acetilglucosamina al presentar una mayor afinidad a este carbohidrato al unirse sobre regiones acrosómicas (Peláez & Long, 2006).

Herrera & col., (2005) evaluaron con lectina WGA a los espermatozoides post criopreservados de halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*) para determinar la presencia y distribución de ciertos carbohidratos membranales. Se concluye que la distribución de residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico se conservaron en los mismos porcentajes durante la evaluación post descongelación (50.3%) y la evaluación en fresco (51.7%).

Asimismo, Camarillo & col, (2019) utilizan las lectinas asociadas a fluorescencia como marcadores de acrosoma, para determinar modificaciones en la presencia y distribución de los carbohidratos membranales manosa y ácido siálico en espermatozoides de gallo durante la criopreservación.

2. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios sobre la conservación seminal de aves en los últimos años, en un estudio realizado por Herrera & col., (2005) se criopreservaron eyaculados de tres especies de aves con dimetilsulfóxido (DMSO) y polivinilpirrolidona (PVP), utilizando como diluyente BPSE. La evaluación de espermatozoides de gallo mostraron una motilidad promedio en fresco de 80.7% y post criopreservación de 52.5%, la morfología normal fue de 98.1% en fresco y 96.3% post criopreservación, en faisán (*Phasianus colchicus*), y halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*) mostraron resultados para la movilidad en fresco de 67% y 34% post criopreservación, así mismo demostró que el PVP es una alternativa en cuanto a crioprotectores ya que no se encontraron diferencias significativas al compararlo con el DMSO.

Herrera & col., (2017) evaluaron los dos diluyentes más utilizados para la conservación seminal en aves, BPSE y Lake, concluyendo que el diluyente Lake es más eficiente para el almacenamiento seminal en fresco, debido a que presenta menos reacciones acrosomales prematuras, mientras que el diluyente BPSE fue más eficiente para la criopreservación seminal en halcón Harris.

Un parámetro al que no se le ha dado importancia, para la realización de medios de conservación en aves, es la viscosidad en el medio de conservación. Pero se ha observado que la viscosidad puede jugar un papel importante para la conservación de la viabilidad y capacidad fertilizante del espermatozoide en los eyaculados de algunas especies de mamíferos, como son los camélidos (Casaretto & col., 2012). Otros estudios realizados con camélidos, en donde se han visto dificultades para la obtención, manejo y evaluación del semen y problemas en la inseminación, debido a la viscosidad del semen de esta especie, el motivo de esta viscosidad es debida a que es importante para mantener la viabilidad y capacidad fertilizante dentro del tracto reproductivo de la hembra. Para ver el efecto de la viscosidad en el semen de estos animales, se han empleado diferentes tipos de enzimas para licuar el semen y así disminuir la viscosidad del mismo, la motilidad fue mantenida de forma adecuada solo utilizando papaína o tripsina (Adams et al., 2009; Bravo et al., 2013; El- Bahrawy et al., 2017).

Debido a estas observaciones se han realizado estudios en toros (Hirai & col., 1997), modificando la viscosidad de los medios de conservación, observando una disminución en la movilidad de los espermatozoides, asociando esto a un mantenimiento de la viabilidad espermática.

Específicamente de águila real, sólo se ha publicado un trabajo relacionado a la evaluación seminal, el cual fue realizado por Villaverde & col., (2015), en el cual se hizo la caracterización y criopreservación seminal de un solo ejemplar de *A chrysaetos* usando glicerol y dimetiacetamida como crioprotectores, pero en conservación en fresco utilizaron medio Lake con PVP, observando 46.7% de motilidad total a las 0 hrs., aumentando a 48.8% a las 24 hrs. el porcentaje de vivos que se observó a las 0 hrs. fue de 74.6% incrementando a las 24 hrs. a 80.7%, concluyendo que la combinación de medio Lake con PVP es buena en conservación seminal en fresco, por un periodo no mayor a 24 hrs.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen medios de conservación para aves como el medio BPSE y el Lake que se desarrollaron desde la década de los 70's para la conservación espermática *in vitro*; sin embargo, se elaboraron de manera muy específica para la conservación de semen de pavo y gallo. Posteriormente se utilizaron para la conservación seminal de aves silvestres, tales como halcón peregrino, águila real y grullas, obteniendo resultados diferentes a los obtenidos cuando se utiliza para espermatozoides de aves domésticas. Considerando que son especies taxonómica y fisiológicamente distintas, es evidente que se requiere diseñar medios específicos para las aves silvestres en cautiverio, por lo que la contribución de conocimientos básicos de la fisiología espermática ayudará a desarrollar medios de conservación seminal adecuados que permitan un mayor éxito reproductivo.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los medios que se diseñaron para la conservación seminal de gallos y pavos también se han usado para la conservación de eyaculados de aves rapaces y otras especies de aves silvestres, sin embargo, no han logrado los resultados esperados. Estudiar el papel de la viscosidad seminal natural en los medios de conservación puede ayudar en la optimización de los medios de conservación seminal del águila real.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo influye la viscosidad del medio de conservación seminal en los parámetros de capacitación, reacción acrosomal, presencia y distribución de carbohidratos membranales en espermatozoides conservados *in vitro* de águila real?

6. HIPÓTESIS

Si la viscosidad de los fluidos naturales está relacionada con la conservación seminal *in vivo*, entonces, su mantenimiento a condiciones similares en el medio para la conservación *in vitro*, conservará los parámetros de capacitación, reacción acrosomal, presencia y distribución de carbohidratos membranales adecuados para la viabilidad espermática.

7. OBJETIVOS

7.1. General

Determinar el efecto de la viscosidad del medio de conservación seminal, en la capacitación, reacción acrosomal, presencia y distribución de carbohidratos membranales de espermatozoides de águila real conservados *in vitro*.

7.2. Particulares

- Determinar la viscosidad seminal de los eyaculados de águila real recién obtenidos.
- Analizar el efecto de la viscosidad del medio de conservación en los parámetros de capacitación y reacción acrosomal.
- Analizar el efecto de la viscosidad del medio de conservación en los parámetros de presencia y distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Diseño experimental

Se trabajaron 5 machos y 5 hembras de águila real, que representan el 16% de la población total registrada para México en cautiverio. Los ejemplares fueron estimulados con el masaje dorso-ventral, durante los meses febrero-marzo. El trabajo de laboratorio fue realizado en los laboratorios de Bioquímica de la Reproducción y Fisiología Veterinaria de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS) que pertenecen al Departamento de Producción Agrícola y Animal (DPAA). Ambos localizados en la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Se determinó la viscosidad del semen recién obtenido, posteriormente se realizaron medios de dilución con diferentes viscosidades, adicionándoles ficoll en diferentes porcentajes (10, 30 y 45%), además del grupo control, que únicamente contenía medio Lake (Figura 6). Todas las muestras fueron congeladas utilizando DMA al 6% como crioprotector, para su posterior descongelación y evaluación. A cada condición se le realizó la evaluación básica para determinar concentración espermática, movilidad y, con la tinción de E-N, la morfología. También se determinaron parámetros de reacción acrosomal con la adición de CTC, así como presencia y distribución de carbohidratos membranales mediante el uso de la lectina *Triticum vulgaris aglutinina* (WGA).

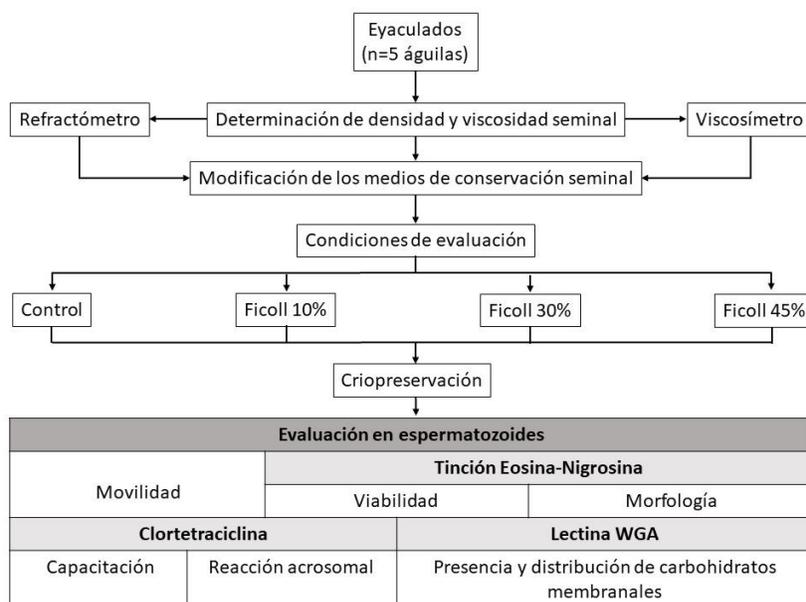


Figura 6. Diseño experimental.

8.2. Aves utilizadas

Los ejemplares de águila real con los que se trabajó para la obtención del material biológico se encuentran en Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAs) (Figura 7). Con las cuales se han logrado convenios de colaboración y que tienen pleno interés en la participación en este proyecto.

1. Reino Animal, localizado en Camino a Belén, Santa María, Colonia Oxtotipac, Delegación Otumba, C.P. 55908, Estado de México (CONVENIO REINO ANIMAL – UAM-X) (Figura 8).

Número de registro SEMARNAT: DGVS-ZOO-P-0074-03-MEX

2. Aguilaro Club América: Del toro N° 100 Col. Ex hacienda de Coapa, C.P. 14390. Delegación Coyoacán, Ciudad de México.

Número de registro SEMARNAT: DGVS-PIMVS-CR-IN-1847-CDMX/18

3. Aviario DILAJESH, localizado en Camino a San Nicolás #23, Barrio la Concepción, C.P. 56070, Tepetlaoxtoc de Hidalgo, estado de México.

Número de registro SEMARNAT: DGVS-CR-IN-0917-MEX/06

4. Centro de Educación Ambiental Cultural y Recreativo (C.E.A.R.) Rodolfo Landeros Gallegos, Zoológico de Aguascalientes, localizado en Avenida José María Chávez, Cd insuctrial, C.P. 20290, Aguascalientes (CONVENIO CRRL – UAM-X) (Figura 9).

Número de registro SEMARNAT: INE/CITES/DGVS-CR-IN-AV-OO35-AGS./00

El manejo de cada ejemplar se realizó de acuerdo al plan de manejo oficial autorizado por la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS)-SEMARNAT.



Figura 7. Zeus ejemplar de águila real (*Aquila chrysaetos*) Club Futbol América

CONVENIO DE COLABORACIÓN QUE CELEBRAN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD XOCHIMILCO, EN LO SUCESIVO LA UAM-X, REPRESENTADA POR SU RECTORA, DOCTORA PATRICIA EMILIA ALFARO MOCTEZUMA, ASISTIDA POR EL SECRETARIO DE LA UNIDAD, LICENCIADO GUILLERMO JOAQUÍN JIMÉNEZ MERCADO, Y LA EMPRESA HACIENDA NIETEPEC, S.A. DE C.V., EN ADELANTE DENOMINADA REINO ANIMAL, REPRESENTADA POR SU DIRECTOR GENERAL, ITHEL BERRUM GONZÁLEZ, AL TENOR DE LAS SIGUIENTES DECLARACIONES Y CLÁUSULAS:

DECLARACIONES

I. De LA UAM-X:

- 1.1. Que es una Universidad pública y autónoma, creada como organismo descentralizado del Estado, con personalidad jurídica y patrimonio propio, según su Ley Orgánica decretada por el Congreso de la Unión de los Estados Unidos Mexicanos y publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de diciembre de 1973.
- 1.2. Que de acuerdo con lo señalado en el artículo 2 de su Ley Orgánica, tiene por objeto:
 - a) Impartir educación superior de licenciatura, maestría y doctorado, y cursos de actualización y especialización, en sus modalidades escolar y extraescolar, procurando que la formación de profesionales corresponda a las necesidades de la sociedad;
 - b) Organizar y desarrollar actividades de investigación humanística y científica, en atención, primordialmente, a los problemas nacionales y en relación con las condiciones del desenvolvimiento histórico, y
 - c) Preservar y difundir la cultura.
- 1.3. Que a fin de realizar su objeto, se ha organizado dentro de un régimen de desconcentración funcional y administrativa, a través de sus unidades universitarias, entre las que se encuentra la Unidad Xochimilco.
- 1.4. Que de conformidad con lo señalado en los artículos 15 y 16, fracción IV de su Ley Orgánica, y 36 del Reglamento Orgánico, su representante legal es el Rector General, Dr. Salvador Vega y León, quien está facultado para otorgar, sustituir y revocar poderes.
- 1.5. Por acuerdo expreso del Rector General, la Rectora de la Unidad Xochimilco, Dra. Patricia Emilia Alfaro Moctezuma, tiene poder para celebrar este tipo de convenios, según consta en la Escritura Pública número 61,278, libro número 1,085, de fecha 26 de noviembre de 2013, otorgada ante la fe del Notario Público número 32 del Distrito Federal, Licenciado Francisco Jacobo Sevillano González.
- 1.6. Que su domicilio legal es el ubicado en Prolongación Canal de Miramontes número 3855, Colonia Ex Hacienda de San Juan de Dios, Delegación Tlalpan, código postal 14387, México, Distrito Federal.
- 1.7. Que su domicilio para efectos del presente Convenio se ubica en Calzada del Hueso número 1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán, código postal 04960, México, Distrito Federal, teléfono 5483-7025, fax 5483-7148.

No obstante lo anterior, en caso de no llegar a algún acuerdo, las partes se someten expresamente a la jurisdicción de los Tribunales competentes de la Ciudad de México, Distrito Federal, renunciando a la que pudiera corresponderles en razón de sus domicilios presentes y futuros.

El presente instrumento se firma por duplicado en Otumba, Estado de México, el 14 de febrero de 2017.

<p style="text-align: center;">POR LA UAM-X</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">DRA. PATRICIA EMILIA ALFARO MOCTEZUMA RECTORA DE LA UNIDAD</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">LIC. GUILLERMO JOAQUÍN JIMÉNEZ MERCADO SECRETARIO DE LA UNIDAD</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">MTRO. RAFAEL DÍAZ GARCÍA DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">DR. REY GUTIÉRREZ TOLENTINO JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">DR. JOSÉ ANTONIO HERRERA BARRAGÁN RESPONSABLE DEL CONVENIO</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">LIC. CHRISTIAN VÁN TAPIA CABAL DELEGADO DE LA ORIGINA DEL ABOGADO GENERAL</p>	<p style="text-align: center;">POR REINO ANIMAL</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">ITHEL BERRUM GONZÁLEZ DIRECTOR GENERAL</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">JOSÉ LUIS GONZÁLEZ MENDOZA GERENTE DE FAUNA</p> <p style="text-align: center;"><i>[Signature]</i></p> <p style="text-align: center;">ALEJANDRA RAMÍREZ ORTEGA Responsable de Proyecto. (Reproducción de aves rapaces)</p>
--	--

Figura 8. Convenio de colaboración Reino Animal-UAM X



Figura 9. Convenio de colaboración C.E.A.R Rodolfo Landeros Gallegos-UAM X

8.3 Uso de animales

Se trabajó a los ejemplares adultos y se evaluó el semen, cumpliendo con la normatividad y legislación vigente, como la NOM-059-ECOL-2010 que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestre, terrestre y acuática, amenazadas, raras y aquellas sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección, la NMX-AA-165-SCFI-2014 que establece las especificaciones y los requisitos para obtener la certificación con respecto al bienestar animal, conservación de especies, investigación, educación y seguridad en los zoológicos, esta norma aplica a todos los zoológicos ubicados en el territorio nacional, tanto públicos como particulares y la NOM-126-ECOL-2000 que establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional (Diario Oficial de la Federación., 2000; Diario Oficial de la Federación, 2010).

8.4. Condicionamiento

Se definió en cada locación un área física para la extracción del semen. Los cinco ejemplares previamente tuvieron entrenamiento con conductas utilizadas en cetrería. A partir de estas se procedió a realizar su condicionamiento para lograr la obtención de los eyaculados, una vez que los ejemplares toleraban mantenerse sobre un guante en el brazo de una persona y cubiertos de la vista con la caperuza adecuada.

El condicionamiento consistió en lo siguiente:

1. La persona encargada del águila entró al recinto para sujetar al ave. Posterior a sujetar al ejemplar, se le colocó la caperuza para evitar estresarlo con el manejo.
2. Se realizó un masaje en la porción dorsal (Figura 10), el cual consistió en la aplicación de un movimiento suave en el dorso en dirección cabeza-cloaca, hasta tocar los huesos pélvicos, repitiéndolo hasta que el ave presentó signos de relajación, seguido de un masaje desde el área ventral hasta la cloaca. Este procedimiento se continuó hasta que el ejemplar mostró conducta de cópula (Picoteo, vocalización, bajar y extender las plumas timoneras, intento por empalmar la cloaca con la de la hembra, debido al manejo, intentó hacer contacto con la mano que realizó el estímulo).
3. Cuando el ejemplar mostró conducta de cópula, se procedió a evertir la cloaca, haciendo una ligera presión en la misma para provocar la expulsión del seme o secreción cloacal, que se recolectaron con una micro pipeta graduada.
4. Posteriormente se permitió descansar al ejemplar unos minutos y se repitió el procedimiento, aproximadamente tres intentos al día por sesión en cada ejemplar.



Figura 10. Masaje dorso-ventral de un ejemplar macho adulto de Águila real para la obtención seminal.

Las sesiones de condicionamiento, se realizaron dos veces por semana con un máximo de tres estímulos por individuo, sin establecer horarios, para que el entrenamiento no lo relacionaran los ejemplares con alguna otra actividad o evento casual concurrente. En la tabla 4 se muestra el protocolo que se siguió para el entrenamiento de los ejemplares, estableciendo criterios para evaluar el avance en la conducta y una estimación en porcentaje del avance para llegar al objetivo. El condicionamiento de las conductas, se reforzó de manera positiva después de cada sesión y según el criterio de avance, utilizando como refuerzo positivo el alimento que integraba su dieta diaria.

Tabla 4. Criterios de avance para el entrenamiento y obtención de semen de los ejemplares *Aquila chrysaetos*.

Conducta	Criterio conductual	Indicador fisiológico	Avance
Desensibilización/ Tolerancia de 3 personas presentes	Ave tranquila sin movimientos	Acomodo de garras en guante	10 %
Tolerancia/ Contacto con presión en región dorsal	Ave sin movimiento	Relajación de alas	20 %
Tolerancia de estímulo 1 / Masaje en zona dorsal (Figura 8)	Permanencia de garras en guante	Relajación de alas	30 %
Tolerancia contacto cloacal / Contacto con presión en región cloacal.	Permanencia de garras en guante	Ligera inclinación frontal	40 %
Tolerancia a estímulo 2 / Masaje en región cloacal	Permanencia de garras en guante	Movimiento de cópula	60 %
Estimulación por Masaje Dorso-ventral	Extensión y relajación de alas	Extensión y relajación de alas con vocalización	80 %
Estímulo o excitación / Contacto en cloaca (Figura 9)	Eversión de cloaca	Eversión repetida de cloaca	90 %
Levantamiento de timón y presión en cloaca (Figura 10)	Extensión y relajación de alas Contracciones en cloaca	Contracciones de cloaca y Vocalización	95 %
Eyaculación.	Eyaculación	Presencia de eyaculado	100 %

8.5. Recolección de muestra

Debido a que las aves ya se encontraban familiarizadas con el procedimiento, cuando se realizó la recolección de las muestras seminales en su época reproductiva (febrero-marzo) presentaron menor estrés, por lo que fue más fácil el manejo.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Del mismo modo que en el condicionamiento, la persona encargada del ave era quien entraba en primer lugar al recinto para percharla, colocarle la caperuza o sujetarla.
2. Se iniciaba el masaje dorso-ventral con la estimulación de la cloaca.
3. Se evertía la cloaca y se hacía una ligera presión en la misma para provocar el eyaculado (Figura 11).
4. Con la ayuda de una micro pipeta graduada se recolectaron las muestras directamente de la cloaca, que posteriormente se colocó en tubos Eppendorf los cuales contenían medio Lake y/o los medios con diferentes viscosidades (Figura 12).
5. Lo obtenido en cada masaje se observaba al microscopio para comprobar la presencia de espermatozoides, así como también, se colocaba una gota en el refractómetro para determinar la densidad que presentaba (Figura 13).
6. Las muestras control y las 3 condiciones con viscosidades modificadas se conservaron en congelación.
7. En total se obtuvieron 5 eyaculados para cada grupo.



Figura 11. Eversión y presión en la cloaca para estimular la eyaculación.



Figura 12. Recolección del eyaculado con ayuda de una micro pípeta graduada

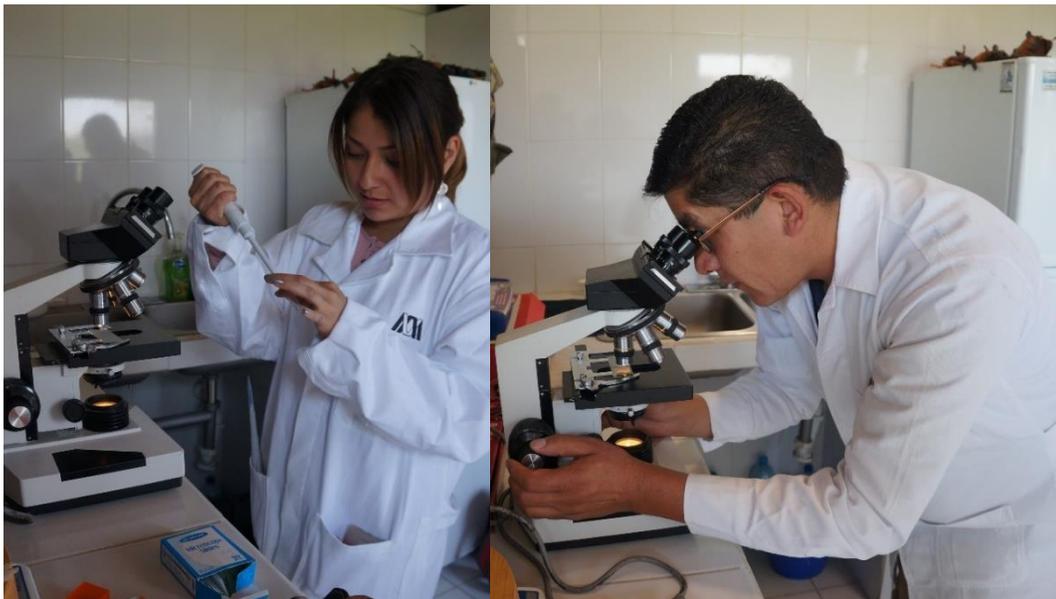


Figura 13. Evaluación de la muestra

8.6. Determinación de densidades

Se determinó en eyaculados obtenidos directo de la cloaca de las aves, para ello, se depositaron 20 μ l del semen sobre el prisma de un refractómetro portátil con un tamaño de 27x40x160 mm, modelo CVQ-4012, su rango de medición va de 0-32% BRIX, precisión 0.2% y una compensación de temperatura de 10°-30°C, que determina la concentración de azúcares presentes en la solución, se observaron y se registraron los niveles indicados de refracción y se estimó el grado de densidad en porcentaje (Calderón, 2015).

8.7. Determinación de la viscosidad

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro Cannon- Manning Semi-Micro (Tamaño 50, Instrumento Cannon, PA). El viscosímetro está formado por dos tubos, uno más grueso que el otro, para determinar la viscosidad se sumergió el tubo delgado en la muestra y se hizo succión con el tubo grueso para que la muestra fluyera a una marca determinada, para posteriormente, girar el instrumento en su posición vertical normal y dejar fluir el líquido por encima de otra marca específica. La muestra tuvo que recorrer el tubo libremente de una marca a la otra para obtener el tiempo de flujo.

Se calculó la viscosidad cinemática de la muestra en mm^2/s (cSt) multiplicando el tiempo de flujo en segundos por la constante del viscosímetro ($C_0 = 0.003812$). Para obtener la viscosidad en micropascales por segundo (mPa/s), se multiplicó la viscosidad cinemática en mm^2/s (cSt) por la densidad en gramos por mililitro.

8.8. Diseño de medios con distinta viscosidad

Con la secreción que se obtuvo de la cloaca de los machos y hembras en etapa reproductiva, se diseñaron las alícuotas con medio Lake, para obtener condiciones de viscosidad inferiores, igual y mayor a la viscosidad que presentaron en promedio las determinaciones en la secreción cloacal. Para la modificación de la viscosidad de los medios de dilución, se ajustaron las alícuotas de medio Lake con la adición de diferentes concentraciones de Ficoll (10, 30 y 45%), incluyendo 6% de DMA para tener tres condiciones de evaluación además del grupo control (Medio Lake), y así completar las condiciones del estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Conformación de las diferentes condiciones de viscosidad del medio de conservación de los espermatozoides de Águila real.

Condición	Medio de conservación de espermatozoides
1	Eyaculado (50 μ l) + DMA (6%)
2	Eyaculado (50 μ l) + DMA (6%) + Ficoll (10%).
3	Eyaculado (50 μ l) + DMA (6%) + Ficoll (30%)
4	Eyaculado (50 μ l) + DMA (6%) + Ficoll (45%)

En cada condición se determinaron parámetros espermáticos básicos (volumen, color, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática), parámetros de capacitación, reacción acrosomal y presencia y distribución de carbohidratos membranales.

8.9. Conservación seminal

Las muestras se conservaron *In vitro* en diluyente Lake que está compuesto por glutamato de sodio monohidratado (19.2 g/L), fructosa (8 g/L), acetato de potasio (5 g/L) y acetato de magnesio (0.8 g/L), suplementado con 10, 30 y 45% de ficoll y se le adicionó 6% de DMA para su posterior congelación. Las muestras se depositaron a 5°C en hielo para comenzar a disminuir la temperatura.

8.10. Criopreservación

Se empleó la técnica de congelación lenta modificada por Herrera & col., (2005), en la cual a alícuotas de 50 μ l de eyaculado se les añadió 10 μ l de crioprotector (DMA 6%) y se homogenizaron. Posteriormente se introdujo el eyaculado en una pajilla de 0.25 ml la cual fue sellada con alcohol polivinílico y se depositó en hielo a 5°C durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo de adaptación al frío, las pajillas se sometieron a vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos y enseguida se sumergieron en nitrógeno líquido a -196°C donde permanecieron hasta su descongelación.

Previo a realizar el proceso de descongelación, en una platina a 38°C se colocaron tubos Eppendorf, portaobjetos y cubreobjetos. Realizada esta actividad, se sacaron

las pajillas del tanque de nitrógeno, para permanecer a temperatura ambiente por 3 segundos. Se introdujo la pajilla en agua a 38°C por 30 segundos para depositar su contenido en uno de los tubos Eppendorf que estaban en la platina a 38°C, para comenzar su evaluación.

8.11. Evaluación espermática básica.

8.11.1. Volumen y concentración

El semen se colectó con una pipeta graduada, con la cual se pudo determinar el volumen del eyaculado. La concentración espermática se determinó con el uso de una cámara de Neubauer (Herrera & col., 2013; Ricart & col., 2015; Umapathy & col., 2005).

8.11.2 Movilidad, viabilidad y morfología

Para determinar la movilidad espermática, se tomaron 10 µl de muestra del eyaculado, se depositaron sobre un portaobjetos precalentado a 38°C, se observó al microscopio óptico a 40X la proporción de espermatozoides que mostraron movimientos rectilíneo y progresivo. Para determinar la viabilidad y morfología espermática se realizaron frotis con la tinción de eosina-nigrosina, para ello, se tomaron alícuotas de 10 µl del semen diluido y se depositaron en una laminilla, a la cual se le agregaron 2 µl de eosina 1% y nigrosina 5%, para homogenizar y hacer un frotis, el cual se dejó secar por al menos 5 minutos, posteriormente, se observó con el microscopio con objetivo 40X. La morfología se evaluó con la misma laminilla con la que se observó la viabilidad espermática con el objetivo a 40X, para determinar anomalías en cabeza, cuello y cola.

8.12. Indicadores de capacitación y reacción acrosomal.

Los parámetros de reacción acrosomal se determinaron con un volumen final de 50 µl (15 µl del eyaculado, 15 µl de medio Lake y 20 µl de CTC [concentración final de 0.009 M]), se incubó durante 30 min a 38°C en oscuridad, cuando transcurrió el tiempo final se determinó si se presentó reacción acrosomal espontánea (Herrera & col., 2017). Debido a que la CTC es un compuesto fluorescente que presenta fluorescencia a la

luz ultravioleta y tienen la capacidad de quelar el calcio, con su uso se identifican espermatozoides con patrones de fluorescencia asociados a capacitación y reacción acrosomal dependientes de la presencia y localización del Ca^{2+} , que al ser expuestas al láser de un microscopio de fluorescencia emiten un color amarillo (Herrera & col., 2017; Ricart & col., 2015). Los patrones de fluorescencia fueron clasificados en tres: Espermatozoides no capacitados, fueron los que presentaron una fluorescencia intensa en todos sus segmentos; Espermatozoides capacitados, fueron los que presentaron fluorescencia intensa brillante en el segmento ecuatorial y con menor intensidad en la cabeza y cola; Espermatozoide con reacción acrosomal espontánea, fueron los que presentaron fluorescencia disminuida en el segmento ecuatorial, menor intensidad en la cola y nula en la región acrosomal (Herrera & col., 2017).

La técnica para evaluar los indicadores morfofisiológicos de espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal ha sido validada por estudios realizado por Camarillo & col., (2019), mediante la co-incubación de espermatozoides de gallo con proteínas de la unión útero-vaginal, así como con MPV, para inducir en alícuotas con espermatozoides condiciones de descapacitación y capacidad de reacción acrosomal, respectivamente. Se distinguieron tres patrones de fluorescencia característica que se observan con la tinción de CTC (Camarillo & col., 2019).

En el presente estudio se determinó la no capacitación, capacitación y reacción acrosomal espontánea en espermatozoides descongelados de águila real. Estos indicadores se determinaron mediante la fluorescencia observada con la tinción de CTC (Figura 14).



Figura 14. Patrones de fluorescencia determinados con la tinción CTC.

8.13. Presencia y distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico.

Para evaluar el efecto del proceso de congelación-descongelación sobre la membrana plasmática de los espermatozoides, y el efecto protector de la viscosidad en los diferentes tratamientos empleados para conservar a los espermatozoides obtenidos por eyaculación, se utilizó una lectina para el reconocimiento de determinados carbohidratos que se encuentren en la membrana plasmática. La lectina utilizada fue la WGA la cual se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico, que son dos de las glicoproteínas de reconocimiento gamético, esta lectina fue conjugada con isotiocinato de fluoresceína (FITC). La evaluación se realizó con un volumen final de 50 μ l (15 μ l del eyaculado, 25 μ l de medio Lake y 10 μ l de la lectina WGA [concentración final de 15 mg/ml]). Se incubó por 20 minutos a 38°C en oscuridad, posteriormente se centrifugaron a 600g por 3 minutos para retirar el sobrenadante y suspender el paquete celular en 15 μ l de etanol frío. Se realizó un control negativo incubando a la lectina con su azúcar antes de ponerlas en contacto con los espermatozoides. De los paquetes marcados se hicieron preparaciones para analizar al menos 100 células por preparación a 1000 aumentos en un microscopio de fluorescencia a 260 nm, y se determinaron los patrones de fluorescencia y la proporción de espermatozoides teñidos y su clasificación.

Con el uso y co-incubación de la lectina FITC-WGA con espermatozoides, se determinaron tres patrones característicos de fluorescencia en los espermatozoides (Figura 15):

- Patrón A: Espermatozoides que presentaron una fluorescencia intensa en todos sus segmentos.
- Patrón B: Espermatozoides que presentaron fluorescencia intensa brillante en el segmento ecuatorial y con menor intensidad en la cabeza y cola.
- Patrón C: Espermatozoides que presentaron fluorescencia disminuida en el segmento ecuatorial, menor intensidad en la cola y nula en la región acrosomal.



Figura 15. Patrones de fluorescencia determinados con la lectina FICT-WGA.

8.14. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ANOVA para los tratamientos. Donde las variables explicativas fueron los tratamientos (diferente proporción de ficoll en el medio de conservación) y las variables de respuesta fueron la movilidad, viabilidad, morfología y en el caso de la distribución de calcio y de carbohidratos membranales fueron los espermatozoides descapitados, capacitados y con reacción acrosomal.

Se realizó la prueba Tukey para la diferencia de medias, todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software estadístico JMP-13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

9. RESULTADOS

Durante las 17 semanas de trabajo del 01 de diciembre de 2018 al 01 de marzo de 2019, se llevaron a cabo 32 sesiones de monitoreo, en las que se realizaron 160 contactos con los ejemplares, con un total de 480 estímulos realizados con el masaje dorso-ventral a los cinco ejemplares.

De los 480 estímulos realizados se obtuvieron 20 eyaculados como resultado final, de los cuales, 12 eyaculados fueron de un solo ejemplar, mismos que representaron el 60% del total de los eyaculados obtenidos, de igual manera se obtuvieron 5 eyaculados de otro ejemplar y 3 más de diferente ejemplar, que representan el 25% y 15% respectivamente del total de eyaculados. Es importante mencionar que de dos ejemplares no se consiguió obtener ningún eyaculado, sin embargo, en uno de ellos se logró un avance conductual del 70% sin llegar a la eyaculación, del segundo ejemplar no se obtuvo más del 40% del comportamiento conductual esperado (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros por ejemplar, para la obtención de eyaculados de *A. chrysaetos*.

N° De Ejemplar	Edad (Años)	Avance conductual (%)	N° de eyaculados obtenidos	Eyaculados obtenidos (%)
1	12	100	12	60
2	8	100	5	25
3	10	100	3	15
4	10	70	0	0
5	4	40	0	0

En los Indicadores de eyaculados recién recolectados, al realizar las evaluaciones en fresco, se determinó un volumen promedio de 12 μ l, con intervalo entre 7 a 18 μ l. La concentración espermática promedio fue de 4×10^3 espermatozoides/ μ l con intervalo entre 3 a 5×10^3 espermatozoides/ μ l. La movilidad espermática promedio fue del 75% con intervalo de 60% a 90%.

9.1 Viscosidad de eyaculados y de medios para la conservación *in vitro*

La viscosidad que se determinó en el semen recién eyaculado fue de 3.2320 mPa/s, la cual fue mayor a la determinada en el medio Lake que fue de 0.4155 mPa/s y a la viscosidad de alícuotas seminales diluidas para su conservación en refrigeración utilizando medio Lake, en las cuales la viscosidad fue de 0.26 mPa/s.

En las alícuotas de medio Lake suplementadas con 6% de DMA y 10% de ficoll se logró un ajuste de la viscosidad de 2.1698 mPa/s, menor al eyaculado fresco recién obtenido en aproximadamente 33%. Cuando el porcentaje de ficoll fue del 30%, la viscosidad fue del 3.5393 mPa/s, similar al eyaculado fresco recién obtenido y cuando el porcentaje de inclusión de ficoll fue de 45%, la viscosidad obtenida fue de 6.1123 mPa/s, mayor al eyaculado fresco recién obtenido, en aproximadamente un 200% (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros de viscosidad de los eyaculados de *A. chrysaetos* y de los medios de conservación seminal (n=5).

Condiciones	°Brix	GE*	mm ² /s**	mPa/s***
Semen	7	1.028	3.1449	3.2320
Líquido oviductal	7	1.028	0.7672	0.7818
Lake	3	1.012	0.4106	0.4155
Semen + Lake	5	1.020	0.2554	0.2605
Semen + Lake + 6% DMA + Ficoll (10%)	17	1.070	2.0279	2.1698
Semen + Lake + 6% DMA + Ficoll (30%)	28	1.120	3.1601	3.5393
Semen + Lake + 6% DMA + Ficoll (45%)	30	1.130	5.4092	6.1123

* Tabla de conversión de °Brix a Gravedad específica (GE) del National Institute of Standards and Technology (NIST)

**Se obtiene multiplicando la viscosidad (S) por la constante de flujo=0.003812

***Se obtiene mediante la multiplicación de la viscosidad por mm²/s por la GE

EVALUACIÓN SEMINAL BÁSICA POST DESCONGELACIÓN.

9.3. Parámetros de evaluación seminal básica post descongelación

Los parámetros de evaluación seminal básica, mostraron resultados con tendencia similar en los porcentajes de viabilidad, sin embargo, la movilidad y morfología se vieron afectadas cuando se compararon los resultados para los diferentes tratamientos empleados es este estudio.

La **Viabilidad espermática**, que se presenta en la tabla 8 ($\bar{x}\pm EE$), muestra que el grupo control mostró un porcentaje de 61%, el cual fue estadísticamente similar ($p>0.2$) a los porcentajes determinados en alícuotas con 10% de ficoll (74%), 30% de ficoll (81%) y de 45% de ficoll (80%). En los cuales se estimó un incremento de entre el 15% al 20% adicional.

Con respecto a la movilidad espermática, los porcentajes determinados también se presentan en la tabla 8 ($\bar{x}\pm EE$). El porcentaje determinado en el grupo control fue de 14%, el cual fue mayor ($p<0.05$) a los porcentajes determinados en alícuotas con 10% de ficoll (0.8 %), 30% de ficoll (0.4%) y de 45% de ficoll (0%). En los cuales se evidencia una disminución de la movilidad cuando se incrementa el porcentaje de inclusión de ficoll.

Tabla 8. Porcentajes de viabilidad y movilidad espermática en diferentes condiciones de viscosidad post descongelación ($\bar{x}\pm EE$).

Medios Indicadores (%)	Control ($\bar{x}\pm EE$)	Ficoll 10% ($\bar{x}\pm EE$)	Ficoll 30% ($\bar{x}\pm EE$)	Ficoll 45% ($\bar{x}\pm EE$)
Viabilidad	61.85 \pm 7.20 ^a	74.54 \pm 7.20 ^a	81.33 \pm 7.20 ^a	80.84 \pm 7.20 ^a
Movilidad	14.6 \pm 3.18 ^a	0.8 \pm 3.18 ^b	0.4 \pm 3.18 ^b	0 \pm 3.18 ^b

Valores en la misma línea, con diferente literal, indica diferencia estadística $p<0.05$ (ANOVA, $n=5$).

Las anomalías morfológicas, que se presentan en la tabla 9 ($\bar{x}\pm EE$), muestran que el grupo control presentó un porcentaje de 67% de anomalías en cabeza, el cual fue estadísticamente similar ($p>0.05$) a los porcentajes determinados en alícuotas con 10% de ficoll (41%), 30% de ficoll (48%) y de 45% de ficoll (42%). En los cuales se estimó un decremento de entre el 20 al 25% adicional, sin encontrar diferencia entre ellos ($p<0.1$).

Con respecto a las anomalías de cuello, que también se presentan en la tabla 9 ($\bar{x}\pm EE$), el porcentaje determinado en el grupo control fue de 32%, el cual fue similar ($p>0.5$) a los porcentajes determinados en alícuotas con 10% de ficoll (19%), 30% de ficoll (36%) y de 45% de ficoll (34%), sin encontrar diferencia estadística ($p=0.5$)

En relación con las anomalías de cola (Tabla 9), se observó que el grupo control presentó un porcentaje de 0%, el cual fue menor ($p<0.05$) a los porcentajes determinados en alícuotas con 10% de ficoll (38%), 30% de ficoll (14%) y de 45% de ficoll (22%). En los cuales se estimó un incremento de entre el 15% al 39%.

Tabla 9. Porcentajes de anomalías espermáticas en diferentes condiciones de viscosidad post descongelación ($\bar{x}\pm EE$).

Anormalidades (%)	Control ($\bar{x}\pm EE$)	Ficoll 10% ($\bar{x}\pm EE$)	Ficoll 30% ($\bar{x}\pm EE$)	Ficoll 45% ($\bar{x}\pm EE$)
Cabeza	67.11 \pm 8.59 ^a	41.81 \pm 8.59 ^a	48.75 \pm 8.59 ^a	42.78 \pm 8.59 ^a
Cuello	32.89 \pm 9.28 ^a	19.83 \pm 9.28 ^a	36.25 \pm 9.28 ^a	34.39 \pm 9.28 ^a
Cola	0 \pm 6.79 ^c	38.36 \pm 6.79 ^a	14.99 \pm 6.79 ^{bc}	22.83 \pm 6.79 ^{ab}
Total	33.33 \pm 8.22	33.33 \pm 8.22	33.33 \pm 8.22	33.33 \pm 8.22

Valores en la misma línea, con diferente literal, indica diferencia estadística (Cabeza $p=0.17$ / Cuello $p=0.59$ / Cola $P>0.008$) ANOVA, $n=5$.

DETERMINACIÓN CON CTC POST DESCONGELACIÓN

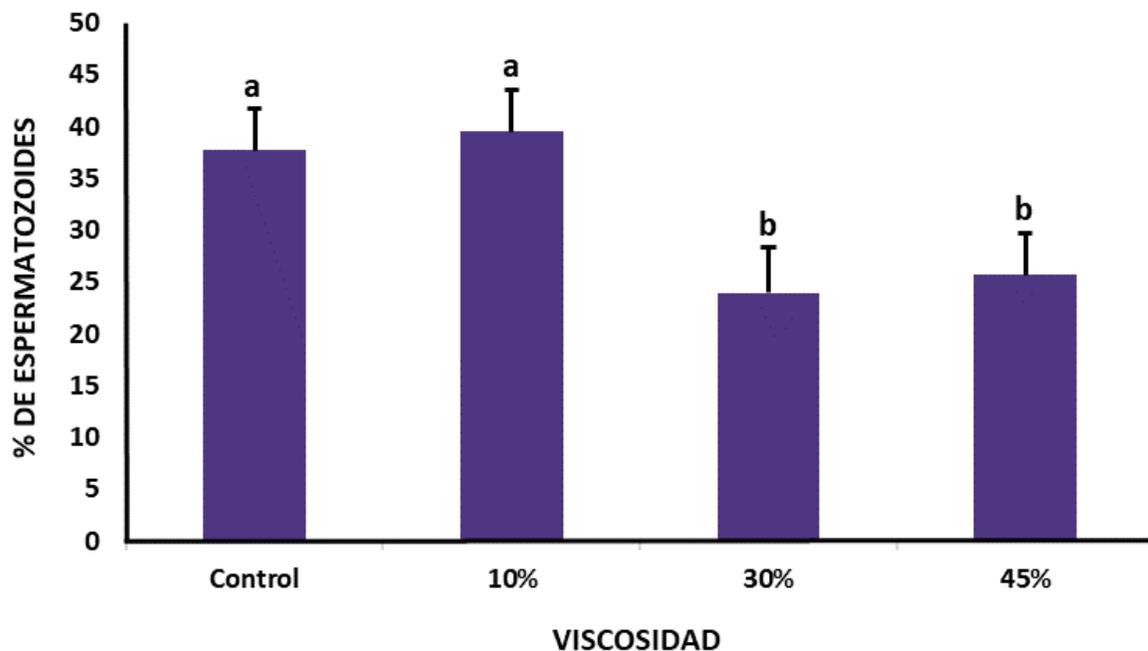
Espermatozoides no capacitados, capacitados
y con reacción acrosomal espontánea.

9.4. Espermatozoides con diferente condición fisiológica.

9.4.1 Espermatozoides no capacitados

El porcentaje de espermatozoides no capacitados, que se presenta en la gráfica 1 ($\bar{x} \pm EE$), muestra que el grupo control presentó un porcentaje de 37%, el cual fue similar ($p > 0.05$) al porcentaje determinado en el grupo con 10% de ficoll (39%), pero mayor ($p < 0.05$) a los porcentajes determinados en los grupos con 30% de ficoll (23%) y de 45% de ficoll (25%). En los cuales se estimó un decremento de entre el 10% al 15% adicional cuando se incrementa el porcentaje de viscosidad.

Gráfica 1. Porcentajes de espermatozoides **no capacitados** en diferentes concentraciones de ficoll post descongelación determinados con CTC ($\bar{x} \pm EE$).

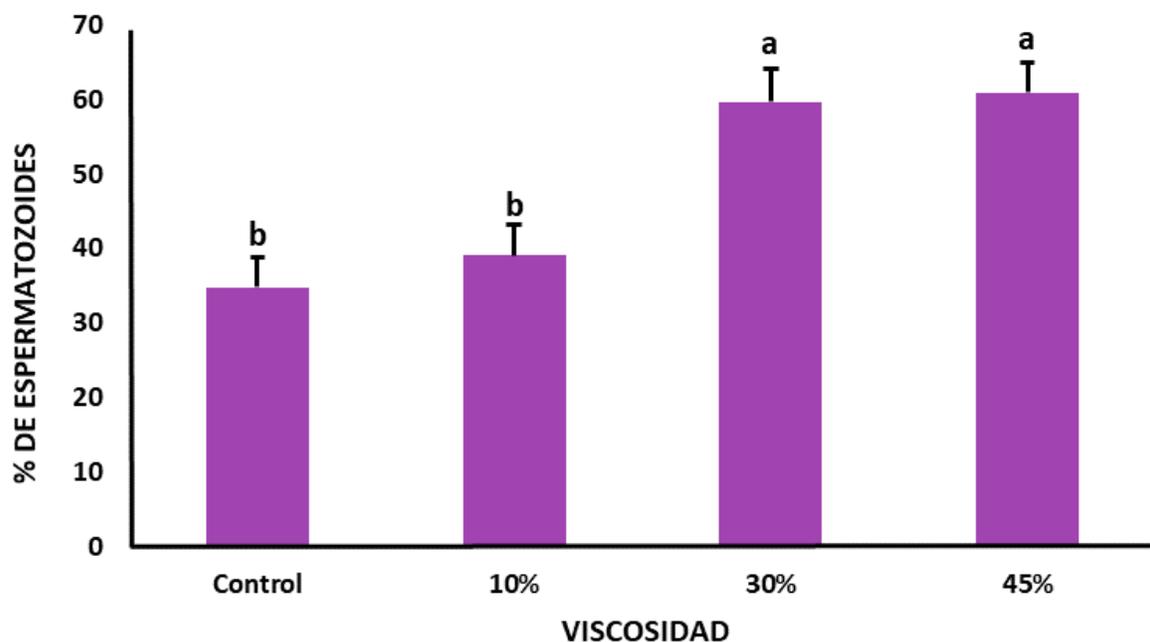


Valores entre columnas con diferente literal, indica diferencia estadística $p > 0.03$ (ANOVA, $n=5$)

9.4.2 Espermatozoides capacitados.

El porcentaje de espermatozoides capacitados, que se presenta en la gráfica 2 ($\bar{x} \pm EE$), muestra que el grupo control presentó un porcentaje de 34%, el cual fue similar ($p > 0.05$) al porcentaje determinado en el grupo con 10% de ficoll (39%). De manera similar a lo observado en los datos de espermatozoides no capacitados, el grupo control tuvo menor ($p < 0.05$) porcentaje de espermatozoides capacitados que los grupos con 30% de ficoll (59%) y de 45% de ficoll (60%). En los cuales se estimó un incremento del 25% adicional cuando aumenta el porcentaje de viscosidad.

Gráfica 2. Porcentajes de espermatozoides **capacitados** en diferentes concentraciones de ficoll post descongelación determinados con CTC ($\bar{x} \pm EE$).

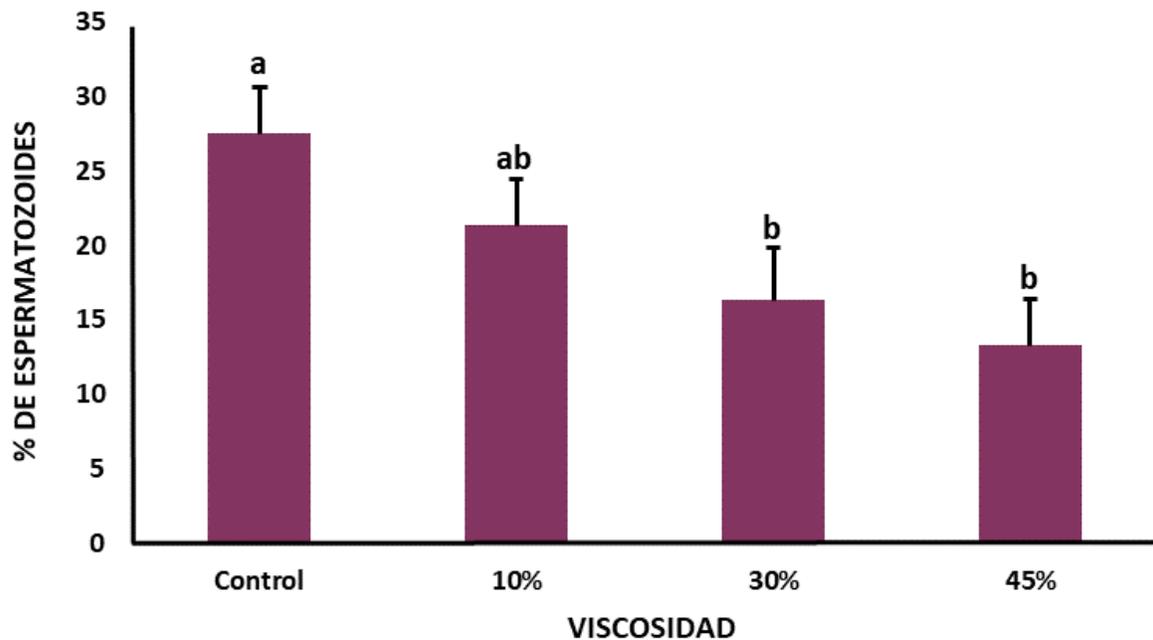


Valores entre columnas, con diferente literal, indica diferencia estadística $p > 0.0005$ (ANOVA, $n=5$)

9.4.3 Espermatozoides con reacción acrosomal espontánea.

El porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal espontánea, que se presenta en la gráfica 3 ($\bar{x} \pm EE$), muestra que el grupo control y el grupo con 10% de ficoll presentaron los porcentajes más altos ($P < 0.05$) de reacción acrosoma (27 y 21 respectivamente) en comparación con los porcentajes determinados en los grupos con 30% de ficoll (16%) y de 45% de ficoll (13%).

Gráfica 3. Porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal espontánea en diferentes concentraciones de ficoll post descongelación determinados con CTC ($\bar{x} \pm EE$).

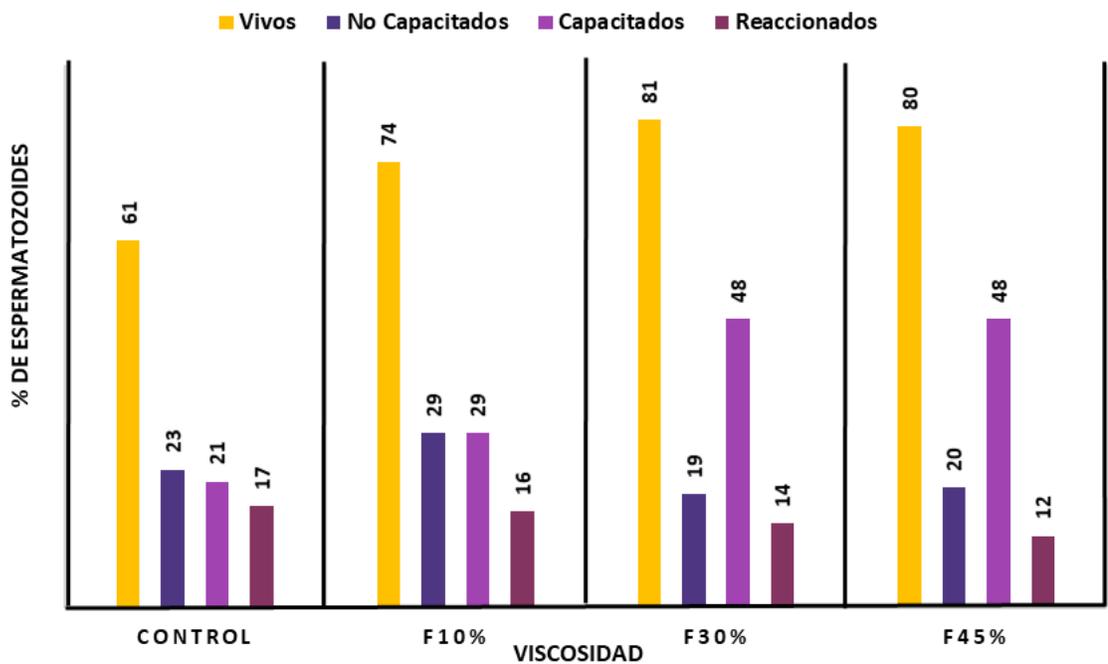


Valores entre columnas, con diferente literal, indica diferencia estadística $p > 0.02$ (ANOVA, $n=5$)

9.5. Espermatozoides vivos vs. Parámetros determinados con CTC

Como se puede observar en la gráfica 4, el aumento de la viscosidad de los medios de conservación, incrementa el porcentaje de espermatozoides vivos, sin embargo, en los medios de mayor viscosidad (30% y 45%) aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides capacitados. De acuerdo a la relación entre el porcentaje de espermatozoides vivos con el porcentaje de espermatozoides con diferente condición fisiológica, el medio con inclusión de ficoll al 10% demostró ser el medio más eficiente para la conservación de espermatozoides de águila real, al aumentar el porcentaje de espermatozoides vivos y espermatozoides no capacitados, aunado a la disminución del porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal espontánea, en comparación al grupo control, sin aumentar de manera significativa el porcentaje de espermatozoides capacitados, a diferencia de lo determinado en los grupos con mayor viscosidad.

Gráfica 4. Porcentajes de espermatozoides vivos vs. Espermatozoides con diferente condición fisiológica en diferentes concentraciones de ficoll post descongelación.



Determinación con FICT-WGA POST DESCONGELACIÓN

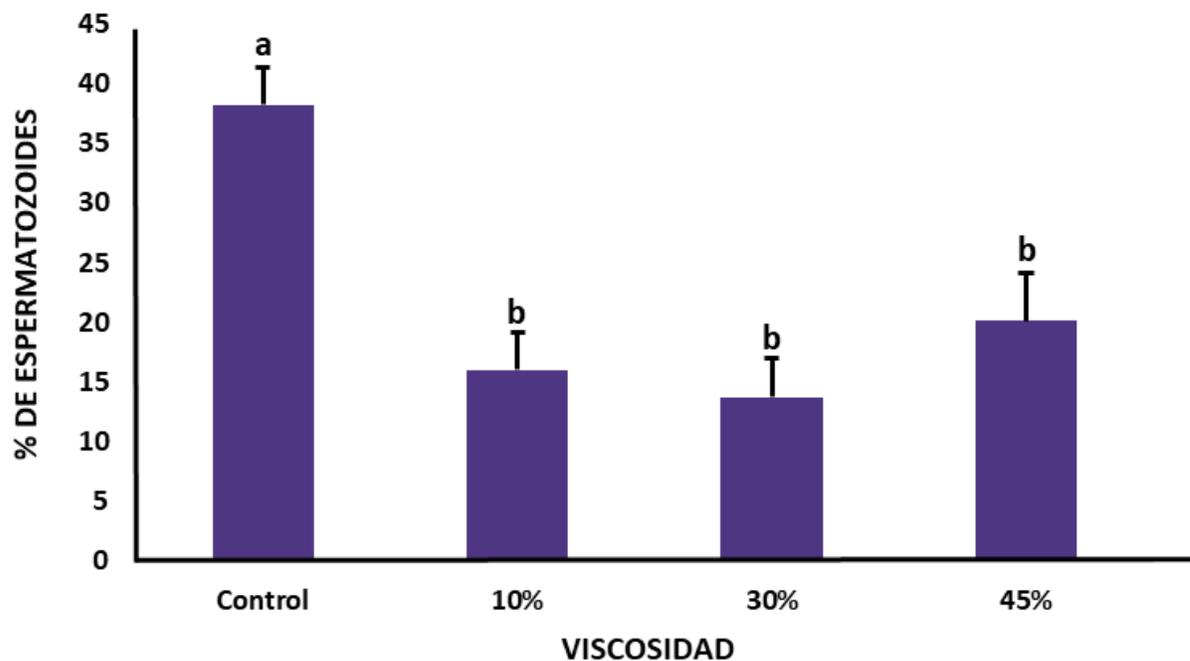
Patrón A, patrón B y patrón C.

9.6. Espermatozoides con diferentes patrones de fluorescencia de acuerdo a la distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico.

9.6.1 Espermatozoides con patrón A.

El porcentaje de espermatozoides que presentaron el patrón A, que se presenta en la gráfica 5 ($\bar{x} \pm EE$), muestra que el grupo control presentó un porcentaje de 38%, el cual fue mayor ($p < 0.05$) a los porcentajes determinados en los grupos con 10% de ficoll (16%), 30% de ficoll (13%) y de 45% de ficoll (20%). En los cuales se estimó un decremento de entre 20% a 25% adicional, cuando incrementa el porcentaje de inclusión de ficoll. Entre los grupos con viscosidad modificada no se determinó diferencia significativa ($p > 0.05$).

Gráfica 5. Porcentajes de espermatozoides con **patrón A** en diferentes concentraciones de ficoll post descongelación determinados con lectina WGA ($\bar{x} \pm EE$).

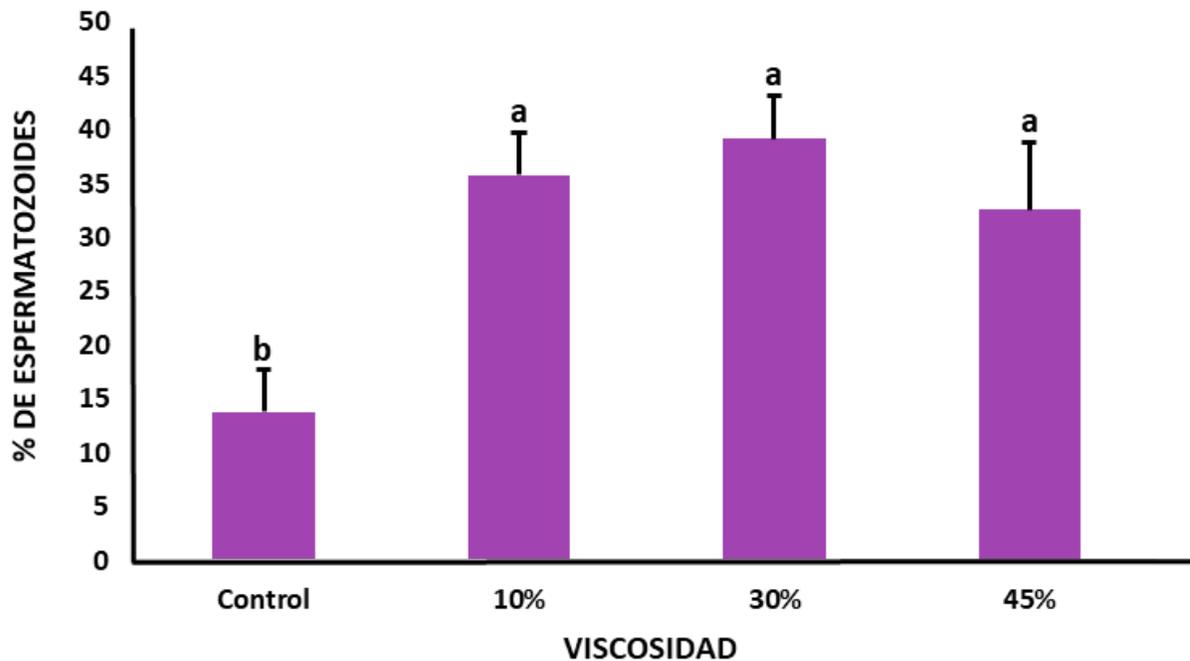


Valores entre columnas, con diferente literal, indica diferencia estadística $p > 0.0003$ (ANOVA, $n=5$)

9.6.2 Espermatozoides con patrón B.

El porcentaje de espermatozoides que presentaron el patrón B, que se presenta en la gráfica 6 ($\bar{x} \pm EE$), muestra que el grupo control presentó un porcentaje de 13%, el cual fue menor ($P < 0.05$) a los porcentajes determinados en los grupos con 10% de ficoll (35%), 30% de ficoll (39%) y de 45% de ficoll (32%). En los cuales se estimó un incremento de entre 20% a 25% adicional, cuando incrementa el porcentaje de inclusión de ficoll. Así mismo entre los grupos con viscosidad modificada no se determinó diferencia significativa ($p > 0.05$).

Gráfica 6. Porcentajes de espermatozoides con **patrón B** en diferentes concentraciones de ficoll post descongelación determinados con lectina WGA ($\bar{x} \pm EE$).

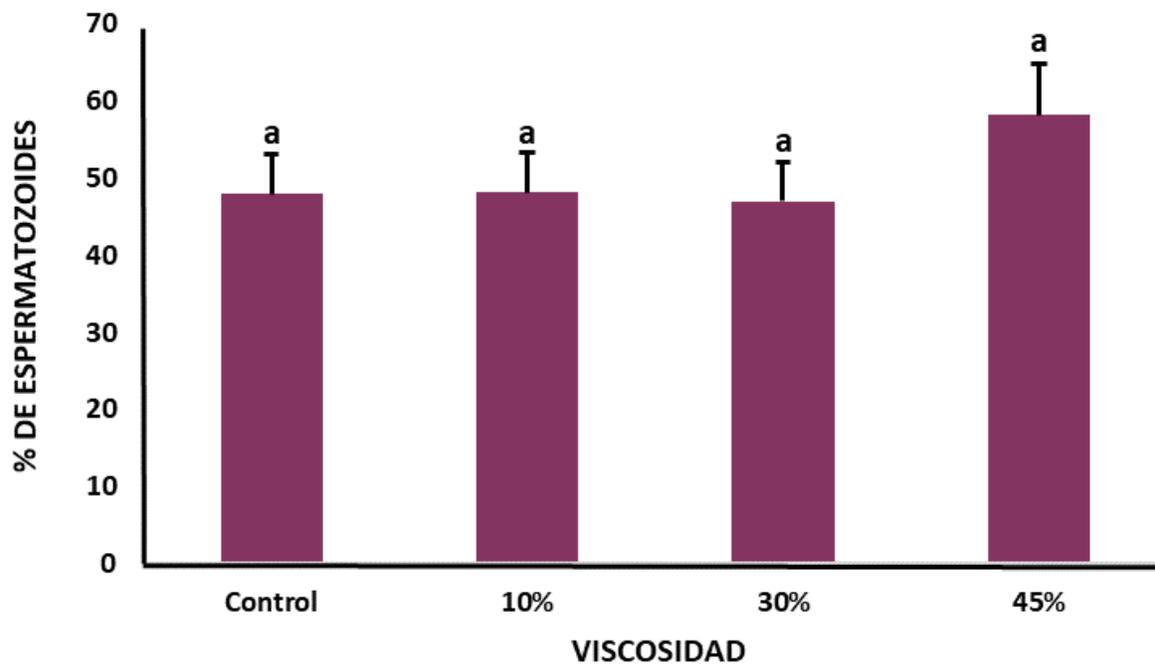


Valores entre columnas, con diferente literal, indica diferencia estadística ($P > 0.002$, ANOVA $n=5$)

9.6.3 Espermatozoides con patrón C.

El porcentaje de espermatozoides que presentaron el patrón C, que se presenta en la gráfica 7 ($\bar{x}\pm EE$), muestra que el grupo control presentó un porcentaje de 47%, el cual fue similar ($p>0.05$) a los porcentajes determinados en los grupos con 10% de ficoll (48%), 30% de ficoll (47%) y de 45% de ficoll (58%).

Gráfica 7. Porcentajes de espermatozoides con **patrón C** en diferentes concentraciones de ficoll post descongelación determinados con lectina WGA ($\bar{x}\pm EE$).



Valores entre columnas, con diferente literal, indica diferencia estadística ($p>0.5$, ANOVA, $n=5$)

10. DISCUSIÓN

En las últimas 4 décadas, se han logrado avances en la gestión de poblaciones *ex situ* de diversas especies de aves, sin embargo, independiente a los excelentes resultados obtenidos con los halcones como el peregrino y buitres como el cóndor de California la reproducción en cautiverio sigue siendo poco exitosa, especialmente para las especies amenazadas o en peligro de extinción como el águila real (Blanco & col., 2002; Dogliero & col., 2016). Se considera que las dificultades del cautiverio para la reproducción de las especies, se debe en gran parte a las necesidades particulares de cada especie de acuerdo a su biología, así como a una probable susceptibilidad al estrés por cautiverio debido al manejo que ocasiona asincronías e incompatibilidad entre macho y hembra (Blanco & col., 2002; Dogliero & col., 2016). Es por lo anterior, que las TRAA comenzaron a incorporarse en los programas de conservación, no obstante, se han encontrado resultados variables y poco favorables en algunas especies de aves, entre las que destaca el águila real. Aunado a esto, se observó que el mal manejo del ejemplar para la recolección de muestras biológicas, ocasionaba una deficiencia en la calidad seminal (Herrera & col., 2017). Lo que hace evidente que el conocimiento de las características seminales de las especies, aunado a la mejora de los métodos para la obtención y recolección seminal, son cruciales para desarrollar programas de conservación con un mejor porcentaje de éxito (Dogliero & col., 2016; Villaverde-Morcillo & col., 2015).

Se ha estudiado poco sobre la importancia del condicionamiento en la recolección seminal de las aves silvestres, así como la importancia de las características físicas y químicas de la secreción cloacal y el plasma seminal, por lo que no se ha detallado que características naturales son necesarias en el medio de conservación seminal para mejorar el porcentaje de viabilidad espermática y capacidad fertilizante de los espermatozoides durante su almacenamiento. Por lo que en el presente estudio se pretendió evidenciar el efecto del condicionamiento en la obtención seminal del águila real, así como el efecto de la viscosidad del medio de conservación seminal durante la conservación *in vitro* de espermatozoides de águila real y los cambios fisiológicos que presentan durante su almacenamiento, en cuanto a movilidad, viabilidad, morfología,

capacitación y reacción acrosomal, estos dos últimos mediante el flujo de calcio, así como de la presencia y distribución de ciertos carbohidratos membranales.

10.1 Condicionamiento y recolección de muestras

El condicionamiento operante (CO) con refuerzo positivo, reduce de manera significativa conductas que pueden presentar riesgos tanto para el animal como para el personal (Miniera & col. 2011). De acuerdo a Starling (2013), la eficacia del CO está vinculada a la capacidad de aprendizaje de cada ejemplar, la habilidad del entrenador al aplicar el entrenamiento y la interacción rutinaria con el ejemplar. En el presente estudio se alcanzaron las conductas deseadas en los ejemplares para el estímulo con el masaje dorso-ventral y la posterior obtención seminal sin incidentes con el personal o los animales. Con estos resultados se evidencia que el entrenamiento correcto y eficiente, no expone en ningún momento la integridad de los ejemplares o entrenadores y permite la obtención de semen, como lo señalan Herrera & col. (2013). Sin embargo, es importante indicar que existen factores conductuales propios de cada ejemplar que se reflejan en la cantidad de eyaculados que se obtienen (Herrera & col., 2005).

En las aves, la recolección de semen es un método complejo debido al alto porcentaje de uratos y/o heces que presentan los eyaculados, sin embargo, la técnica de masaje dorso-ventral ha mejorado el porcentaje de éxito en la obtención seminal, siendo la técnica más utilizada en la actualidad (Herrera & col. 2013). Blanco & col., (2000) reportaron dificultades en la obtención de semen debido a la presencia de contaminantes (orina/heces) en los eyaculados de las aves, las cuales estimularon con la técnica de masaje dorso-ventral. Sin embargo, Villaverde & col., (2016), no detectaron contaminantes en los eyaculados, utilizando a un ejemplar entrenado durante dos años para la colecta de semen por cópula voluntaria. Del mismo modo, en el presente trabajo se observaron eyaculados contaminados con materia fecal u orina al inicio del trabajo, sin embargo, esta dificultad disminuyó durante el periodo de entrenamiento de los ejemplares. Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se evidencia que el masaje dorso-ventral y el entrenamiento de los ejemplares para la obtención seminal, logran la recolección seminal sin técnicas invasivas que estresen a

los ejemplares, evitando comprometer la calidad del eyaculado. No obstante, también se hace evidente que un ejemplar puede ser un excelente donador y del cual se puede obtener un gran número de eyaculados, de tal manera que pueden considerarse para un programa de reproducción asistida, pero existen otros ejemplares que pueden tener una capacidad limitada en donar su material genético e incluso encontrar individuos de los que no se obtenga ningún eyaculado.

10.2 Parámetros seminales en fresco

En el presente estudio se determinó volumen, concentración y movilidad espermática en fresco. Se observó un volumen seminal promedio de 12 μl , mostrando diferencia con lo reportado por Villaverde & col., (2016), en el cual reportan un volumen promedio para el águila real de 31.8 μl . La diferencia de 19.8 puntos porcentuales puede entenderse por la variabilidad en el volumen que presentó el ejemplar con el que trabajaron (1-115 μl), el cual fue entrenado durante dos años para permitir la obtención seminal, a diferencia de la cantidad de ejemplares que se usaran en este trabajo, así como el tiempo que se estuvo trabajando con ellos. Se hace evidente que la variabilidad en el volumen de los eyaculados depende de cada ejemplar (Kim & Yang, 2001) y de la tolerancia que tengan al manejo.

Con respecto a la concentración espermática, Villaverde & col., (2016), reportan una concentración promedio para el águila real de 467.7×10^6 espermatozoides/ml, encontrando eyaculados azoospermicos al inicio y al final de la temporada reproductiva. En el presente estudio, la concentración espermática promedio determinada fue de 4×10^3 espermatozoides/ μl . Estas diferencias se pueden explicar por el efecto individual de la especie en diferentes regiones geográficas (Kim & Yang, 2001). Sin embargo, Herrera & col., (2005), reportaron un rango de concentraciones para el halcón cola roja de $5-50 \times 10^3$ espermatozoides/eyaculado. Tomando en cuenta el tamaño, lo reportado para el águila real es una concentración muy baja en comparación al halcón, no obstante, se debe considerar, que el águila real es una especie monógama con una estacionalidad reproductiva marcada (Eccardi, 2008). Lo anterior puede explicar la baja concentración espermática; por ser una especie monógama no se requiera competencia espermática.

En cuanto a la movilidad espermática, Villaverde & col., (2016), reportaron que en eyaculados recién obtenidos, el porcentaje promedio de movilidad fue de 46.7%, en contraste con lo reportado en este trabajo, en el cual se determinó una movilidad espermática promedio de 75% en eyaculados recién obtenidos, similar a lo reportado por Herrera & col., (2005), en el cual reportan una movilidad promedio para los espermatozoides de halcón cola roja de 67% utilizando la técnica de masaje dorso-ventral para la obtención seminal. La diferencia entre los reportes de movilidad espermática de águila real, de aproximadamente 30% puede explicarse por el utilizado. Esto sugiere que la calidad del semen obtenido por masaje dorso-ventral puede ser mayor a la obtenida por copula cooperativa.

10.3 Efecto de la viscosidad en eyaculados

La viscosidad seminal es diferente en cada una de las especies, ya que es una característica específica que permiten al espermatozoide sobrevivir. Específicamente se ha estudiado esta característica en los camélidos, los cuales presentan una viscosidad seminal alta que permite a los espermatozoides sobrevivir en el aparato reproductor de la hembra para la posterior fertilización (Casaretto & col., 2012). Debido a que otros mamíferos no tienen un plasma seminal tan viscoso, se han realizado estudios para evaluar el impacto de esta característica en otras especies. Hirai & col. (1997), modificaron la viscosidad del medio de conservación para el semen de toro, encontrando que una mayor viscosidad disminuye la movilidad de los espermatozoides, asociándolo a un aumento en la viabilidad espermática.

Particularmente, en las aves no se ha estudiado la importancia de la viscosidad del semen, pero se han realizado estudios en gallo y pavo, en los cuales se ha determinado que el plasma seminal presenta hasta 822 y 607 proteínas respectivamente (Baskt & Bauchan., 2016). Estas proteínas, además de tener un papel importante en la conservación de los espermatozoides en el aparato reproductor de la hembra, como lo reportaron Vargas, (2018) y Camarillo & col., (2019), pueden ser las responsables de la viscosidad seminal. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la viscosidad del semen de águila real es de 3.2320 mPas/s, mientras que el medio Lake presentó una viscosidad de 0.4155 mPas/s, que es 90%

inferior a la viscosidad natural del semen. Posteriormente se determinó la viscosidad de las alícuotas seminales diluidas con medio Lake, estableciendo una viscosidad de 0.2605 mPas/s, la cual representa aproximadamente el 8% de la viscosidad natural del semen. Debido a que no se han realizado estudios que evalúen la viscosidad de los eyaculados de las aves o de los medios de conservación, los resultados determinados en el presente estudio evidencian que el medio de conservación disminuye la viscosidad natural del semen, lo cual puede afectar la viabilidad espermática durante su conservación.

10.4 Parámetros seminales básicos post descongelación.

Los espermatozoides de aves rapaces son morfológicamente similares a los de las aves domésticas, sin embargo, las características específicas de su membrana plasmática son distintas, lo cual puede reflejarse en la diferente capacidad de responder al mismo protocolo de criopreservación (Blanco & Höfle, 2003; Herrera & col., 2005).

Herrera & col., (2005), reportan una viabilidad promedio de 82% utilizando DMSO y 83% con PVP en espermatozoides de halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*) post descongelados. Cruz, (2016), reporta una viabilidad promedio de 58% con DMSO y 75% con glicerol en espermatozoides de halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*). Mientras, Villaverde & col., (2016), reportan que no hay diferencias significativas en el efecto de glicerol o DMA como crioprotectores al usarlos en la criopreservación de espermatozoides de águila real, reportando valores de viabilidad espermática de 44% con glicerol y 42% con DMA con una disminución en la movilidad del 70%. En el presente estudio se determinaron porcentajes mayores de viabilidad espermática (75%) con el uso de DMA como crioprotector en la conservación de espermatozoides de águila real que los reportados por otros autores. La diferencia de aproximadamente los 30 puntos porcentuales de incremento en la viabilidad espermática obtenida en este trabajo, se puede explicar por la modificación de la viscosidad que se realizó a los medios de conservación seminal. Determinando que los mayores porcentajes de viabilidad espermática se encontraron en los grupos con mayor inclusión de ficoll (30% y 45%).

En cuanto a la movilidad espermática, se determinó una reducción de aproximadamente 95% en las muestras descongeladas. Esta disminución se hizo evidente en los grupos con viscosidades modificadas en los cuales se observó que la viscosidad disminuía en mayor porcentaje conforme la inclusión de ficoll aumentaba, observando movilidad espermática nula en el grupo con 45% de ficoll. Se ha determinado que los espermatozoides de las aves, pueden almacenarse en el aparato reproductor de la hembra gracias a la presencia de túbulos de almacenamiento espermático, los cuales cuentan con secreciones de la unión útero-vaginal que permiten la inactivación del espermatozoide (Sasanami, 2013). Dentro de los túbulos de almacenamiento, los espermatozoides son típicamente inmóviles, por lo que se cree que son metabólicamente inactivos, es decir, que se encuentran inactivos debido al bajo consumo de ATP, que a su vez conduce a una producción reducida de especies reactivas de oxígeno favoreciendo la supervivencia espermática (Bakst, 2015). Existen varios factores que pueden generar cambios de activación espermática, entre los que se encuentra el cambio de osmolaridad (Blanco & col., 2011). El aumento de la viscosidad en los medios de conservación seminal con inclusión de ficoll, provocó un cambio en la osmolaridad del medio que se reflejó en un movimiento flagelar limitado. Debido a la aparente inactivación de los espermatozoides en los medios de conservación con viscosidad modificada, se explica el aumento en el porcentaje de viabilidad espermática por un menor desgaste metabólico durante su almacenamiento, donde el ficoll tuvo un papel importante al ser un agente reductor de estrés mecánico como lo reportaron Kuleshova & col., (2001).

Así mismo Kulikova & col., (2014) evaluaron el efecto de la viscosidad con ficoll 70 en la criopreservación de espermatozoides de conejo, determinando una disminución de aproximadamente 35% en el grupo con ficoll, sin embargo, cuando se incubaron a 37°C, por 30 minutos se observó un aumento de la movilidad de aproximadamente el 10%, demostrando que los espermatozoides se encontraban inmóviles, pero no muertos, activándose en las condiciones adecuadas. Es importante señalar que aun cuando en el presente experimento se determinó una disminución importante de movilidad de los espermatozoides con el uso de ficoll, también se determinó un porcentaje importante en la viabilidad espermática. Por lo tanto, se abre la posibilidad

del uso de medios con viscosidades altas para la criopreservación de semen en las TRAA. De acuerdo con Herrera & col., (2005), con semen descongelado, con una reducción importante de la movilidad espermática es posible lograr resultados de fertilidad comparables a los obtenidos con semen fresco. Una causa para que la fertilidad sea buena, aún con movilidad disminuida, probablemente sea por la activación de los espermatozoides una vez se encuentren en el interior del aparato reproductor de la hembra. De acuerdo a lo reportado en otros trabajos (Arenas & col., 2010), se ha visto que cuando los espermatozoides están en contacto con Ca^{2+} extracelular, ocurren cambios en la actividad mitocondrial, lo cual se relaciona con un aumento en la movilidad del espermatozoide para su transporte.

Con respecto a las anormalidades, Villaverde & col., (2016), reportan un promedio de 42% de anormalidades post descongelación en águila real, diferente a lo determinado en el presente estudio en el cual se observó 33% de anormalidades. Esta diferencia de aproximadamente 9 puntos porcentuales se puede explicar por la cantidad de estímulos realizados a los ejemplares y el volumen que se obtuvo de los eyaculados. Villaverde & col., (2016) estimularon y obtuvieron eyaculado una vez a la semana, con mayor volumen y mayor porcentaje de anormalidades, a diferencia de lo realizado en el presente estudio, en el cual se estimuló y se obtuvo eyaculados dos veces a la semana, con menor volumen, pero menor porcentaje de anormalidades. Al realizar el análisis de las anormalidades por segmentos se determinó un incremento en anormalidades de cola en los grupos con viscosidades modificadas, estimando un incremento de entre el 15% al 39%. Esto se puede explicar por la evidente criocapacitación que adquirieron los espermatozoides en los grupos adicionados con ficoll, que de acuerdo a Lemoine, (2009), el proceso de capacitación espermática es caracterizado por la hiper-activación, que ocasiona movimiento flagelar acelerado.

10.5 Espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal.

Para que la fertilización se efectúe, es necesario que se lleve a cabo la reacción acrosomal, la cual en aves sucede cuando el espermatozoide se pone en contacto con la MPV del huevo (Nishio & Matsuda, 2017). La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis enzimática del espermatozoide para hidrolizar la MPV (Lemoine, 2008). Este proceso está mediado por el flujo del calcio al interior del espermatozoide, el cual puede ser detectado *in vitro* a través de un componente fluorescente como la CTC que determina la actividad del calcio iónico en los espermatozoides.

En este estudio se determinaron los parámetros de espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal de acuerdo a la presencia y distribución de calcio. Conforme a los resultados obtenidos en el presente estudio se determinó que el porcentaje de espermatozoides no capacitados va disminuyendo cuando la viscosidad del medio aumenta.

En el parámetro de espermatozoides capacitados se determinó que este patrón aumentaba a medida que la viscosidad del medio incrementa. Sin embargo, en el parámetro de espermatozoides con reacción acrosomal espontánea se determinó que este patrón disminuía a medida que la viscosidad del medio aumentaba. De manera similar a lo reportado por Kulikova & col., (2014), al determinar el mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto en el grupo con ficoll 70. En el trabajo mencionado anteriormente, se concluyó que la adición de ficoll puede mejorar varias características de los espermatozoides de conejo después de la congelación. De acuerdo al estudio realizado por Lemoine, (2011), el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal se relaciona positivamente con los parámetros de la calidad del espermatozoide, que la criopreservación altera al provocar disminución de la fluidez membranal, cambios en la relación colesterol/fosfolípidos y los perfiles de fosfolípidos, así como modificaciones en la composición de ácidos grasos y actividad metabólica del espermatozoide de gallo. Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se evidencia que una mayor viscosidad en el medio de conservación seminal, ayuda al mantenimiento de la integridad membranal, lo cual podría favorecer la

viabilidad espermática y reduce de manera importante el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal espontánea.

10.5 Espermatozoides con patrones de fluorescencia determinados con WGA-FITC.

Los espermatozoides presentan una zona llamada glicocáliz, que es un conjunto de carbohidratos presentes en la membrana plasmática, la cual tienen como función principal mediar eventos de reconocimiento gamético (Peláez & Long, 2006). El estudio de la distribución de este glicocáliz, permite una evaluación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Los carbohidratos membranales pueden ser detectados *in vitro* con el uso de lectinas, como la WGA que tiene afinidad a los residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico, permitiendo su visualización por su conjugación con un isotiocinato de Fluorescencia (FICT).

En el presente estudio se determinaron los patrones de fluorescencia A, B y C en los espermatozoides de acuerdo a la presencia y distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico. El patrón A, es donde se presenta una fluorescencia en todo el espermatozoide y, por tanto, una distribución homogénea de los carbohidratos N-acetilglucosamina y ácido siálico, este patrón indica que la membrana del espermatozoide esta integra estructuralmente, cualquier cambio en la presencia y distribución de estos carbohidratos es representada por los patrones B y C, que indican una alteración en la membrana. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se determinó que el porcentaje de espermatozoides que presentaron el patrón A disminuyó cuando la viscosidad del medio de conservación aumentó. Se determinó una evidente disminución del patrón en aproximadamente 22 puntos porcentuales en todos los grupos adicionados con ficoll en diferente porcentaje en comparación con el grupo control.

En contraste, el porcentaje de espermatozoides con patrón B aumentó con forme la viscosidad del medio incrementaba. No obstante, el porcentaje de espermatozoides con patrón C se mantuvo en el mismo rango en los diferentes grupos, mostrando en promedio el 50% de espermatozoides con este patrón, independiente de la inclusión de ficoll. Los resultados del presente estudio demuestran la modificación de la proporción de los carbohidratos N-acetilglucosamina y ácido siálico en la membrana

de los espermatozoides post descongelados. Esto sugiere que, a pesar del uso de un crioprotector y de la adición de ficoll para la modificación de la viscosidad del medio de conservación seminal, la presencia y distribución de los carbohidratos N-acetilglucosamina y ácido siálico en la superficie espermática puede alterarse, independientemente del porcentaje de ficoll que presentó el medio. De acuerdo a lo reportado por Peláez y Long, (2008), la alteración o pérdida de los carbohidratos membranales durante el almacenamiento espermático, puede afectar la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Herrera & col., (2005), a pesar de comprobar la alteración de los residuos de manosa en la membrana plasmática de los espermatozoides de gallo y faisán post descongelados, se logró la inseminación de las hembras de estas especies con la obtención de huevos fértiles.

Se hace evidente que el almacenamiento de semen, puede tener efectos nocivos sobre las características de los espermatozoides, incluida la integridad de la membrana plasmática que es determinante para la fertilización. Es conocido que, durante el proceso de capacitación espermática, existen modificaciones lipoprotéicas membranales que permiten la exteriorización de receptores, además activan canales iónicos necesarios para procesos bioquímicos como síntesis de AMPc, fosforilación-desfosforilación de proteínas y flujo de calcio extra e intracelular (Arenas & col., 2010). La evaluación de estos mecanismos es importante para determinar el estado metabólico en el que se encuentran los espermatozoides.

11. CONCLUSIONES

La hipótesis propuesta en el presente trabajo se rechaza, al determinar que el medio de conservación más eficiente para la criopreservación seminal de águila real no fue el medio con viscosidad similar al semen, sin embargo, el medio con inclusión al 10% de ficoll demostró ser el medio más eficiente, siendo este similar a la viscosidad del líquido oviductal.

En el presente trabajo se demuestra que una mayor viscosidad en los medios de conservación, disminuye la movilidad y mantiene porcentajes de espermatozoides vivos después de la descongelación.

También se demuestra que el incremento de la viscosidad en el medio de criopreservación resulta eficiente para mantener la viabilidad espermática y lograr obtener menor porcentaje de espermatozoides con reacción acrosoma espontánea post descongelación.

La presencia y distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico, son alterados por el efecto de la viscosidad en el medio, logrando mantener los porcentajes de espermatozoides con estados fisiológico similares. Esta alteración puede interferir negativamente en el proceso de fertilización.

De manera evidente, se demuestra que la viscosidad en el medio de criopreservación influye de distinta manera en el metabolismo y estructura membranal de los espermatozoides, contribuyendo a incrementar la viabilidad espermática post descongelación.

12. LITERATURA CITADA

- Ahammad, M., Miyazato, T., Nishino, C., Tatemoto, H., Okura, N., Okamoto, S., Kawamoto, Y. & Nakada, T. (2013). Effects of fluid secreted from the uterus on duration of fertile egg production in hens, and survivability and penetrability of fowl sperm *in vitro*. *The Journal of Poultry Science*, 50: 74-82. DOI <https://doi.org/10.2141/jpsa.0120045>
- Álvarez, C. (2016). Separación por gradientes de densidad (ficoll-hypaque). En *Biología celular y molecular*. Accedido el día 23 de marzo, 2019 desde <https://docplayer.es/user/20395841/>
- Arenas, E., Cambrón, A. & Ambriz, E. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. ContactoS*, 78, 5-11.
- Asano, A. & Tajima, A. (2017). Development and Preservation of Avian Sperm in T. Sasanami (ed.), *Avian Reproduction. Advances in Experimental Medicine and Biology* vol 1001. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 214: 59-73. DOI https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_4
- Bakst, M. R. (1980). Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *Reproduction*, 60(1), 121-127. DOI <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600121>
- Bakst, M., Wishart, G., & Brillard, J. P. (1994). Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poultry Science Reviews*, 5(3), 117-143.
- Bakst, M. (2015). Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology*, 83(9): 1438-1444. DOI <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.016>
- Bakst, M. & Bauchan, G. (2016). Lectin staining of the uterovaginal junction and sperm-storage tubule epithelia in broiler hens. *Poultry Science*, 95(4), 948-955. DOI <https://doi.org/10.3382/ps/pev440>
- Ball, A., Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology* 22, 1061–1069. DOI <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x>
- Barbas, P., & Mascarenhas, D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10(1), 49-62. DOI <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- BirdLife International. (2016). *Aquila chrysaetos*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22696060A93541662. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22696060A93541662.en> (consultado el 10 de septiembre de 2018).
- Blanco, M. & Höfle, U. (2003). Reproducción en cautividad del águila imperial ibérica. X Jornadas sobre gestión y conservación de fauna silvestre en peligro de extinción. FMV, Universidad de Murcia, España.
- Blanco, M., Wildt, E., Höfle, U., Voelker, W. & Donoghue, M. (2009). Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, 71(1), 200-213. DOI <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.019>
- Blanco, M., Wildt, E., Monfort, L., Gee, G. & Donoghue, M. (2002). Developing assisted reproductive technologies to promote *ex situ* raptor conservation. En: *The Second International Symposium on Assisted Reproductive Technology (ART) for the Conservation and Genetic Management of Wildlife* 28-29 September 2002 Wild Kingdom Pavilion, Henry Doorly Zoo, Omaha, Nebraska, USA (p. 264).

- Blesbois, E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63(2): 213-222. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043933907001419>
- Burrows, W. & Quinn, J. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 16(1): 19-24. DOI <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>
- Calderón, C. G. (2015). Uso de los medios BPSE y Lake para la conservación seminal de halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*). (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. México, CDMX.
- Camarillo, R., Jiménez, I., Guzmán, A., Rosales, A., Rodríguez, F., Pérez-Rivero, J., Herrera, J. (2019). Oviductal proteins effect in rooster spermatid cryopreservation. *CryoLetters* 40(6): 352-356. Disponible en: http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_40_6_2019.htm#352
- Campos-Rodríguez, I., Sosa-Guerrero, O., Flores-Leyva, X. (2016). Avistamientos recientes del águila real (*Aquila chrysaetos*) en la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda de Guanajuato, México y sus consecuencias en el Plan de Manejo. *Huitzil Revista Mexicana de Ornitología* 17(2):192-197. DOI 10.28947/hrmo.2016.17.2.246
- Campos-Rodríguez, I., Flores-Leyva, X., Pérez-Valera, D., & García-Martínez, P. (2018). Anidación del águila real en el sureste de Zacatecas, México. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*, 20(1), 1-13. DOI 10.28947/hrmo.2019.20.1.394
- Canorio, N., Paredes, F., & Valdivia, M. (2015). Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 434-443. DOI <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11185>
- Casaretto, C., Martínez Sarrasague, M., Giuliano, S., Rubin de Celis, E., Gambarotta, M., Carretero, I. & Miragaya, M. (2012). Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer: Lama glama semen viscosity. *Andrologia*, 44, 335-341. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01186.x>
- CITES. (2015). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Recuperado a partir de <http://www.cites.org/eng/app/e-appendices.Pdf>.
- Comité de Expertos en Águila Real, FMCN (Fondo Mexicano de la Conservación de la Naturaleza, A.C.). 2012. Proyecto de recuperación de las poblaciones de águila real (*Aquila chrysaetos canadensis*) y su hábitat en México. México. Disponible en: <https://fmcn.org/wp-content/uploads/2012/03/Águila-Real-VF-2012.pdf> (consultado el 14 de junio de 2018).
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2011). Fichas de especies prioritarias. Águila real (*Aquila chrysaetos*) comisión nacional de áreas naturales protegidas y comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México, D.F.
- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas), IMAE (Instituto del Medio Ambiente). 2008. Primer informe sobre la identificación de áreas de anidación y distribución del águila real (*Aquila chrysaetos*) en el estado de Aguascalientes. Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes. Disponible en: https://www.aguilarealmexico.org/home_biblioteca/Conservacion/Conservaci%C2%A2n%208-Proceeding%20of%20the%20Convenio%20CONANP.pdf (consultado el 12 de enero de 2018).
- CONANP/ SEMARNAT. (2014). La conanp ubica a 16 especies de aves rapaces en la reserva de la biosfera selva el ocote (Comunicado de prensa). Recuperado a partir de: http://www.conanp.gob.mx/difusion/comunicado.php?id_subcontenido=694
- Cox, J., Fernandez, P., Saravia, F. & Santa Maria, A. (1998). Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en

- espermatozoides caprinos. Archivos de Medicina Veterinaria, 30(1), 93-99. DOI <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X1998000100010>
- Cruz, C. (2016). Indicadores de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides criopreservados con dimetilsufóxido o glicerol de Halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*). (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, CDMX.
- De León-Girón, G. (2017). Abundancia, ecología reproductiva, dieta, uso de hábitat y amenazas del águila real (*Aquila chrysaetos canadensis*) en Baja California, México. Propuestas para su conservación. (Tesis de doctorado), Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
- Diario Oficial de la Federación. (2000). NOM-126-ECOL-2000. Por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional.
- Diario Oficial de la Federación. (2010). NOM-059-ECOL-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.
- Dogliero, M., Rota, A., Lofiego, R., Mauthe von Degerfeld, M. & Quaranta, G. (2016). Semen evaluation in four autochthonous wild raptor species using computer-aided sperm analyzer. Theriogenology, 85(6): 1113-1117. DOI <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.023>
- Donoghue, M., & Wishart, J. (2000). Storage of poultry semen. Animal reproduction science, 62(1-3): 213-232. DOI [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00160-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00160-3)
- Duchi, D., Almela V., Peinado R. & Poto R. (2009). Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana. Recuperado en diciembre de 2018, de agroecologia.net: http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicacionesonline/2009/eventos/seae/cds/congresos/actasbullas/seae_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPREDSERVACION.pdf
- Eccardi, F. (2008). El Águila Real, símbolo de la identidad mexicana. Biodiversitas, 77, 1–6. ISBN 1870-1760
- Espinosa, D., Morrone, J., Aguilar, C. & Llorente, J. (2001). Hacia una clasificación natural de las provincias biogeográficas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. Q054. México D. F.
- Etches, R. (1996). The male, Reproduction in poultry. Edited by International, C. Cambridge. Ontario Canada, CAB International, 208, 2033. ISBN: 0851987389
- Fox, N. (2003). Comprender al Ave de Presa. (Cairel Ediciones). ISBN: 9788485707423
- García-Herreros, M. (2016). Sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and Guinea fowl (*Numida meleagris*). Asian Journal of Andrology, 18(6): 889-894. DOI 10.4103/1008-682X.188448
- González, J. (2019). Morfofisiología del espermatozoide de *Gallus gallus* en el tracto reproductor del macho y la hembra. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. México, CDMX.
- Graham, K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. Animal reproduction science, 68(3-4), 239-247. DOI [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00160-9)
- Hammerstedt, H. & Graham, K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. Cryobiology (29) 26-28.

- Hammerstedt, H., Graham, K. & Nolan, P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? *Journal of Andrology*, 11(1) 73-88. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
- Herrera, J., Quintana, J., López, M., Betancourt, M. & Fierro, R. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of Andrology*, 51(5), 353-360. DOI 10.1080 / 014850190944401
- Herrera, J., Ávalos, A., Rodríguez, I., González, J. & Rosales, A. (2013). *Técnicas de Reproducción Asistida en Aves Domésticas Y Silvestres*. México, D.F: Universidad Autónoma Metropolitana. pp. 11-37. ISBN 978-607-28-0028-1
- Herrera, J., Calderón, G., Guzmán, A., Vargas, A., Ávalos, A. & Rosales, A. (2017). Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved semen of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*). *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 49(1), 39-43. ISSN (electronic) 0719-8132
- Hirai, M., Cerbito, W., Wijayagunawardane, M., Braun, J., Leidl, W., Ohosaki, K. & Sato, K. (1997). The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology*, 47(7), 1463-1478. DOI [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00136-2)
- Holt, W. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58. DOI [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Huitrón, J. (2019). Estudio de la viscosidad del medio de conservación para mantener la viabilidad espermática *in vitro* del gallo. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. México, CDMX.
- Ikegami, K. & Yoshimura, T. (2016). Comparative analysis reveals the underlying mechanism of vertebrate seasonal reproduction. *General and comparative endocrinology*, 227, 64-68. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.05.009>
- Kim, I. & Yang, H. (2001). Seasonal changes of testicular weight, sperm production, serum testosterone, and *in vitro* testosterone release in korean ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpowi*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(2), 151-156. DOI <https://doi.org/10.1292/jvms.63.151>
- Kropil, J. & M. Majda. (1996). Causes of low productivity in the Golden Eagle *Aquila chrysaetos* in the central west Carpathians. Pp. 490-494. En: Meyburg, B.U. y R.D. Chancellor (eds.). *Eagle studies*. World Working Group on Birds of Prey (WWGBP). Berlin, London and Paris. Disponible en: http://www.raptors-international.org/book/eagle_studies_1996/Kropil_Majda_1996_489-494.pdf
- Kuleshova, L., Shaw, J. & Trounson, A. (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43(1): 21–31. DOI <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2335>
- Kuliková, B., Di Iorio, M., Kubovicova, E., Kuzelova, L., Iaffaldano, N., & Chrenek, P. (2014). The cryoprotective effect of Ficoll on the rabbit spermatozoa quality. *Zygote*, 23(5), 785-794. DOI <https://doi.org/10.1017/S0967199414000471>
- Kuzlu, M. & Taskin, A. (2017). The effect of different extenders on the sperm motility and viability of frozen Turkey semen. *Indian Journal of Animal Research*, 51(2): 235-241. DOI 10.18805/ijar.v0iOF.6825
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Pina-Rosato, M. (2012). The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 78, 1381– 1389. DOI <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.009>

- Iaffaldano, N., Dilorio, M., Cerolini, S. & Manchisi, A. (2016). Overview of turkey semen storage: focus on cryopreservation - a Review. *Annals of Animal Science*, 16(4): 961-974. DOI 10.1515/aoas-2016-0026
- Lake, P., Ravie, O. & McAdam, J. (1981). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *British Poultry Science*, 22(1): 71–7. DOI <https://doi.org/10.1080/00071688108447865>
- Lemoine, M., Grasseau, I., Brillard, J. & Blesbois, E. (2008). A reappraisal of the factors involved *in vitro* initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction*, 136(4): 391-399. DOI 10.1530/REP-08-0094
- Lemoine, M., Dupont, J., Guillory, V., Tesseraud, S. & Blesbois, E. (2009). Potential Involvement of Several Signaling Pathways in Initiation of the Chicken Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction*, 81(4): 657-665. DOI <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072660>
- Lemoine, M., Mignon-Grasteau, S., Grasseau, I., Magistrini, M., & Blesbois, E. (2011). Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*, 75(1): 122-130. DOI <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.017>
- Long, J. & Kulkarni, G. (2004). An Effective Method for Improving the Fertility of Glycerol-Exposed Poultry Semen. *Poultry Science* 83:1594–1601. DOI: 10.1093/ps/83.9.1594
- Long, J. (2006). Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science*, 85(2): 232-236. DOI <https://doi.org/10.1093/ps/85.2.232>
- Maciel, M., Cotta, J., Murgas, L., Lima, F., Lima, D., Gonçalves, E. & Alvarenga, A. (2007). Desarrollo e histología testicular de gallos ligeros sometidos a diferentes fotoperiodos. En *Anales de Veterinaria de Murcia*, 23, 35-43. Disponible en: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/40491/38951>
- Margalida A., Mañosa, S., González, L.M, Ortega, E., Sánchez, R. & Oria, J. (2008). Breeding of non-adults and effects of age on productivity in the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. *Ardea* 96(2):173-180. DOI <https://doi.org/10.5253/078.096.0203>
- Maxwell, W. & Johnson, L. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 46(3), 408-418. DOI [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199703\)46:3<408::AID-MRD21>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<408::AID-MRD21>3.0.CO;2-T)
- Méndez, P., Curti, M., de Montuto, & Benedetti, A. (2006). Las aves rapaces: guía didáctica de educación ambiental. The Peregrine Fund/Fondo Peregrino–Panamá. ISBN 9962-02-978-3
- Minier, D., Tatum, L., Gottlieb, D., Cameron, A., Snarr, J., Elliot, R. & McCowan, B. (2011). Human-directed contra-aggression training using positive reinforcement with single and multiple trainers for indoor-housed rhesus macaques. *Applied animal behaviour science*, 132(3-4), 178-186. DOI <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.009>
- Moyle, J., Whipple, S., Clark, F., & Bramwell, R. (2011). Observations of testicular abnormalities in *Gallus domesticus* males. *Journal of Applied Poultry Research*, 20(4), 577-583. DOI <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00244>
- Naccache, P. & Sha'afi, R. (1973). Patterns of nonelectrolyte permeability in human red blood cell membrane. *Journal of General Physiology* 62, 714-736. DOI 10.1085 / jgp.62.6.714
- Nagy, S. Z., Sinkovics, G. Y., & Kovács, A. (2002). Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Animal reproduction science*, 70(3-4), 283-286. DOI [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00189-0)
- Nishio, S. & Matsuda, T. (2017). Fertilization 1: Sperm–Egg Interaction. En T. Sasanami (Ed.), *Avian Reproduction*, 1001, 91-103. Singapore: Springer Singapore. DOI 10.1007/978-981-10-3975-1_6

- Ochoa, F., Val, D., Juárez, A., Toscano, I., Olivo, I. & Conejo, J. (2014). Determination of functional status of plasmatic membrane in native turkey during cryopreservation process. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 4, 123-125. Disponible en: http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2014/Trabajo03_3_AICA2014.pdf
- Okumura, H., Kohno, Y., Iwata, Y., Mori, H., Aoki, N., Sato, C. & Matsuda, T. (2004). A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm-egg interaction. *Biochemical Journal*, 384(1): 191-199. DOI <https://doi.org/10.1042/BJ20040299>
- Pardo-Carrasco, S., Salas, J., Reza, L., Espinosa, J., Atencio-García, V. (2015) Criopreservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*) con dimetilacetamida como crioprotector. *Medicina veterinaria y Zootecnia*. 10(2): 122-131.
- Parks, J. & Graham, K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38, 209-222. DOI:10.1016/0093-691X(92)90231-F
- Pelaez, J. & Long, J. (2006). Characterizing the Glycocalyx of Poultry Spermatozoa: I. Identification and Distribution of Carbohydrate Residues Using Flow Cytometry and Epifluorescence Microscopy. *Journal of Andrology*, 28(2): 342-352. DOI <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.001073>
- Pelaez, J. & Long, J. (2008). Characterizing the Glycocalyx of Poultry Spermatozoa: II. In Vitro Storage of Turkey Semen and Mobility Phenotype Affects the Carbohydrate Component of Sperm Membrane Glycoconjugates. *Journal of Andrology*, 29(4): 431-439. DOI <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004259>
- Pelaez, J., Bongalhardo, D. & Long, J. (2011). Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poultry Science*, 90(2): 435-443. DOI <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00998>
- Peralta, M. & Miazzi, R. (2002). Manejo Reproductivo en Aves. Cursos de Introducción a la Producción Animal y Producción Animal I. FAV UNRC.
- Pérez, J., Meddle, S., Wingfield, J. & Ramenofsky, M. (2018). Effects of thyroid hormone manipulation on pre-nuptial molt, luteinizing hormone and testicular growth in male white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *General and comparative endocrinology*, 255, 12-18. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.09.025>
- Purdy, P., Song, Y., Silversides, F. & Blackburn, H. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry science*, 88(10), 2184-2191. DOI <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00402>
- Ramírez, E. & Luza, S. (1967). Dimethyl sulfoxide in the treatment of mental patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141: 655-667. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb34937.x
- Rateb, S. (2016). Ultrasound-assisted liquefaction of dromedary camel semen. *Small Ruminant Research*, 141, 48-55. DOI <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.07.005>
- Real Academia Española. (2019). Disquisición. En *Diccionario de la lengua española* (22.a ed.). Recuperado de <https://dle.rae.es/?id=DglqVCc>
- Ricart, M., Breininger, E., Rodriguez, P. & Beconi, M. (2015). Participation of membrane adenylyl cyclase in heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*, 47(1), 30-36. DOI <https://doi.org/10.1111/and.12218>
- Ricaurte, G. (2006) Importancia de un buen manejo de la reproducción en avicultura. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(4), 1-16. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617138013.pdf>
- Rodríguez-Estrella, R. & Rivera-Rodríguez, L. (2005). Ficha técnica de *Aquila chrysaetos*. En: P. Escalante. *Fichas sobre las especies de Aves incluidas en el Proyecto de Norma*

- Oficial Mexicana PROY-NOM-ECOL-2000, Parte 2, bases de datos SNIB-Conabio, Proyecto W042. IB-UNAM, CONABIO. México. D.F. Disponible en: <http://conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Aquilachrysaetos00.pdf> (consultado el 20 de junio de 2018).
- Rodríguez, I. (2013). Calidad seminal en un periodo anual, de tres especies de aves rapaces. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. México, CDMX.
- Sánchez, G., Ambríz, D & Navarro, M. (2011). La reproducción animal asistida: Un instrumento para el concierto de la conservación. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S. & Hiyama, G. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *Journal of Reproduction and Development*, 59(4), 334-338. DOI <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-038>
- SEMARNAT. (2008). Programa de acción para la conservación de la especie: Aguila Real. Disponible en: https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies_priori/fichas/pdf/pace_aguila.pdf
- Sexton, T. (1977). A new poultry semen extender: 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry science*, 56(5), 1443-1446. DOI <https://doi.org/10.3382/ps.0561443>
- Sexton, T. (1978). A New Poultry Semen Extender: 3. Effect of Storage Conditions on the Fertilizing Capacity of Chicken Semen Stored at 5° C. *Poultry science*, 57(1), 285-289. DOI <https://doi.org/10.3382/ps.0570285>
- Starling, M., Branson, N., Cody, D. & McGreevy, P. (2013). Conceptualising the impact of arousal and affective state on training outcomes of operant conditioning. *Animals*, 3(2), 300-317. DOI <https://doi.org/10.3390/ani3020300>
- Tavizón, G. (2014). Dinámica poblacional y viabilidad espacio temporal del águila real. (Tesis de doctorado), Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.
- Tsien, Y. (1989). In: *Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part B. Quantitative fluorescence microscopy – Imaging and spectroscopy*. Taylor, D., Wang, L. New York: Academic Press. 30: 127-156.
- Varadi, E., Vegi, B., Liptoi, K., & Barna, J. (2013). Methods for cryopreservation of guinea fowl sperm. *PLOS one*, 8(4), e62759. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062759>
- Vargas, A. (2018). Secreciones de la unión útero vaginal y su efecto en los parámetros de descapacitación y capacitación espermática de *Gallus gallus in vitro*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. México, CDMX.
- Villaverde-Morcillo, S., García-Sánchez, R., Castaño, C., Rodríguez, E., Gonzalez, F., Esteso, M. & Santiago-Moreno, J. (2015). Characterization of natural ejaculates and sperm cryopreservation in a golden eagle (*Aquila chrysaetus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(2), 335-338. DOI <https://doi.org/10.1638/2013-0293R1.1>
- Waclawek, M., Foisner, R., Nimpf, J. & Schneider, WJ. (1998). The chicken homologue of zona pelucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 59(5):1230-9. DOI <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1230>
- Weaver, J. & Cade, T. (2000). Artificial insemination. *Falco propagation a manual on captive breeding*. T.p. Fund. Boise idaho: 19-21. Disponible en: https://assets.peregrinefund.org/docs/research-library/manual-propagation-2017-02-28_163913.pdf



Obtención de eyaculados por condicionamiento de águila real (*Aquila chrysaetos*)

S.S. Landa¹, J.A. Herrera*², J.J. Pérez-Rivero², J.M. Huitrón³, M.A. León⁴, A. Guzmán², C.S. Reyes⁵.

¹Maestría en Biología de la Reproducción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma, 09340 Ciudad de México, CDMX.

²Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México, México.

³Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México, México.

⁴Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma, 09340 Ciudad de México, CDMX

⁵Parque Reino Animal. Camino a Belén, Santa María, Colonia Oxtotipac, Delegación Otumba, C.P. 55908, Estado de México.

*herreraaves@gmail.com / jherrerab@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

En México habitan 88 especies de aves rapaces, el águila real (*Aquila chrysaetos*) es una de las 65 especies que se encuentra en categoría de riesgo, clasificada en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Se han documentado 50 nidos de águila real en estado silvestre, y 60 individuos en cautiverio, estimando que la población mundial es de 250 mil. Se pretendió describir las expectativas para la obtención de eyaculados de *A chrysaetos*, para contribuir a los protocolos de reproducción asistida. En la temporada reproductiva, se realizó dos veces por semana el procedimiento de masaje dorso-ventral a 5 ejemplares adultos, con el propósito de obtener eyaculados. El estudio ocupó 17 semanas, en las que se realizaron 160 contactos en total. De este trabajo, únicamente se logró obtener 20 eyaculados, los cuales fueron obtenidos: 12 de un solo ejemplar, 5 de un ejemplar, 3 de un ejemplar, de dos ejemplares no se logró obtener ningún eyaculado. Se logró solo un 4% de éxito para obtener eyaculados. A pesar de tener un proyecto ambicioso, al incluir un número importante de ejemplares, las posibilidades de éxito, representadas en la cantidad de eyaculados esperados fue mínima. Lo anterior debe ser contemplado en programas de reproducción asistida, ya que como se demuestra con los resultados de este estudio, no todos los ejemplares proporcionan eyaculados suficientes, por lo cual, es indispensable realizar una evaluación de ejemplares antes de incluirlos en programas de reproducción asistida.

Palabras clave. Cautiverio, conservación, falconiformes, reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
a través de su
Programa de Educación Continua
y el
Departamento de Producción Agrícola y Animal
otorgan la presente

CONSTANCIA

a: Sofia S. Landa García, Miguel A León Galván, José M Huitrón Rodríguez, Adrián Guzmán Sánchez, Juan José Pérez-Rivero CyC, José A Herrera Barragán.

Por su participación con el cartel: "PRODUCCIÓN SEMINAL DE ÁGUILA REAL (Aquila chrysaetos)" en el
8º CONGRESO DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
realizado en la UAM-Xochimilco, los días 4 y 5 de julio de 2019

"Casa abierta al tiempo"
Ciudad de México a 5 de julio de 2019

Dr. Rey Guzmán Tolentino
Jefe del Depto. de Producción Agrícola y Animal



PRODUCCIÓN SEMINAL DE ÁGUILA REAL (Aquila chrysaetos)

Sofía S. Landa García¹, Miguel A. León Galván², José M. Huitrón Rodríguez³, Adrián Guzmán Sánchez⁴, Juan José Pérez-Rivero CyC⁴, José A. Herrera Barragán^{4*}.

¹Maestría en Biología de la Reproducción Animal, ²Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma Ira Secc, 09340 Ciudad de México, México; ³Maestría en Ciencias Agropecuarias; ⁴Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Huesso 1100, Col. Villa Cuautém, Coyoacán, 04650, Ciudad de México, México.
*herrera@coneo.xoc.uam.mx

Introducción. En la actualidad el 10% de las 300 especies del orden falconiforme se encuentran amenazadas; en México existen 88 especies de aves rapaces, entre las que se encuentra el águila real, que es una de las 65 especies que se encuentra en categoría de riesgo de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2010 y clasificada en el apéndice II de la CITES. Se desconoce el número de individuos residentes en nuestro país, pero se han documentado al menos 50 nidios de águila real en estado silvestre, y más de 60 individuos en cautiverio, estimando que la población mundial es de 250 mil individuos.

Palabras clave. Cautiverio, conservación, falconiformes, reproducción.

Objetivo. Describir las expectativas para la obtención de semen, para contribuir a los protocolos de reproducción asistida para *A. chrysaetos*.

Metodología. Durante la temporada de reproducción 2019, de enero a abril, se realizó dos veces por semana el procedimiento de masaje dorso-ventral a cinco ejemplares adultos, realizando un máximo de tres estímulos a cada ejemplar por sesión, con el propósito de obtener eyaculados.

Resultados. En el estudio, se logró tan solo un 4% de éxito para obtener eyaculados.

N° de Ejemplar	Edad (Años)	Avance conductual (%)	N° de eyaculados obtenidos	Eyaculados obtenidos (%)
1	12	100	12	50
2	8	100	5	25
3	10	100	3	15
4	10	70	0	0
5	4	40	0	0

Discusión. Se logró evidenciar, que a pesar de tener un proyecto ambicioso, al incluir un número importante de ejemplares, las posibilidades de éxito, representadas en la cantidad de eyaculados esperados es mínima. Esto debe ser contemplado en programas de reproducción asistida que contemplen la variabilidad genética, ya que como se demuestra con los resultados de este estudio, existen ejemplares considerados buenos donadores y por el extremo ejemplares de los cuales de una manera limitada se podrá disponer de su material genético, habiendo también ejemplares de los cuales no se logrará obtener semen.

Conclusión. Es indispensable realizar una evaluación de ejemplares antes de incluirlos en programas de reproducción asistida.



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Otorgan la presente

CONSTANCIA

A

Sofía S. Landa García, José A. Herrera Barragán, Adrián Guzmán Sánchez, Miguel A. León Galván y Ricardo Camarillo Flores

Por su participación en la
Tercera Reunión Científica Interinstitucional sobre Diversidad Biológica
con el cartel

Conservación espermática de águila real (Aquila chrysaetos)

Ciudad de México, 18 de mayo de 2019

Mtro. Rafael Díaz García
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Conservación espermática de águila real (Aquila chrysaetos).

Landa García S¹, Herrera Barragán José A², Guzmán Sánchez A³, León Galván Miguel A⁴, Camarillo Flores R⁵
¹Maestría en Biología de la Reproducción Animal, UAM X, ²Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM X, ³Departamento de Salud, UAM X, ⁴Comité Ejecutivo, UAM X, ⁵Comité Ejecutivo, UAM X, ⁶Comité Ejecutivo, UAM X

INTRODUCCIÓN
En la actualidad al menos el 10% de las 300 especies que se encuentran en el orden Falconiforme se encuentran amenazadas ¿cuál es nuestra? ¿?

En México, de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT, una de las 65 especies de aves rapaces que se encuentran en categoría de riesgo a nivel nacional¹.

La vida en cautiverio se presenta dificultada, posiblemente debido al desconocimiento de parámetros reproductivos y cómo obtenerlos a partir de muestras "centrálicas".

El águila real (*Aquila chrysaetos*) en México, es una de las 65 especies de aves rapaces que se encuentran en categoría de riesgo a nivel nacional de acuerdo a la NOM 059 ECOL 2010, reconocida como especie en el apéndice II del CITES (CITES, 2016). La vida en cautiverio, principalmente de especies que se encuentran en peligro de extinción como algunas águilas y halcones, está lejos de ser sencilla (Illanes et al., 2012) debido al poco conocimiento que se tiene sobre los parámetros reproductivos, métodos de las especies, métodos, además a posibles desconocimiento por el semen en cautiverio.

JUSTIFICACIÓN
Hoy lo anterior se ha propuesto el desarrollo de medios específicos para la conservación seminal y que pueda ser utilizado posteriormente en la inseminación artificial. El papel de la diversidad genética natural en los métodos de conservación puede ayudar en la reproducción de los métodos de conservación seminal del águila real.

Nadie se conservará jamás época de los FIT²

Necesario conocimiento básico de su biología reproductiva³

Método para la conservación seminal de especies específicas

PARA OBTENER
1. Identificación del individuo.
2. Descripción de la especie.
3. Descripción de la especie.
4. Descripción de la especie.
5. Descripción de la especie.
6. Descripción de la especie.
7. Descripción de la especie.
8. Descripción de la especie.
9. Descripción de la especie.
10. Descripción de la especie.

OBJETIVO
El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la cantidad del medio de conservación seminal en la capacidad de recolección, preservación y distribución de cariotipos cromosómicos de espermatozoides de águila real conservados in vitro.

METODOLOGÍA

Masaje Dorsal → Evolución rápida sexual → Inseminación natural → Fecundación interna → Análisis de cariotipo (ANUSCA) → Frecuencia (M² 25) → PATRONES DE FLUORESCENCIA PARA EVALUAR VIABILIDAD ESPERMÁTICA

Además se usó para medir la viabilidad (medición a base de) → Fecundación interna → Análisis de cariotipo (ANUSCA) → Frecuencia (M² 25) → PATRONES DE FLUORESCENCIA PARA EVALUAR VIABILIDAD ESPERMÁTICA

Leidano: WGA, FIT-C, COLA, FIT-C

ANUSCA → Frecuencia (M² 25) → PATRONES DE FLUORESCENCIA PARA EVALUAR VIABILIDAD ESPERMÁTICA

So permite el diseño de medios especie específicos, mediante el desarrollo de varios proyectos para determinar diferentes características de los requerimientos biológicos de los espermatozoides.



Gracias al convenio de colaboración entre el parque Reino Animal y la UAM-X, se realizó una colaboración con el noticiero Televisa para la elaboración de un reportaje referente al águila real. En el reportaje se menciona la categoría de riesgo en la que se encuentra la especie, su distribución en México, así como el número de parejas registradas en vida libre y el número de individuos registrados en cautiverio. Del mismo modo, se menciona la participación de la Universidad Autónoma Metropolitana en los proyectos de reproducción asistida que se realizan junto con el Club América y el parque Reino Animal.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal

Extiende la presente constancia a :

Sofía Sarahi Landa Garcia

Por su participación como **Asistente** en el curso-taller:

Elaboración de dardos para uso veterinario

En el: 7° Congreso y 3° Feria Técnico-científica del Departamento de Producción Agrícola y Animal, realizada en esta universidad, con una duración de 4 horas, el lunes 17 de septiembre del 2018.


Dr. José Antonio Herrera Barragán
Coordinador del curso


Dr. Rey Gutiérrez Tolentino
Jefe del Departamento de Producción Agrícola y Animal



Extiende la presente constancia a:

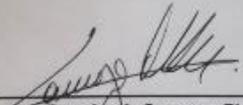
Sofía Sarahi Landa García

Por su participación en el:

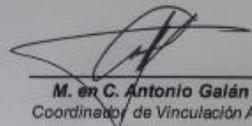
Inseminación artificial por el método de laparoscopia en ovinos

El 15 de julio de 2019, con duración de 5 horas.

Ciudad de México, 15 de julio de 2019.


Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud


Dra. Edith Arenas Ríos
Coordinadora del Curso


M. en C. Antonio Galán Alcalá
Coordinador de Vinculación Académica

