



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

División en Ciencias Biológicas y de la Salud
Maestría en Biología de la Reproducción Animal

TESIS

Caracterización y criopreservación de espermatozoides del
Ajolote Mexicano *Ambystoma mexicanum*
(Anfibia: Ambystomatidae)

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

Presenta:

Biól. Juan Carlos Rivera Pacheco

Comité tutorial:

Tutor: Dr. José Antonio Herrera Barragán

Asesor: Dr. Miguel Ángel León Galván

Asesor: Dr. José Antonio Ocampo Cervantes

Ciudad de México, México a 29 de noviembre de 2018

COMITÉ TUTORAL

TUTOR:

Dr. José Antonio Herrera Barragán

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Correo electrónico: jherrerab@correo.xoc.uam.mx

UAM-Xochimilco

ASESORES:

Dr. Miguel Ángel León Galván

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Biología.

Correo electrónico: leon@xanum.uam.mx

UAM-Iztapalapa

Dr. José Antonio Ocampo Cervantes

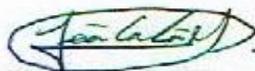
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento del Hombre y su Ambiente.

Correo electrónico: jocampo@correo.xoc.uam.mx

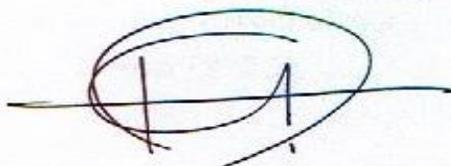
UAM-Xochimilco

JURADO DE EXAMEN



DR. MIGUEL ÁNGEL LEÓN GALVÁN

(Presidente)



DR. JOSÉ ANTONIO OCAMPO CERVANTES

(Secretario)



DR. JUAN JOSE PEREZ RIVERO CRUZ Y CELIS

(Vocal)



Dr. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ.

(Vocal)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi casa de estudios la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por haberme dado la oportunidad de ingresar y terminar la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, la cual pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad de CONACyT con registro **003797**.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México, por el apoyo económico brindado con la beca 797759.

Agradecemos al Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC-UAM-X), por permitirnos el acceso para uso del material biológico proporcionado para la realización del experimento de esta de tesis.

Así también al Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del DPAA, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, por el acceso a su equipo e infraestructura.

El producto logrado con este apoyo es la culminación de esta tesis de posgrado, titulada “Caracterización y criopreservación de espermatozoides del Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*)” correspondiente a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

DEDICATORIA

A mi madre

Por ser la persona que has estado siempre a mi lado en todo el transcurso de mi educación, así como el apoyo que me brindas en cada decisión que tomo, por darme una lección mediante tu ejemplo que trabajando se pueden lograr las cosas, por todo el cariño y el buen trato que me das, por esto y muchas cosas más, te doy las gracias con todo el amor que te tengo Isabel.

A mis hermanos

Gracias Gabriela por el tiempo que compartimos juntos a veces de risas o de tristezas, pero siempre saliendo adelante, por tu tiempo brindado en algunos aspectos de la maestría y por aguantar algunas veces mi carácter lo cual sé que te hice sentir mal, pero sabes que no es personal.

Gracias José Manuel, aunque sé que no eres muy expresivo con tus muestras de cariño, te doy las gracias por ser parte de mi vida y de cada paso que doy en algunas veces inciertos y otros consolidados, por los momentos igualmente de risas como de tristezas, pero siempre de pie y hacia adelante.

A mis profesores y amigos

Al Dr. José Antonio Herrera Barragán primeramente por aceptarme en su laboratorio para poder realizar mi investigación, segundo por todo el tiempo que estuvo ahí para ayudarme personalmente en las técnicas que llevaron a cabo, tercero por cada uno de sus consejos e ideas para que terminara bien la maestría y cuarto el apoyo mostrado tanto en congresos y exposiciones con el objetivo de mejorar como estudiante, así mismo le reitero mi agradecimiento por los consejos e impulso que me ha dado por seguir con mis estudios.

Al Dr. Miguel Ángel León Galván por aceptarme para comenzar los trámites de ingreso a la maestría, por aceptar formar parte de mi comité y por el tiempo que se tomó para revisar mi tesis cada trimestre, por sus consejos y críticas para mejorar cada día más en mi forma escribir, así como en la forma de exponer y por siempre recordarme no dejar a lado la importancia de la biología en la investigación.

Al Dr. José Antonio Ocampo Cervantes igualmente le doy las gracias por aceptar formar parte de mi comité, por darme la facilidad de poder trabajar en el CIBAC y de proporcionarme todo el material que necesité, así como el tiempo que se tomó para revisar mi tesis y sus consejos puntuales para llevar a cabo mis presentaciones de la mejor manera.

A todos los profesores de la MBRA que se tomaron su tiempo para darnos clase de la mejor manera y que sin duda dan a conocer su experiencia y calidad como profesores e investigadores.

A ustedes compañeros y amigos de la maestría; Georgina, Ricardo, Gustavo, Alain, Quique, Cintia y Yumara con los cuales compartí varios momentos tanto de estudio, desveladas y de frustración y que superamos estos momentos platicándolo, pero sin duda gracias por todos los días divertidos y llenos de risas que me regalaron.

A ti Georgina que fuiste más que un apoyo en lo académico, fuiste, sigues y seguirás siendo un apoyo moral, esa persona que con sus muestras de cariño me ayudas a lograr mis objetivos día con día, gracias por creer en mí, definitivamente conocerte fue lo mejor que me pasó en la maestría, sabes que te quiero y que aunque tengo un carácter muy raro a veces, siempre te guardo el respeto como mi pareja y mi reconocimiento como colega, esta vez de la UAMI.

A mis amigos del laboratorio Junior, Karen, Fernanda, Samanta y nuevamente a Ricardo, los cuales me aceptaron muy bien cuando llegué a su equipo y me mostraron su solidaridad y lo que es trabajo en equipo, característica que es impulsada por el Dr. Herrera.

A ti Biól. Arturo que me ayudaste desde el primer día que llegué al CIBAC y que fuiste clave para comenzar a reproducir mis animales, gracias por el tiempo de tu ayuda, el cual a veces era llegar temprano para revisar animales y salir de noche por estar estandarizando la técnica de extracción espermática.

A ti Memo el cual te agradezco tu ayuda en mantener en buen estado mis animales por varios días cuando no podía ir yo a revisarlos, lo cual también fue importante para llevar a cabo mi trabajo.

Por último, pero no menos importante agradezco de la mejor manera a los estudiantes de veterinaria; Alan, Ale, Andrea, Eduardo, Humberto, Laura, Úrsula y Edith, que debido a su módulo de bienestar animal y fauna silvestre me ayudaron en muchos aspectos en el transcurso de mi proyecto.

INDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	11
2. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	15
2.1 Taxonomía de <i>Ambystoma mexicanum</i> (Shaw & Nodder, 1798)	15
2.2. Importancia biológica	16
2.3. Descripción y presencia de especies	16
2.4. Presencia de especies en cautiverio	17
3. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA ESPECIE	18
3.1. Ciclo biológico	18
3.2. Biología reproductiva	19
3.3. Morfología y ultraestructura espermática de los urodelos	21
3.4. Glándulas de la cloaca del macho	21
3.5. Feromonas en el cortejo	22
3.6. Formación y liberación del espermátóforo	22
3.7. Estrategias de reproducción en cautiverio	23
3.8. Obtención de gametos	24
4. ANTECEDENTES	25
4.1. Crioprotectores y mecanismo de acción	27
5. JUSTIFICACIÓN	29
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
7. OBJETIVOS	31
7.1 General	31
7.2 Específicos	31
8. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1. Material Biológico	33
8.2. Material de laboratorio	34
8.3. Métodos	34
8.3.1. Acondicionamiento de los ejemplares	34
8.3.2. Morfometría de los ejemplares	34

8.3.3. Obtención de espermátóforos	34
8.3.4. Obtención de espermatozoides	35
8.3.5. Evaluación de calidad espermática	36
8.3.6. Distribución de carbohidratos membranales	38
8.3.7. Criopreservación espermática	39
8.3.8. Análisis estadístico	40
9. RESULTADOS	41
9.1 Caracterización morfométrica de los ejemplares	41
9.2 Caracterización morfométrica de los espermátóforos	42
9.3. Relación morfométrica de los ejemplares vs espermátóforos.	43
9.4. Tamaño de la cloaca y cantidad de espermátóforos liberados	44
9.5 Morfometría en de espermatozoides de diferente espermátóforo.	45
9.6 Parámetros de evaluación espermática básica diferente espermátóforo	46
9.7. Parámetros espermáticos post descongelación.	49
9.8. Presencia y distribución de carbohidratos membranales.	50
9.9. Evaluación de patrones de distribución con lectina WGA	52
9.10. Protocolo de criopreservación	53
10. DISCUSIÓN	56
11. CONCLUSIONES	59
11. REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS	60
12. TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS ESPECIALIZADOS	61

RESUMEN

Actualmente los anfibios presentan un deterioro de sus poblaciones a nivel mundial. En México el ajolote es una especie endémica que se ha visto afectada. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, señala que debe ser prioritaria y fundamental la criopreservación del material genético. El presente trabajo tuvo el objetivo de determinar las características espermáticas de cada espermátforo producido por diferente ejemplar de *Ambystoma mexicanum* y los posibles cambios que pueden ocurrir en los espermatozoides sometidos a criopreservación. Se utilizaron 9 ajolotes machos, del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC). De cada ejemplar se determinó la morfometría y la correlación con las características morfométricas de los espermátforos producidos. Se determinó la calidad general de los espermatozoides en fresco y post descongelación extraídos de cada espermátforo, y se determinó la presencia de carbohidratos membranales del espermatozoide, con el uso de lectinas *Triticum vulgare* aglutinina (WGA) y *Arachis hypogaea* (PNA) conjugadas a Isotiocianato de fluoresceína. Se reconocieron diferentes correlaciones entre la morfometría de los ejemplares y las características de los espermátforos, destacando la correlación existente entre el peso de los organismos y el tamaño del capuchón del espermátforo. En la evaluación espermática realizada, se observaron diferencias entre los valores registrados en muestras en fresco, respecto a las registradas después de la congelación-descongelación; siendo las diferencias de: viabilidad 30 % y morfología normal 20 %. La concentración espermática mostró un intervalo entre 13,000 y 29,000 espermatozoides. Con el uso de las lectinas WGA y PNA, se evidenciaron dos estados fisiológicos de los espermatozoides, que fueron similares tanto en muestras en fresco como descongeladas. Sin embargo, se registraron diferencias en las proporciones de cada condición fisiológica determinada. Los resultados demostraron que existe diferente calidad y estado fisiológico de los espermatozoides entre ejemplares y entre espermátforos, así también que es posible mantener la viabilidad espermática post descongelación con el método de criopreservación empleado.

ABSTRACT

Nowadays, amphibians have shown worldwide deterioration in their populations. In Mexico, the axolotl is an endemic species that has been affected. The International Union for the Conservation of Nature says that it should be priority and essential in genetic material cryopreservation. This study's aim was to determine spermatoc characteristics of each spermatophore produced by different *Ambystoma mexicanum* specimen and possible changes that could happen when undergoing cryopreservation. Nine male axolotls were used from Biological and Aquaculture Research Center of Cuernavaca (CIBAC, by its initials in Spanish). From each specimen, its morphometry and its possible correlation with the morphometry of the spermatophores produced were determined, additionally general quality of spermatozoa extracted from spermatophores was determined when fresh and thawed, finally it was determined the presence of membrane carbohydrates using lectins *Triticum vulgare* agglutinin (WGA) and *Arachis hypogea* (PNA) conjugated to fluorescein isothiocyanate. Different correlations among specimens morphometry and spermatophores characteristics were recognized, highlighting the correlation between organism's weight and the spermatophores top's size. In spermatoc evaluation, there were differences among fresh and thawed samples; being different in viability (30%) and normal morphology (20%). Spermatoc concentration fluctuated from 13,000 and 29,000 spermatozoa. With the use of lectins WGA and PNA, two physiological states of spermatozoa were evident similar within fresh and thawed samples; nevertheless, there were different proportions of each physiological state. Results showed that there are different spermatozoa's qualities and physiological states among specimens and spermatophores; also, that it is possible to maintain spermatoc viability when thawed with the preservation method applied.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente las transformaciones que están ocurriendo en los ecosistemas debido a acciones antropogénicas como: urbanización, deforestación y contaminación, han llevado a una aceleración en el calentamiento global y con esto a alteraciones a muchos niveles en la naturaleza (CONABIO-SEMARNAT, 2009; Kouba et al., 2009; CONABIO, 2014), perjudicando directa e indirectamente a muchas especies de vertebrados (Gascon, 2007; UICN, 2016). Los anfibios no son la excepción, ya que el impacto de las acciones humanas, aunado a la introducción de especies exóticas invasoras y enfermedades causadas por hongos, están originando que sus poblaciones disminuyan de una forma acelerada a nivel mundial (Catenazzi, 2015; Hayes et al., 2010; Jimenez et al., 2017; Kouba et al., 2009, 2013; Mendoza, 2012; Zambrano, 2003), y en otros casos causando su extinción (Beebee and Griffiths, 2005; Martínez-Meyer et al., 2014; McCallum, 2007; Roelants et al., 2007). Para el caso de México se estima que el 43% de las especies de anfibios están críticamente amenazados (Parra-Olea et al., 2014) y datos mostrados por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN por sus siglas en inglés), indican que más del 85% de las especies de anfibios de México se encuentran en alguna categoría de conservación por estar en grave peligro de extinción (UICN, 2016). Para estos problemas de extinción, los científicos proponen como respuesta estrategias de conservación, las cuales consisten en programas de reproducción *ex situ* (*cautiverio*), debido a que en la mayoría de los casos la amenaza se encuentra en su propio hábitat (Gascon, 2007; Griffiths and Pavajeau, 2008; Jimenez et al., 2017).

La técnica utilizada para la reproducción de estas especies es por medio de la reproducción asistida, la cual representa una alternativa para contribuir a mantener el material genético por tiempo indefinido (Clulow et al., 2014; Jimenez et al., 2017; Kouba et al., 2013). En las últimas décadas, la conservación de material genético ha sido identificado como una prioridad necesaria para evitar los problemas de extinción de especies en vida silvestre, así como aumentar la variabilidad genética en cautiverio (Clulow et al., 2014; Gascon, 2007; IUCN, 2012). La Reproducción Asistida (RAA) cuenta con varias metodologías una de ellas es la criopreservación

de espermatozoides (Andrabi and Maxwell, 2007; Beesley et al., 1998; Clulow et al., 2014; Reyes et al., 2011). La criopreservación de espermatozoides es una herramienta de gran utilidad para obtener éxito en procedimientos de reproducción (Chester, 2013; Kouba et al., 2009, 2013; Sanches et al., 2013). Para llevar a cabo el proceso de criopreservación, es de suma importancia conocer la biología reproductiva de dicha especie (fisiología, morfología y conducta) (Aguilar-Miguel et al., 2009), dentro de estos atributos biológicos se encuentran la gametogénesis, fecundidad, duración del desarrollo, edad reproductiva, esfuerzo reproductivo, limitaciones ambientales y el cuidado parental (Aguilar-Miguel et al., 2009; Duellman and Trueb, 1994; Prieto et al., 2014). Así mismo, otro aspecto importante para obtener éxito en la criopreservación es conocer las características espermáticas de la especie (Robles, 2005), debido a que se ha reconocido que la criopreservación es especie-específico, por lo tanto; la investigación de la biología reproductiva como de las características de la célula espermática son indispensables (Agarwal, 2011; Atencio et al., 2013; Prieto et al., 2014). Para la criopreservación de espermatozoides de especies en peligro de extinción, un punto a tomar en cuenta es que se deben utilizar métodos no invasivos donde no se tenga que sacrificar el animal (Chester, 2013; Hopkins and Herr, 2008; Recuero et al., 2010).

Por todo lo anterior; nuestro interés para iniciar el estudio de la caracterización y la estrategia de criopreservación de espermatozoides lo centramos en el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*); primeramente, porque es una especie endémica de México (Duhon, 1997; Kuxulcab, 2013; Recuero et al., 2010), actualmente restringida solamente al lago de Xochimilco (Bride et al., 2008; Voss et al., 2015; Zambrano et al., 2010) y Chalco-Tláhuac y debido a que se encuentra ubicada como una especie en peligro de extinción (P)” por la NOM-059 - SEMARNAT- 2010. Por último, y no menos importante, debido a que es una especie bandera para la ciencia a nivel nacional e internacional, utilizada en líneas de investigación, como: Biología del Desarrollo, Fisiología, Evolución y Procesos Regenerativos (Bride et al., 2008; Evans et al., 2018; Kochegarov, 2015; Kumar and Simon, 2015; Khattak et al., 2014; Maex et al., 2016; Recuero et al., 2010; Sanchez, 2016; Voss et al., 2015; Zambrano, 2003). El ajolote mexicano es un animal acuático

y paedomórfico natural (mantiene características juveniles con capacidad de reproducirse) (Casas et al., 2004; Maex et al., 2016; Parra-Olea et al., 2012; Recuero et al., 2010; Vázquez, 2010; Voss et al., 2015; Zambrano et al., 2003), sobre su reproducción algunos investigadores mencionan que es estacional en vida silvestre, llevándose a cabo en los meses de octubre a marzo (Uribe and Mejía-Roa, 2014) así mismo, otros indican que es una especie que puede reproducirse durante todo el año en condiciones de laboratorio (Aguilar-Miguel, 2009; Eisthen and Krause, 2012). Por otra parte; la fertilización de la hembra es interna por medio de espermátóforos (Chester, 2013; Mansour et al., 2011) los cuales son producidos y liberados durante el cortejo por un complejo de glándulas conocidas como Kingsbury y ventrales, localizadas en el interior de la cloaca del macho (Maex et al., 2016; Uribe and Mejía-Roa, 2014).

El espermátóforo es una estructura generalmente de forma cónica que consiste en dos partes (Doyle et al., 2011), la primera es una base gelatinosa transparente, la cual tiene como función adherirse al sustrato y la segunda en una punta en forma de capuchón de color blanco que contiene un paquete de espermatozoides producidos anteriormente en los lóbulos de los testículos durante la espermatogénesis (Miltner and Armstrong, 1983; Uribe and Mejía-Roa, 2014). La cantidad y el tamaño de los espermátóforos que pueden liberar los machos de los diferentes géneros del orden Urodelo, varía ampliamente, relacionándose con la duración en su temporada de crianza (Halliday, 1998; Holt and Van Look, 2004), así como de tres características físicas: tamaño corporal, tamaño de los testículos o la edad (Halliday, 1998; Uribe and Mejía-Roa, 2014).

Los anfibios están clasificados actualmente en tres órdenes: Anura (ranas y sapos), Urodelo (salamandras y tritones) y Gymnophiona (cecilias) (Kumar & Simon, 2015; Parra-Olea et al., 2014). Esta clasificación está basada en características específicas de algunos aspectos de su morfología e historia natural. El orden Urodelo, en general son de cuerpo alargado, con cola larga y 2 pares de extremidades de tamaño similar (AmphibiaWeb, 2012; Kumar & Simon, 2015; Parra-Olea et al., 2013). Estas características en su anatomía pueden verse modificadas dependiendo su modo de vida, el cual puede ser acuático o terrestre. Por ejemplo,

en México los urodelos completamente acuáticos como los ajolotes del género *Ambystoma*, presentan cuerpos robustos y largos que alcanzan una longitud hocico-cloaca de hasta 34 cm, con una cola comprimida lateralmente (Amphibiaweb, 2017; Canseco Márquez et al., 2010). Las cuatro extremidades que poseen comienzan su desarrollo a partir de la tercera semana de edad (Kumar & Simon, 2015), las cuales cuentan con diferente cantidad de dedos, las dos extremidades anteriores poseen cuatro mientras que las dos posteriores poseen cinco (Mena and Servín, 2014). En su cabeza cuenta con tres pares de branquias, la cual les ayuda a respirar en el fondo del agua, también tienen pulmones por lo que asumen la capacidad de nadar hasta la superficie y tomar aire del exterior (Kumar & Simon, 2015; Mena and Servín, 2014). Los ajolotes adultos son carnívoros estrictos poseen un tracto gastrointestinal corto y simple, cuentan con una boca amplia, dentro de esta se encuentra el paladar con unas estructuras aserradas cartilaginosas que funcionan como dientes para sujetar a las presas para poder tragarlas (Kumar & Simon, 2015; Mena & Servín, 2014).

2. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

2.1 Taxonomía de *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798).

Reino: Animalia

Grupo de organismos con la capacidad de moverse, eucariotas, pluricelulares y heterótrofos

Filo: Chordata

Animales con notocorda presente durante el proceso embrionario, la cual es posteriormente sustituida por la columna vertebral ósea o cartilaginosa.

Subfilo: Vertebrata

Animales con presencia de un endoesqueleto, compuesto de varias vertebras dividido en tres regiones: cabeza, tronco y cola

Clase: Anfibia

Vertebrados anamniotas, tetrápodos, ectotérmicos, con respiración branquial durante la fase larvaria y pulmonar al alcanzar el estado adulto. Se compone de tres órdenes: Urodelos, Anuros y Gymnophiona

Orden: Urodelo

Anfibio de cuerpo alargado con cuatro extremidades del mismo tamaño y que poseen una cola bien desarrollada.

Sub-Orden: Salamandroidea

Aquí se incluyen las Salamandras verdaderas

Familia: Ambystomatidae

Animales con la característica de poseer una boca amplia. Es un Clado en el cual se compone 4 géneros divididos 34 especies endémicas de México y estados Unidos.

Género: *Ambystoma*

Este género está representado por 34 especies

Especie: *mexicanum*

Especie endémica de la cuenca de la Ciudad de México

Nombre común: Ajolote de Xochimilco

2.2. Importancia biológica.

Los anfibios son los primeros vertebrados que comenzaron a colonizar la vida terrestre (Catenazzi, 2015; Kumar and Simon, 2015), actualmente son descritos como especies indicadores de la calidad de vida en el planeta, esto debido a la delicada permeabilidad de su membrana epidérmica que es sensible a cualquier cambio medioambiental y patógeno (Catenazzi, 2015; Hayes et al., 2010). Estas características en su fisiología los convierte en una especie importante para señalar posibles amenazas en la naturaleza (Ananjeva et al., 2015; Hayes et al., 2010). Así mismo, los anfibios pueden ser Indicadores de éxito cuando se trata de llevar a cabo un proceso de restauración de algún ecosistema (Ken et al., 2016).

Así mismo, tienen un papel clave en la cadena alimenticia, debido a que constituyen un gran componente de la biomasa de vertebrados y pueden fungir como depredador de muchos organismos invertebrados, en muchos casos plagas de insectos lo cual es muy importante ya que se encargan de reducir la propagación de enfermedades y de mantener limpio el medio terrestre y acuático (Beja & Alcazar, 2003). También fungen como presas de animales como peces, aves, reptiles y pequeños mamíferos, ayudando de este modo en conjunto a sostener el delicado balance de la naturaleza (Angulo, 2016).

2.3. Descripción y presencia de especies.

Los anfibios en su conjunto colocan a México en el quinto país más diverso a nivel mundial, solo por debajo de países como Brasil, Colombia, Ecuador y Perú (Parra-Olea et al., 2014). Pero si hablamos del orden Urodela, México se encuentra colocado en el segundo lugar con 137 especies a nivel mundial, solo por debajo de Estados Unidos el cual cuenta con 189 especies (Amphibiaweb, 2017). Para el género *Ambystoma*, se conoce alrededor de treinta y cuatro especies en el mundo (Amphibiaweb, 2017), su distribución va desde algunas partes de América del Norte, el sur de Canadá y Alaska hasta el eje neo volcánico transversal de México (Ananjeva et al., 2015; Casas et al., 2013). De las treinta y cuatro especies de ajolotes descritas, dieciocho se encuentran en México y de estas, dieciséis son

endémicas del país (Parra-Olea et al., 2014), aunque algunos reportan que son diecisiete especies (Jiménez et al., 2017).

Para las especies presentes en el territorio mexicano su distribución se encuentra restringida a solo algunos lugares como son: la Ciudad de México, el Estado de México, Michoacán, Puebla, Tlaxcala y algunas zonas de Jalisco (Amphibiaweb, 2017). Los ajolotes que se encuentran ubicados en alguna categoría de riesgo son: el de Lerma (*A. lermaense*, Estado de México), de Xochimilco (*A. mexicanum*, CDMX), de cabeza chata (*A. amblycephalum*, Michoacán), de Anderson (*A. andersoni*, Michoacán), de piel fina (*A. bombypellum*, Estado de México), salamandra de Taylor (*A. taylori*, Puebla), ajolote de meseta (*A. velasci*, Puebla), ajolote de Pátzcuaro (*A. dumerilii*, Michoacán), Siredón de Leora (*A. leorae*, Puebla), y el ajolote granulada (*A. granulosum*, Estado de México) (Aguilar-Miguel, 2005).

2.4. Presencia de especies en cautiverio

Preservar el medio natural siempre será la mejor estrategia que podemos llevar a cabo para conservar la biodiversidad de fauna silvestre, desafortunadamente, en ocasiones preservar el medio natural no es una táctica posible. Afortunadamente existen estrategias complementarias para ayudar a estos problemas de pérdida en el número de individuos de una especie, una de estas estrategias es la crianza en cautiverio reconocido por la UICN (1987) como parte de los esfuerzos de conservación. La reproducción y crianza en cautiverio es una adecuada estrategia para conservar la diversidad de especies que se encuentren en alguna categoría de riesgo o en peligro de extinción, pues se ha demostrado que estos métodos han sido eficaces en varias especies de mamíferos (Ananjeva et al., 2015), hasta anfibios (Browne et al., 2011). La reproducción en cautiverio de ajolotes tiene un propósito principal que es la conservación de la especie, así mismo, pueden emplearse para varios objetivos alternos, uno de estos es para la venta legal de ejemplares debido a que actualmente se ha incrementado la demanda de estas especies (Jimenez et al., 2017; Zambrano, 2003). Con esto ayudaría a disminuir la venta ilegal en el mercado negro y/o la extracción de animales de su medio. Por otra

parte, se podría hacer uso de los ejemplares para proyectos de investigación en diferentes campos de la ciencia (Prieto et al., 2014). A pesar de que se han obtenido buenos resultados con estas estrategias de reproducción, actualmente el número de anfibios reproducidos y criados en cautiverio es relativamente mínimo (Ananjeva et al., 2015). Para el caso de las especies de ajolotes que actualmente se encuentran en proyecto de reproducción en cautiverio son las especies pertenecientes al estado de Michoacán, como: *A. dumerilli* endémico del lago de Pátzcuaro y *A. andersoni* endémico del lago Zacapu, el estado Puebla con: *A. velasci*, *A. leorae* y *A. taylori*, el Estado de México con: *A. lermaense* que habita en las Ciénegas de Lerma siendo restringida su distribución a esta área y la Ciudad de México con: *A. mexicanum* endémica del lago de Xochimilco, la cual es reproducida en el centro de Investigaciones biológicas y acuícolas de Cuernavaca (CIBAC). Estas especies de ajolotes que se encuentran en programas de reproducción tienen en común dos principales características, la primera; su distribución es restringida (endémicas) y la segunda; sus poblaciones en vida silvestre están sufriendo reducciones rápidamente (Zambrano et al., 2007) llegando a ser consideradas como especies en peligro de extinción (IUCN, 2018).

3. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA ESPECIE

3.1. Ciclo biológico

Actualmente no hay un consenso general entre los investigadores referente al ciclo reproductivo del ajolote macho de *A. mexicanum*, esto es debido a que aún hay poca información comparativa del patrón reproductivo de esta especie en diferentes épocas del año con animales mantenidos en condiciones de laboratorio. Los datos histológicos de testículos de ejemplares de *A. mexicanum* (obtenidos de vida silvestre) publicados hasta el momento, muestran que esta especie de ajolote tiene un ciclo de reproducción de octubre a marzo (Uribe and Mejía-Roa, 2014). Por otro lado, algunos investigadores mencionan que la reproducción en condiciones de laboratorio se puede obtener a lo largo de todo el año (Aguilar-Miguel, 2009; Eisthen and Krause, 2012), obteniéndose mejores resultados de enero a mayo y

reduciéndose este en los meses de agosto a octubre (Aguilar-Miguel, 2009) (datos no publicados).

El trabajo descrito por Uribe y Roa (2014), muestra que el ciclo espermatogénico de *A. mexicanum* se lleva a cabo en el testículo en dirección cefalocaudal, los testículos cuentan con varios lóbulos, los cuales aumentan en cantidad en relación con la edad del individuo. La espermatogénesis es de tipo quística, esta comienza cuando la célula en estado de espermatogonia se ve rodeada por una célula de Sertoli, las cuales forman la pared del quiste. El proceso de desarrollo de la espermatogonia hasta espermatozoide se lleva a cabo entre las estaciones de verano y otoño, en estos meses ocupan la mayoría de los lóbulos testiculares y solamente una pequeña área de la región cefálica del lóbulo, conteniendo espermatogonias y algunos quistes con espermocitos y espermátidas (Uribe and Roa, 2014). El almacenamiento de los espermatozoides se da durante varios meses en los testículos o en los conductos eferentes, llegando a darse la espermiación en primavera.

3.2. Biología reproductiva

La maduración sexual del Ajolote *A. mexicanum* se inicia alrededor del primer año, esta característica varía entre especies, la cual depende de las condiciones ambientales en las que estas evolucionaron. La etapa de maduración sexual es similar a todos los vertebrados, la cual se inicia con la activación del eje hipotálamo hipófisis gónada, responsable de todos los cambios y procesos reproductivos, desde el desarrollo de estructuras reproductivas primarias y secundarias durante la diferenciación y maduración sexual, esta activación del eje tiene otras funciones como es la producción de hormonas esteroides por parte de las gónadas, para que la espermatogénesis comience su ciclo (Tanaka and Moore, 2004).

Para diferenciar el sexo en *A. mexicanum*, depende en gran medida del tamaño de los labios cloacales (Amstrong et al., 1989; Harding et al., 2016) los cuales son visibles después del primer año de vida, sin embargo, en algunos individuos se puede presentar esta característica hasta el año y medio (Aguilar-Miguel., 2009; Amstrong et al., 1989; Zambrano et al., 2003;). En un macho reproductivamente

activo, se observa un crecimiento de los labios (ensanchamiento) (Amstrong et al., 1989). Esta peculiaridad en los machos es debido al desarrollo y crecimiento de los testículos, los cuales se ha relacionado con el aumento en el número de los lóbulos testiculares que son dependientes de la edad del animal (Uribe and Mejía-Roa, 2014; Uribe et al., 1994), así mismo, al desarrollo y activación de las glándulas productoras del espermátforo durante el cortejo (Janssenswillen et al., 2015; Maex et al., 2016; Uribe and Mejía-Roa, 2014; Vázquez, 2010). A diferencia de las hembras las cuales no muestran esta característica tan marcada (Vázquez, 2010). El tipo de fertilización en *A. mexicanum* es interna (Hall et al., 2016; Janssenswillen et al., 2015; Mansour et al., 2011; Vázquez, 2010; Zambrano, 2003), por medio de espermátforos, los cuales llevan encapsulados los espermatozoides, en una estructura conocida como capuchón (Chester, 2013; Edward & Zalisco, 1984; Jiménez et al., 2017; Russell et al., 1981; Server & Houck, 1985). El espermátforo es la estrategia de reproducción de muchas salamandras (Amstrong, 1989; Janssenswillen et al., 2015; Jimenez et al., 2015; Mansour et al., 2011; Miltner & Armstrong, 1983; Zambrano, 2003). La formación del espermátforo es producido por un complejo de glándulas localizadas en el interior de la cloaca del macho, activándose en el momento del cortejo (Hall et al., 2016). En ejemplares mantenidos en condiciones de laboratorio, el número de espermátforos liberados que se ha observado varía entre machos, obteniéndose desde 4 (Chester et al., 2013; Mansour et al., 2011) a 16 espermátforos por ejemplar (datos personales).

La liberación de los espermátforos es sobre las rocas en el medio acuático, para esto, primeramente, el macho libera feromonas las cuales se dispersan en el agua, y son captadas por los órganos quimiosensores de Jacobson de la hembra (Hall et al., 2016; Janssenswillen et al., 2015; Maex et al., 2016; Rivera et al., 2017). Después el macho realiza un largo cortejo sobre la hembra, el cual consiste en contacto tanto corporal como de ambas cloacas (Hall et al., 2016; Vázquez, 2010), lo que hace que se active las glándulas cloacales del macho para que comience la formación de los espermátforos. Después de que el macho liberó los espermátforos, la hembra se posiciona encima de ellos y lo succiona con sus labios cloacales guiándolo hasta la espermateca que es la estructura donde se liberan y

se almacenan los espermatozoides (Hall et al., 2016; Kumar and Simon, 2015; Vázquez, 2010; Zambrano, 2003). Dependiendo las condiciones ambientales, la hembra puede quedar fertilizada a las pocas horas, de lo contrario, tiene la capacidad de mantener almacenados y viables a los espermatozoides por un largo tiempo en la espermateca, hasta que las condiciones cambien y sean favorables para liberar los huevos (Vázquez, 2010).

3.3. Morfología y ultraestructura espermática de los Urodelos

La fisiología reproductiva de caudados se destaca por presentar fecundación de tipo interna. El macho introduce un espermatóforo, es decir, una masa o cápsula que contiene los espermatozoides, en la cloaca de la hembra que luego fecundarán a los óvulos. Los espermatozoides del género *Ambystoma* se encuentran en el espermatóforo de una forma agrupada con las cabezas en dirección hacia el interior y las colas al exterior (Mansour et al., 2011). La longitud cabeza-cola de los espermatozoides se encuentra en un promedio de 410 a 450 μm esta variación es dependiente de la especie (Watanabe, 1986). El espermatozoide cuenta con una zona acrosomal la cual contiene enzimas que ayudan a que se lleve a cabo la fertilización. La parte del cuello cuenta con mitocondrias las cuales son indispensables para la movilidad del flagelo y la cola está compuesta por una estructura de tubos llamada axonema (Watanabe and Onitake, 1986).

3.4. Glándulas de la cloaca del macho

Los machos poseen una serie de estructuras localizadas en el interior del tejido que compone la cloaca, estas estructuras son nombradas como glándulas cloacales y han sido bien estudiadas en varias familias de Urodelos (*Plethodontidae*, *Salamandridae*, *Ambystomatidae*) (Janssenswillen et al., 2015; Maex et al., 2016; Rupp and Sever, 2018; Sever, 1985; Sever, 1992; Sever and Siegel, 2015; Sever et al., 2016). Los machos albergan seis diferentes tipos de glándulas (Sever, 1992). Este tipo de glándulas sexuales se dividen en dos tipos: glándulas basófilas y glándulas eosinófilas (Hall et al., 2016). Las primeras incluyen las de Kingsbury y ventrales, estas últimas pueden dividirse en anteriores y posteriores. Para el caso

de las eosinofilas se dividen en pélvicas y las glándulas del cortejo productoras de feromonas. El papel de estas glándulas sobre la reproducción es muy importante (Hall et al., 2016; Janssenswillen et al., 2015; Maex et al., 2016). Algunas de sus funciones principales son la de liberar señales químicas (feromonas) al medio acuático para atraer a la hembra y propiciar el cortejo (Hall et al., 2016; Halliday, 1998; Maex et al., 2016; Sever, 1985), así mismo, son importantes en el momento y al final del cortejo, pues son las responsables de la formación y expulsión del espermátforo (Maex et al., 2016; Russell et al., 1981)

3.5. Feromonas en el cortejo

La comunicación química (feromonas sexuales) en algunas especies de salamandras constituyen un aspecto importante como una estrategia para la reproducción, estas sustancias han sido ampliamente estudiadas en algunas familias de salamandras (Salamandridae y Plethodontidae) (Houck et al., 2008; Wilburn et al., 2015), pues se sabe que tienen una función en el cortejo desde la evolución temprana de las salamandras (Janssenswillen et al., 2015). Una de las primeras feromonas sexuales que fueron descritas son los llamados Factores Precursores Parecidos a la Sodefrina (o SPF por sus siglas en inglés), la cual fue descubierto en la salamandra *Cynops pyrrhogaster* que es liberada una glándula que se encuentran localizada por debajo del mentón (Hall et al., 2016; Janssenswillen et al., 2015; Maex et al., 2016). Debido a la diversificación en las formas de reproducción en los Urodelos, se sabe que también hubo una diversificación en el sistema de feromonas, desde entonces se han identificado diferentes variantes (parálogos, ortólogos y homólogos) de la proteína Sodefrina (Janssenswillen et al., 2015; Maex et al., 2016), sin embargo, para la familia Ambystomatidae en especial en *Ambystoma mexicanum*, la caracterización de estas proteínas que participan en el cortejo está poco estudiada (Maex et al., 2016).

3.6. Formación y liberación del espermatóforo

El espermatóforo es importante en la reproducción de la mayoría de las salamandras pues es el vehículo para transferir los espermatozoides a la espermateca de la hembra y llevar a cabo la fertilización (Kumar and Simon., 2015; Russell et al., 1981). La morfología del espermatóforo se divide en dos partes, un capuchón en el cual están inmersos los espermatozoides y en una base gelatinosa que sirve para mantener elevado el capuchón del suelo y para anclarlo al sustrato (Doyle et al., 2011; Kumar and Simon, 2015). Las principales sustancias de las que está constituida el espermatóforo son sintetizadas por la glándula de Kingsbury que se localiza en el interior del tejido que compone la cloaca (Russell et al., 1981). Así mismo, la base está constituida por glucosaminoglicanos que son sintetizados y secretados por las glándulas ventrales posteriores (Halliday, 1998; Russell et al., 1981).

3.7. Estrategias de reproducción en cautiverio

Debido a la problemática en la que se encuentran varias especies del género *Ambystoma* en vida silvestre (Aguilar et al., 2009; Jimenez et al., 2017; Mendoza, 2012), actualmente se ha optado por reproducirlos en condiciones de laboratorio (Aguilar et al., 2009; Khattak et al., 2014; Jimenez et al., 2017). Para el caso específico de *A. mexicanum* se han planteado estrategias *ex situ*, las cuales garanticen actividad reproductiva todo el año y así poder obtener ejemplares para ser utilizados en varios objetivos (Aguilar et al., 2009; Mansour et al., 2011). Las estrategias que hasta el día de hoy se han ensayado experimentalmente son: Reproducción natural, este tipo de reproducción se realiza en los meses favorables inherentes a su reproducción. Reproducción mediante modificaciones ambientales artificiales fuera de su ciclo reproductivo, para este caso, las variables que se manipulan son; la temperatura (Amstrong et al., 1989; Chai, 2017) y el fotoperiodo (Chai, 2017), las cuales está más que demostrado que en anfibios es una parte importante para activar la reproducción. Otra de las estrategias que se utilizan es por medio de la selección de los reproductores, ya que se sabe que las hembras,

son poliestricas y poliespermicas y que conservan un alto sentido de selección sexual (Jimenez et al., 2017). Por último, se ha optado por reproducirlos mediante inducción hormonal con Hormona Coriónica Humana (hCG) (Jimenez, 2017; Mansour et al., 2011; Trottier and Armstrong, 1975), buscando activar el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada fuera de la época reproductiva (Aguilar et al., 2009; Jimenez et al., 2017; Kouba et al., 2009; Mansour et al., 2011) y activar con esto la esteroidogénesis, la conducta sexual y por consiguiente la espermatogénesis en machos y/o la ovulación en las hembras. Hasta ahora, los resultados obtenidos han sido variables, indicando que se necesitan mejoras en las técnicas empleadas, para un mejoramiento en los proyectos de conservación *ex situ* (Jimenez et al., 2017).

3.8. Obtención de gametos

Actualmente las técnicas de obtención de gametos (espermatozoides y óvulos) que se realizan en anfibios son altamente invasivas, pues la mayoría de los procesos requiere de matar al animal (macerado de testículo o conductos eferentes), esto es preocupante, debido a que la mayoría de las especies con las que se trabajan están en peligro de extinción, por lo cual se deben de implementar nuevas estrategias no invasivas para obtención de gametos (Chester, 2013; Hopkins and Herr, 2008; Shishova et al., 2011). Por otra parte, algunos de los métodos que se están tratando de llevar a cabo para obtener gametos de especies del género *Ambystoma*, es por medio de la administración de hormona Coriónica Humana (hCG) a diferentes concentraciones (Chester, 2013; Jimenez et al., 2017; Mansour et al., 2011; Trottier and Armstrong, 1975) y se han llevado a cabo tanto en machos como en hembras maduros sexualmente. Para el caso de los machos, se ha realizado con el objetivo de recuperar los espermatozoides procedentes de los túbulos eferentes por medio de masaje de la cloaca, los cuales son liberados del macho en forma de suspensión (Mansour et al., 2011), y también para obtener espermátóforos (Jimenez et al., 2017; Mansour et al., 2011; Ramirez, 2013). Por otra parte, esta técnica (Hormona-masaje) es utilizada en hembras, en las cuales se trata de estimular para dos propósitos principales: Obtener óvulos en distintas épocas del año y para sincronizar el cortejo con el macho y se lleve la reproducción.

4. ANTECEDENTES

En los últimos 20 años diferentes protocolos de criopreservación han sido realizados en varios laboratorios (Ohta et al., 2001) y “muchos de estos protocolos que se llevan a cabo actualmente se han modificado de los utilizados para criopreservar semen de peces” (Medina et al., 2005; Pinzón et al., 2005). Los resultados como lo muestra la tabla 1 son altamente variables en cuanto al tipo de crioprotector utilizado, la tasa de dilución que se realiza, indicando que la técnica de criopreservación depende de varios factores (Comizzoli et al., 2012) “sugiriendo que en la mayoría de los casos son necesarios ajustes especie-específicos a los protocolos existentes” (Comizzoli et al., 2012). “La elección del crioprotector y diluyente ha sido una cuestión de ensayo y error en la mayoría de las investigaciones, quizá porque aún no existe una explicación satisfactoria para la acción de estos sobre la célula espermática debido al desconocimiento de las características espermáticas” (Chester, 2013; Medina et al., 2005) En la tabla 1., se muestran las diferencias existentes en los protocolos de criopreservación de espermatozoides de algunas especies de anfibios, obsérvese que el tipo y concentración del crioprotector difieren en cada experimento, lo que indica que los protocolos deben ser específicos para cada especie. Por otra parte, en los resultados note la heterogeneidad en porcentaje de viabilidad y movilidad obtenidos por cada investigador, donde la movilidad más baja fue de 65.3% en *Rana Temporaria* y la viabilidad más alta observada fue de 81.2% para *Rana Silvatica*. Un dato que destacar es el trabajo de criopreservación realizado con *A. mexicanum* el cual fue realizado con el espermatóforo y no directamente en los espermatozoides, por lo cual no se sabe que efecto pudiese tener directamente si se congela el espermatozoide (Chester, 2013). Un punto importante que resaltar en la tabla de resultados son los diferentes métodos que usan los investigadores para evaluar si la célula sufrió algún daño en el proceso de criopreservación.

Tabla 1. Metodologías y procesos de criopreservación reportados

Espece	1.Diluyente+ crioprotector 2.Tasa de dilución	1.Osmolaridad 2.pH 3.Sistema de envasado	1.Tiempo de equilibrio 2. Vel. de enfriamiento	Condición de descongelación	Resultados	Referencia
* <i>Ambystoma mexicanum</i> (Ajolote Mexicano)	1. 10% sucrosa 1. SAR (Simplified Amphibian Ringer) 2. ND	1. 341 mOsmol/kg 1. 287 mOsmol/kg 2. ND 3. Cryo vial 1 ml	1. ND 2. ~24°C/min ~10°C/min vapores de NL Después por debajo de - 100°C	Después de 48hr. Se descongelaron los espermatoforos uno a la vez en baños de agua 25°C/5 min	64.7% Viabilidad	Chester, 2013
<i>Rana temporaria</i> (Rana bermeja)	1. ½ RS, 12% DMFA, 10% sucrosa 2. 1:1	1. ND 2. ND 3. Cryo vial 2ml	1. A 4°C/10 min 2. 10cm sobre vapores de NL ₂ por 5min Vel. de 5 a 7°C/min Después a NL ₂	Descongeladas en baños de 40°C/10 a 11 seg.	65.3% movilidad 72% Integridad membranal	Shishova, 2011
<i>Bufo Marinus</i> (Sapo gigante)	1. 1.15% DMSO + 10% sacarosa (w/v) 2. 1:2	1. 2928 mOsmol/kg ⁻¹ 2. ND 3. Pajillas de 0.25 ml	1. 2°C/10 min Enfriado a - 85° C usando un enfriador de velocidad controlada 1,3 cm en vapores de NL ₂ 2. Después en NL ₂	Descongelación en aire a 21 ° C.	Movilidad 68.9% Fertilidad 60.5%	Browne, 1998

* En *Ambystoma mexicanum* se criopreservaron espermatozoides dentro del espermátforo. **ND**= No determinado, **SB**= Suspensión Isotónica (104.4mM Na Cl, 2.0mM KCL, 6.1mM Na₂HPO₄, 1.0 KH₂PO₄; 230 mosmol/kg, pH 7.4), **FBS**= Suero Fetal Bovino, **SAR**= Simplified Amphibian Ringer (113.0 mM NaCl, 1 Mm).

Especie	1.Diluyente+ crioprotector 2.Tasa de dilución	1.Osmolaridad 2.pH 3.Sistema de envasado	1.Tiempo de equilibrio 2. Vel. de enfriamiento	Condición de descongelación	Resultados	Referencia
<i>Lithobates sylvaticus</i> (Rana de la madera)	1. Suspendidos en SB + 0.5 M DMSO + Suero Fetal Bovino (FBS) 2. Concentración final FBS 50% (v/v).	1.FBS (312 mOsmol/kg, 3.0–4.5 % protein; Sigma) 2. ND 3.Tubos de microcentrifuga de 0.5 ml	1.Incubadas en hielo durante 15 minutos Luego se congelaron a una temp. de equilibrio de -80 °C durante 1h en un ultracongelador 2. 130°C/min	Rápidamente en agua caliente hasta el punto de aguanieve y se mantuvieron en hielo hasta usarlo (sin diluir) ~45 min más tarde	81.2 % Viabilidad	Beesley,1998

CaCl₂, 2.0 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃; 220 mosmol kg⁻¹), **DMSO**= Dimetil Sulfoxido, **MIS**= Solución Salina Inhibidora de Movilidad (150 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCL, 1 mmol/L Mg₂SO₄, 1 mmol/L CaCl₂, 20 mmol/L Tris), **DMFA**= Dimetil formaldehido, **SR**= Solución Ringer (128 mmol/L NaCl, 1.0 mmol/L KCl, 1.6 mmol/L CaCl₂, 1.5 mmol/L NaHCO₃).

4.1. Crioprotectores y mecanismo de acción.

Los crioprotectores se clasifican en dos grupos, los que atraviesan la membrana celular y los que actúan desde el exterior de la célula (Herrera et al., 2005) y los que atraviesan las membranas, 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 post descongelación (Blanco et al., 2009); los crioprotectores más usados son: el glicerol, dimetilsulfóxido y dimetilacetamida (DMA)

DMA La N, N-Dimetilacetamida es un disolvente orgánico de carácter polar ampliamente utilizado en síntesis orgánica, a nivel de laboratorio como a nivel farmacéutico, así como en la industria textil en el hilado de fibras sintéticas y en la síntesis de pesticidas. Su fórmula química es CH₃CN(CH₃)₂. Punto de ebullición: 165 °C. Fórmula: C₄H₉NO. Soluble en agua (20 °C). 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 (SIGMA).

Consecuencias celulares de la criopreservación: Este proceso involucra la exposición del espermatozoide a temperaturas no fisiológicas que inducen cambios en diferentes dimensiones como lo son la organización lipídica membranal, la modificación cinética espermática y otras alteraciones que pudieran alterar la capacidad fertilizante del espermatozoide (Xia et al., 1988), el contenido intracelular permanece líquido por debajo del punto de congelación, con lo cual se establece una diferencia en el potencial químico del agua intra y extra celular, creándose una tendencia a que el agua salga de la célula a favor del gradiente osmótico. Si la velocidad de enfriamiento es lo suficientemente lenta, el agua sale de la célula y ésta se deshidrata progresivamente. Cuando la velocidad de enfriamiento es demasiado alta, el agua no puede moverse de la célula lo suficientemente rápido y hay un incremento en el grado de súper enfriamiento hasta que ocurre la congelación intracelular para restaurar el equilibrio (Otero-Muiño, s/f). Otro de los sucesos durante la criopreservación de espermatozoides que se detecta después de la descongelación es la redistribución de los carbohidratos membranales (Herrera et al., 2005).

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a que es limitada la base de datos sobre estudios morfológicos y de criopreservación en espermatozoides de anfibios del orden urodelo (Browne and Chester, 2011; Chester, 2013; Kouba et al., 2009, 2013),(Shishova et al., 2011; Sunny et al., 2014) por lo tanto; esta investigación contribuirá a obtener información básica de las características biológicas de los espermatozoides de los diferentes espermatóforos del ajolote *A. mexicanum*, con el fin de poder conseguir mejores resultados en el proceso de criopreservación, analizando posibles subpoblaciones de espermatozoides entre ellos.

En un futuro estos espermatozoides podrían ser empleados para fines de fertilización *in situ* o *ex situ* y enfocarlos en proyectos para aumentar la variabilidad genética en poblaciones naturales como en cautiverio (Shishova et al., 2011; Sunny et al., 2014), ya que es bien reconocido que poblaciones pequeñas o aisladas (por eventos antropogénicos) sufren un cuello de botella, reduciendo su variabilidad genética (Sunny et al., 2014), disminuyendo su potencial adaptativo, aumentando la probabilidad de extinción (Parra-Olea et al., 2012; Sunny et al., 2014).

Por otra parte, poder proveer de gametos a los laboratorios para su uso en inseminación artificial y/o fertilización *in vitro* (Mansour et al., 2011) y obtener ajolotes con fines de investigación en diferentes campos de la ciencia. Por lo anterior es importante realizar el estudio de la caracterización y criopreservación de los espermatozoides para esta especie en peligro de extinción y obtener información de cómo se comportan estas células ante el proceso de criopreservación y con esto conseguir experiencia para que en situaciones de emergencia se pueda aplicar este conocimiento tanto en esta especie como para otros urodelos que se encuentren en la misma situación de peligro (Gascon, 2007; IUCN, 2015), ya que se ha reconocido que factores como el calentamiento global y enfermedades causadas por hongos entre los más importantes, son la causa de la disminución de las poblaciones de anfibios a nivel mundial (Hayes et al., 2010).

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día se trabaja para la conservación del ajolote *Ambystoma mexicanum* en el lago de Xochimilco a través de múltiples programas, como son: el ecoturismo, restauración del hábitat, controlando las especies exóticas y generando refugios. A pesar de estos programas de conservación y de que actualmente el ajolote tiene la facilidad de poder criarse en cautiverio, las estadísticas indican que las poblaciones en vida silvestre siguen disminuyendo debido a que no es viable su reintroducción hasta que las amenazas en su hábitat sean erradicadas. Por lo tanto; es necesario contar en un futuro con gametos de esta especie de importancia tanto cultural, social y científica. Considerando lo anterior, y debido que se puede disponer de material biológico en cautiverio es que surge el siguiente planteamiento del problema para el presente estudio, en donde primeramente nos enfrentamos a la posibilidad de lograr extraer espermatozoides de buena calidad a partir de los espermatóforos (como un método nuevo y no invasivo) de ejemplares adultos mantenidos en condiciones de laboratorio, con la finalidad de poder realizar su evaluación. Posteriormente, poder establecer con éxito el primer protocolo de criopreservación para espermatozoides de Urodelos, para en una primera instancia, buscar mantener valores semejantes de calidad espermática a las encontradas en fresco y que esto nos permita en un futuro gestionar su incorporación a un banco de germoplasma certificado.

7. OBJETIVOS

7.1 General

-Determinar las características espermáticas de cada espermátóforo producido por diferente ejemplar de *A. mexicanum* y los posibles cambios que pueden ocurrir en los espermatozoides sometidos a criopreservación.

7.2 Específicos

-Determinar los parámetros morfométricos de los espermátóforos producidos por diferentes machos de *A. mexicanum* mantenidos bajo condiciones de laboratorio.

-Evaluar la calidad espermática básica de espermatozoides en fresco de los diferentes espermátóforos producidos por cada macho.

-Someter al proceso de criopreservación a los espermatozoides, mediante la aplicación de un protocolo reportado para anfibios.

-Determinar la calidad espermática de los diferentes espermátóforos producidos por cada macho después del proceso de criopreservación.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron los espermatozoides de cada espermátforo obtenidos de cada macho. Se analizaron parámetros de: concentración, viabilidad, integridad membranal y la morfología. Estas evaluaciones se determinaron en primera instancia para espermatozoides en fresco y después de descongelarlos. El número de muestras analizadas serán las obtenidas de 9 machos.

8.1. Material Biológico

Modelo animal: Para esta investigación se emplearon 9 ejemplares machos y 20 hembras de *A. mexicanum* sexualmente maduros (>1 Año), los cuales son reproducidos y mantenidos en cautiverio en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco (CIBAC), instancia dependiente de la UAM-Xochimilco, por lo tanto, no se requirieron permisos adicionales ante organizaciones gubernamentales ya que el CIBAC cuenta con ellos, por lo que tampoco se requirió la extracción de organismos de vida libre ni de su sacrificio. El cuidado y el bienestar de estos animales se apegaron a lineamientos del plan de manejo utilizado por el CIBAC.

8.2. Material de laboratorio

Reactivos químicos y soluciones: Agua destilada, Tinción eosina-nigrosina, Solución de lectina WGA (*Triticum vulgare* aglutinina) y PNA (*Arachis hypogaea*) conjugada a Isotiocianato de fluoresceína (FITC), DMA 0.5M al 6% (Dimetilacetamida) y nitrógeno líquido.

En el cuadro 1, muestran los componentes contenidos en la solución de NaOH al 20% y los cuadros 2 y 3 las soluciones utilizadas para la dilución y conservación de los espermatozoides respectivamente.

Cuadro 1. Composición y cantidad de la solución de NaOH al 20%

Componente	Concentración
NaOH (pureza 98%)	50 g
H ₂ O	250 ml

Cuadro 2. Composición de solución SAR

(Simplified Amphibian Ringer 220 mosmol kg⁻¹).

Componente	Concentración
NaCl	113.0 mM
CaCl ₂	1mM
KCl	2.0 mM
NaHCO ₃	3.6 mM

Cuadro 3. Composición de solución Ringer

Componente	Concentración
NaCl	128 mmol/L
KCl	1.0 mmol/L
CaCl ₂	1.6 mmol/L
NaHCO ₃	1.5 mmol/L

8.3. Métodos

8.3.1. Acondicionamiento de los ejemplares: Los ejemplares adultos tanto machos como hembras se mantuvieron en un sistema de recirculación de agua, el cual cuenta con filtros mecánicos que limpian el agua y una bomba (2301/h 0.60m) que la recircula y la recicla. Este sistema de recirculación contiene 10 contenedores de plástico (31 x 48 x 28cm) de 60L litros de capacidad, llenados al 70% con agua declorada a una temperatura entre 16 y 17°C la cual se controló mediante un enfriador de agua programable (Resum Acuarium Cooler, Modelo CL 600). Se colocó un ejemplar macho por contenedor y en los cuatro contenedores restantes se instalaron las hembras, por lo cual se mantuvieron siempre aislados. Los ejemplares se alimentaron con gusano de fango (*Tubifex tubifex*) que es la dieta utilizada por el CIBAC, suministrándoles el alimento cada tercer día (Mena and Servín, 2014).

8.3.2. Morfometría de los ejemplares: Para cada uno de los 9 ejemplares utilizados en el ensayo se midieron las características morfométricas. Para el peso se utilizó una balanza analítica electrónica, en el caso de la talla se realizó con una regla plástica y la medición de las cloacas se llevó a cabo con un vernier digital. Estos datos morfométricos se utilizaron para relacionarlos con variables como: cantidad de espermatozoides y tamaño de los espermatozoides.

8.3.3. Obtención de espermatozoides: Se realizaron ensayos para la obtención de espermatozoides en los meses de marzo a noviembre, los cuales la literatura indica que son los meses donde cesa la reproducción del ajolote *A. mexicanum*. Para llevar a cabo estos ensayos se utilizaron 12 machos y 20 hembras. Se dividieron en 4 lotes (3 machos y 3 hembras), se estimuló el cortejo mediante la manipulación de la temperatura y la rotación de las hembras. Las temperaturas utilizadas fueron 18, 17, 16 y 14°C. Para llevar a cabo estos ensayos, se utilizó un contenedor de cristal (240 x 70 x 60cm), la cual se dividió en tres partes con malla plástica, se colocaron parejas (1 macho y 1 hembra) una en cada división. El contenedor se acondicionó con arena y rocas de río y se mantuvo con burbujeo de aire constante, la temperatura se manipuló de 18 a 14°C (de 1800 a las 0800 h) con la ayuda de un

enfriador de agua programable (Resum Aquarium Cooler, Modelo CL 600), para provocar el cortejo y con esto la estimulación del macho para la producción de espermátóforos. Se realizaron observaciones diariamente (0800) en el fondo del contenedor para cerciorarse de la presencia de espermátóforos. Los espermátóforos liberados, primeramente, se colectaron de las rocas y después se midieron uno por uno, posterior a eso se colocaron en un tubo falcón de 15ml al cual se le añadió agua del contenedor, a continuación, se depositó el tubo en una hielera y con la ayuda de gel refrigerante se mantuvo a una temperatura de entre 4 y 6°C hasta la extracción de los espermatozoides. Después de la extracción de los espermatozoides, estos se colocaron en tubos Eppendorf de 250ml, se etiquetaron y se guardaron en la hielera con gel refrigerante para su transportación al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM Xochimilco donde se llevó a cabo su análisis y criopreservación. La distancia entre el CIBAC y la UAMX es de aproximadamente 30 min, por lo cual es un tiempo que se considera que los espermatozoides no sufren daño, considerando que estos se mantienen por varias horas en el agua (1 a 5 horas aprox.) antes de que la hembra los introduzca en su espermateca y/o comience su desintegración.

8.3.4. Obtención de espermatozoides: Con la ayuda de una caja Nunc^{MR} de 4 pozos, en el primero se lavó cada uno de los espermátóforos con medio SAR (Simplified Amphibian Ringer (113.0 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 2.0 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃; 220 mosmol kg⁻¹) para eliminar residuos de materia orgánica que este unida a los espermátóforos, en el segundo pozo se procedió a retirar el material gelatinoso (glucoproteínas), y con esto obtener el capuchón en el cual se encuentran los espermatozoides. Posteriormente; ya teniendo el capuchón aislado, se extrajeron los espermatozoides empleando un nuevo método, incorporando a este la metodología utilizada por Sato et al. (2004), aplicando una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 20%, al cual se le modificó el tiempo de humedecimiento del espermátóforo dentro del NaOH de 60 a 10 min. Para esto primero, en un tubo Eppendorf de 1ml se le añadió 0.5 ml de solución de Hidróxido de Sodio al 20%, posteriormente se sumergió el capuchón por un tiempo de 10 min. a una temperatura entre 16 y 18°C, esto ayudo a que los espermatozoides se

disociaran del espermátóforo, (pues se sabe que el NaOH es un fuerte quelante de proteínas) pasado ese tiempo el espermátóforo se retiró del NaOH y se colocó en una bolsa plástica de 2cm conteniendo 200 µL de solución SAR, a continuación, se maceró mediante compresión del espermátóforo para lograr la separación definitiva de los espermatozoides. Finalmente, con la ayuda de una micropipeta se recuperó la suspensión y se filtraron en un tubo Eppendorf de 250ml al cual se le modificó para que funcionara como tamiz (se perforó la tapa y se le colocó un fragmento de 1.5 x 1.5cm de malla de 75 micras). Se añadieron 200 µL más de solución SAR para filtrar todos los espermatozoides, obteniéndose la cantidad total de 400 µL de suspensión. Por último, se llevó a cabo la evaluación de los parámetros de calidad espermática y la criopreservación.

8.3.5. Evaluación de calidad espermática

Concentración: Se evaluó el número de espermatozoides de cada espermátóforo obtenido de cada macho el promedio con el uso de la cámara Neubauer® el cual es un portaobjeto de microscopio que cuenta con cámaras numeradas con precisión. Se realizaron diluciones de las muestras con medio SAR dependiendo de un cálculo visual preliminar de la concentración de los espermatozoides mediante observación microscópica. La cámara se llenó con alícuotas de 10 µl de la suspensión de espermatozoides y el recuento se llevó a cabo usando un microscopio óptico a 400X. Con ayuda de esta ecuación se estableció la concentración de espermatozoides/ml.

$$E = \frac{E}{S \cdot A \cdot D} \cdot 1000$$

Esp = Número de espermatozoides / mm³

E = Número de espermatozoides contados

S = Superficie empleada en mm³

A = Altura de la cámara

D = Grado de dilución

Viabilidad: Para determinar el número de espermatozoides vivos, se realizó una tinción de eosina-nigrosina mediante un frotis, posteriormente se dejó secar durante 5 minutos y por último se observó al microscopio óptico. Los espermatozoides que perdieron la integridad de la membrana (muertos) se permearon por el colorante y se tiñeron rojo-rosa de forma parcial o total. El procedimiento consistió en mezclar 1:1 muestra con espermatozoides y eosina-nigrosina en un portaobjeto, se realizó el frotis y por último se observó en el microscopio óptico a 400X. Se efectuó el recuento de 100 espermatozoides y el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos).

La viabilidad de los espermatozoides determinada con la tinción de eosina-nigrosina, mostró características específicas de los espermatozoides como la presencia de membrana ondulante, cabeza alargada y un flagelo prominente, así también cierta dificultad para establecer límites de la pieza media. Los espermatozoides vivos se observan más claros (Figura. 1A), mientras que los muertos se encuentran teñidos (Figura. 1B).



Figura 1. Espermatozoides de *A. mexicanum*. A) Vivos y B) muertos.
(Eosina-Nigrosina; x400).

Morfología: Para estimar el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y anormal, se realizó un conteo de 100 espermatozoides y de estos, se anotó el número de células vivas sin anomalías en cabeza, cuello y cola. Al no haber un catálogo de anomalías publicado para *A. mexicanum*, por lo tanto, se tomó como referencia fotografías que se fueron registrando bajo la referencia de un espermatozoide normal publicado por Watanabe (2004). Esta evaluación se realizó bajo el microscopio óptico a 400X con la misma tinción de eosina-nigrosina que se manejó para la determinación de vivos y muertos. Se registró este parámetro con la finalidad de contar con criterios de calidad espermática para cada muestra analizada.

8.3.6. Distribución de carbohidratos membranales (β -galactosa y N-Acetilglucosamina).

Se evaluó la integridad membranal en espermatozoides fresco y descongelados, con la finalidad de evaluar si hubo modificaciones en los patrones de distribución por efecto de la criopreservación. Estas lectinas se enlazan de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Por tanto, van a ser capaces de reconocer de forma selectiva determinadas secuencias oligosacáridicas que forman parte de las glucoproteínas de la membrana de los espermatozoides y que, potencialmente, van a intervenir en el reconocimiento primario del ovocito. Se contabilizaron 100 espermatozoides por muestra de cada lectina empleada y se calculó el respectivo porcentaje de cada patrón encontrado y de este porcentaje se obtuvo la proporción.

WGA (*Triticum vulgaris aglutinina*): Esta lectina fue preparada en una solución stock la cual se preparó en un tubo Eppendorf de 0.25 ml colocando un volumen final de 100 μ l el cual estuvo conformado de 90 μ l de la solución conteniendo los espermatozoides y 10 μ l de solución de lectina WGA conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC), se protegió de la luz y se almacenó a -4°C. Para evaluar la integridad membranal, a cada solución de espermatozoides de 100 μ l, se le añadió 0.10 μ l de la solución stock de lectina y fue incubada al menos por 10 min en obscuridad absoluta a temperatura ambiente y posteriormente los espermatozoides se centrifugaron por 5 minutos. Finalmente se retiró el excedente, dejando

únicamente el botón, el cual se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos para eliminar el exceso de tinción, y se fijaron en etanol puro. Posteriormente 20 μ l fueron depositados en un portaobjetos limpio y cubierto con un cubreobjetos para facilitar su evaluación. La evaluación fue realizada bajo un objetivo de x 40 a un aumento de 1000X utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon, se determinó la estructura membranal, por medio de la fluorescencia completa o incompleta de la membrana.

PNA (*Arachis hypogaea*): Esta lectina fue preparada en una solución stock la cual se preparó en un tubo Eppendorf de 0.25 ml colocando un volumen final de 100 μ l el cual estuvo conformado de 90 μ l de la solución conteniendo los espermatozoides y 10 μ l de solución de lectina PNA conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC), se protegió de la luz y se almaceno a -4°C. Para evaluar la integridad membranal, a cada solución de espermatozoides de 100 μ l, se le añadió 0.10 μ l de la solución stock de lectina y fue encubada al menos por 10 min en obscuridad absoluta a temperatura ambiente y posteriormente los espermatozoides se centrifugaron por 5 minutos. Finalmente se retiró el excedente, dejando únicamente el botón, el cual se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos para eliminar el exceso de tinción, y se fijaron en etanol puro. Posteriormente 20 μ l fueron depositados en un portaobjetos limpio y cubierto con un cubreobjetos para facilitar su evaluación. La evaluación fue realizada bajo un objetivo 40 X a un aumento de 100 X utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon, se determinó la estructura membranal, por medio de la fluorescencia completa o incompleta de la membrana.

8.3.7. Criopreservación espermática

Se criopreservaron por separado alícuotas de los espermatozoides de cada espermatóforo, el volumen final fue de 212 μ l, utilizando como principal crioprotector penetrante DMA al 6%. Para esto, al tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía 200 μ l de suspensión de los espermatozoides se le agregó la cantidad de 12 μ l de crioprotector DMA, se mezcló para homogeneizar la muestra e inmediatamente se colocó en pajillas de 250 μ l y se etiquetaron, se mantuvieron en hielo a una

temperatura de 4°C por 10 minutos y posteriormente se colocaron en canastillas para poder comenzar con la criopreservación. Primeramente, se colocaron en vapores de nitrógeno líquido, descendiendo en una congelación lenta de 5cm por cada 10 minutos, por último, se sumergieron en nitrógeno líquido a -196°C y se almacenaron hasta el momento de su evaluación. Para la descongelación de los espermatozoides se utilizarán baños de agua a una temperatura similar a la cual los espermátóforos se mantienen dentro del agua (10 a 14°C) por 5 min, ya que se ha sugerido como una clave para que se evite el proceso de recristalización en el interior de las células. Inmediatamente después de la descongelación se procederá a realizar una nueva evaluación de la calidad de los espermatozoides criopreservados, considerando las mismas pruebas a las que se sometieron los espermatozoides en fresco.

8.3.8. Análisis estadístico

De los parámetros obtenidos, se presenta una descripción que incluye los promedios generales y el intervalo de los parámetros obtenidos. Los datos obtenidos de la evaluación de la calidad espermática y criopreservación se expresaron en promedio \pm error estándar (EE). Para reconocer las diferencias significativas de calidad espermática entre individuos se utilizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) y la prueba test de Tukey. También, se determinó mediante una prueba de correlación de Pearson las variables morfométricas de los ejemplares.

9. RESULTADOS

9.1 Caracterización morfométrica de los ejemplares

Los 9 ejemplares machos utilizados en este trabajo fueron pesados y medidos tanto en la longitud hocico cola (LHC), así como la longitud de la cloaca (LC), estas mediciones morfométricas se llevaron a cabo de enero a abril de 2018. No hubo diferencia significativa en la LHC obteniéndose un promedio de 23.8 ± 0.35 cm, en cuanto al tamaño de la cloaca se encontró una variación, obteniéndose un intervalo de 0.9 mm como mínimo y un máximo de 2 cm. Para la variable peso (P) se percibió un intervalo de 92 g como mínimo y un máximo de 172 g (Cuadro1).

Cuadro 1. Parámetros morfométricos de los ejemplares
(Datos registrados de enero a abril de 2018) n= 9.

EJEMPLAR #	PESO (g)	LONGITUD CORPORAL (cm)	LONGITUD CLOACA (cm)
	X Intervalo	X Intervalo	X Intervalo
1	119 119-121	22 22-22.5	2.0
2	101 100-102	24 24-25	1.8
3	105 103-107	25 25-26.5	1.5
4	96 93-99	22 22-24	1.5
5	100 99-102	23 22-27	1.3
6	172 171-174	23 23-24	1
7	92 90-92	23	0.9
8	159 155-163	21 21-22	1.3
9	140 137-145	25	1.2
X Intervalo	123.5 96-172	23.5 21-25	1.3 0.9-2.0

9.2 Caracterización morfométrica de los espermatozoides

Los datos fueron recopilados de 61 espermatozoides que fueron liberados de los 9 ejemplares de *A. mexicanum*. Se registró el promedio de la longitud total (LT) del espermatozoides, así como la longitud del capuchón (LC) espermático. Los datos mostrados en el cuadro 2 indican la longitud promedio de los espermatozoides que liberó cada ejemplar. Analizados los resultados se observa una amplia variación intra e interindividual en los tamaños de los espermatozoides tanto en la LT como en LC.

Cuadro 2. Características morfométricas de los espermatozoides liberados por 9 ejemplares de *A. mexicanum* mantenidos en condiciones de laboratorio.

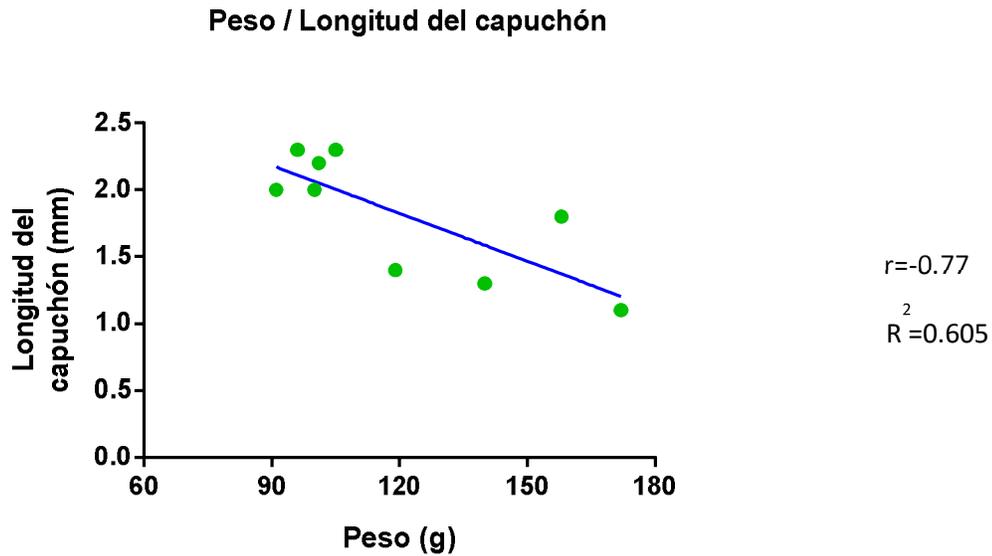
	LONGITUD TOTAL (mm)	LONGITUD CAPUCHÓN (mm)
Espermatozoides n=	X Intervalo	X Intervalo
12	8.9 6-12	1.4 0.5-3.0
10	11.1 9-15	2.2 0.7-4.0
10	10.5 8-15	2.3 1.0-4.0
8	11.4 8-15	2.3 0.5-4.0
6	10.0 8-15	2.3 1.0-4.0
4	8.0 6-10	1.1 0.5-2.0
4	7.5 7-9	2.0 1.0-3.0
4	10.8 9-12	1.8 1.0-3.0
3	9.7 9-10	1.3 0.5-2.0
X Intervalo	10 7.5-11.4	2 1.1-2.3

9.3. Relación morfométrica de los ejemplares vs espermátóforos.

Los ejemplares analizados en este estudio se sometieron a un análisis de correlación para observar si las características morfométricas de los espermátóforos liberados por los machos pueden ser dependientes a primera instancia de los rasgos fenotípicos de los organismos. En el cuadro 3 muestra las correlaciones que se analizaron: (LT vs lt, lc) (P vs lt, lc) (C vs lt, lc). Se logró determinar que las características de los ejemplares, solo en algunos casos se correlacionaron en diferente grado. Para el caso de la LT no se observó correlación para ninguna de las dos características de los espermátóforos ($r= 0.0$), por otra parte, el tamaño de la C mostró una correlación ligera tanto para la lt y lc ($r= 0.4$ y 0.2). En la gráfica 1, se destaca que cuando una correlación negativa para P vs lt ($r=-0.21$), alcanzando un valor más alto para la correlación con lc ($r=-0.77$).

Cuadro 3. Se muestran los parámetros morfométricos: Longitud total (LT), peso (P) y tamaño de la cloaca (C) de 9 ejemplares de *A. mexicanum* mantenidos en condiciones de laboratorio, y sus correlaciones sobre las características morfométrías de los espermátóforos: longitud total del espermátóforo (lt) y la longitud del capuchón espermático (lc), (LT vs lt, lc) (P vs lt, lc) (C vs lt, lc). $P<0.05$.

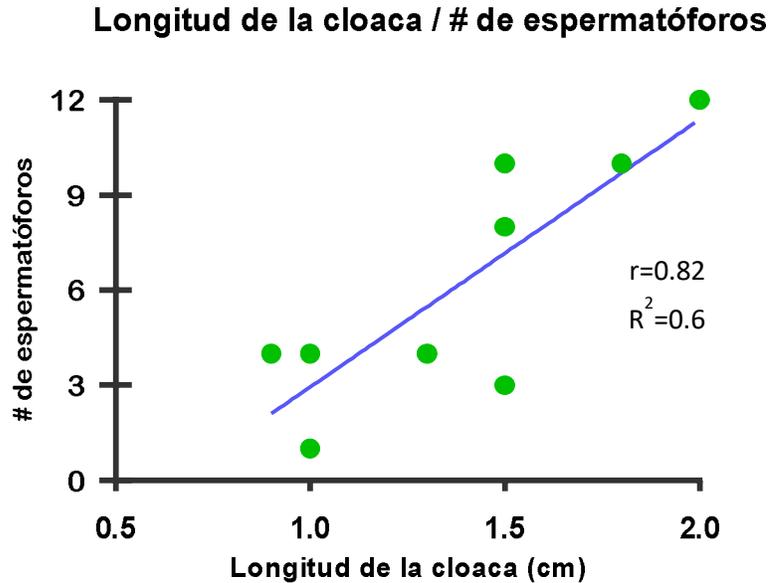
	Longitud total (lt)		Longitud capuchón (lc)	
	r	p	r	p
LONGITUD EJEMPLAR (LT)	0.0	0.44	0.0	0.41
PESO (P)	-0.21	0.59	-0.77	0.01
LONGITUD CLOACA (C)	0.4	0.25	0.2	0.57



Grafica 1. Correlación longitud del capuchón (n=61) - Peso de los ejemplares (n=9). Donde se observa que cuando el peso aumenta la longitud del capuchón disminuye.

9.4. Relación del tamaño de la cloaca y la cantidad de espermatozoides liberados

Se realizó un análisis de correlación con datos obtenidos en este estudio como son la longitud de la cloaca y la cantidad de espermatozoides liberados por cada ejemplar. Tomando en cuenta lo anterior se puede apreciar que, con el incremento en la longitud de la cloaca, el número de espermatozoides liberados fue aumentando y viceversa a menor número de espermatozoides liberados, menor es la longitud de la cloaca (Gráfica 2). Se obtuvo una correlación fuerte de $r=0.82$.



Gráfica 2. Se observa una correlación y regresión lineal positiva ($r=0.82$) entre la longitud de la cloaca y el número de espermatozoides liberados de 9 ejemplares de *A. mexicanum* mantenidos en condiciones de laboratorio. La relación que representa la gráfica es que, a mayor longitud de la cloaca, hay un aumento en el número de espermatozoides liberados.

9.5 Parámetros morfométricos de espermatozoides de diferente espermatozoides.

Se observó que los espermatozoides obtenidos de liberaciones con mayor número de espermatozoides son más largos ($P<0.05$) en comparación con los obtenidos de liberaciones con menor número de espermatozoides (Cuadro 4).

Cuadro 4. Se muestran los parámetros morfométricos de los espermatozoides obtenidos de liberación con diferente número de espermátóforos de 3 ejemplares de *A. mexicanum* mantenidos en condiciones de laboratorio.

Número total de espermátóforos de diferente			
MEDICIÓN n=	4	8	12
Longitud Total ($\mu\mu$)	413.5 \pm 34.3 ^a	445.0 \pm 13.4 ^a	468.6 \pm 6.2 ^b
Longitud Cabeza ($\mu\mu$)	111.4 \pm 9.4 ^a	118.4 \pm 3.9 ^a	127.9 \pm 3.7 ^b
Longitud Cuello ($\mu\mu$)	13.4 \pm 1.0 ^a	13.17 \pm 0.7 ^a	17.42 \pm 1.6 ^b

Diferente literal entre columna indica diferencia estadística ($P < 0.05$).

9.6 Parámetros de evaluación espermática básica diferente espermátóforo.

Se determinó la calidad de los espermatozoides evaluando los parámetros de viabilidad, concentración y morfología en muestras en fresco. En el cuadro 5 se muestra el número de espermátóforos por ejemplar que fueron analizados, obteniéndose los promedios \pm ee de cada uno de los parámetros que conforman el análisis.

En el cuadro 5 se describen los promedios de viabilidad obtenidos en las muestras. En semen fresco, la cantidad de espermatozoides vivos se situaron en un intervalo de 79.25 ± 9.41 como mínimo y un máximo de 98.33 ± 1.66 , situándose la mayoría de las muestras analizadas entre un 80%. El conteo de células morfológicamente normales se hizo en relación con la forma de la cabeza, cuello y flagelo. En la figura 2 se observa un espermatozoide normal con las características definidas como lo describe Watanabe en (2004). El promedio obtenido de morfología normal en fresco estuvo en un intervalo de 95.00 ± 3.44 como mínimo y un máximo de 99.50 ± 0.50 dando un promedio de todas las muestras de 97.89 ± 0.53 .

Cuadro 5. Parámetros espermáticos en semen fresco: viabilidad, concentración y morfología normal de muestras obtenidas por cada uno de los ejemplares de *A. mexicanum*.

# ejemplar	# espermátóforos	% VIVOS	CONCENTRACION X 10 ⁴ / μL	% MORFOLOGIA NORMAL
		X ± EE Rango	X ± EE Rango	X ± EE Rango
1	12	86.83 ± 2.48 70 - 100	2.1 ± 4.3 1.0 - 5.0	96.58 ± 1.27 85 - 100
2	10	93.00 ± 2.40 79 - 100	2.6 ± 5.4 1.0 - 6.0	98.80 ± 0.67 94 - 100
3	10	93.10 ± 1.99 82 - 100	2.7 ± 4.4 1.0 - 5.0	98.40 ± 0.79 92 - 100
4	8	88.25 ± 6.25 56 - 100	2.9 ± 8.5 1.0 - 7.0	98.38 ± 0.67 95 - 100
5	6	89.44 ± 1.73 96 - 100	2.8 ± 9.4 2.0 - 7.0	99.50 ± 0.50 96 - 100
6	4	88.50 ± 4.34 76 - 96	1.3 ± 5.6 4 - 3.0	96.25 ± 1.25 93 - 99
7	4	89.00 ± 4.34 79 - 100	1.8 ± 3.1 1.0 - 2.5	95.00 ± 3.44 85 - 100
8	4	79.25 ± 9.41 58 - 100	2.2 ± 7.5 1.0 - 4.0	99.50 ± 0.50 98 - 100
9	3	98.33 ± 1.66 95 - 100	1.4 ± 5.3 4 - 2.0	98.67 ± 0.88 97 - 100
	X ± EE Rango	89.44 ± 1.73 79-100	2.6 ± .5 .4 - 7.0	97.89 ± 0.53 95-100

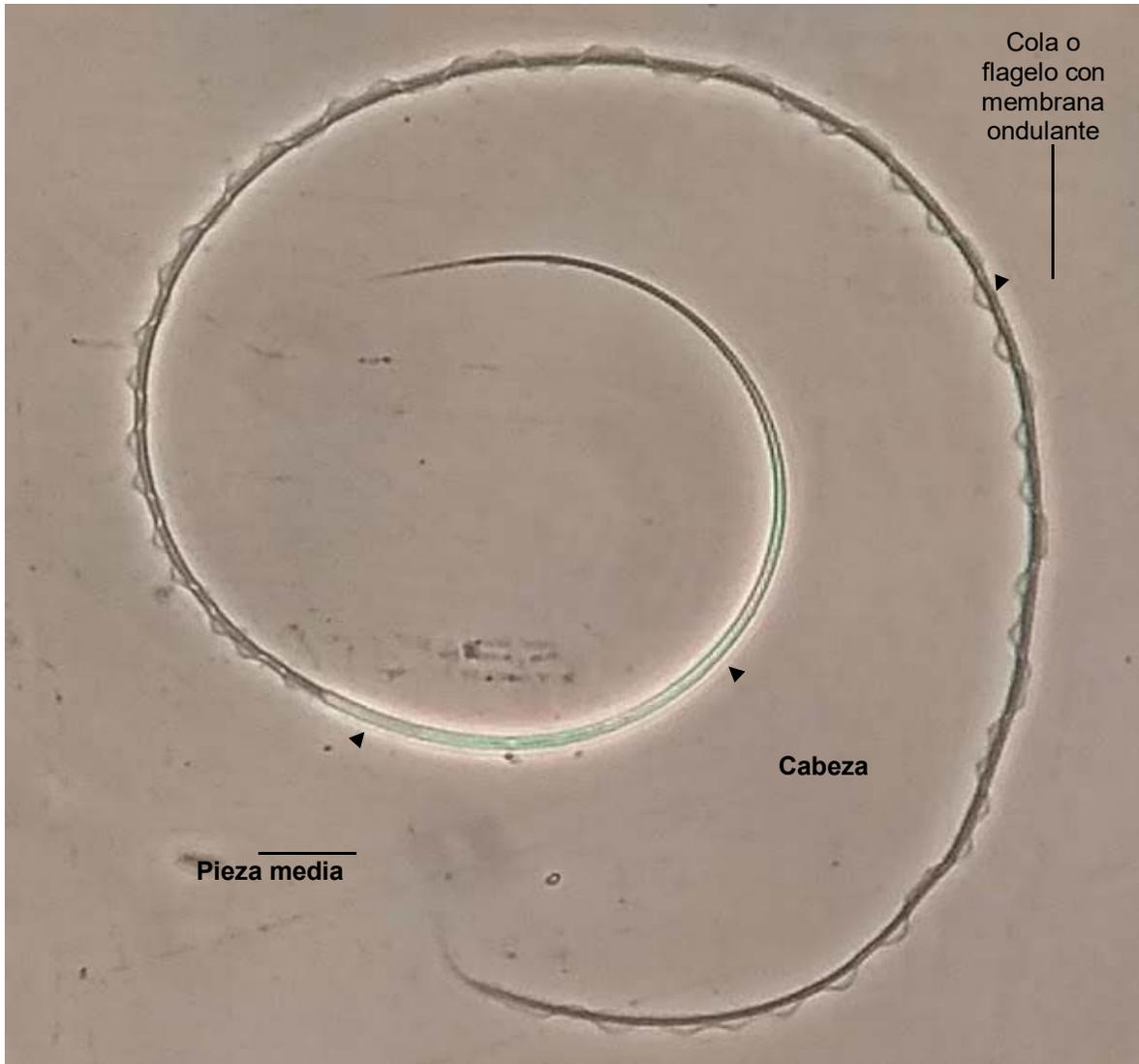


Figura 2. Espermatozoide normal de *A. mexicanum*. En el cual se puede observar las tres partes principales que lo conforman (cabeza, cuello y flagelo) Nótese en particular la membrana ondulante que se encuentra en toda la longitud del flagelo, característica muy peculiar y única en Urodelos. (Sin tinción; 400X).

9.7. Parámetros espermáticos post descongelación.

En el cuadro 6, se presentan los porcentajes espermatozoides vivos y con morfología normal después de descongelación. El porcentaje de espermatozoides vivos en semen descongelado presentó un intervalo de 45.25 ± 12.60 como mínimo y un máximo de 67.67 ± 4.20 , situándose la mayoría de las muestras analizadas entre un 50 y 60%. Con respecto a los porcentajes de morfología normal después de la descongelación se situaron en un intervalo de 77.50 ± 7.18 como mínimo hasta un máximo de 90.30 ± 2.08 , situándose la mayoría de las muestras en un 85%.

Cuadro 6. Porcentajes de espermatozoides vivos y con morfología normal de *A. mexicanum*, post descongelación.

# de espermátóforos	% VIVOS	% CON MORFOLOGIA NORMAL
	Promedio \pm EE Intervalo	Promedio \pm EE Intervalo
12	54.58 ± 4.23 30-80	78.75 ± 2.58 70-92
10	62.10 ± 4.63 39-85	82.90 ± 3.39 63-94
10	61.20 ± 2.86 50-80	90.30 ± 2.08 78-100
8	59.75 ± 5.96 30-80	82.63 ± 3.64 65-93
6	67.67 ± 4.20 40-76	79.17 ± 3.48 73-94
4	57.50 ± 6.91 42-75	84.25 ± 4.36 75-96
4	59.00 ± 5.11 50-73	87.00 ± 2.85 79-92
4	45.25 ± 12.60 15-74	77.50 ± 7.18 60-92
3	56.67 ± 6.00 45-65	86.33 ± 4.66 79-95
Promedio \pm EE Intervalo	58.22 ± 2.00 67-45	83.22 ± 1.35 90-78

9.8. Presencia y distribución de carbohidratos membranales.

La intensidad de la fluorescencia que emitió la lectina PNA asociada a FITC sobre la membrana del espermatozoide se designaron en patrones A (intenso) y B (ligero) dejando ver los bordes bien definidos en cabeza, cuello y flagelo (figura 3), esto debido a los residuos glicosídicos de β -galactosa que están presentes en la membrana del espermatozoide de *A. mexicanum* y que reconoce la lectina PNA. Las proporciones obtenidas de cada uno de los patrones se presentan en el cuadro 7, en donde se observa la frecuencia del patrón A en fresco, los cuales se situaron en un intervalo de 41.25 ± 4.27 como mínimo y 55.63 ± 4.76 como máximo, para en caso de las muestras descongeladas se observó un promedio de 36.25 ± 6.25 como mínimo y 57.50 ± 6.61 como máximo. Por otra parte, el patrón B en fresco se situó en un promedio de 45.63 ± 5.29 , hasta un 61.25 ± 4.2 , y para las muestras descongeladas de 42.50 ± 6.61 hasta 63.75 ± 6.25 .

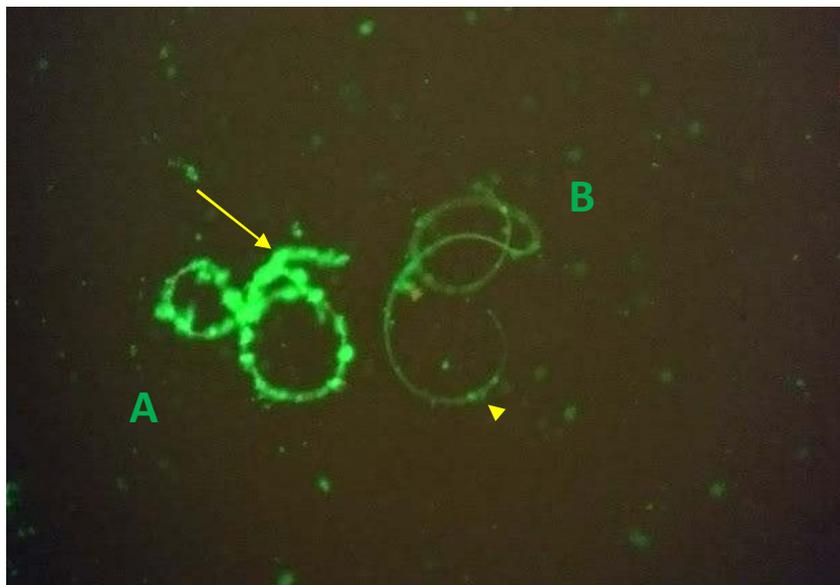


Figura. 3. Patrones de fluorescencia en espermatozoide con lectina PNA-FITC. En la imagen se reconoce el patrón **A** bien definido en gran parte de la membrana del espermatozoide, en el cual se observa mayor intensidad de fluorescencia con mayor intensidad en la parte de la cabeza (flecha amarilla) a diferencia del **B**, dicha proporción de patrones entre frescos y descongelados se puede observar en el cuadro 8. Fotografías tomadas con microscopio de epifluorescencia. (400X).

Cuadro 7. Valores promedio para el número de espermatozoides que presentan los diferentes patrones de fluorescencia (A, B), registrados mediante el marcaje con lectina PNA-FITC en la membrana plasmática. En la tabla se muestran los datos obtenidos de cada ejemplar.

	A	A	B	B
	FRESCO	DESCONGELADOS	FRESCO	DESCONGELADOS
# DE ESPERMATÓFOROS	Promedio ± EE	Promedio ± EE	Promedio ± EE	Promedio ± EE
12	45.83 ± 3.18	50.83 ± 6.93	54.17 ± 3.18	50.00 ± 7.04
10	44.00 ± 3.48	46.00 ± 3.48	58.50 ± 3.87	54.00 ± 3.48
10	52.50 ± 4.03	56.50 ± 6.58	47.50 ± 4.03	43.50 ± 6.58
8	55.63 ± 4.76	55.00 ± 8.50	45.63 ± 5.29	46.25 ± 8.17
6	52.50 ± 3.59	56.67 ± 9.54	47.50 ± 3.59	43.33 ± 9.54
4	48.75 ± 7.73	57.50 ± 6.61	61.25 ± 4.27	42.50 ± 6.61
4	41.25 ± 4.27	55.00 ± 6.45	58.75 ± 4.27	45.00 ± 6.45
4	45.00 ± 7.36	36.25 ± 6.25	55.00 ± 7.36	63.75 ± 6.25
3	45.00 ± 2.88	45.00 ± 5.00	55.00 ± 2.88	55.00 ± 5.00
Promedio ± EE Intervalo	48.00 ± 1.67 41-55	51.11 ± 2.46 36-57	52.89 ± 1.81 45-61	49.33 ± 2.38 42-63

9.9. Evaluación de patrones de distribución con lectina WGA

Se encontró fluorescencia en toda la membrana del espermatozoide y nulo para la cabeza en el patrón A (intenso), para el patrón B (ligero) se observa una fluorescencia uniforme en toda la membrana del espermatozoide con menor intensidad en la cabeza como en el patrón B (Figura 4) La fluorescencia que emitió la lectina WGA asociada a FITC sobre la membrana del espermatozoide se debe a los residuos glicosídicos N-acetilglucosamina que están presentes en la membrana del espermatozoide. Las proporciones obtenidas de cada uno de los patrones se presentan en el cuadro 8, en donde se observa la frecuencia del patrón A en fresco, los cuales se situaron en un intervalo de 47.50 ± 6.29 como mínimo y 68.33 ± 7.26 como máximo, para en caso de las muestras descongeladas se observó un promedio de 36.25 ± 6.88 como mínimo y 62.50 ± 4.33 como máximo. Por otra parte, el patrón B en fresco se situó en un promedio de 31.67 ± 7.26 hasta un 52.50 ± 6.29 y para las muestras descongeladas de 24.38 ± 7.16 hasta 63.75 ± 6.88 .

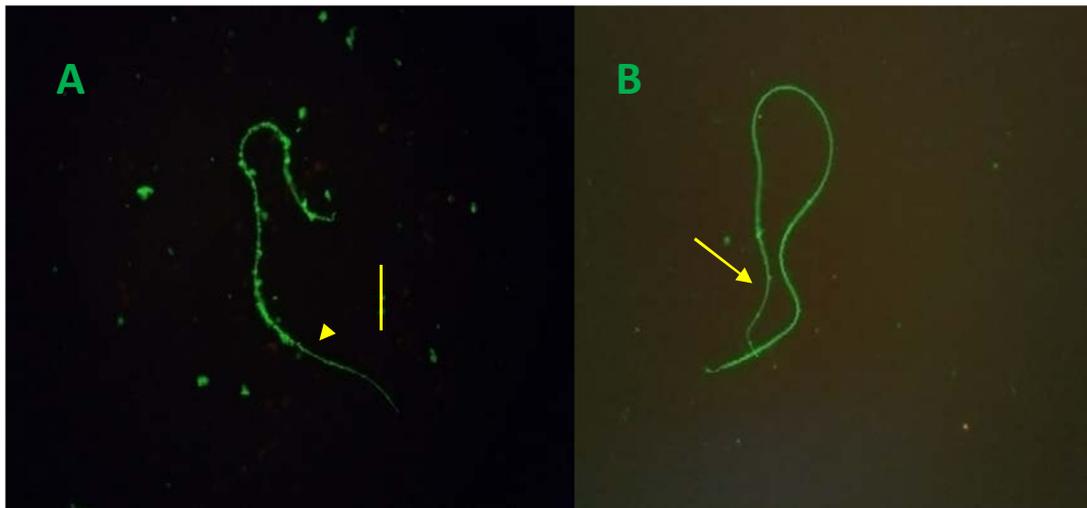


Figura. 4. Patrones de fluorescencia de espermatozoide con la lectina WGA-FITC. Se observa mayor intensidad de fluorescencia en el patrón A excepto en la parte de la cabeza (flecha amarilla), para el caso del patrón B se observa intensidad menor disminuyendo igualmente en la cabeza (flecha amarilla) con dicha proporción de patrones entre frescos y descongelados se puede observar en el cuadro 9. Fotografías tomadas con microscopio de epifluorescencia. Visto a 400X.

Cuadro 8. Valores promedio para el número de espermatozoides que presentan los diferentes patrones de fluorescencia (A, B), registrados mediante el marcaje con lectina WGA-FITC, en semen fresco y descongelado.

# DE ESPERMATÓFOROS	A FRESCO	A DESCONGELADOS	B FRESCO	B DESCONGELADOS
	Promedio ± EE	Promedio ± EE	Promedio ± EE	Promedio ± EE
12	50.83 ± 4.02	46.67 ± 5.12	49.17 ± 4.02	53.33 ± 5.12
10	51.00 ± 4.81	49.50 ± 5.39	49.00 ± 4.81	50.50 ± 5.39
10	53.50 ± 6.50	52.50 ± 6.37	48.50 ± 7.22	47.50 ± 6.37
8	48.75 ± 8.27	75.63 ± 7.16	51.25 ± 8.27	24.38 ± 7.16
6	56.67 ± 6.66	60.00 ± 11.55	43.33 ± 6.66	40.00 ± 11.55
4	55.00 ± 10.41	62.50 ± 4.33	45.00 ± 10.41	37.50 ± 4.33
4	65.00 ± 6.45	36.25 ± 6.88	35.00 ± 6.45	63.75 ± 6.88
4	47.50 ± 6.29	37.50 ± 6.29	52.50 ± 6.29	62.50 ± 6.29
3	68.33 ± 7.26	56.67 ± 8.81	31.67 ± 7.26	43.33 ± 8.81
Promedio ± EE Intervalo	55.33 ± 2.32 47-68	53.33 ± 4.17 36-75	45.11 ± 2.41 31-52	44.22 ± 3.71 24-63

9.10. Protocolo de criopreservación

Preparación de las muestras. El procedimiento se realizó empleando los espermatozoides de los diferentes espermatóforos obtenidos de ejemplares machos adultos de ajolote mexicano (*A. mexicanum*) mantenidos en condiciones de laboratorio en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC). Los espermatóforos fueron colectados a las 0800 h, y se mantuvieron a una temperatura de 10°C hasta el momento de la extracción. Para los ensayos se emplearon muestras obtenidas de 9 machos.

Extracción de los espermatozoides. Los espermatozoides fueron extraídos de los capuchones espermáticos empleando un nuevo método, incorporando a este la metodología utilizada por Sato et al. (2004). Los espermatozoides ya liberados del capuchón se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, añadiendo solución SAR (Simplified Amphibian Ringer (113.0 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 2.0 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃; 220 mOsmol kg⁻¹), obteniendo una suspensión final de 400 µL. Una vez diluidos, las muestras fueron divididas en 2 alícuotas, las cuales se refrigeraron a 10°C, una parte de 200 µl se utilizó para evaluarlos en fresco y 200 µl para la congelación.

Criopreservación. Se criopreservaron alícuotas de los espermatozoides de cada espermátforo, con un volumen final de 212µl, utilizando como principal crioprotector penetrante DMA al 6%. Para esto, a los tubos Eppendorf de 1.5 ml que contenían 200 µl de suspensión de espermatozoides se le agregó la cantidad de 12µl de crioprotector DMA, se mezcló para homogeneizar la muestra e inmediatamente se envasaron en pajillas de 250µl y se etiquetaron para comenzar con la congelación. Para ello, las pajillas se mantuvieron en hielo a una temperatura de 4°C por 10 minutos, posteriormente se colocaron en canastillas para poder introducir las al tanque de Nitrógeno líquido. Primeramente, se colocaron a una altura de 20 cm por encima del nivel del NL y se mantuvieron en los vapores por un tiempo de 10 minutos. Por último, se sumergieron en el nitrógeno líquido y se almacenaron durante 1 mes.

Evaluación de los espermatozoides descongelados. Las pajillas fueron descongeladas a una temperatura de 16°C durante 5 segundos, inmediatamente después de la descongelación se llevó a cabo la siguiente evaluación de calidad de los espermatozoides.

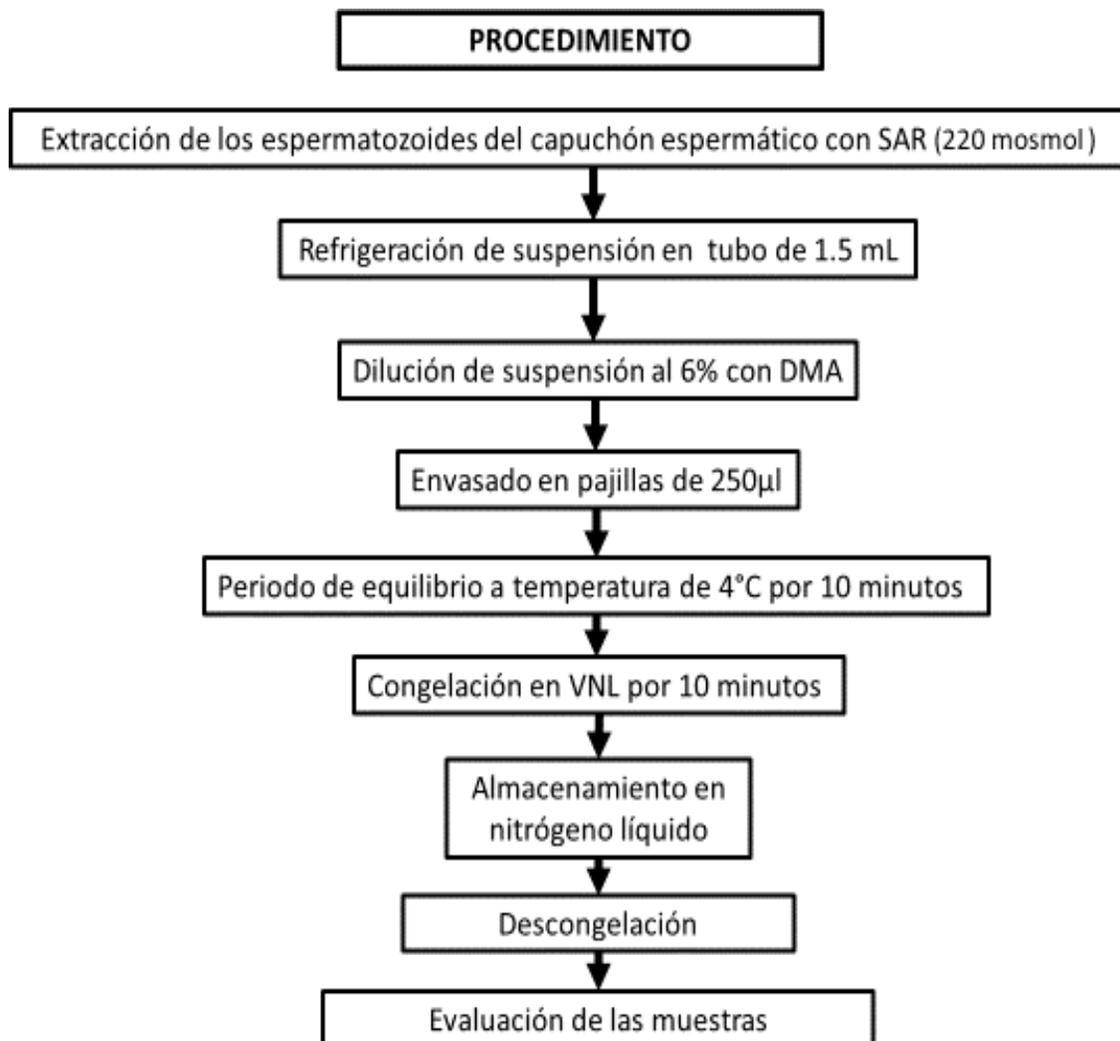


Fig. 5. Se describe la metodología empleada en el proceso de criopreservación de los espermatozoides de *A. mexicanum*, donde se observa las soluciones utilizadas para la extracción de los espermatozoides, el tiempo de refrigeración, el porcentaje de dilución con el crioprotector DMA, el periodo de equilibrio y temperatura después del empajillado, así como el tiempo de congelación con vapores de nitrógeno líquido a la cual se congelaron.

10. DISCUSIÓN

Los valores obtenidos en este trabajo en cuanto a las medidas morfométricas del ajolote mexicano *A. mexicanum* son comparables con lo reportado con otros autores. Así el porcentaje promedio de la longitud total (LH) (22-25 cm) es similar a lo descrito por Aguilar-Miguel et al. (2009), Mansour et al., (2010), Chester (2013) y Jimenez et al., (2007). En cuanto a las correlaciones realizadas en este estudio con respecto a la longitud del cuerpo, el peso y el tamaño de la cloaca sobre las características y número de espermátóforos, se observó que solamente influyó en el número de espermátóforos liberados por los ejemplares. Estos datos se asemejan a lo publicado en varias especies de salamandras principalmente del género Plethodontidae y Salamandridae donde el tamaño del cuerpo, así como la longitud de la cloaca influyeron en la morfología o en la cantidad de espermátóforos liberados (Holliday, 1998; Sever et al., 1990). A lo referente en el tamaño de los organismos se sabe que cuerpos más grandes están correlacionados con testículos más grandes (Holliday, 1998). Así mismo, el tamaño del testículo está relacionado con aumento en el número de lóbulos testiculares en Urodela lo que hace que los machos tengan mayor producción de espermatozoides (Uribe and Mejía-Roa, 2014).

En cuanto a la concentración espermática los datos mostraron que hay diferencias en cuanto a la concentración espermática entre espermátóforos de un mismo ejemplar y entre ejemplares. Estos resultados son similares a los publicados por Doyle et al. (2010), donde demostró por medio de la técnica de espectrofotometría y PCR-TR, que hay una variación en el número de espermatozoides entre los espermátóforos liberados de ejemplares de *A. maculatum*.

En lo que respecta a la morfología, los datos obtenidos mostraron un promedio entre el 97 y 99% de morfología normal, lo que nos indica que los espermatozoides que son liberados de los testículos a los tubos eferentes pasan por un proceso de selección antes de ser encapsulados en los espermátóforos. Un estudio de histología de testículo realizado por Uribe y Mejía-Roa (2004, 2014) en *A. dumerilli* y *A. mexicanum* respectivamente señala que en los quistes testiculares los espermatozoides pasan por un proceso de selección, donde los espermatozoides

inmaduros o con malformaciones son fagocitadas por las células de Sertoli, por lo tanto impiden que estas células sean liberadas a los conductos deferentes.

La viabilidad espermática observada en fresco en esta tesis fue de 80 a 98%, siendo este el primer trabajo que registra el porcentaje de espermatozoides vivos extraídos de los espermátóforos. Estos resultados se contraponen a los reportados por Mansour et al. (2010), el cual obtuvo espermatozoides por medio de masaje cloacal, reportando un 100% de espermatozoides vivos en todas las muestras analizadas. Por otra parte, un estudio realizado por Chester, (2013), menciona que obtuvo 64 a 86 % de viabilidad espermática después de llevar a cabo la criopreservación de espermátóforos. Estos datos difieren de lo obtenido en este trabajo donde la viabilidad obtenida en espermatozoides descongelados estuvo en un promedio de 45 a 67 %. Por lo que este resultado nos indica que la membrana del capuchón puede funcionar como una barrera la cual protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de la congelación (Chester, 2013).

En cuanto a la movilidad solo se pudo observar en algunos espermátóforos por un tiempo muy corto (datos personales), este dato contrapone a todo lo descrito hasta ahora, ya que se menciona en trabajos realizados por Watanabe et al. (2002, 2003, 2004) donde indica que la movilidad de los espermatozoides de Urodela solo se da mediante la interacción con la egg-jelly (jalea del huevo), debido a las altas concentraciones de calcio que se encuentra en las capas del óvulo, las cuales son necesarias para inducir la movilidad. Por otra parte, Mansour et al. (2010) reporta el 100% de movilidad en los espermatozoides recuperados de los conductos deferentes por medio de masaje. El menciona que la movilidad encontrada se debe a que en la suspensión que se libera de los conductos deferentes puede estar en un proceso de maduración, antes de que lleguen a los espermátóforos.

Es el primer estudio en el cual se utilizan lectinas para llevar a cabo la caracterización de los patrones y la frecuencia de los residuos glucosídicos presentes en la membrana de los espermatozoides de Urodelos, específicamente en *A. mexicanum*. La aplicación de lectinas WGA y PNA para caracterizar los patrones de carbohidratos membranales ofrece resultados alentadores, pues demostró que están presentes residuos glucosídicos como B- galactosa y acetilglucosamina. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Záes et al. (2004), el cual determinó que en el momento de la espermatogénesis diferentes carbohidratos entre ellos B- galactosa y acetilglucosamina van uniéndose a la membrana de las células que se encuentran en diferente etapa de desarrollo hasta la espermiogénesis.

En cuanto a la localización y proporción estas difieren a lo largo de toda la membrana, un ejemplo es WGA que se encuentra en gran cantidad en cuello y cola, pero en mínima proporción en la cabeza, al contrario de PNA la cual si se encuentra presente. Trabajos realizados en peces teleósteos demuestran que la proporción de los carbohidratos en la membrana de los espermatozoides pueden ser heterogéneos o en su caso no estar presentes (Rojas et a., 2001). A pesar de que solo se trata de una caracterización, esta descripción de la presencia de estos azucares permite determinar no solo parámetros de normalidad sino inferir la calidad espermática (Cabrita, 2009), y puede ser de gran ayuda para poder relacionarlos con proyectos de fertilidad en esta especie, mediante la relación de los carbohidratos presentes en su membrana.

11. CONCLUSIONES

Se observó que hay diferencia entre la cantidad de espermátóforos liberados, lo cual está descrito que puede depender de la edad, peso y longitud del animal, por lo que se recomienda realizar un proyecto donde se tenga certeza de que los animales son de la misma cohorte de edad, para corroborar la existencia de diferencias.

Un dato importante que resaltar en este estudio es el resultado obtenido sobre la influencia que tuvo el peso corporal del animal sobre el tamaño del capuchón del espermátóforo y por ende en la concentración de espermatozoides. Es necesario investigar con mayor detalle la influencia que puede tener el peso y su posible correlación con la calidad espermática en Urodelos.

Los resultados obtenidos de esta tesis muestran que es necesario implementar ensayos para poder estimular la movilidad de los espermatozoides *in vitro* y contar con datos que permitan realizar un mejor análisis de la calidad. Así mismo para estandarizar el tipo y el nivel de movimiento que este puede adquirir, ya el movimiento es pieza fundamental en cualquier estudio espermatobioscópico para observar su capacidad fecundante.

Es necesario realizar más estudios en los cuales se apliquen lectinas como PSA, UEA y Con A, para observar y tener un estudio más amplio y detallado de la membrana del espermatozoide de *A. mexicanum*, para, en una primera instancia pueda ser útil en la realización de protocolos de reproducción asistida que nos permita un manejo adecuado para su criopreservación o en cultivos.

Este fue el primer estudio de criopreservación directamente realizado en los espermatozoides de *A. mexicanum*, en el cual se obtuvo una tasa de viabilidad del 70% en promedio. Sin embargo, es de suma importancia realizar más ensayos de criopreservación con el fin de llegar a obtener un promedio de calidad espermática cercana al obtenido en las muestras en fresco.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, N.K. (2011). Cryopreservation of Fish Semen. *Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology*. 104-127.

Ananjeva, N.B., Uteshev, V.K., Orlov, N.L., and Gakhova, E.N. (2015). Strategies for conservation of endangered amphibian and reptile species. *Biol. Bull.* 42, 432–439.

AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2013. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponible: <http://amphibiaweb.org/>; última consulta: 05.07.2018.

Andrabi, S.M.H., and Maxwell, W.M.C. (2007). A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 223–243.

Andreu C. G., Aviña C. R., Miguel A., X. (2003). Un regalo poco conocido de México al mundo: El ajolote o axolotl. *Ciencias Ergo Sum*. Vol. 3, 304-308

Angulo, A. (2016). Anfibios y paradojas: Perspectivas sobre la diversidad y las poblaciones de anfibios. *Ecol. Apl.* 1, 105.

Atencio, V., Perez, E., Espinosa, J., and Pardo, S. (2013). Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Arch. Med. Vet.* 45, 151–158.

Beebee, T.J.C., and Griffiths, R.A. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biol. Conserv.* 125, 271–285.

Beesley, S.G., Costanzo, J.P., and Lee, R.E. (1998). Cryopreservation of Spermatozoa from Freeze-Tolerant and -Intolerant Anurans. *Cryobiology* 37, 155–162.

Beja, P., and Alcazar, R. (2003). Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: an evaluation using amphibians. *Biol. Conserv.* 114, 317–326.

Blanco, J.M., Wildt, D.E., Voelker, W. y Donoghue, A.M. 2009. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology* 71: 200–213.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.019>

Bride, I.G., Griffiths, R.A., Meléndez-Herrada, A., and McKay, J.E. (2008). Flying an amphibian flagship: conservation of the Axolotl *Ambystoma mexicanum* through nature tourism at Lake Xochimilco, Mexico: THE AXOLOTL AS A FLAGSHIP SPECIES. *Int. Zoo Yearb.* 42, 116–124.

Browne R. and Chester R. Figiel Jr. (2011). Amphibian conservation and cryopreservation of sperm, cells, and tissues. In *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2, 345–365.

Browne, R. and C. R. Figiel Jr. (2011). Amphibian Conservation and Cryopreservation of Sperm, Cells, and Tissues. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. T. R. Tiersch and C. C. Green, editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. 345-365.

Canseco Márquez, L., Gutiérrez Mayén, M.G., Mexico, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, and Fundación para la Reserva de la Biósfera Cuicatlán (2010). *Anfibios y reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (México, D.F.; Puebla, Pue.: CONABIO: Fundación para la Reserva de la Biósfera Cuicatlán; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Catenazzi, A. (2015). State of the World's Amphibians. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 40, 91–119.

CONABIO-SEMARNAT, 2009. Cuarto Informe Nacional de México al Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. CDMX. Disponible en línea en: http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/4oInforme_CONABIO.pdf.

CONABIO, 2014. Quinto Informe Nacional de México ante el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en línea en <http://www.conabio.gob.mx>.

Chai, N. (2017). Reproductive Medicine in Amphibians. *Veterinary Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 20, 307–325.

Clulow, J., Trudeau, V.L., and Kouba, A.J. (2014). Amphibian Declines in the Twenty-First Century: Why We Need Assisted Reproductive Technologies. In *Reproductive Sciences in Animal Conservation*, W.V. Holt, J.L. Brown, and P. Comizzoli, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 275–316.

- Comizzoli, P., Songsasen, N., Hagedorn, M., and Wildt, D.E. (2012). Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology* 78, 1666–1681.
- Chester R. Figiel (2013). Cryopreservation of sperm from the axolotl *Ambystoma mexicanum*: implications for Conservation. *Herpetological Conservation and Biology*. 8, 748–755.
- Doyle, J.M., McCORMICK, C.R., and DeWOODY, J.A. (2011). The quantification of spermatozoa by real-time quantitative PCR, spectrophotometry, and spermatozoa cap size: TECHNICAL ADVANCES. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 101–106.
- Duellman, William E. & Linda Trueb (1986). *Biology of Amphibians*. – New York-St. Louis–San Francisco (McGraw-Hill Co.). 65, 322-375.
- Eisthen, H.L., and Krause, B.C. (2012). Ambiguities in the relationship between gonadal steroids and reproduction in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 472–480.
- Edward J. Zalisko, Ronald A. Brandon and Jan Martan. (1984). Microstructure and Histochemistry of Salamander Spermatozoa (*Ambystomatidae*, *Salamandridae* and *Plethodontidae*). *Copeia American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH)*. 3, 739-747.
- Evans, T., Johnson, A.D., and Loose, M. (2018). Virtual Genome Walking across the 32 Gb *Ambystoma mexicanum* genome; assembling gene models and intronic sequence. *Sci. Rep.* 8.
- Gascon, C. (2007). *Amphibian conservation action plan: proceedings of the IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005* (Gland, Switzerland: IUCN--the World Conservation Union).
- Griffiths, R.A., and Pavajeau, L. (2008). Captive Breeding, Reintroduction, and the Conservation of Amphibians: *Amphibian Captive Breeding*. *Conserv. Biol.* 22, 852–861.
- Hall, K.W., Eisthen, H.L., and Williams, B.L. (2016). Proteinaceous Pheromone Homologs Identified from the Cloacal Gland Transcriptome of a Male Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *PLOS ONE* 11, e0146851.
- Halliday, T. (1998). Sperm Competition in Amphibians. In *Sperm Competition and Sexual Selection*, (Elsevier), pp. 465–502.

Harding, G., Griffiths, R.A., and Pavajeau, L. (2016). Developments in amphibian captive breeding and reintroduction programs: Amphibian Breeding and *Reintroduction*. *Conserv. Biol.* 30, 340–349.

Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., and Stice, M. (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exp. Biol.* 213, 921–933.

Herrera, J.A., Quintana, J.A., López, M.A., Betancourt, M. y 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

Holt, W.V., and Van Look, K.J.W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 127, 527–535.

Hopkins, B.K., and Herr, C. (2008). 78 CRYOPRESERVATION OF FROG (*RANA PIPIENS*) SPERM CELLS COLLECTED BY NON-LETHAL METHODS. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 120.

Houck, L.D., Watts, R.A., Arnold, S.J., Bowen, K.E., Kiemnec, K.M., Godwin, H.A., Feldhoff, P.W., and Feldhoff, R.C. (2008). A Recombinant Courtship Pheromone Affects Sexual Receptivity in a Plethodontid Salamander. *Chem. Senses* 33, 623–631.

Janssenswillen, S., Vandebergh, W., Treer, D., Willaert, B., Maex, M., Van Bocxlaer, I., and Bossuyt, F. (2015). Origin and Diversification of a Salamander Sex Pheromone System. *Mol. Biol. Evol.* 32, 472–480.

Jimenez J.O., Aviña C.R., Ramirez A.E., Lucero F.G., Andreu C.G. (2017). Conservación ex-situ de poblaciones en riesgo de ajolotes (*ambystoma* spp.) del estado de Puebla, Mexico. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias.* 8, 1-10.

John B. Armstrong and George M. Malacinski. (1989). Raising the axolotl in captivity. *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press. 320.

Khattak, S., Murawala, P., Andreas, H., Kappert, V., Schuez, M., Sandoval-Guzmán, T., Crawford, K., and Tanaka, E.M. (2014). Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-promediated recombination. *Nat. Protoc.* 9, 529–540.

Kouba, A.J., Vance, C.K., and Willis, E.L. (2009). Artificial fertilization for amphibian conservation: Current knowledge and future considerations. *Theriogenology* 71, 214–227.

Kouba, A.J., Lloyd, R.E., Houck, M.L., Silla, A.J., Calatayud, N., Trudeau, V.L., Clulow, J., Molinia, F., Langhorne, C., Vance, C., et al. (2013). Emerging trends for biobanking amphibian genetic resources: The hope, reality and challenges for the next decade. *Biol. Conserv.* 164, 10–21.

Kochegarov A, Moses-Arms A, Hanna MC, Lemanski LF. (2015) Identification of Genes Involved in Limb Regeneration in the Axolotl *Ambystoma mexicanum*. *JSM Regen Med Bio Eng* 3(1): 1014.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación publicado el jueves 30 de diciembre de 2010. Disponible en línea en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf (consultado el 26, julio, 2017).

Maex, M., Van Bocxlaer, I., Mortier, A., Proost, P., and Bossuyt, F. (2016). Courtship Pheromone Use in a Model Urodele, the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Sci. Rep.* 6.

Mansour, N., Lahnsteiner, F., and Patzner, R.A. (2011). Collection of gametes from live axolotl, *Ambystoma mexicanum*, and standardization of in vitro fertilization. *Theriogenology* 75, 354–361.

Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, J.E., and Álvarez, F. (2014). El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Rev. Mex. Biodivers.* 85, 1–9.

McCallum, M.L. (2007). Amphibian Decline or Extinction? Current Declines Dwarf Background Extinction Rate. *J. Herpetol.* 41, 483–491.

Medina Robles, Víctor M, Velasco Santamaría, Yohana M, Cruz Casallas, Pablo E. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.18, [Fecha de consulta: 26 de mayo de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295022952005>

Mendoza, V., T. (2012). Importancia Ecológica y cultural de una especie endémica de ajolote (*Ambystoma dumerilii*) del lago de Patzcuaro Michoacan. *Etnobiología* 10, 40- 49.

Miltner, M.J., and Armstrong, J.B. (1983). Spermatogenesis in the mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Exp. Zool.* 227, 255–263.

- Molina V., A. (2010). El ajolote de Xochimilco. *Ciencias*. 98, 54-59.
- Ohta, H., Kawamura, K., Unuma, T., and Takegoshi, Y. (2001). Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *J. Fish Biol.* 58, 670–681.
- Otero-Muiño, R. sin fecha. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. [Tesis]. Chile, Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria 157 pp.
- Parra-Olea, G., Zamudio, K.R., Recuero, E., Aguilar-Miguel, X., Huacuz, D., and Zambrano, L. (2012). Conservation genetics of threatened Mexican axolotls (*Ambystoma*): Conservation of Mexican axolotls. *Anim. Conserv.* 15, 61–72.
- Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., and Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Rev. Mex. Biodivers.* 85, 460–466.
- Pinzón Arciniegas, S. M.; Mojica Rodríguez, J. E.; Cruz Casallas, P. E. (2005). Ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus 1766). (Trabajo de grado) Facultad de Ciencias Agrarias y Recursos Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.
- Prieto, M.T., Sanchez-Calabuig, M.J., Hildebrandt, T.B., Santiago-Moreno, J., and Saragusty, J. (2014). Sperm cryopreservation in wild animals. *Eur. J. Wildl. Res.* 60, 851–864.
- Recuero, E., Cruzado-Cortes, J., Parra-Olea, G., and Zamudio, K.R. (2010). Urban Aquatic Habitats and Conservation of Highly Endangered Species: The Case of *Ambystoma mexicanum* (Caudata, Ambystomatidae). *Ann. Zool. Fenn.* 47, 223–238.
- Reyes, S. G., García A. D., Maldonado, N. C. (2001). La reproducción animal asistida: Un instrumento para el concierto de la conservación. *Contactos*. 81, 62-67.
- Rice G. K., Mazzotti J. F., Waddle H. J., Conill D. M. (2016). Uso de Anfibios como Indicadores del Éxito de la Restauración de Ecosistemas. *Wildlife Ecology and Conservation, UF/IFAS Extension*. Disponible en: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>.
- Rivera H., A, Bello S. E., Hernández S. L., Morales M. J. (2017). The olfactory system of salamanders (Plethodontidae) and its relationship with predator's detection. *neurobiología, revista electrónica*. 8(19):281117. Disponibl en: www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2017/19/19.html.

Roelants, K., Gower, D.J., Wilkinson, M., Loader, S.P., Biju, S.D., Guillaume, K., Moriau, L., and Bossuyt, F. (2007). Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 887–892.

Rupp, A.E., and Sever, D.M. (2018). Histology of mental and caudal courtship glands in three genera of plethodontid salamanders (Amphibia: Plethodontidae). *Acta Zool.* 99, 20–31.

Russell, L.D., Brandon, R.A., Zalisko, E.J., and Martan, J. (1981). Spermatophores of the salamander *Ambystoma texanum*. *Tissue Cell* 13, 609–621.

Sanches, E.G., Oliveira, I.R., Serralheiro, P.C.D.S., and Cerqueira, V.R. (2013). Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 85, 1083–1092.

Sánchez V. (2016). Los ajolotes podrían develar el misterio de la regeneración de tejidos. Agencia Informativa Conacyt.

Sáez J. F., Madrid F. J., Cardoso S., Gomez L., Hernandez F. (2004). Glycoconjugates of the Urodele Amphibian Testis Shown by Lectin Cytochemical Methods. *Microscopy Reserch and Technique.* 64:63–76.

Sever D.M (1985). Sexually dimorphic glands of *Eurycea nana*, *Euricea notenens* and *typhlomolge Rathbuni* (Amphibia: Plethodontidae). *Herpetologica* 41, 71-84.

Sever, D.M. (1992). Comparative anatomy and phylogeny of the cloacae of salamanders (Amphibia: Caudata) IV. Salamandridae. *Anat. Rec.* 233, 229–244.

Sever, D.M., and Siegel, D.S. (2015). Histology and ultrastructure of the caudal courtship glands of the red-backed salamander, *Plethodon cinereus* (Amphibia: Plethodontidae): Salamander Caudal Courtship Glands. *J. Morphol.* 276, 319–330.

Sever, D.M., Pinsoneault, A.D., Mackenzie, B.W., Siegel, D.S., and Staub, N.L. (2016). A Description of the Skin Glands and Cloacal Morphology of the Plethodontid Salamander *Karsenia koreana*. *Copeia* 104, 816–823.

Shishova, N.R., Uteshev, V.K., Kaurova, S.A., Browne, R.K., and Gakhova, E.N. (2011). Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology* 75, 220–232.

Sunny, A., Monroy-Vilchis, O., Fajardo, V., and Aguilera-Reyes, U. (2014). Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in Mexico. *Conserv. Genet.* 15, 49–59.

Trottier, T.M., and Armstrong, J.B. (1975). Hormonal stimulation as an aid to artificial insemination in *Ambystoma mexicanum*. *Can. J. Zool.* 53, 171–173.

The IUCN Red List of Threatened Species. 2012. Disponible en línea en: <http://www.iucnredlist.org/details/59073/0> (consultado el 26, mayo, 2018).

Uribe, M.C., and Mejía-Roa, V. (2014). Testicular structure and germ cells morphology in salamanders. *Spermatogenesis* 4, e988090.

Uribe, M.C.A., Rios, G.G., and Brandon, R.A. (1994). Spermatogenesis in the urodele *Ambystoma dumerilii*. *J. Morphol.* 222, 287–299.

Vance E. (2017). THE AXOLOTL PARADOX An iconic salamander species, celebrated and studied around the world, is racing towards extinction. *NATURE.* 551, 286-289.

Voss, S.R., Woodcock, M.R., and Zambrano, L. (2015). A Tale of Two Axolotls. *BioScience* biv153.

Wilburn, D.B., Eddy, S.L., Chouinard, A.J., Arnold, S.J., Feldhoff, R.C., and Houck, L.D. (2015). Pheromone isoform composition differentially affects female behaviour in the red-legged salamander, *Plethodon shermani*. *Anim. Behav.* 100, 1–7.

Xia, L., Michael, F., George, A. y Auckland, R. 1988. Ultrastructure of fresh and frozen-thawed spermatozoa of high and low fertility lines of chickens. *Poultry Science.* 67:819-825. doi: 10.3382/ps.0670819

Zambrano, L., Vega, E., Herrera M., L.G., Prado, E., and Reynoso, V.H. (2007). A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of endangered species in highly managed water systems. *Anim. Conserv.* 10, 297–303.

Zambrano, L., Valiente, E., and Vander Zanden, M.J. (2010). Food web overlap among native axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and two exotic fishes: carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Xochimilco, Mexico City. *Biol. Invasions* 12, 3061–3069.

Kumar A., Simon A., 2015. Salamanders in Regeneration Research (New York, NY: Springer New York). 1290, 27-46.

Zambrano González, L., Reynoso, V. H. y G. Herrera. 2003. Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. AS004. México D.

Sanz-Ochotorena, Ana; Segura-Valdez, María de Lourdes; Rodríguez-Gómez, Yamilka; LaraMartínez, Reyna; Jiménez-García, Luis Felipe ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA DE LA GÓNADA DE LOS MACHOS DE Bufo fustiger (ANURA: BUFONIDAE) Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 11, núm. 2, diciembre, 2008, pp. 81-86 Universidad Nacional Autónoma de México Distrito Federal, México

TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS ESPECIALIZADOS

Encuentro estudiantil sobre el Aprovechamiento de Vida Silvestre y Ganadería Diversificada de México, con tema de ponencia **"Una propuesta para la conservación del ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum*"** realizado en la Universidad Autónoma de Chapingo en abril de 2018.

Tercera Reunión Científica Interinstitucional sobre Diversidad Biológica, con tema de cartel **" Obtención circunual de espermátóforos del ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum*"** realizado en la Universidad Autónoma metropolitana Unidad Xochimilco en mayo de 2018.

IV Simposio Herpetológico internacional de Costa Rica, con tema de ponencia **" Criopreservación de gametos una alternativa para evitar la extinción de anfibios, el caso del ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum*"** realizado en la Universidad de Costa Rica en septiembre de 2018.

IV Simposio Herpetológico internacional de Costa Rica, con tema de cartel **" Caracterización y Criopreservación de espermatozoides del ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Ambystomatidae)"** realizado en la Reserva Selva Verde Lodge Costa Rica en septiembre de 2018.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Nº 00062
Matrícula: 2163801789

CARACTERIZACIÓN Y
CRIOPRESERVACIÓN DE
ESPERMATOZOIDES DEL AJOLOTE
MEXICANO *Ambystoma MEXICANUM*
(*Amphibia: Ambystomatidae*).

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 3 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ
DR. JUAN JOSE PEREZ RIVERO CRUZ Y CELIS
DR. JOSE ANTONIO OCAMPO CERVANTES



J.C. Pacheco

JUAN CARLOS RIVERA PACHECO
ALUMNO

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:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: JUAN CARLOS RIVERA PACHECO

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 al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISOR

J. A. Heredia
DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

Sara Lucia Camargo Ricalde
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

Miguel Angel Leon Galvan
DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

VOCAL

Alejandro Avalos Rodriguez
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

VOCAL

Juan Jose Perez Rivero Cruz y Celis
DR. JUAN JOSE PEREZ RIVERO CRUZ Y
CELIS

SECRETARIO

Jose Antonio Ocampo Cervantes
DR. JOSE ANTONIO OCAMPO CERVANTES