Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

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

Idónea comunicación de resultados

“Caracterización y criopreservación seminal de Cathartes aura y Coragyps atratus.”

TESIS

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

PRESENTA
MVZ. HEMEROHEB ADRIÁN MORENO MARÍN
Matricula: 2203801587
Correo: hemeroheb.moreno@gmail.com

DIRECTOR
DR. JOSÉ ANTONIO HERRERA BARRAGÁN (UAM-X)

CODIRECTORA
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA (UAM-I)

ASESOR
MSc. FERNANDO GUAL SILL
Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre de la CDMX.

JURADO

PRESIDENTE
DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

VOCAL
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

VOCAL
M. EN. C. FELIX DOMINGO SANCHEZ GODOY

SECRETARIO
MTRO. FERNANDO GUAL SILL

Iztapalapa, Ciudad de México, México. 25 de Abril de 2023.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR
Dr. José Antonio Herrera Barragán
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco,
DCBS, DPAA, Profesor investigador Titular "C"

CODIRECTORA
Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa,
DCBS, DCS, Profesora investigadora Titular "C"

ASESOR
***MSc.* Fernando Gual Sill**
Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre de la CDMX.

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

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó la beca con número 1099763, al alumno Hemeroheb Adrián Moreno Marín, inscrito al posgrado de Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

- PARQUE REINO ANIMAL. REGISTRO SEMARNAT. DGVS-ZOO-P-0074-03-MX.

PARQUE RODOLFO LANDEROS GALLEGOS. ZOOLÓGICO DE AGUASCALIENTES. (PIMVS) CON NÚMERO DE REGISTRO: INE/CITES/DGVS-CR-IN-AV-0035-AGS./00

FAUNISTICA ANIMAL, CENTRO DE RECUPERACIÓN DE FAUNA SILVESTRE CON CLAVE DE REGISTRO DGVS-PIMVS-EA-0086-MEX/09

- UMA “ZOOLÓGICO REGIONAL MIGUEL ÁLVAREZ DEL TORO”. INE/CITES/DGVS-ZOO-E-0009-01/CHIS.

UMA LA SIBERIA, VIDA SILVESTRE. JESUS ESTUDILLO ÓPOEZ: DGCERN-CR-IN-0039-MEX/00

Jurado designado por la Comisión académica de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, para la tesis titulada: **"Caracterización y criopreservación seminal de *Cathartes aura y Coragyps atratus*".**

Que presentó:

MVZ. HEMEROHEB ADRIAN MORENO MARIN.

JURADO DEL EXAMEN



PRESIDENTE
Dr. Miguel Ángel León Galván.
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, DCBS, Dpto. Biología.
Profesor investigador Titular "A



SECRETARIO
***MSc.* Fernando Gual Sill**
Dirección General de Zoológicos y Conservación de la
Fauna Silvestre de la CDMX.



VOCAL
Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, DCBS, DPAA,
Profesor investigador Titular "C"



VOCAL

M EN C. Félix Domingo Sánchez Godoy
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
Departamento de Aves**.**

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para llevar a cabo los estudios de maestría y la elaboración de la tesis.

A la UAM. Por el uso de sus instalaciones en los laboratorios de Bioquímica de la Reproducción de UAM-X, así como al laboratorio de Andrología de UAM-I.

Al parque Reino Animal por brindarme el apoyo para el muestreo de sus ejemplares , por el recibimiento dado , por el apoyo recibido por parte de su personal, por permitirme utilizar sus instalaciones, y sobre todo al MVZ José Luis Gonzales)QPD), por su apoyo para el manejo de los ejemplares.

Al Zoológico Rodolfo Landeros, Aguascalientes, por el recibimiento, por el apoyo del personal para el manejo de los ejemplares, por la prestación de sus espacios y a su personal por la ayuda brindada.

A Faunística Animal, por el acceso a sus ejemplares para el muestreo, por el espacio brindado y por la ayuda brindada por parte de su personal y propietario David Rodríguez Vargas.

Al NIDO por la prestación de varios de sus ejemplares, la prestación de espacios y el apoyo de su personal.

Al ZOOMAT por el cálido recibimiento para la estancia de investigación, por el apoyo de los médicos y biólogos para la planeación del muestreo, por el apoyo de su personal para la contención de los ejemplares y por la prestación de sus espacios y el interés.

También agradezco **al Dr. Pichardo** el cual me asesoró previamente para entrar a la maestría y su apoyo para dedicarme a algo que realmente me gusta.

A la Doctora Reyna F, por su apoyo tanto en la escritura de la tesis, la realización de los experimentos, su paciencia y constante apoyo para la misma.

Especialmente **al Dr. Herrera** por su constante apoyo e interés, tanto para la obtención de ejemplares para las muestras, el apoyo de las técnicas, y la escritura de la tesis, además de su paciencia conmigo.

A Anita por su apoyo en el muestreo, y procesado de muestras, además de su amistad.
A Casandra por su apoyo en los procesos de muestreo.
A José Antonio Herrera (Jr.) por su apoyo en el muestreo y su buen humor.

A los alumnos del Dr. Herrera que alguna vez me apoyaron en el muestreo y a todas aquellas personas que ya no mencioné pero que estuvieron presentes en cada una de las instituciones apoyándome en los manejos y muestreos, los manejadores, la bióloga Ashley en Aguascalientes, el personal del Nido, del ZooMAT y de Reino Animal y de Faunística Animal. .

DEDICATORIA

A mi mamá, Ethel por su apoyo brindado durante la pandemia al permitirme vivir con ella una vez más y sus cuidados.

A mi hermana Mérit por ayudarme y darme ánimos durante la pandemia que tanto nos hizo falta a todos, a mis perros *Chikis, Perrolita* y Luna porque su presencia fue un apoyo emocional para mí en los tiempos de aislamiento y pandemia.

A mi papá Carlos por inculcarme desde pequeño el amor a los animales.

A mi tío Alejandro por apoyar desde niño mi curiosidad en la biología y a Arais, por devolverme el amor al estudio de la biología y la fauna en general, por estar conmigo en las noches leyendo, por sus conversaciones que tanto me animaron cuando más me hicieron falta y por querer tanto a Pipi y a Bambú que fueron al final lo que me ha hecho dedicar gran parte de mi vida al estudio de las aves.

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 16 de ABRIL de 2023.

Comisión Académica del Posgrado
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

P r e s e n t e.

El que suscribe **HEMEROHEB ADRIAN MORENO MARIN**, alumno con número de matrícula **2203801587** del posgrado **MAESTRIA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **"Caracterización y criopreservación seminal de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus*"** a desarrollar en LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.

HEMEROHEB ADRIAN MORENO MARIN

Nombre completo y firma autógrafa*

* Firmar con tinta azul

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El que suscribe, HEMEROHEB ADRIAN MORENO MARIN, alumno del posgrado: MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **"Caracterización y criopreservación seminal de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus*"**

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal, es de mi autoría y original, creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría *y* originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas *y* jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 16 de abril de 2023.

Atentamente



HEMEROHEB ADRIAN MORENO MARIN
(Autor de la tesis)

RESUMEN.

La familia Cathartidae incluye siete especies, que son consideradas aves carroñeras que se distribuyen de sur a norte del continente americano. La importancia ecológica de estas aves obedece a que se alimentan de carroña, y con esto evitan la dispersión de microorganismos potencialmente dañinos al ecosistema. De las 5 especies que se distribuyen dentro del territorio mexicano, 3 se encuentran en diferentes estatus de protección, mientras que dos de ellas, el zopilote aura (*Cathartes aura*) y el zopilote negro (*Coragyps atratus*) ya que sus poblaciones se mantienen hasta ahora estables, sin embargo, es necesario desarrollar estrategias en apoyo a los Programas de Acción para la Conservación de Especies (PACE) incluyendo aquellas relacionadas al manejo reproductivo de estas especies bajo cuidado humano a fin de crear protocolos relacionados con la reproducción asistida en aves, como la inseminación artificial (IA). La criopreservación seminal representa uno de los avances en la reproducción asistida en aves, misma que involucra las técnicas para su obtención y almacenamiento, incluyendo el uso de los diluyentes y crioprotectores necesarios. En el presente estudio se realizó la evaluación espermática básica de los eyaculados de *Coragyps atratus* y *Cathartes aura* mediante microscopía de luz transmitida, con el fin de clasificar y contabilizar los espermatozoides (porcentaje de espermatozoides vivos/muertos y morfometría espermática). También, mediante técnicas con microscopía de fluorescencia, se realizó la determinación de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana espermática. Se determinó la reacción acrosomal (RA) adicionando clortetraciclina (CTC) con el fin de evaluar y determinar mediante fluorescencia tres patrones diferentes: espermatozoides intactos, espermatozoides capacitados y espermatozoides con RA. Los indicadores de maduración espermática, confirmaron la viabilidad espermática *in vitro*, además de demostrar parámetros de espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal in vitro, los cuales nunca han sido reportados para las especies estudiadas.

PALABRAS CLAVE: Cathartidae, conservación de la vida silvestre, clortetraciclina, N-acetilglucosamina

ABSTRACT.

The Cathartidae family includes seven species, considered scavenger birds distributed from south to north of the American continent. Part of the ecological importance of these birds is that by feeding on carrion, it prevents the spread of potentially harmful microorganisms to the ecosystem. Out of the five species that are distributed within the Mexican territory, three are in different protection status, except the aura vulture (*Cathartes aura*) and the black vulture (*Coragyps atratus*) whose populations remain stable up to now, however, it is necessary to develop strategies to support the Action Program for the Conservation of Species (PACE), including those related to the reproductive management of these species in human care in order to create protocols related to assisted reproduction in birds, such as artificial insemination (AI). Seminal cryopreservation represents one of the advances in bird assisted reproduction, which involves techniques for obtaining and storing it, including the use of extenders and cryoprotectants. In this study, the basic sperm evaluation of *Coragyps atratus* and *Cathartes aura* ejaculates was carried out using light transmitted microscopy for sperm count and classification (percentage of live/dead sperm and sperm morphometry). A determination was also made using the fluorescence technique of N-acetyl glucosamine and/or sialic acid in the spermatic membrane. The acrosome reaction (AR) was induced by adding chlortetracycline (CTC) in order to evaluate and determine three different patterns by fluorescence: intact sperm, capacitated sperm and acrosome reacted spermatozoa. Sperm maturation indicators confirmed *in vitro* sperm viability, in addition to demonstrating parameters of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa *in vitro*, which have never been reported for the species studied.

KEY WORDS. Cathartidae, wildlife conservation, clortetracicline, N-acetilglucosamine

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN 12

1.1 Taxonomía de la familia Cathartidae 12

1.2 Distribución mundial de Cathartidae 13

1.3 Descripción de Cathartes aura y Coragyps atratus 13

1.3.1 Zopilote común o negro (*Coragyps atratus)* 13

1.3.2 Zopilote aura (Cathartes aura) 14

1.4 Función biológica de Cathartidae 14

1.5 Decomisos de Cathartiformes 15

1.6 Especies en peligro de extinción y grados de protección 15

2 MARCO TEÓRICO 16

2.1 Biología reproductiva de Catharthidae. 16

2.1.1 Estacionalidad y regulación neuroendocrina 16

2.2 Morfofisiología reproductiva de las aves 16

2.3 Diferencias de espermatozoides entre especies aviares 18

2.4 Especies de la familia Cathartidae bajo cuidado humano 18

2.5 Proyectos de conservación de la familia Cathartidae 19

2.6 Protocolos de reproducción bajo cuidado profesional especializado. 19

2.6.1 Técnica de Inseminación Artificial. 20

2.6.2 Obtención y conservación seminal 21

2.6.3 Criopreservación espermática 22

2.6.4 2.6.4. Efecto de los crioprotectores (DMA). 23

2.7 Reintroducción de ejemplares en medio silvestre 24

2.8 PACE para aves rapaces neotropicales y zopilote rey 24

3 JUSTIFICACIÓN 26

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 26

5 HIPÓTESIS 26

6 OBJETIVOS 27

6.1 General 27

6.2 Específicos 27

7 MATERIAL Y MÉTODOS 27

7.1 Cuidado y bienestar animal 28

7.2 Ejemplares y material biológico 28

7.3 Recolección seminal 29

7.4 Evaluación espermática 30

7.5 Descripción morfométrica 31

7.6 Determinación de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana espermática. 32

7.7 Capacitación espermática y capacidad de RA. 32

7.8 Estado fisiológico (Intacto, capacitado y Reaccionado) de los espermatozoides evaluados con CTC y WGA-FICT. 32

7.9 Criopreservación seminal 33

7.10 Análisis estadístico 33

8 RESULTADOS 34

8.1 Recolección seminal 34

8.2 Evaluación espermática básica 34

8.3 Descripción de la morfometría espermática 37

8.4 Patrones de Fluorescencia determinados con Clortetraciclina (CTC). 38

8.5 Capacidad de reacción acrosomal *in vitro* 40

8.6 Determinación de Acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana plasmática del espermatozoide. 42

8.7 Comparación entre capacidad de reacción acrosomal y evaluación membranal. 44

9 DISCUSIÓN. 45

10 CONCLUSIONES. 51

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 52

12 ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA MAESTRIA 62

1. INTRODUCCIÓN

México se encuentra entre los países con mayor riqueza de especies debido a su diversidad de hábitats, clima y topografía. Además, posee al menos 10% de la diversidad terrestre del planeta y una gran cantidad de especies autóctonas, entre ellas, las aves que se encuentran en el octavo lugar de diversidad a nivel mundial (CONABIO, 2008). Sin embargo, actividades como la cacería ilegal, el avance de la frontera agrícola y ganadera, la introducción y tráfico ilegal de especies exóticas y la expansión de áreas urbanas han deteriorado la riqueza biológica del país a lo largo de los años. Los zopilotes al igual que muchas otras aves de alimentación principalmente carnívora pueden considerarse como aves rapaces. Para contribuir a la conservación de aves rapaces existen estrategias complementarias, entre ellas la reproducción bajo cuidado profesional, el desarrollo de bancos de recursos genéticos y el uso de biotecnologías reproductivas (Etches, 1996). El estudio de la fisiología reproductiva aviar, es importante para la reproducción *ex situ*, ya que ayuda a entender los cambios que experimentan las aves al ser manipuladas fuera de su medio natural (Gutiérrez, 1999).

1.1 Taxonomía de la familia Cathartidae

La clase de las Aves es uno de los linajes de vertebrados tetrápodos más diversos que existen, comprendiendo alrededor de 10,000 especies en la actualidad (Prum, 2015). El uso de secuencias de ADN ha desarrollado nuevos enfoques para la clasificación de organismos denominado filogenómica (Braun, 2019). Así mediante análisis filogenómico en el orden de los Accipitriformes, que esta formado por una sola familia Cathartidae, la cual comprende zopilotes y cóndores (Braun, 2019; Prum, 2015) y Accipitriformes que comprenden águilas y buitres del viejo mundo, entre otros (Braun, 2019). El grupo de los Cathartiformes abarca aves carroñeras que se distribuyen sólo en Norte y Sudamérica, abarcando 5 géneros y 7 especies que son: Cóndor de california (*Gymnogyps californianus*), cóndor andino (*Vultur gryphus*), zopilote rey (*Sarcoramphus papa*), zopilote negro (*Coragyps atratus*), zopilote aura (*Cathartes aura*), zopilote sabanero (*Cathartes burrovianus*) y aura selvática (*Cathartes melambrotus*) (Johnson y cols., 2016).

1.2 Distribución mundial de Cathartidae

Los zopilotes son aves que habitan desde el norte hasta el sur de América, abarcando casi todo el continente americano (Jhsonon et al., 2016; Winkler y cols., 2020). El cóndor californiano (*Gymnogyps californianus*) se distribuye en América del Norte específicamente en Estados Unidos de América (EUA) en California, Arizona y Utah, además de que en México se encuentra en Baja California en la Sierra de San Pedro Mártir (Finkelstein y cols., 2020; SEMARNAT, 2012). El cóndor andino (*Vultur gryphus*) se distribuye en Suramérica en Venezuela, Colombia, Argentina, Perú y Chile (Houston y cols., 2020). El zopilote rey (*Sarcoramphus papa*) se distribuye desde el noroeste de México hasta Brasil, Argentina y Uruguay en zonas con vegetación de selva alta a selva mediana (SEMARNAT, 2018; Holste y cols., 2020).

El zopilote negro (*Coragyps atratus*) se distribuye desde el norte de América abarcando EUA y México, hasta Centro y Suramérica; en México se le encuentra en todo el país excepto en Baja California, Sonora y Chihuahua (Buckley, 2020). El zopilote aura (*Cathartes aura*) se distribuye desde Norteamérica incluyendo a Canadá, EUA y México, hasta Centroamérica y Suramérica incluyendo Tierra del Fuego y las Islas Malvinas (Kirk y Mossman, 2020). El zopilote sabanero (*Cathartes burrovianus*) se distribuye desde México hasta el sur de Panamá en Suramérica desde Colombia hasta Argentina y Uruguay, el aura selvática (*Cathartes melambrotus*) se distribuye únicamente en Sur América (Holste y cols., 2020).

1.3 Descripción de Cathartes aura y Coragyps atratus

1.3.1 Zopilote común o negro (*Coragyps atratus)*

Es de un tamaño mediano y cola corta, su longitud es de 60-68 cm, pesa de 1.6-2.2 Kg y su envergadura alar mide de 1.36-1.5 m. Su plumaje es completamente negro excepto la superficie inferior de las plumas primarias que son blanquecinas. La cabeza no presenta plumas pero el cuello sí. Son aves sin dimorfismo sexual y son monógamo. En EUA se observan vuelos de cortejo desde enero hasta febrero y la postura de los huevos inicia en febrero y principios de abril con un período de incubación de 39 días aproximadamente y 2 huevos por pareja; anidan en cuevas, troncos, pendientes, matorrales y edificios abandonados (Buckley, 2020).

1.3.2 Zopilote aura (Cathartes aura)

Es un ave de alas grandes, su longitud es de 64-81 cm, peso de 2 Kg y envergadura alar de 1.5- 2 m. Su plumaje es marrón negruzco, la cabeza en gran parte sin plumas de color rojo y se observan unas narinas prominentes. Son aves sin dimorfismo sexual, en EUA se observan intentos de cortejo desde marzo, identificándose la postura de huevos desde febrero hasta abril y en Centroamérica se observa el inicio de la postura de huevos desde febrero (Arévalo y Funes, 2019) poniendo 2 huevos por pareja con 38-40 días de incubación. Anidan en varios sitios desde cuevas, grietas, pendientes, madrigueras de mamíferos, troncos huecos, matorrales y edificios abandonados (Kirky Mossman, 2020).

1.4 Función biológica de Cathartidae

Los carroñeros se clasifican en dos grupos: carroñeros obligados y carroñeros facultativos. Los carroñeros obligados requieren carroña para sobrevivir y por esta condición suplen sus necesidades energéticas para sus actividades de supervivencia y reproducción con carroña, los únicos vertebrados terrestres que se pueden considerar carroñeros obligados son los buitres del viejo mundo y los buitres del nuevo mundo o zopilotes que se distribuyen en nuestro país. Sus adaptaciones para el consumo de carroña les proveen de estrategias y adaptaciones para abarcar grandes distancias, sentidos para localizar la carroña como olfato o vista, la ausencia de plumas en la cabeza y diversos mecanismos adaptativos para consumir carroña como un pH estomacal más ácido. Los carroñeros facultativos no requieren carroña para sobrevivir y pueden prescindir de ella ya que su fuente de energía primaria se encuentra en otros recursos, sin embargo, pueden acudir a la carroña ocasionalmente, ejemplos de estos los encontramos en perros ferales, coyotes, lobos, mapaches, jabalíes, cerdos, osos, roedores entre otros (Sincerbox y DiGangi, 2018). Los servicios que proveen los carroñeros al medio ambiente son la aceleración al proceso de retorno de nutrientes y energía a los sistemas ecológicos y la reducción y contención de enfermedades que puedan transmitirse por la carroña a otros vertebrados. El mejor ejemplo de su papel como contenedores de enfermedades son los casos ocurridos en la india por la

reducción de los buitres del viejo mundo que trajo consigo el aumento de perros ferales portadores de rabia y ratones portadores de peste bubónica (Şekercioğlu y cols, 2004).

1.5 Decomisos de Cathartiformes

En México, el tráfico ilegal de especies, donde se incluye a las aves, afecta a un gran número de especies, por lo que existen mecanismos para regular esta actividad ilegal (SEMARNAT, 2013). La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) regula el comercio internacional basado en un sistema de concesión de autorizaciones y licencias necesarias para la importación, exportación e introducción de ejemplares de vida silvestre. En México la NOM-059-SEMARNAT-2010, la Ley General de Vida Silvestre y la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente regulan aspectos respecto a su conservación y aprovechamiento sustentable. La procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) es el órgano administrativo encargado de vigilar el cumplimiento de las disposiciones jurídicas, siendo una de sus funciones el combate a actividades relacionadas con el tráfico ilegal, realizando acciones de inspección y vigilancia, donde se aseguran ejemplares de plantas y animales que no cumplan las disposiciones legales, siendo una de las funciones correctivas el decomiso de ejemplares de vida silvestre (SEMARNAT, 2013).

1.6 Especies en peligro de extinción y grados de protección

Los Cathartiformes son aves carroñeras, solo existen 5 especies en todo el país, dos son consideradas por la NOM-059-SEMARNAT-2010 en peligro de extinción las cuales son: cóndor californiano (*Gymnogyps californianus*) y el zopilote rey (*Sarcoramphus papa*) clasificadas también en CITES, la primera en el apéndice I y la segunda en el III. El zopilote sabanero (*Cathartes burrovianus*) se encuentra en protección especial de igual manera por la NOM-059. Las dos restantes que son el zopilote negro (*Coragyps atratus*) y el zopilote aura (*Cathartes aura*) son las únicas especies no mencionadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 ni en CITES por lo que sus poblaciones se consideran más estables que el resto (SEMARNAT, 2013).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Biología reproductiva de Catharthidae.

2.1.1 Estacionalidad y regulación neuroendocrina

En diversas especies de aves, la reproducción ocurre durante ciertas épocas del año, usualmente en aquellas con mayor disponibilidad de alimento (Gutiérrez, 1999). Cuando la duración del día es mayor que la de la noche, en la mayoría de las aves, se activa el inicio de la actividad reproductiva, esto mediante la percepción de la luz por la retina del ojo para continuar hacia el núcleo supraquiasmático y la glándula pineal que liberará melatonina que llegará al hipotálamo, que tiene receptores hormonales encargados de regular funciones reproductivas como la liberación de GnRH (Gwinner, 2003; Brandstätter, 2003; Bentley y cols., 2006). La GnRH es la principal hormona en el control de la fisiología reproductiva de los vertebrados, ya que es la encargada de la liberación de las hormonas de la adenohipófisis, hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La producción y liberación de esteroides por las gónadas (ovario y testículo) está controlada por la LH y la FSH (Bentley y cols., 2006). En los machos la LH actúa en las células de Leydig de las gónadas y la FSH actúa sobre los túbulos seminíferos; en las hembras, la FSH estimula el crecimiento folicular ovárico y es la principal fuente de estrógenos que participan en la formación del huevo, al activarse el folículo se produce progesterona y finalmente la ovulación (Ito y cols., 2011; Ikegami y Yoshimura, 2013). Además de la diferenciación sexual, las hormonas tienen también un papel importante en la conducta reproductiva. Las hormonas son esenciales para la activación del comportamiento sexual y desarrollo de caracteres secundarios y primarios (Bentley y cols., 2006). En hembras, las altas concentraciones de estrógenos incrementan la actividad sexual presentando conductas de receptividad a la cópula (Wingfield y Farmer, 1990).

2.2 Morfofisiología reproductiva de las aves

El aparato reproductor del macho está constituido por tres unidades morfofuncionales: los testículos, conductos deferentes y el órgano copulador o papila eréctil y carecen de epidídimo (González y cols., 2019). El proceso de espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos del testículo y promueve el desarrollo de las espermatogonias que

se transforman en espermatozoides; de este proceso depende la calidad y la producción espermática constante. La espermiogénesis y espermatogénesis, se efectúan en estrecha relación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli y están bajo control de las gonadotrofinas LH y FSH (Peralta y Miazzo, 2002).

En aves silvestres es escasa o nula para ciertos grupos como los cathartiformes, la información respecto a la morfo fisiología de sus espermatozoides; por lo cual se describen los espermatozoides de galliformes como el gallo y el pavo, que generalmente son de forma alargada con longitud de 80 a 90 µm y se subdividen en cabeza, pieza media y cola (Herrera y cols., 2005). La cabeza es curva, filamentosa y mide de 12 a 13 µm, se corona por el acrosoma de 2 µm de largo (Long, 2006). La parte media tiene 4 µm de largo y contiene mitocondrias, y el resto de la cola, con una longitud de aproximadamente 100 µm; a lo largo de ésta se extienden fibras centrales relacionadas con el centriolo proximal y distal. En su parte más ancha, el espermatozoide mide cerca de 0.5 µm. Posee una membrana plasmática donde se encuentran carbohidratos unidos a proteínas y a lípidos, como N-acetil-glucosamina, glicofosfatidil-inositol, β1, 3-galactosa, entre otros, que actúan como receptores. También están presentes fosfolípidos que se encuentran organizados en forma asimétrica bilaminar (Gilbert, 1996; Long, 2006). Los espermatozoides tienen un acrosoma que se deriva del aparato de Golgi, está formado por una membrana externa cercana a la membrana plasmática, y una membrana interna situada cerca de la envoltura nuclear; el acrosoma contiene enzimas hidrolíticas que le van a permitir eliminar las capas que envuelven al óvulo para poder fertilizarlo. Los espermatozoides para obtener su capacidad fertilizante deben llevar a cabo una maduración, capacitación y reacción acrosomal (RA) (Lemoine y cols., 2008), aunque algunos autores mencionan que, en las aves al momento de obtener eyaculados, los espermatozoides ya están capacitados y con capacidad fertilizante (Lemoine y cols, 2009, 2011).

2.3 Diferencias de espermatozoides entre especies aviares

La poligamia y la monogamia, son sistemas de apareamiento, que pueden influir en el grado de pleomorfismo del espermatozoide, siendo que las galliformes, mayormente poligámicas, presentan una concentración espermática superior a las aves monogámicas como halcones y águilas, las cuales presentan menor calidad relacionada a un mayor porcentaje de espermatozoides con morfología anormal (Santiago y cols., 2016). La morfometría espermática también varía ya que existen diferencias dependiendo de la especie, así los galliformes poseen espermatozoides filiformes, largos y anchos; en falconiformes y los accipitriformes tienen espermatozoides con la cabeza más corta y ancha y en el caso de paseriformes con una membrana que forma una estructura en espiral en forma helicoidal (Santiago y cols., 2016).

2.4 Especies de la familia Cathartidae bajo cuidado humano

Actualmente, de las 7 especies de Cathartiformes que existen, 3 de ellas se encuentran bajo cuidado humano en diversos programas de reproducción en zoológicos alrededor del mundo debido a sus características y su estado de conservación que pasó de preocupación menor á amenazado y en peligro crítico (SEMARNAT, 2012).

En México el cóndor californiano (*Gymnogyps californianus*) se encuentra bajo cuidado profesional en el Zoológico de Chapultepec ubicado en la Ciudad de México (SEMARNAT, 2012) bajo el programa programa de acción para la conservación de especies (PACE), el cual es un programa impulsado por el gobierno mexicano para contribuir a la conservación de las especies en riesgo, en este programa, se encuentra de manera específica el “PACE para la Conservación de las Águilas Neotropicales y Zopilote Rey”. La *Association of Zoos and Aquariums* (AZA), en el 2010, menciona que el cóndor andino (*Vultur gryphus*) se encuentra en diversos zoológicos de EUA, y en Suramérica; Houston y colaboradores (2020) sitúan también bajo cuidado profesional a algunos ejemplares en Venezuela, Colombia y Argentina, en diversos zoológicos.

2.5 Proyectos de conservación de la familia Cathartidae

Mediante el plan de acción para la recuperación del cóndor de California de 1996, se han realizado diversas estrategias para su conservación *ex situ*, mediante su reproducción bajo cuidado profesional, en estos proyectos han participado diversos zoológicos de EUA y México; además de realizar acciones para contribuir a la reintroducción del cóndor californiano al medio ambiente silvestre, de manera específica en la Sierra de San Pedro Mártir en Baja California México y en California y Arizona EUA (SEMARNAT, 2012).

La AZA (2010) y el Programa de Conservación del Cóndor Andino (Rodríguez, 2006) mencionan que se han mantenido ejemplares en diversos zoológicos alrededor del mundo, contando con registros en zoológicos de Londres y desde 1940, en zoológicos de EUA se ha logrado su reproducción desde 1973. En Colombia, en el zoológico de Cali se han reproductivo y criado ejemplares que se han liberado desde 1989 y mediante un acuerdo con *The zoological society of San Diego* se inició la repoblación de la especie en los páramos y laderas de los Andes colombianos.

2.6 Protocolos de reproducción bajo cuidado profesional especializado.

El método principal de reproducción en animales bajo cuidado profesional es el de la cópula natural a partir de una pareja reproductora; la reproducción dependerá de diversos factores incluyendo la compatibilidad entre la pareja reproductora, la capacidad fértil individual del macho y la hembra, el período de incubación y los cuidados parentales de la cría (Miller *et al,* 2019). Dentro de las ventajas de la cópula natural la principal es la disminución de la intervención humana para que sean los padres quienes críen a los polluelos sin una impronta con el humano, lo cual facilitará su reintroducción y la posterior formación de parejas reproductoras. Sin embargo, dentro de las desventajas de lograr la cópula natural de las aves, se encuentra la incapacidad de las parejas designadas para que puedan realizar una cópula natural, la agresión que puede producirse durante los intentos de cópula entre los individuos y la asincronía entre el período reproductivo de la pareja (Blanco y cols., 2008).

Por tanto, se han desarrollado diversas técnicas de reproducción asistida para poder reducir estos problemas, entre las que destaca la de inseminación artificial (IA) (Miller

y cols., 2019). Mediante el uso de IA se puede inseminar a más de una hembra por eyaculado, optimizar eyaculados e incluso producir híbridos en algunos casos. También se puede aprovechar la capacidad de los espermatozoides a sobrevivir a la criopreservación para poder mantener un banco genético, desde el cual se pueden enviar espermatozoides a zonas lejanas geográficamente o de individuos valiosos que ya hayan muerto (Blanco y cols., 2008). Dentro de las limitaciones de la IA se puede encuentra la baja calidad del semen que puede ser contaminado con heces y uratos (Blanco y cols., 2008), la mayor inversión en equipo e instalaciones, y el mayor nivel de capacitación necesario para realizarla. Se destaca la importancia de la variedad genética de las poblaciones para poder mantener a una población saludable, además de que ciertos individuos puedan ser extremadamente valiosos por sus características genéticas para proveer de mayor variabilidad genética a la población, lo cual se puede lograr mediante IA (Blanco y cols., 2008).

2.6.1 Técnica de Inseminación Artificial.

La técnica de IA para aves fue desarrollada en 1930, con la implementación de una metodología no invasiva y específica para la obtención del semen de gallos. Consiste en el depósito del semen en la cloaca de la hembra, sujetándola y haciendo presión en el abdomen exponiendo la cloaca para posteriormente vaciar el semen a una profundidad de 3-4 cm en el interior de la cloaca. Presenta distintas modalidades desde el uso de la inseminación *in vivo* de la hembra, con semen fresco, diluido o criopreservado y la fertilización *in vitro* de ovocitos para su posterior transferencia a hembras receptoras (Tanaka y cols., 1994; Samour y cols., 2009; Blesbois y cols., 1999; Lukaszewicz, 2001; Saint Jalme y cols., 2003).

La técnica ha sido utilizada en la actualidad en diversas especies animales, por ejemplo, Fischer y colaboradores (2020) utilizaron la IA con semen fresco en la el loro amazónico de San Vicente (*Amazona guildingii)*, la cual presentaba problemas de reproducción mediante cópula natural, logrando la producción de huevos fértiles. Para accipitriformes y falconiformes, Blanco y colaboradores (*2002*) obtuvieron huevos fértiles mediante IA.

Para la conservación *in vitro* del semen existen dos métodos: 1) “Semen diluido” que involucra la dilución del semen con amortiguadores a baja temperatura (5°C) para poder ser usado en IA (Sexton, 1988). 2) “Semen criopreservado” utiliza la suspensión del semen en diluyentes con crioprotectores para ser conservado en nitrógeno líquido y almacenarlo por corto, mediano o largo plazo según se requiera.

Herrera y colaboradores (2013) describieron un protocolo para la criopreservación seminal de aves que consiste en: obtención de semen, dilución, adición del crioprotector, goteo directo sobre hielo seco, recuperación de la gota en un criotubo, para almacenamiento en nitrógeno líquido y posterior descongelación para su evaluación.

2.6.2 Obtención y conservación seminal

En las aves, existen varias técnicas de obtención seminal: invasivas como la de electroeyaculación, lavado de conductos deferentes, procedimiento quirúrgico, y las no invasivas como el masaje dorsoventral en ejemplares entrenados y no entrenados (Herrera y cols., 2013).

El almacenamiento del semen líquido es una práctica frecuente que involucra la dilución del semen en amortiguadores a baja temperatura (5°C aproximadamente) para ser utilizado en la IA. Se ha demostrado que, dependiendo de los ingredientes utilizados para hacer un diluyente, las condiciones fisicoquímicas que éstos produzcan, estos medios tendrán diferente capacidad de conservación (Sexton, 1988).

Los diluyentes se utilizan para aumentar el volumen del eyaculado, mantener la viabilidad de los espermatozoides, maximizar el número de hembras inseminadas y para facilitar el análisis de los espermatozoides en un eyaculado; existen dos medios que son los más comúnmente utilizados: *Beltsville poultry semen extender* (BPSE) y la solución Lake (Lake y Stewart, 1978). Éstos han sido utilizados en diferentes especies de aves como el buitre de espalda blanca (*Gyps bengalensis)* (Umapathy y cols., 2005), en gallos (Sexton, 1988; Lemoine y cols., 2008), faisanes (*Ssp*) y aguilillas de cola roja (*Buteo jamaicensis*) (Herrera y cols., 2005).

Los diluyentes seminales deben contar con un amortiguador para mantener un pH y una osmolaridad adecuados, que ayudarán a proteger a las células espermáticas y a aumentar el volumen de la muestra (Barbas & Mascarenhas, 2009). En estudios recientes en aves se ha demostrado que la RA puede ser inducida *in vivo* por diferentes compuestos salinos, calcio o compuestos derivados del huevo, es por esta razón que debe prestarse mucha atención a los reactivos utilizados para el diluyente que se ocupará para conservar en buen estado el semen fresco o criopreservado. Un aspecto importante es que la movilidad de los espermatozoides es muy sensible a los factores que componen el plasma seminal y a las modificaciones que los diluyentes sintéticos le ocasionan *(*Lemoine y cols., 2008*).*

Con respecto a la osmolaridad, el semen de aves puede permanecer en un amplio rango que abarca de 250 a 460 mOsm kg-1 H_2O, a menor osmolaridad los espermatozoides se deforman en la región de la cabeza, además de presentar cuellos doblados y a mayor osmolaridad, se deshidratan, en ambos casos esto ocasiona una disminución de su capacidad fertilizante (Donoghue y Wishart, 2000).

También se ha observado que al utilizar un diluyente con una viscosidad similar a la del semen, se obtienen mejores resultados de fertilidad, comparado con semen diluido de manera convencional (semen-diluyente 1:4) con diferente viscosidad (Bootwalla y Miles, 1992).

2.6.3 Criopreservación espermática

La tecnología para la criopreservación espermática se ha desarrollado desde hace aproximadamente 50 años. Ha permitido la conservación de las células germinales de individuos o especies que están en riesgo de extinguirse y para las que todavía no se implementan técnicas de reproducción asistida, como la IA. Sin embargo, las diferencias fisiológicas de las células espermáticas entre las especies e incluso entre individuos, todavía representa un problema sin resolver. A pesar de los esfuerzos realizados en el campo de la criopreservación espermática, pocas técnicas permiten supervivencias elevadas (Avalos y cols., 2018).

Los crioprotectores conocidos se dividen en dos grupos: los que atraviesan la membrana celular como glicerol, eritritol, adonitol, dimetilsulfóxido (DMSO) y

dimetilacetamida (DMA); y los que actúan desde el exterior de la célula, como la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y polivinilpirrolidona (PVP). El DMSO y DMA son los más utilizados para la criopreservación del semen de aves exóticas y silvestres como águilas *(Aquila adalberti*) y halcones *(Falco peregrinus)*; águila dorada (*Aquila chrysaetos*), águila bonelli (*Hieraaetus fasciatus*), águila imperial (*Aquila adalberti*), halcón peregrino (*Falco peregrinus*) y pingüinos (*Spheniscus magellanicus*) se evaluó el efecto de la criopreservación en las características morfológicas y fisiológicas de los espermatozoides y obtuvieron valores aceptables de viabilidad (Blanco y cols., 2002). Blanco y colaboradores (2000) usaron diferentes variables y protocolos de descongelación y evaluaron los efectos en la viabilidad espermática de diferentes especies de aves rapaces, reportando valores de 50.8 % a 93.2 %, con rangos similares a los observados por Herrera y colaboradores (2002) en el halcón cola roja (*Buteo jamacensis*). Aunque se encontró una alta variabilidad en la concentración de los eyaculados y *Parabuteo unicinctus* (Herrera y cols., 2005).

Por otra parte, se ha demostrado la modificación de la distribución de carbohidratos en la superficie membranal de los espermatozoides criopreservados, entre ellos, residuos de manosa; a pesar del uso de crioprotectores con diferente mecanismo de acción, prevalece la presencia de residuos de manosa en la superficie espermática (Herrera y cols., 2005), la cual se ha demostrado que juega un importante papel en el proceso de fertilización en las aves (Robertson y cols., 2000); si hay una alteración en estos carbohidratos, puede verse afectada la capacidad fertilizante del espermatozoide, a pesar de mostrar indicadores similares de evaluación espermática básica, aceptables para su utilización en la IA de otras rapaces (Blanco y cols., 2002).

2.6.4 Efecto de los crioprotectores (DMA).

Cuando el agua extracelular se congela ocurre un segundo ajuste de volumen, motivado por la salida de agua del interior de la célula, en respuesta a las altas concentraciones de sales extracelulares. El DMA es un líquido orgánico que, posee una masa molar de 78.13 g/mol que es menor a la del glicerol; es usado como disolvente orgánico industrial, como crioprotector; 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 (Kuzlu y Taskin, 2017).

El estudio y empleo de otros crioprotectores como la DMA, ha demostrado que permite la fusión de las membranas a una temperatura aproximada de 0 °C, evitando la difusión de los cationes y demás componentes intracelulares a través de las roturas de membrana causadas por la formación intracelular de cristales de hielo (Barbas y Mascarenhas, 2009).

2.7 Reintroducción de ejemplares en medio silvestre

Existen estrategias de reintroducción de aves dentro de las cuales se encuentra el uso de estrategias que tomen ventaja de la capacidad de la población para reproducirse para reforzarlas y también ingresar individuos al entorno, estos individuos pueden ser del mismo entorno, en situaciones ya sea de lesiones del ave o cualquier situación que le impida desenvolverse con normalidad para así facilitar su reingreso, o la crianza artificial de individuos para su posterior reintroducción. Un ejemplo de estas estrategias son las que la SEMARNAT (2012) menciona dentro del Programa de Acción para la Conservación de la Especies (PACE) para la recuperación del cóndor californiano donde se considera la captura, reproducción bajo cuidado humano y liberación para aumentar su población.

2.8 PACE para aves rapaces neotropicales y zopilote rey

El PACE de águilas neotropicales y zopilote rey define las actividades que contribuyan a la conservación y recuperación de especies seleccionadas, en este caso el águila harpía (*Harpia harpyja),* 3 aves del *Spizateus(S. tyrannys, S. ornatus, S. melanoleucus)* y el zopilote rey (*Sarcoramphus papa)* (SEMARNAT, 2018), todas son aves en una categoría de riesgo a nivel nacional e internacional incluidas además en la NOM-059-SEMARNAT-2010 y consideradas en peligro de extinción. El PACE define acciones que permitan la conservación mediante el cumplimiento de los objetivos y metas planteadas utilizando estrategias a corto, mediano y largo plazo (SEMARNAT, 2018), las cuales en 2021 durante la renovación del PACE se acordó dentro de las acciones

de conservación, incluir aquellas estrategias relacionadas al manejo reproductivo de estas especies bajo cuidado profesional a fin de crear protocolos que en este caso estén relacionados con la reproducción asistida en aves. Por lo anterior, es que se hace de importancia y utilidad el desarrollo de proyectos para la conservación *ex situ* mediante la reproducción bajo cuidado humano de ejemplares de espéciese que pueden estar en alguna categoría de riesgo para su conservación, o el estudio estudio de la fisiología reproductiva de especies que a pesar de no estar en un riesgo alto para su conservación como lo son el *Coragyp atratus* y *Cathartes aura*, que si pueden contribuir con información de utilidad para la conservación de otras especies.

3 JUSTIFICACIÓN

La información sobre espermatozoides de aves de la familia Cathartidae en la actualidad es limitada (SEMARNAT, 2012; SEMARNAT, 2018), además de que estas limitaciones se extienden cuando se trabaja con especímenes en peligro de extinción como el cóndor californiano (*Gymnogyps californianus*) y el zopilote rey (*Sarcoramphus papa*), las cuales son aves que pertenecen a esta familia, por lo que se pretende ampliar la información espermática de la familia Cathartidae mediante el uso de especies que no se encuentren en peligro de extinción como son el zopilote negro *(Coragyps atratus)* y el zopilote aura (*Cathartes aura)*, también se pretende ampliar el conocimiento en el uso de semen criopreservado y facilitar el uso del material genético de las especies en peligro de extinción bajo cuidado humano.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles serán los parámetros de evaluación espermática básica y de capacidad de inducir la RA de espermatozoides de *Coragyps atratus* y *Cathartes aura* después de un proceso de congelación y descongelación?

5 HIPÓTESIS

Los espermatozoides de *Coragyps atratus* y *Cathartes aura* mostrarán parámetros morfo fisiológicos de buena calidad y similares, por lo cual un mismo protocolo para su criopreservación que demuestre adecuada viabilidad espermática post descongelación podrá ser utilizado para espermatozoides de otras especies de la misma familia.

6 OBJETIVOS

6.1 General

Describir la morfometría y determinar parámetros fisiológicos de espermatozoides post descongelación, de *Coragyps atratus* y *Cathartes aura*.

6.2 Específicos

- Describir la obtención seminal para ejemplares de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus.*

- Conocer la evaluación seminal básica en fresco y post descongelación, de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus*

- Describir la morfometría espermática de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus*

- Determinar la presencia y distribución de receptores para el reconocimiento de gametos post descongelación, de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus*

- Evaluar la capacidad de reacción acrosomal post descongelación de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus*

7 MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en los laboratorios de: Andrología del Departamento de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Unidad Xochimilco y se utilizó equipo de campo para la evaluación seminal básica (Figura 1).



Figura 1. Evaluación seminal en campo

7.1 Cuidado y bienestar animal

El cuidado y manejo de los ejemplares para la obtención de semen se realizó cumpliendo con la normatividad y legislación vigente:

- NMX-AA-165-SCFI-2014 que establece las especificaciones y los requisitos para obtener la certificación con respecto al bienestar animal, conservación de especies, investigación, educación y seguridad en los zoológicos, esta norma aplica a todos los zoológicos ubicados en el territorio nacional, tanto públicos como particulares.

- NOM-126-ECOL-2000 que establece las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional.

7.2 Ejemplares y material biológico

Se obtuvieron eyaculados de *Coragyps atratus* y *Cathartes aura,* de ejemplares adultos y clínicamente sanos. Alimentados de acuerdo con sus requerimientos, con agua *ad libitum* y de acuerdo con el plan de manejo respectivo para cada UMA o PIMVS, autorizado por la SEMARNAT. Los eyaculados se obtuvieron a partir de cuatro

ejemplares de *Cathartes aura* y de tres ejemplares de *Coragyps atratus*; de los cuales se obtuvieron diferente número de eyaculados, los cuales se utilizaron para montaje de las técnicas y posteriormente para realizar las diferentes evaluaciones en fresco y post descongelación.

El manejo de los ejemplares se realizó en UMAS y PIMVS, con el respectivo plan de manejo autorizado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

UMA/ REINO ANIMAL. REGISTRO SEMARNAT. DGVS-ZOO-P-0074-03-MX.

PIMVS/ PARQUE RODOLFO LANDEROS GALLEGOS. ZOOLÓGICO DE AGUASCALIENTES. CON NÚMERO DE REGISTRO: INE/CITES/DGVS-CR-IN-AV-0035-AGS./00

UMA/ FAUNISTICA ANIMAL, CENTRO DE RECUPERACIÓN DE FAUNA SILVESTRE CON CLAVE DE REGISTRO DGVS-PIMVS-EA-0086-MEX/09

UMA/ "ZOOLÓGICO REGIONAL MIGUEL ÁLVAREZ DEL TORO". INE/CITES/DGVS-ZOO-E-0009-01/CHIS.

UMA/ LA SIBERIA, VIDA SILVESTRE. JESUS ESTUDILLO ÓPOEZ: DGCERN-CR-IN-0039-MEX/00

7.3 Recolección seminal

Los eyaculados se obtuvieron mediante masaje dorsoventral en los meses de diciembre a abril; cada eyaculado se recolectó con una micropipeta graduada (Figura 2), una vez recolectado, se depositó en un tubo Eppendorf con 50 µL de solución Lake (Herrera y cols., 2005), posteriormente, la muestra se mantuvo a una temperatura de 5 ºC hasta su uso para evaluación (Santiago y cols., 2011).



Figura 2. Obtención seminal de *Coragyps atratus*, por método de masaje dorso ventral y eversión de cloaca para la aspiración del semen.

7.4 Evaluación espermática

La movilidad se determinó mediante microscopía de luz transmitida, para estimar el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (Váradi y cols., 2013) en una preparación y vista al microscopio a 400 aumentos.

La viabilidad se determinó mediante el conteo de 100 células espermáticas que se clasificaron y contabilizaron, determinando el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Se utilizó la tinción de eosina-nigrosina que permite evaluar la viabilidad, ya que la eosina es una sustancia de bajo peso molecular que penetra la membrana celular que está dañada y tiñe su núcleo de un color rosado, lo que se consideró como espermatozoides muertos; en aquellos espermatozoides que están vivos y conservan la membrana íntegra, nigrosina muestra un fondo de contraste, apreciándose los espermatozoide transparentes, los cuales se clasificaron como vivos (Figura 3).

Para esto, se agregaron 4 µL de la muestra y 2 µL de la solución de tinción sobre un portaobjetos atemperado a 37 °C, se realizó el frotis y se dejó secar. Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos observando con la herramienta de contraste de fases del microscopio de luz transmitida a 1000 aumentos.

Las formas anormales de los espermatozoides se determinaron también utilizando estos frotis, contando al menos 100 espermatozoides por preparación (Herrera y cols., 2005).

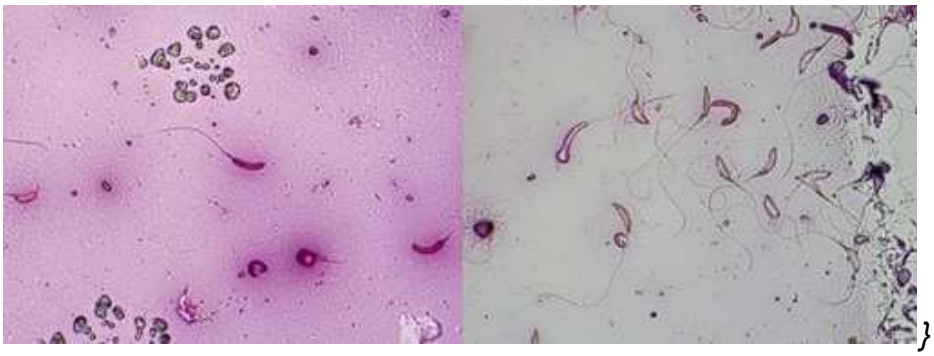


Figura 3. Espermatozoides de *Cathartes aura,* teñidos con solución de eosina-nigrosina, a la izquierda muertos y a la derecha espermatozoides vivos.

7.5 Descripción morfométrica

La morfometría espermática se determinó midiendo la longitud de la cabeza, longitud de la pieza media, longitud del flagelo y longitud total de cada sección de los espermatozoides (Figura 4). Se midieron al menos 100 espermatozoides de cada preparación (Váradi y cols., 2013). Se, utilizó un microscopio trifásico de campo claro, para realizar las observaciones a 1000 aumentos, y obtener imágenes con una cámara y un programa de cómputo EPview ®, con el cual se realizaron las mediciones digitales de cada espermatozoide.

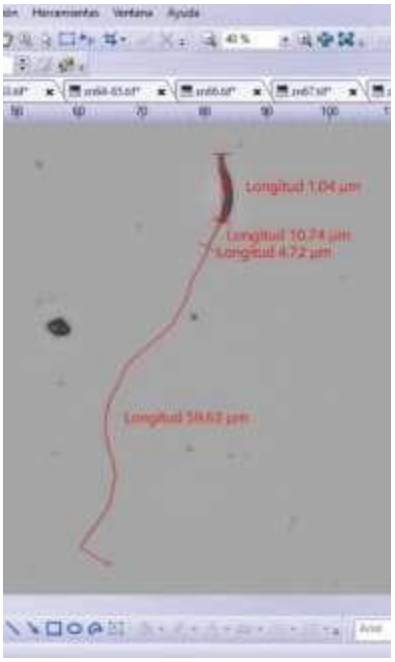


Figura 4. Morfometría espermática.

Se determinó la longitud de cada región y la longitud total.

7.6 Determinación de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana espermática.

Se incubaron alícuotas de $5X10^6$ espermatozoides con 10 µL de aglutinina de germen de trigo (*Triticum vulgaris*), unida a isotiocianato de fluoresceína (WGA-FITC) a una dilución de 1:50, un volumen final de 500 µL en obscuridad por 30 min a 37 °C, posteriormente se centrifugaron (600G x 1 min); se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular con 5 µL de etanol a 2 °C hasta la evaluación. Posteriormente, de cada alícuota se realizaron preparaciones para observar bajo un microscopio de fluorescencia a 1000 aumentos, a longitud de onda 488 nm y excitación de 560 nm, las imágenes se evaluaron con el *software EPview.* Se evaluaron 200 espermatozoides por muestra y se determinó la distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana plasmática de los espermatozoides.

7.7 Capacitación espermática y capacidad de RA.

Para la inducción de la RA se colocó en un tubo Eppendorf una alícuota de 20 µL conteniendo $5X10^6$ espermatozoides, se adicionaron 50 µL de clortetraciclina (CTC) y 50 µg de membrana perivitelina, se resuspendió y se mantuvo sobre una platina térmica marca Tokai Hit protegiéndolos de la luz. Se incubaron por 20 min a 37 °C. Se evaluó tomando 10 µL de esta mezcla sobre un portaobjetos, se realizó un frotis dejando secar para después colocar un cubreobjetos y se analizó en el microscopio de fluorescencia. Se contaron al menos 100 espermatozoides determinando los tres patrones diferentes: espermatozoides no capacitados, espermatozoides capacitados y espermatozoides con RA (Ochoa y cols., 2014; Herrera y cols., 2017).

7.8 Estado fisiológico (Intacto, capacitado y Reaccionado) de los espermatozoides evaluados con CTC y WGA-FICT.

Al evaluar las características de fluorescencia con las técnicas y metodología empleada, se determinó que cada ensayo de evaluación (distribución y actividad de Ca2+ con CTC para determinar el porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y con RA y distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico con WGA-FITC (Camarillo y cols., 2019).

7.9 Criopreservación seminal

Para su criopreservación (Figura 5), el semen recolectado se diluyó con medio Lake (fructosa al 0.6% p/v, glutamato de sodio al 1.92% p/v, acetato de magnesio al 0.08% p/v, acetato de sodio al 0.51% p/v, citrato de potasio al 0.128% p/v, pH de 7.2 y osmolaridad de 330 mOms) (Lake y Stewart, 1978); como crioprotector se utilizó DMA al 6% (Sasanami y cols., 2013; Camarillo y cols., 2019).

Se utilizaron pajillas de 0.25 mL, se dejaron enfriar por 10 minutos a 5 °C, posteriormente se congelaron en vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos, y finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido para su criopreservación (Rakha y cols., 2016). La descongelación se realizó a 37 °C por 30 segundos, para enseguida realizar su evaluación.



Figura 5. Criopreservación seminal en campo.

7.10 Análisis estadístico

De los parámetros de evaluación básica fueron determinadas las medianas de cada evaluación, en la morfometría espermática se determinaron el porcentajes y promedios de cada determinación de longitud. Los datos obtenidos de la evaluación de la fisiología espermática (capacitación y reacción acrosomal) calidad espermática y criopreservación se expresaron como promedio ± error estándar (EE). Para reconocer las diferencias significativas de calidad espermática entre individuos se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, además de la determinación de cuartiles.

8 RESULTADOS

8.1 Recolección seminal

Se obtuvieron 14 eyaculados por masaje dorsoventral de zopilote negro (*Coragyps atratus*) desde diciembre hasta abril, los cuales fueron procesados según la metodología descrita previamente. Se descartaron las muestras que mostraron ausencia de espermatozoides. El volumen de los eyaculados fue tan bajo que siempre se requirió del uso del diluyente para la obtención y análisis de la muestra. La obtención de esta muestra fue complicada por el temperamento del ave y las condiciones de su resguardo.

De zopilote aura (*Cathartes aura*), se obtuvieron 12 eyaculados obtenidos en febrero, la calidad espermática en fresco, de éstos eyaculados, fue de mayor que en cualquier muestra obtenida de zopilote negro; (*Coragyps atratus*) sin embargo, siempre fue necesario el uso del diluyente para la obtención y el procesado de la muestra.

8.2 Evaluación espermática básica

Durante la evaluación básica del eyaculado del zopilote negro la concentración de espermatozoides visualizados en fresco fue menor en comparación con los visualizados con zopilote aura. En ambas especies y debido al bajo volumen de los eyaculados, que fue menor a 15 µl por eyaculado, no fue posible determinar de manera precisa ninguno de estos dos parámetros.

Debido al tipo y número de muestras se usó la prueba estadística no paramétrica de Kruskall-Wallis; en las tablas 1 y 2 se muestran las medianas y el error estándar en los percentiles 25-75 [Mediana ± EE (Perc. 25-75)] de los parámetros de evaluación básica obtenidos en los eyaculados en fresco y postdescongelación para *C. atratus* en la tabla 1 y para *C. aura* en la tabla 2.

Los parámetros espermáticos de *C atratus* en semen fresco, fueron similares a los que se determinaron en el semen postdescongelación (Tabla 1). Determinando un promedio de 23 % de espermatozoides vivos.

Tabla 1. Evaluación espermática básica de Zopilote negro *(Coragyps atratus).*

Evaluación espermática básica	Semen Fresco	Semen Descongelado
Vivos	25±3.0 [a] (17.2-33.5)	22.5±4.9 [a] (7.2-36.5)
Muertos	3.5±0.7 [a] (2.7-4.2)	5.0±1.1 [a] (2.2-8.5)
Normales	26.5±3.2 [a] (18.7-35.5)	25.5±5.6 [a] (9.7-42.2)
Anormales	1.0±0.5 [a] (0.75-3.25)	1.5±0.6 [a] (0.2-2.7)
Con cabeza enrollada	1.0±0.2 [a] (0.0-1.25)	0.5±0.2 [a] (0.0-1.0)
Con cabeza doblada	0.0±0.1 [a] (0.0-0.0)	0±0.1 [a] (0.0-0.7)
Con cuello enrollado	0.5±0.2 [a] (0.0-1.0)	0±0.4 [a] (0.0-0.7)
Con cuello doblado	0.0±0.2 [a] 0.0-0.2	0±0.2 [a] (0.0-0.7)
Con cola enrollada	0.0±0.0 [a] 0.0-0.2	0±0.1 [a] (0.0-0.0)
Con cola doblada	0.0±0.0 [a] 0.0-0.0	0±0.0 [a] (0.0-0.0)

En parámetros de espermatozoides en fresco comparados post descongelación, distinta literal en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)

Mediana ± *EE (Perc 25-75)*

Los parámetros espermáticos de *C. aura* en semen fresco, presentaron diferencias estadísticas al comparar los parámetros de espermatozoides muertos los cuales fueron 3 % mayores en semen descongelado (P<0.05); los demás parámetros fueros similares en semen fresco y en el semen post descongelación (Tabla 2).

Tabla 2 Evaluación espermática básica de Zopilote aura *(Cathartes aura).*

Evaluación espermática básica	Semen Fresco	Semen Descongelado
Vivos	58.5±6.2[a] (43.3-75.5)	58.0±4.3 [a] (41.5-63.0)
Muertos	5.0±0.6 [a] (3.3-6.0)	8.0±0.7 [b] (5.5-10.0)
Normales	60±6.4 [a] (46.2-79.5)	65.0±4.7 [a] (47.0-68.5)
Anormales	3.0±0.4 [a] (2.0-3.7)	2.0±5.2 [a] (1.0-3.5)
Con cabeza enrollada	2.0±0.2 (1.0-2.0)	1.0±0.4 [a] (0-0-2.0)
Con cabeza doblada	0.0±0.0 [a] (0.0-0.0)	0.0±0.1 [a] (0.0-0.5)
Con cuello enrollado	0.5±0.3 [a] (0.0-1.7)	0.0±0.3 [a] (0.0-2.0)
Con cuello doblado	0.0±0.2 [a] (0.0-1.0)	0.0±0.1 [a] (0.0-0.5)
Con cola enrollada	0.0±0.1 [a] (0.0-0.0)	0.0±0.0 [a] (0.0-0.0)
Con cola doblada	0.0±0.0 [a] (0.0-0.0)	0.0±0.0 [a] (0.0-0.0)

En parámetros de espermatozoides en fresco comparados post descongelación, distinta literal en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)
Mediana ± *EE (Perc 25-75)*

8.3 Descripción de la morfometría espermática

Se determinaron las medidas de los espermatozoides de *C. atratus* y *C. aura*; estimando los promedios de la longitud total, de la cabeza, parte media y del flagelo, también se determinó el ancho en la región de la cabeza de los espermatozoides.

En la tabla 3, se evidencia que únicamente la longitud de la pieza media fue mayor 0.5 µm ($P<0.01$) en los espermatozoides de *C. atratus* en comparación con los espermatozoides de *C. aura.*

Tabla 3 Morfometría espermática de Zopilote negro *(Coragyps atratus)* y Zopilote aura *(Cathartes aura).*

	Espermatozoides de:	
Longitud de:	*Coragyps atratus*	*Cathartes aura*
Cabeza (µm)	9.2±0.2 [a] (7.5-10.3)	9.4±1.2 [a] (8.6-10.3)
Pieza media (µm)	2.7±0.1 [a] (2.0-3.3)	3.2±0.1 [b] (2.7-3.7)
Flagelo (µm)	39.7±1.9 [a] (20.5-55.9)	45.7±1.3 [a] (39.7-48.5)
Total (µm)	49.6±1.9 [a] (32.3-67.6)	58.4±1.3 [b] (52.2-61.1)
Ancho cabeza (µm)	1.9±0.2 [a] (1.2-2.6)	1.8±0.04 [a] (1.6-2.1)

En parámetros de espermatozoides en fresco comparados post descongelación, distinta literal en superíndice indica diferencia estadística ($P<0.05$)

Mediana ± *EE (Perc 25-75)*

8.4 Patrones de Fluorescencia determinados con Clortetraciclina (CTC).

En las condiciones de evaluación espermática de este estudio, al igual que en los resultados reportados por Ochoa *et al.,* (2014) se determinaron en los espermatozoides tres patrones de fluorescencia:

Patrón 1, (Figura 6). Espermatozoides con una fluorescencia uniforme a lo largo de toda su superficie; considerado como intacto o no capacitado.

Patrón 2, (Figura 7). Espermatozoides con una fluorescencia en la pieza media hacia el acrosoma; catalogado como capacitado.

Patrón 3, (Figura 8). Espermatozoides con una zona de fluorescencia pequeña bien marcada en el área de la pieza media, se aprecian pequeñas manchas, clasificado como espermatozoide RA.

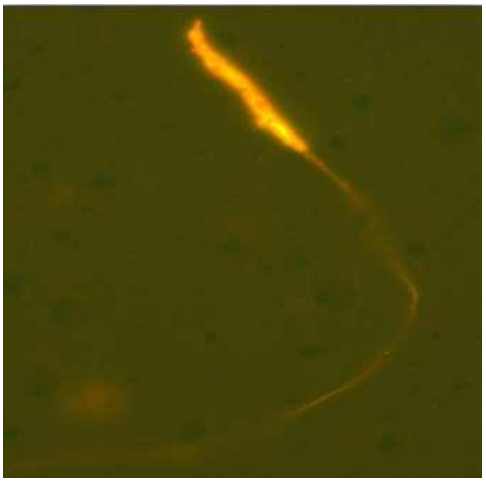


Figura 6.- Espermatozoide intacto, determinado con el uso de clortetraciclina. Lo que sugiere que la presencia de Ca^{2+} está de manera homogénea en toda la superficie de la célula, relacionada con un estado metabólico pasivo o movilidad progresiva característica de espermatozoides no capacitados.

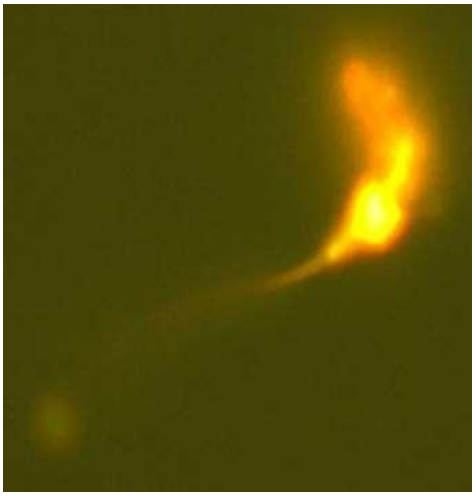


Figura 7.- Espermatozoide capacitado, determinado con el uso de clortetraciclina. La actividad de Ca^{2+} (fluorescencia) se acumula en la zona donde se encuentran la región postecuatorial y apical del cuello, sitio donde se localizan las mitocondrias, lo que sugiere una hiperactivación espermática, relacionada con el proceso de capacitación.

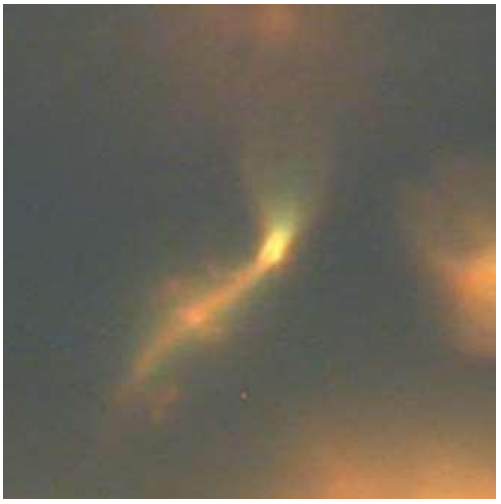


Figura 8. Espermatozoide con reacción acrosomal, determinado con clortetraciclina. La actividad de Ca^{2+} sin denotar en la región acrosomal, sugiere la pérdida de éste, evidenciando una menor actividad y presencia de Ca^{2+}

8.5 Capacidad de reacción acrosomal *in vitro*

En los espermatozoides descongelados de *C. atratus* (Tabla 4), de manera evidente se demostró la viabilidad espermática al observar diferencias (P<0.05), en los porcentajes de espermatozoides no capacitados, capacitados y con RA espontánea al demostrar cambios asociados a la capacidad fertilizante de los espermatozoides (En espermatozoides no incubados con MPV) y reacción acrosomal inducida (En espermatozoides incubados con MPV), esto asociado también, al determinar un incremento del 34 % (P<0.05) de espermatozoides que presentaron RA ante la coincubación con MPV como inductor de ésta. Lo anterior se observó asociado de manera inversamente proporcional a los parámetros de espermatozoides no capacitados los cuales presentaron un decremento del 44 % (P<0.05) en los parámetros determinados en los espermatozoides coincubados con MPV. Encontrando también una diferencia (P<0.05) de aproximadamente 7 % en los espermatozoides capacitados.

Tabla 4 Capacidad de reacción acrosomal en espermatozoides descongelados de Zopilote negro *(Coragyps atratus)*

	Coincubación:		
% de espermatozoides	**Sin Membrana perivitelina**	**Con membrana perivitelina**	**Mann-Whitney (P)**
NO capacitados	51.0 ± 4.6 [a 1] (42.4 – 60.8)	6.4 ± 1.1 [b 1] (25.0 – 30.1)	0.01
Capacitados	36.7 ± 5.1 [a 2] (29.9 – 49.9)	30.2 ± 2.3 [b 2] (27.7 – 33.3)	0.05
Con Reacción acrosmal	9.5 ± 1.4 [a 3] (6.1 – 12.2)	43.1 ± 2.1 [b 3] (36.8 – 45.1)	0.05
Kruskall-Wallis (p)	<0.01	<0.01	

En porcentajes de espermatozoides comparados sin Vs co incubados con membrana perivitelina, distinta literal en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)
El porcentajes de espermatozoides con diferente condición fisiológica, distinta número en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)
Porcentaje ± *EE (Perc 25-75)*

En los espermatozoides descongelados de *C. aura* (Tabla 5), Los porcentajes de espermatozoides incubados sin y con MP, mostraron diferencias estadística significativa (P<0.0) entre aquellos no capacitados, capacitados y con RA espontánea e inducida. También se determinó un incremento (P<0.05) del 20 % de espermatozoides con RA inducida. También se observó, con una relación inversamente proporcional, una disminución (P<0.05) del 15 % en espermatozoides no capacitados. El porcentaje de espermatozoides capacitados se determinó en un porcentaje promedio de 32% en espermatozoides sin y con coincubación con MPV (P<0.05).

Tabla 5 Capacidad de reacción acrosomal, en espermatozoides descongelados de Zopilote aura *(Cathartes aura)*

	Coincubación:		
% de espermatozoides	**Sin Membrana perivitelina**	**Con membrana perivitelina**	**Mann-Whitney (P)**
NO capacitados	54.4 ± 3.4 a 1 (51.2 – 63.2)	39.7 ± 2.2 b 1 (38.5 – 45.2)	0.01
Capacitados	34.3 ± 2.9 a 2 (28.8 – 38.0)	31.0 ± 2.1 a 2 (24.9 – 32.5)	0.02
Con Reacción acrosmal	9.25 ± 1.3 a 3 (7.3 – 12.7)	29.3 ± 3.7 b 3 (22.2 – 36.5)	0.01
Kruskall-Wallis (p)	<0.01	<0.05	

En porcentajes de espermatozoides comparados Sin Vs Co incubados Con Membrana Perivitelina, distinta literal en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)

El porcentajes de espermatozoides con diferente condición fisiológica, distinta número en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)

Porcentaje ± *EE (Perc 25-75)*

8.6 Determinación de Acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana plasmática del espermatozoide.

Se determinaron tres patrones de fluorescencia con el uso de lectina de germen de trigo (*Triticum vulgaris*) ligada a isotioscionato de fluoresceína (WGA-FITC). Estos patrones A, B y C (Figura 9) se determinaron en las mismas condiciones de evaluación de las alícuotas que fueron evaluadas mediante tinción con CTC, para determinar los porcentajes de espermatozoides no capacitados, capacitados y con RA espontánea e inducida mediante su coincubación con MPV, como inductor natural de la RA.



Figura 9. En la observación microscópica, se determinaron en los espermatozoides, tres patrones de fluorescencia.

A: espermatozoide con fluorescencia en cabeza, pieza media y flagelo
NO CAPACITADO.

B: espermatozoide con fluorescencia en la parte acrosomal, en la zona postecuatorial y pieza media.
CAPACITADO

C: espermatozoide con fluorescencia tenue homogénea en todas las secciones del espermatozoide, con una fluorescencia ligeramente mayor en la cabeza del espermatozoide.
CON REACCION ACROSOMAL

En los espermatozoides descongelados de *C. atratus y C. aura* (Tablas (6 y 7), se determinó que, entre los porcentajes de espermatozoides con fluorescencia asociada a no capacitados, capacitados y con RA, tanto incubados con o sin MPV en las diferentes condiciones, se observaron diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

En la tabla 6, de manera específica se muestra para espermatozoides de *C. atratus*, que los porcentajes de espermatozoides no capacitación no mostraron diferencias en sus porcentajes (P>0.05); a diferencia de los porcentajes de espermatozoides capacitados en los cuales se determinó una disminución (P<0.05) del 15 % aproximadamente, la cual puede explicar el incremento (P<0.05) del 20 % de espermatozoides con reacción acrosomal inducida (RAI), cuando fueron coincubados con MPV con respecto a los no incubados con MPV

Tabla 6 Determinación de N-acetilglucosamina mediante lectina WGA en espermatozoides descongelados de Zopilote negro *(Coragyps atratus)*

Coincubación:			
% de espermato-zoides	**Sin Membrana perivitelina**	**Con membrana perivitelina**	**Mann-Whitney (P)**
NO capacitados	40.0 ± 3.9 [a 1] (38.5 – 49.4	36.4 ± 3.5 [a 1] (27.9 – 40.1)	0.01
Capacitados	41.7 ± 3.3 [a 2] (34.7 – 46.4)	26.5 ± 2.8 [b 2] (21.6 – 31.3)	0.05
Con Reacción acrosmal	19.0 ± 2.1 [a 3] (10.9 – 19.7)	39.1 ± 2.3 [b 3] (33.9 – 44.2)	0.05
Kruskall-Wallis (P)	<0.01	<0.05	

En porcentajes de espermatozoides comparados Sin Vs Co incubados Con Membrana Perivitelina, distinta literal en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)

El porcentajes de espermatozoides con diferente condición fisiológica, distinta número en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)

Porcentaje ± *EE (Perc 25-75)*

En la tabla 7, de manera específica se muestra para espermatozoides de *C. aura*, que los porcentajes de espermatozoides no capacitados mostraron una diferencia (P>0.05) del 25 % en sus porcentajes; en espermatozoides capacitados no se encontraron diferencias con un promedio de ambas del 30%. La diferencia en los porcentajes de espermatozoides no capacitados puede relacionarse con el incremento (P<0.05) del 30 % de espermatozoides con RA, cuando fueron coincubados con MPV con respecto a los no incubados con MPV.

Tabla 7 Integridad membranal en espermatozoides descongelados de Zopilote aura *(Cathartes aura)*

	Coincubación:		
% de espermato-zoides	**Sin Membrana perivitelina**	**Con membrana perivitelina**	**Mann-Whitney (P)**
NO capacitados	54.5 ± 4.1 [a 1] (44.2 – 60.0)	30.4 ± 2.9 [b 1] (23.5 – 36.6)	0.01
Capacitados	36.4 ± 4.0 [a 2] (28.3 – 44.8)	23.6 ± 4.2 [a 2] (21.0 – 38.0)	0.02
Con Reacción acrosmal	10.4 ± 1.7 [a 3] (7.9 – 14.1)	42.6 ± 2.6 [b 3] (36.3 – 46.3)	0.01
Kruskall-Wallis (P	<0.01	<0.05	

En porcentajes de espermatozoides comparados sin Vs co incubados con membrana perivitelina, distinta literal en superíndice indica diferencia estadística (P>0.05)

El porcentajes de espermatozoides con diferente condición fisiológica, distinta número en superíndice indica diferencia estadística (P<0.05)

Porcentaje ± *EE (Perc 25-75)*

8.7 Comparación entre capacidad de reacción acrosomal y evaluación membranal.

Cuando la evaluación se realizó en condición de capacitación se encontró una mayor proporción de los patrones 1 y A no capacitados, lo cual se invirtió, cuando los espermatozoides se evaluaron en condiciones de RA, en donde se encontró una mayor proporción de espermatozoides con los patrones de fluorescencia 3 y C consideraron como espermatozoides con reacción acrosomal.

La proporción de espermatozoides con reacción acrosomal, se incrementó cuando los espermatozoides se coincubaron con MPV; cuando los espermatozoides fueron incubados en condiciones de capacitación, se encontró que los patrones 2 y B se presentaron en mayor proporción.

Al relacionar la actividad espermática se determinó que los patrones 1 y A corresponden a espermatozoides no capacitados o intactos; los patrones 2 y B a espermatozoides considerados como capacitados y los patrones 3 y C corresponden a espermatozoides con RA.

9 DISCUSIÓN.

En el presente estudio, en ambas especies *Coragyps atratus* y *Cathartes aura*, los eyaculados se obtuvieron mediante masaje dorso ventral, para recolectar el semen con el uso de una micro pipeta graduada en fechas en las que la información bibliográfica reporta que no se encontraban en periodo reproductivo natural (Bucley, 2020; Arévalo y Funes, 2019); sin embargo se evidenció la producción seminal, lo cual contrasta con los reportes antes citados, demostrando que en Cathartiformes, la producción espermática puede variar, al parecer de manera dependiente y asociada a la disponibilidad de alimento y otras condiciones ambientales como puede ser el fotoperiodo.

También es evidente el impacto antropogénico negativo para la conservación de especies y de la diversidad genética (Váradi y cols., 2013), por lo que existe una necesidad urgente de crear bancos de germoplasma que resguarden información biológica en riesgo. Este estudio, se estandarizó un protocolo de congelación que permitió de manera adecuada la criopreservación espermática de dos especies de Cathartiformes que puede servir de antecedente para la criopreservación espermática de ejemplares del mismo grupo taxonómico, que pueden estar en alto riesgo de extinción como lo son el zopilote rey y el cóndor de California.

Los resultados de morfometría espermática muestran que la longitud del cuello de los espermatozoides de *Cathartes aura* poseen una diferencia significativa frente a los espermatozoides de *Coragyps atratus*, siendo la de *Cathartes aura* más grande. Ni-

Hao Gu (2019) describe en mamíferos que la pieza media contribuye al movimiento flagelar, siendo que aquellos espermatozoides con piezas medias más largas poseen una movilidad mayor que aquéllos con pieza media más corta, también hace mención que en mamíferos hay una relación positiva entre el tamaño de la pieza media y el grado de promiscuidad en las especies.

En aves paseriformes, Benisson (2016), describe que la pieza media incrementa su volumen conforme la longitud del flagelo se incrementa, sin embargo, esto no se presenta en todas las especies de paseriformes siendo que hay descripción de flagelos largos con piezas medias cortas; Santiago y colaboradores (2017) también describe que espermatozoides de aves con mayor competencia sexual se relacionan con piezas medias más grandes.

Cramer y Grønstøl (2022), describieron como espermatozoides con un mayor volumen de pieza media se relacionan positivamente con machos polígamos que tienen una alta competencia entre otros machos. Dentro de las hipótesis que intentan explicar la razón de esto se ha descrito principalmente que los espermatozoides más largos tienen oportunidades mayores de alojarse en los túbulos de almacenamiento espermático de las hembras (TAE). También Briskie y James (1997) describen que los espermatozoides más largos se encuentran en aves con mayor competencia espermática, y Santiago (2017), menciona que las aves polígamas presentan eyaculados con mayor concentración, volumen y espermatozoides vivos, en comparación con los eyaculados de aves monógamas.

Por tanto parece ser que la competencia entre machos y la poligamia se encuentran relacionados con espermatozoides más largos, ya sea con piezas medias o flagelos más largos (Briskie y James,1997). Parece ser que a su vez el mayor tamaño se relaciona con mayor movilidad ya sea por mayor cantidad de ATP producida por mayor cantidad de mitocondrias alojadas en la pieza media (Benison, 2016) o por mecanismos de movilidad en el flagelo (Mccarthy, 2021), de manera específica para poder alojarse primero en los TAE, prevenir que otros espermatozoides se almacenen en los TAE o evitar ser desplazados por otros espermatozoides en los TAE.

Por lo anterior, el hecho de que la pieza media en *Cathartes aura* sea de mayor longitud que la de *Coragyps atratus* podría indicar que las primeras aves se encontraban bajo mayor presión social ya sea por un comportamiento polígamo o por encontrarse éstas en un sitio donde eran frecuentadas por otros ejemplares de *Cathartes aura* que pudieron inducir la estimulación, ya que ambas aves se describen como monógamas. Otro factor a tomar en cuenta es la longitud total del espermatozoide, donde existe mayor variabilidad en los espermatozoides de *Coragyps atratus* en comparación con los espermatozoides de *Cathartes aura*; en ese sentido, Mccarthy y colaboradores (2021), mencionan que a mayor competencia espermática, menor variabilidad en el tamaño espermático, y se relaciona con *Coragyps atratus* que se vieron enfrentados a una menor competencia espermática que *Cathartes aura* y por tanto esta última especie tuvo una menor variabilidad en la longitud total de los espermatozoides.

La mayor diferencia encontrada con respecto a la morfometría, fue al comparar entre especies, lo cual podría explicarse por el estímulo reproductor, ya que *Cathartes aura* se vio sujeto a un mayor estímulo por la presencia de mayor número de ejemplares a diferencia de *Coragyps atratus* los cuales no se encontraban bajo la misma condición ambiental por estimulación de hembras o machos (Cramer y cols., 2022; Mccarthy y cols., 2021; Santiago-Moreno y cols., 2017).

Al realizarse la evaluación básica de los espermatozoides en fresco y post descongelación en *Coragyps atratus* se observó que no hubo diferencia significativa en los parámetros de vivos, muertos, normales y anormales, los cuales son esenciales para valorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides del eyaculado, por lo tanto el diluyente y el crioprotector mantuvieron a los espermatozoides viables y en buen estado morfofisiológico (Rakha y cols., 2016; Matsuzaki y cols., 2015).

Respecto a *Cathartes aura*, los parámetros de evaluación básica en fresco y postdescongelación no mostraron diferencia significativa respecto a los parámetros de vivos, normales y anormales a excepción del porcentaje de muertos donde sí se encontró una diferencia significativa encontrándose mayor cantidad de espermatozoides muertos post descongelados, lo cual es lo esperado al momento de criopreservar espermatozoides ya que se reportó recientemente que el crioprotector DMA altera la membrana plasmática del espermatozoide (Mehaisen, 2022).

En aves se ha descrito que la movilidad espermática aumenta conforme estos avanzan en los conductos deferentes hasta el momento de su eyaculación (González y cols., 2019), también se reportó que los espermatozoides obtenidos de testículo tienen una capacidad fertilizante, por lo que se plantea que desde los testículos hasta los conductos deferentes suceden eventos importantes para el proceso de la capacitación, al igual que los túbulos de almacenamiento espermático que poseen las hembras, los cuales se encuentra en el oviducto, en la unión útero-vaginal donde los espermatozoides pueden sobrevivir durante un largo tiempo, asociado esto a un proceso de descapacitación y capacitación (González y cols., 2019). Respecto a la RA, puede inducirse al incubarse con membrana perivitelina o con Ca^{2+} extracelular (González y cols., 2019).

Los procesos importantes para la fertilización son la RA y la capacitación, ambos indicadores de fertilidad muy usados en estudios *in vitro* (Kawamoto, 1999), además de que la N-acetilglucosamina también puede utilizarse para medir capacitación y reacción acrosomal.

La viabilidad espermática pos descongelación2+ puede ser distinta entre diferentes especies de aves, uno de los factores biológicos potencialmente responsables de tales diferencias es la variación de la fluidez de la membrana plasmática, la cual tiene un papel importante en la restauración fisiológica después de la criopreservación; el estado de la membrana espermática post descongelación puede ser evaluado utilizando técnicas de microscopía con fluorescencia (Blesbois *et al.,* 2005). Los resultados de este estudio demostraron similitud entre los espermatozoides de las dos especies estudiadas, sugiriendo que es posible utilizar la misma metodología para criopreservar espermatozoides de especies del mismo grupo taxonómico de los cathartiformes y también tratar de dilucidar mecanismos de otros aspectos fisiológicos

En cuanto al estado metabólico de los espermatozoides determinado con el uso de CTC, en espermatozoides de *Coragyps atratus* la viabilidad espermática se mantuvo, ya que al agregarse la membrana perivitelina (MPV) e inducirse RA, se obtuvo un incremento del 34% en la RA al usar la MPV, además los espermatozoides no capacitados disminuyeron en un 44 %. Respecto a los espermatozoides de *Cathartes aura,* estos incrementaron su RA en un 20% al usar la MPV disminuyendo en un 15%

los espermatozoides no capacitados al usar MPV manteniendo también la viabilidad espermática.

Los parámetros de maduración espermática determinados con CTC que mide la actividad de calcio iónico en el espermatozoide mediante fluorescencia, mostraron que los porcentajes de espermatozoides intactos, fueron mayores a los porcentajes de espermatozoides capacitados, los cuales pareciera se mantuvieron sin cambio, sin embargo el porcentaje de espermatozoides con RA, se incrementé después de la coincubación con MPV, ya que al evaluar la RA, los niveles de espermatozoides intactos disminuyeron y los niveles de espermatozoides reaccionados aumentaron, observando porcentajes de espermatozoides capacitados similares a los incubados en condición de RA; mientras los espermatozoides reaccionados fueron claramente menores a los porcentajes de espermatozoides reaccionados incubados en esta misma condición, lo que demostró el efecto inductor de RA de la MPV, ya que contiene la proteína ZP1 y progesterona, que son inductores naturales de la RA en espermatozoides de aves (Sasanami y cols., 2007*).*

Al determinar la presencia y distribución de N-acetylgucosamina y/o ácido siálico como receptores membranales, mediante el uso de WGA-FITC; los espermatozoides de *Coragyps atratus* no mostraron una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de espermatozoides no capacitados, teniendo una diferencia significativa en el porcentaje de espermatozoides capacitados que disminuyendo al usar MPV y evidenciar un incremento en los espermatozoides con RA, en los cuales se encontró diferencia significativa aumentando este porcentaje. En cuanto a los espermatozoides de *Cathartes aura* existe una diferencia significativa en cuanto a los espermatozoides no capacitados disminuyendo el porcentaje de éstos al usar MPV y aumentando de manera significativa el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

Se ha reportado que el proceso de capacitación espermática en las aves no es identificado durante la fertilización ya que ocurre en un tiempo muy corto (Lemoine y cols., 2011), así también la presencia de sustancias como proteínas descapacitantes y condiciones que inducen de manera natural la descapacitación espermática en el tracto de las hembras (Sasanami y cols., 2013). Los resultados de este estudio evidencian parámetros de capacitación espermática que de manera indudable son el

“paso” para que los espermatozoides maduren al grado de lograr la capacidad de realizar la RA.

Las determinaciones realizadas con CTC y WGA evidenciaron que existe una diferencia significativa con un aumento del porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal tanto en *Coragyps atratus* como en *Cathartes aura*, por lo que la viabilidad de sus espermatozoides se mantuvo en un porcentaje adecuado, además de que al momento de realizar la descongelación en ambas muestras se un porcentaje de espermatozoides vivos y normales sin diferencias significativas en fresco y post descongelación, nos muestran que los espermatozoides se mantienen viables al descongelarlos.

Un hallazgo que destaca, son los porcentajes de capacitación determinados con ambas técnicas (CTC y WGA):

En *Coragyps atratus* los parámetros son los esperados, en *Cathartes aura* también los parámetros son los esperados a excepción del porcentaje de espermatozoides capacitados los cuales disminuyeron en *Coragyps atratus*. Con el uso de WGA-FITC, en *Coragyps atratus* los parámetros que destacaron fueron el de espermatozoides con RA y espermatozoides no capacitados, ambos sin diferencias estadísticamente significativas y con diferencias significativas en espermatozoides capacitados, con un porcentaje menor de espermatozoides capacitados. En *Cathartes aura* los parámetros son los esperados con el parámetro mayormente marcado de RA con una diferencia significativa que indica que reaccionaron al encontrarse con la MPV y no anteriormente con el DMA y el proceso de criopreservación.

10 CONCLUSIONES.

Se evidenció la producción espermática en ejemplares ex situ bajo cuidado humano y en periodos naturales distintos a los reportados por la bibliografía.

El protocolo de criopreservación espermática implementado, demostró ser útil para ambas especies estudiadas, mostrando resultados similares, lo cual sugiere que puede ser utilizado para otras especies del mismo grupo taxonómico Cathartidae.

Los parámetros de morfología espermática evidenciaron diferencias entre especies, sin embargo, no se asociaron a resultados de evaluación básica distintos postdescongelación espermática.

Los indicadores de maduración espermática confirmaron la viabilidad espermática adecuada *in vitro*, además de demostrar parámetros de espermatozoides no capacitados, capacitados y con RA, los cuales, hasta donde sabemos, no han sido reportados para las especies estudiadas.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Arévalo D., Funes G. (2019). Primer registro de nidificación del zopilote aura (*Cathartes aura*) en El Salvador. *Huitzil* 20(2): e525. https://doi.org/10.28947/hrmo.2019.20.2.414

Ávalos A., Gonzales J., Vargas A., Herrera J. (2018) Recolección y manipulación seminal *in vitro*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. ISBN: PDF 978-607-28-1299-4 epub 978-607-28-1300-7

AZA Raptor TAG 2010. Andean Condor (*Vultur gryphus*) Care Manual. Association of Zoos and Aquariums, Silver Spring, MD.https://assets.speakcdn.com/assets/2332/andeancondorcaremanual20101.pdf

Barbas J., Mascarenhas R. (2009) Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10, 49-62. https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4.

Bentley GE., Kriegsfeld L., Osugi T., Ukena K., O'Brien S., Perfito N., Moore I., Tsutsui K., Wingfield J. (2006). Interactions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology 305*(9): 807-814. https://doi.org/10.1002/jez.a.306

Blesbois E., Grasseau I., Hermier D. (1999). Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 degrees C. *Theriogenology 52*(2): 325-334. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00132-6

Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction (129) 371-378. DOI: 10.1530/rep.1.00454

Blanco J., Gee G., Wildt D., Donoghue A. (2002). Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramagnal insemination approach. *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians 33*(1): 1-7. https://doi.org/10.1638/1042-7260(2002)033[0001:PPFEBO]2.0.CO;2

Blanco J., Wildt D., Höfle U., Voelker W., Donoghue A. (2008). Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. *Theriogenology 71*(1): 200-213. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X08006730?via%3Dihub.

Bootwalla S., Miles D. (1992) Development of diluents for domestic fowl semen. *World's Poultry Science Journal* 48(2): 121-128, DOI: 10.1079/WPS19920012

Brandstätter R. (2003). Encoding time of day and time of year by the avian circadian system. *Journal of Neuroendocrinology 15*(4): 398–404. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01003.x

Braun EL., Cracraft J., Houde P. (2019) Resolving the avian tree of life from top to bottom: The promise and potential boundaries of the phylogenomic era. In: Kraus R. (eds) *Avian Genomics in Ecology and Evolution*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16477-5_6

Briskie R., James RV. (1997). *The evolution of sperm size in birds* . Ontario, Canada: Department of Biology, Queen's University, Kingston. https://www.jstor.org/stable/2411167

Buckley N. (2020). Black *Vulture* (*Corahyps atratus*), version 1.0. In Birds of the World (A. F. Poole and F. B. Gill, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. https://doi.org/10.2173/bow.blkvul.01

Camarillo R., Jimenez I., Guzmán A., Rosales AM., Rodríguez F., Pérez-Rivero JJ., Herrera JA. (2019). Oviductal proteins effect in rooster spermatic cryopreserva- tion. *Cryo letters 40*(6), 352-356.

Cramer ERA., Grønstøl G., Lifjeld JT. (2022). Flagellum tapering and midpiece volume in songbird spermatozoa. *Journal of Morphology* 283, 1577-1589. https://doi.org/10.1002/jmor.21524

Donoghue A., Wishart G. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science 62*(1-3):213-232. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00160-3

Etches R. (1996). "Reproducción aviar", Departament of Animal and Poultry Science. Editorial Acribia. 348 pp.

Finkelstein M., Kuspa NF., Schmitt NJ (2020).California Condor (*Gymnogyps californianus*), version 1.0. In Birds of the World (P. G. Rodewald, Editor). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. https://doi.org/10.2173/bow.calcon.01

Fischer D., Schneider H., Meinecke-Tillmann S., Wehrend A., Lierz M. (2020). Semen analysis and successful artificial insemination in the St. Vincent amazon (*Amazona guildingii*). *Theriogenology 148*:132-139. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.004

Gilbert A. (1996). Aves de Corral. En reproducción e inseminación artificial en animales, Editado por S, H.E. Zaragoza España. Interamericana. 232-187 p.

González-Santos JA., Ávalos-Rodríguez Alejandro., Martínez-García JA., Rosales-Torres AM., Herrera-Barragán J A. (2019). Sperm morphophysiology in different sections of the rooster reproductive tract. *International Journal of Morphology 37*(3), 861-866. https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000300861

Gutiérrez, G (1999). Hormonas y reproducción en aves: La influencia de factores ambientalesy sociales. *Revista Latinoamericana de Psicología* 31(1):151-174. [fecha de Consulta 29 de enero de 2021]. ISSN: 0120-0534. Disponible en: https://www.rdalyc.org/aticulo.oa?id=805/80531109

Gwinner E. (2003). Circannual rhythms in birds. *Current opinion in neurobiology 13*(6), 770–778. https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.10.010

Herrera JA., Quintana JA., López MA., Betancourt M., Fierro R. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of Andrology 51*(5):353–360. https://doi.org/10.1080/014850190944401

Herrera JA., Ávalos A., Rodríguez I., Gonzales, JA., Rosales AM. (2013). Técnicas de Reproducción Asistida en Aves Domésticas y Silvestres. Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Unidad Xochimilco. México, D.F. 71 pp.

Herrera J., Guzmán A., Vargas A., Ávalos A., Rosales A. (2017). Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved eyaculado of Harris hawk (Parabuteo unicinctus). *Austral Journal of Veterinary Sciences 49*(1):39-43. https://dx.doi.org/10.4067/s0719-81322017000100039

Holste M., Ruth JM., Eitniear JC. (2020). King *Vultur*e (*Sarcoramphus papa*), version 1.0. In Birds of the World (T. S. Schulenberg, Editor). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. https://doi.org/10.2173/bow.kinvul1.01

Houston D., Kirwan GM., Christie DA., Sharpe CJ. (2020). Andean Condor (*Vultur gryphus*), version 1.0. In Birds of the World (J. del Hoyo, A. Elliott, J. Sargatal, D. A.

Christie, and E. de Juana, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. https://doi.org/10.2173/bow.andcon1.01

Ikegami K., Yoshimura T. (2013). Seasonal time measurement during reproduction. *The Journal of Reproduction and Development* *59*(4):327–333. https://doi.org/10.1262/jrd.2013-035

Ito T., Yoshizaki N., Tokumoto T., Ono H., Yoshimura T., Tsukada A., Kansaku N., Sasanami T. (2011). Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. *Endocrinology* 152:3952–3962

Johnson JA., Brown JW., Fuchs J., Mindell DP. (2016). Multi-locus phylogenetic inference among new world vultures (Aves: Cathartidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution 105*, 193–199. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.08.025

Kawamoto A., Ohashi K., Kishikawa H., Zhu LQ., Azuma C., Murata Y. (1999). Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertility and Sterility 71*(3), 497–501. https://doi.org/10.1016/s0015- 0282(98)00507-x

Kirk DA., Mossman MJ. (2020). Turkey *Vultur*e (*Cathartes aura*), version 1.0. In Birds of the World (A. F. Poole and F. B. Gill, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. https://doi.org/10.2173/bow.turvul.01

Kuzlu M., Taskin A. (2017). The effect of different extenders on the sperm motility and viability of frozen Turkey semen. *Indian Journal of Animal Research* 51:235-241

Lake P., Stewart J. (1978). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen an improved method. *British Poultry Science* 19:2:187-194, DOI: 10.1080/00071667808416462

Lemoine M., Grasseau M., Brillard I., Blesbois E. (2008). A reappraisal of the factors involved *in vitro* initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction* 136(4): 391.

Lemoine M., Dupont J., Guillory V., Tesseraud S., Blesbois E. (2009). Potential involvement of several signaling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction. *Biology of Reproduction 81*(4):657-665. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072660

Lemoine M., Mignon-Grasteau S., Grasseau I., Magistrini M., Blesbois E. (2011). Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology* *75*(1):122-130. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.017

Long JA. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science 85*(2): 232-236. https://doi.org/10.1093/ps/85.2.232

Lukaszewicz E. (2001). Effects of semen filtration and dilution rate: On morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. *Theriogenology* 55:1819-1829 https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00524-6.

Mccarthy E., Mcdiarmid CS., Hurley LL., Rowe M., Griffith SC. (2021). Highly variable sperm morphology in the masked finch (*Poephila personata*) and other estrildid finches. *Biological Journal of the Linnean Society* 33(4):1099-1109. https://academic.oup.com/biolinnean/article/133/4/1099/6276770#395625425

Mehaisen GMK., Elomda AM., Hamad SK., Ghaly MM., Sun Y., Li Y., Zong Y., Chen J., Partyka A., Nazmi A., Abbas A. O., Stino FKR. (2022). Effect of dimethylacetamide concentration on motility, quality, antioxidant biomarkers, anti-freeze gene expression, and fertilizing ability of frozen/thawed rooster sperm. *Animals an Open Access Journal From MDPI 12*(20), 2739. https://doi.org/10.3390/ani12202739

Miller E., Lamberski N., Calle P. (2019). Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 9, W.B. Saunders, Page-123, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55228-8.00134-X.

Mills A., Crawford L., Domjan M., Faure J. (1997). The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21(3): 261-281. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00028-0

Ni-Hao Gu., W.-L ZS. (2019). Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reproduction Biology and Endocrinology* 17(66). https://doi.org/10.1186/s12958-019-0510-y

NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana para la protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. SEMARNAT; Gobierno Federal.

Ochoa F., Val D., Juárez A., Toscanol O., Conejo J. 2014. Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo durante el proceso de criopreservación. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 4, 123-125. http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2014/Trabajo033_AICA2014.pdf

Peralta M., Miazzo R., 2002. Manejo Reproductivo en Aves. Cursos de Introducción a la Producción Animal y Producción Animal I. FAV UNRC. https://www.buenastareas.com/ensayos/Manejo-Reproductivo-En-Aves/31885585.html

Prum R., Berv, J., Dornburg A., Field D., Townsend J., Lemmon E., Lemmon A. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature 526*(7574): 569-573. https://doi.org/10.1038/nature15697

Rakha B., Ansari M., Akhter S., Hussain I., Blesbois, E. (2016). Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus murghi*) semen. *Animal Reproduction Science 174*: 45-55. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.004

Rodríguez C., Rodriguez M., Ciri F. (2006) Programa Nacional para la Conservacion del Condor Andino en Colombia "Plan de acción 2006-2016". Editorial Jotamar Ltda. https://www.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2021/10/Programa-Nacional-para-la-Conservacio%CC%81n-del-Co%CC%81ndor-Andino-2006.pdf

Saint Jalme M., Lecoq R., Seigneurin F., Blesbois E., Plouzeau E. (2003). Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology 59*(3-4):875-888. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01153-6

Santiago J., Castaño C., Toledano A., Coloma M., López A., Prieto M., Campo J. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science* 90(9):2047-2053. DOI: 10.3382/ps.2011-01355.

Samour J., Markham J., Moore H., Watson P. (2009). Semen cryopreservation and artificial insemination in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of Zoology*. (216):169-176. 10.1111/j.1469-7998.1988.tb02422.x.

Santiago-Moreno J, Esteso MC, Villaverde-Morcillo S, Toledano-Déaz A, Castaño C, Velázquez R, López-Sebastián A, Goya AL, Martínez JG. (2016). Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian Journal of Andrology* 18(6):882-888. doi: 10.4103/1008-682X.188660

Sasanami T., Matsuzaki M., Mizushima S., Hiyama G. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *The Journal of Reproduction and Development 59*(4): 334-338. https://doi.org/10.1262/jrd.2013-038

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales / Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas / Instituto Nacional de Ecología (2012). Programa de Acción para la Conservación de la Especie: Cóndor de California (*Gymnogyps californianus*) Jesús Lizardo Cruz Romo, Ismael Cruz Molina y Elvia de la Cruz Robles (Eds.) (1a Ed.) México.

Şekercioğlu C., Wenny D., Whelan C. (2016) Why Birds Matter: Avian Ecological Function and Ecosystem Services. University of Chicago Press https://www.researchgate.net/publication/276279152_Why_Birds_Matter_Avian_Ecological_Functions_and_Ecosystem_Services#:~:text=Birds%20engage%20in%20numerous%20and,over%20the%20last%20two%20decades.

SEMARNAT (2013) Tráfico Ilegal de Vida Silvestre. Primera edición. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2013/CD001601.pdf

SEMARNAT, 2018 Programa de acción para la conservación de las especies: Águilas neotropicales y Zopilote Rey. (Harpia *harpyj, pizaetus tyrannus, Spizaetus ornatus, Spizaetus melanoleucus*, *Sarcoramphus papa*) , SEMARNAT/CONANP, Mexico https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/443936/PACE__guilas_Neotropicales.pdf

Sexton T. (1988). Comparison of commercial diluents for holding turkey semen 24 hours at 5 C. *Poultry science 67*(1): 131-134. https://doi.org/10.3382/ps.0670131

Sincerbox SN., DiGangi AE. Chapter 5 - What Big Teeth You Have: Taphonomic Signatures of North American Scavengers, Editor(s): Susan N. Sincerbox, Elizabeth A. DiGangi, Forensic Taphonomy and Ecology of North American Scavengers, Academic

Press, 2018, Pages 63-148, ISBN 9780128132432, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813243-2.00005-1.

Tanaka K., Wada T., Koga O., Nishio Y., Hertelendy, F. (1994). Chick production by *in vitro* fertilization of the fowl ovum. *Journal of Reproduction and Fertility 100*(2), 447-449. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000447

Umapathy G., Sontakke S., Reddy A., Ahmed S., Shivaji S. (2005). Semen characteristics of the captive Indian white-backed vulture (*Gyps bengalensis*). *Biology of Reproduction 73*(5):1039-1045. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043430

Váradi É., Végi B., Liptói K., Barna, J. (2013). Methods for cryopreservation of guinea fowl sperm. *PloS One 8*(4): e62759. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062759

Winkler DW., Billerman SM., Lovette IJ. (2020). New World *Vultur*es (Cathartidae), version 1.0. In Birds of the World (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. https://doi.org/10.2173/bow.cathar2.01

Wingfield J., Farner D. (1990). The determination of five steroids in avian plasma by radioimmunoassay and competitive protein-binding. *Steroids* 26(3):311-321. DOI: 10.1016/0039-128x(75)90077-x

12 ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA MAESTRIA

A) Se participó en el curso “2021 del PACE”, para aves neotropicales y del zopilote rey organizado por la CONABIO. Noviembre de 2021.





Ilustración 1 PACE para aves neotropicales y zopilote rey

B) Reunión del PACE 2012. Se definieron las acciones a seguir en los siguientes 2 meses en el subgrupo “Manejo reproductivo bajo cuidado humano” Con las acciones: Inventario de individuos bajo cuidado humano de las seis especies del PACE y condiciones de resguardo de los individuos de las seis especies (con potencial de reproducción).

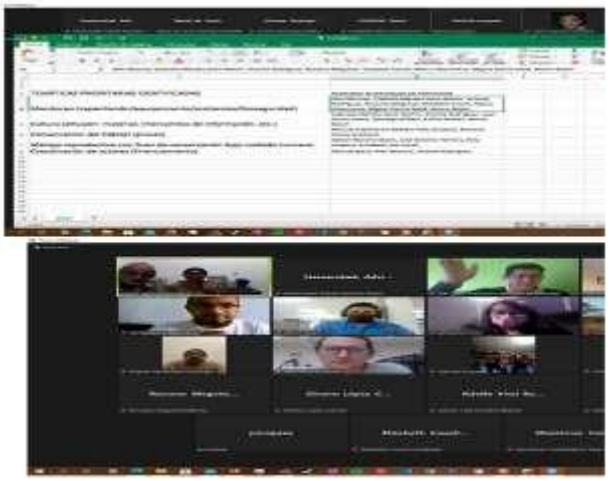


Ilustración 2 Participación en el PACE

C) Se realizó una estancia de investigación de movilidad en el Zoológico Miguel Álvarez del Toro durante un mes desde el 15 de julio al 18 de agosto de 2022, donde se manejaron ejemplares de Zopilote Rey (*Sarcoramphus papa*) y de *Spizaetus tirannus.*



Ilustración 3 Manejo reproductivo de Spizaetus tirannus y Sarcoramphus papa en el zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro

D) Se realizó una conferencia sobre “reproducción asistida en aves” como parte del curso de “Medicina y manejo de aves silvestres bajo cuidado humano” realizado el 25,26 y 27 de agosto del 2022 en el Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro.



Ilustración 4 Conferencia sobre "Reproducción Asistida en aves"

E) Se participó como ponente en el curso Medicina y manejo de aves silvestres bajo cuidado humano" .Realizado en el ZooMAT en Agosto de 2022.



Ilustración 5 Curso de Medicina y manejo de aves silvestres bajo cuidado humano

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00110
Matrícula: 2203801587

Caracterización y criopreservación seminal de *Cathartes aura* y *Coragyps atratus.*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 25 del mes de abril del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ
M. EN C. FELIX DOMINGO SANCHEZ GODOY
MTRO. FERNANDO GUAL SILL

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

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: HEMEROHEB ADRIAN MORENO MARIN

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.



HEMEROHEB ADRIAN MORENO MARIN
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. MIGUEL ANGEL LEON GALVAN

VOCAL

DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

VOCAL

M. EN C. FELIX DOMINGO SANCHEZ GODOY

SECRETARIO

MTRO. FERNANDO GUAL SILL