



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL CONEJO DE
LOS VOLCANES (*Romerolagus diazi*) EN EL ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARIA FERNANDA DE LA VEGA ARNAUD

ASESOR: M.C. JUAN ARTURO RIVERA REBOLLEDO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

Dedico el presente trabajo de tesis con todo mi amor y cariño a:

Mis padres por su total apoyo en la elaboración de este trabajo y por ser un ejemplo de superación y guiar mi vida con amor.

A mi hermana Mariana quien me apoya incondicionalmente con mucho cariño.

A Mariano y Sofía con quien he compartido momentos de gran felicidad y han cambiado mi vida. Los Amo.

Agradecimientos

A Juan Arturo Rivera, quien me apoyo en todo momento, ya que sin su paciencia, consejos y enseñanzas no hubiera logrado mis metas.

A Saúl Soto, por la oportunidad que me brindo al ingresar al laboratorio de Reproducción y por su ayuda en todo momento.

A Diana por estar a mi lado tantos años y compartir tantos momentos de felicidad y apoyarme en todo momento.

A mis amigas Mariana, Paulina, Karla y Verónica quienes me han acompañado a lo largo de la carrera con su apoyo incondicional y han vivido junto conmigo un sueño que se ha hecho realidad.

A los médicos y directivos del Zoológico de Chapultepec quienes me dieron la oportunidad de realizar éste trabajo.

INDICE

RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCION.....	7
1.1 Importancia de los lagomorfos en México	
1.2 El conejo zacatuche	
1.2.1 Clasificación taxonómica	
1.2.2 Hábitat	
1.2.3 Comportamiento	
1.2.4 Conducta social	
1.2.5 Conducta sexual	
1.3 Importancia de los lagomorfos en México	
1.4 Importancia del cautiverio y la conservación	
1.5 Biología reproductiva	
1.5.1 Madurez reproductiva	
1.6 Técnicas de recuperación espermática	
1.7 Características del semen de conejo	
II.JUSTIFICACION.....	20
III. OBJETIVO GENERAL.....	21
IV.MATERIAL Y METODOS.....	22
V. RESULTADOS.....	26
VI. DISCUSION.....	32
VII. CONCLUSIONES.....	35
VIII. ANEXOS.....	37
IX. BIBLIOGRAFIA.....	39

RESUMEN

El zacatuche o conejo de los volcanes (*Romerolagus diazi*) es una especie de lepórido endémica que se distribuye solamente al Sur de la Ciudad de México, y estados colindantes en el área de Morelos, Puebla y Estado de México ⁽¹⁾. Se le ha catalogado en grave peligro de extinción y de la que se conoce muy poco sobre su reproducción ⁽²⁾.

El objetivo de éste estudio fue el de evaluar las características macroscópicas del semen de zacatuches adultos en cautiverio. La recuperación espermática se realizó utilizando el epidídimo de 6 cadáveres. Se extrajo el aparato reproductor de los ejemplares que ingresaron al área de patología de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre (DGZVS) por muerte no asociada al sistema reproductivo. Las gónadas se extrajeron de la bolsa escrotal y se disecaron junto con el epidídimo. Posteriormente, se colocaron en bolsas de plástico limpias y debidamente identificadas por gónada, individuo, fecha y hora de recolección. Los espermatozoides fueron obtenidos por medido de diversos cortes transversales a la cola de epidídimo.

El examen microscópico se realizó a través de un microscopio óptico, evaluando sus características de motilidad, concentración y viabilidad.

Los promedios de la concentración espermática, motilidad y viabilidad fueron de 914×10^6 espermatozoides / g de epidídimo, 36 % de motilidad y 57% para espermatozoides vivos.

Observamos que el peso del ejemplar no está influenciado por la edad del mismo y el tamaño corporal no es proporcional al de los testículos ni del epidídimo. Al calcular la concentración de espermatozoides en el epidídimo pudimos observar que el tamaño del mismo no influyó sobre las reservas espermáticas almacenadas en él y que el tamaño de los testículos no es proporcional a la cantidad de espermatozoides en epidídimo.

Por otro lado se encontró un tamaño testicular mayor al reportado por Cervantes *et al.* (1996). El porcentaje de motilidad y viabilidad fueron bajos probablemente debido al tiempo que transcurrió desde la muerte del ejemplar hasta el procesamiento de las muestras.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de los lagomorfos en México

En el país existe gran variedad y diversidad biológica, tan sólo en el Estado de México y el Distrito Federal, se han registrado 118 especies de mamíferos silvestres (25% total de las especies reportadas para el país) ⁽³⁾.

Alrededor de 26 son endémicas de México, de las cuales seis se distribuyen en el Eje neovolcánico, como lo son el Teporingo (*Romerolagus diazi*), la Tuza (*Cratogeomys merriam* y *C. tylosinus*) y los roedores de los volcanes (*Neotomodon alstoni*, *Reithrodontomys chrysopsis* y *Peromyscus hylocetes*). ⁽⁴⁾.

México es el país más rico del Continente Americano en cuanto al número de especies de conejos y liebres silvestres, ya que en su territorio alberga a nueve especies de conejos: ocho del género *Sylvilagus* y una del *Romerolagus*, y cinco especies de liebres del género *Lepus*. Todas las especies de *Sylvilagus* habitan exclusivamente en el continente americano ⁽¹⁾.

Los conejos y liebres silvestres de México son de importancia ecológica porque constituyen la base de las cadenas alimentarias de los ecosistemas mexicanos. Además de los roedores, representan el alimento de la mayor parte de las poblaciones de depredadores como serpientes, aves rapaces diurnas y nocturnas y mamíferos carnívoros ⁽¹⁾.

La dieta de los lagomorfos incluye grandes cantidades de partes vegetativas de pastos, hierbas, arbustos y hasta corteza de árboles, lo cual trae como consecuencia un proceso de regulación de poblaciones de especies vegetales, tanto en el aspecto florístico como estructural. Asimismo, los lagomorfos contribuyen a la dispersión de varias especies de plantas al transportar sus semillas a otras áreas ⁽¹⁾.

Los lagomorfos mexicanos también son importantes en todo el territorio nacional como fuente de alimento para habitantes de sector rural y como fuente de atracción de

cazadores deportivos. Actualmente, el calendario cinergético autoriza la cacería de cinco especies de conejos (*Sylvilagus*) y dos especies de Liebres (*Lepus*) ⁽¹⁾.

Algunas especies de lagomorfos mexicanos son considerados como plaga ya que sus actividades alimentarias ocasionan daños en la agricultura. La liebre cola negra (*L. californicus*), es un claro ejemplo ya que compite activamente por el pasto que sirve de forraje para el ganado vacuno ⁽¹⁾.

1.2 El conejo zacatuche

El conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) pertenece a un género monotípico y considerada como especie primitiva por sus características morfológicas, genéticas y ecológicas, que lo distinguen como una especie única y relíctica; ya que presenta características óseas que se asemejan a las de los lepóridos del periodo Terciario ⁽¹⁾.

Se encuentra en el Apéndice I de la Conservación sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) ⁽²⁾, así como en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como especie en peligro de extinción ⁽⁵⁾. En México se encuentra protegido por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2006, en la categoría P (en peligro de extinción) ⁽⁶⁾. La Asociación Mexicana para la Conservación y Estudio de los Lagomorfos A.C (AMCELA) ha determinado que el cautiverio es necesario para contribuir al mantenimiento de poblaciones viables para la conservación del *Romerolagus diazi* ⁽⁷⁾.

1.2.1 Clasificación taxonómica

Clase: Mammalia

Orden: Lagomorpha

Familia: Leporidae

Genero: *Romerolagus*

Especie: *Romerolagus diazi*

Nombre común: Teporingo, Conejo zacatuche o Conejo de los volcanes



Figura 1. *Romerolagus diazi*.

1.2.2 Hábitat

El conejo zacatucho se distribuye solamente al Sur de la Ciudad de México y estados colindantes en el área de Morelos, Puebla y Estado de México. Su hábitat comprende la región central del Eje Neovolcánico Transversal. En la actualidad básicamente los Volcanes Popocatepetl e Iztaccíhuatl, Sierra Nevada y los volcanes El Pelado, Tláloc y Sierra Chichinautzin,⁽⁸⁾. En donde se encuentran los bosques abiertos de pino-encino con densas coberturas de gramíneas amacolladas como *Muhlenbergia macroura*, *Stipa ichu* y *Festuca amplissima*⁽¹⁾. El área total de su hábitat se estima en 280 km² (146 en la zona Popo-Izta, 48 en el V. El Pelado y 86 en el V. Tlaloc)⁽⁸⁾.

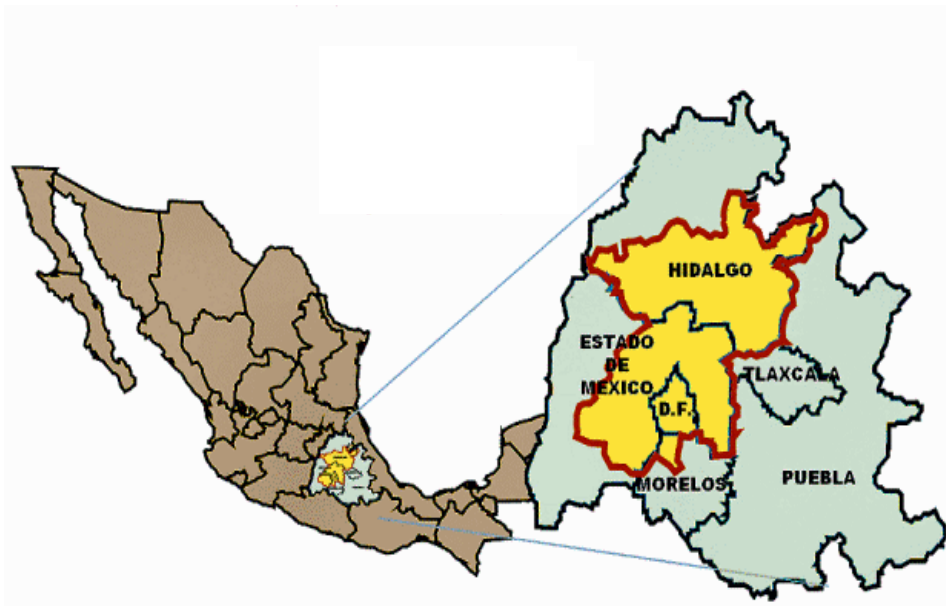


Figura 2. Mapa de distribución del hábitat del zacatucho.

1.2.3 Comportamiento del zacatuche

El zacatuche puede estar activo a cualquier hora del día o de la noche, sin embargo, sus actividades se concentran durante el crepúsculo, permanece activo todo el año, incluyendo los días nublados y fríos ⁽⁸⁾.

1.2.4 Conducta Social

Es gregario y vive en grupos de dos a cinco individuos y presenta un patrón de organización social bien definido. Las hembras, debido a su tamaño son quienes ocupan una jerarquía más alta en la colonia, por lo que son más agresivas ⁽⁸⁾.

El zacatuche tiene un ámbito hogareño de no más de 2500m², puede presentar pautas conductuales de agresión, tales como morder y expulsar a otros individuos en defensa de territorio y de un compañero ⁽⁹⁾.

Para permanecer activo, el zacatuche requiere de la presencia de una cobertura herbácea densa, particularmente de gramíneas amacolladas. El permanecer inmóvil, con las orejas distendidas, es una pauta conductual en presencia de posibles depredadores. A diferencia de los *Sylvagus* el zacatuche no se aleja distancias considerables cuando huye, sino que corre solamente varios metros y se detiene, proceso que repite varias veces antes de llegar a su madriguera ⁽⁹⁾.

Realiza con frecuencia vocalizaciones agudas y fuertes para informar a otros individuos sobre la presencia de depredadores, lo cual propicia que otros zacatuches a su vez vocalicen. Sin embargo, aun en ausencia de situaciones de alarma, vocaliza como parte normal de sus interacciones sociales, utiliza un repertorio amplio de sonidos asociados al desarrollo de diferentes pautas conductuales ⁽⁹⁾.

1.2.5 Conducta sexual

En el caso del zacatuche la conducta del cortejo es un poco diferente a la de los conejos domésticos, mientras el macho se acerca, la hembra se desplaza varios pasos en dirección contraria. Este acto se repite unas diez veces durante diez minutos. A la mitad

de estos intentos, la hembra se torna hacia el macho repentinamente y finge atacar, saltando sobre la cabeza del macho. En ese momento el macho se torna hacia la hembra y se avecina. Finalmente, la hembra se detiene, se extiende estirando las extremidades anteriores y adopta una postura de sumisión. Mientras el macho realiza la monta la hembra mueve su perineo hacia arriba y se completa la cópula. La copulación se lleva a cabo en cuestión de segundos, caracterizándose por la caída del macho hacia la parte trasera de la hembra ⁽¹⁰⁾.

Un despliegue conductual comúnmente observado durante el cortejo de apareamiento es el conocido como "pelea o evasión", lo que ha causado la muerte de varios machos. Mientras el conejo macho realiza el ritual de las aproximaciones, la hembra puede alejarse, entonces el macho se muestra nervioso y puede desplegar una persecución. Además, la hembra puede brincar una o varias veces sobre la cabeza del macho, o tornarse y atacar al macho, ocasionándole heridas fatales ⁽¹⁰⁾.

1.3 Importancia biológica y ecológica del zacatucho

Las especies de tamaño corporal medio o pequeño que se consideran en riesgo y tienen por lo general, distribuciones restringidas a ambientes limitados. Ejemplos de especies de bosques templados en esta categoría son el teporingo (*Romerolagus diazi*), la ardilla voladora (*Glaucomys volans*) y la rata zacatonera (*Sigmodon leucotis*) ⁽¹¹⁾.

El *Romerolagus* es el lagomorfo de menor talla de nuestro país y se caracteriza por su color pardo oscuro homogéneo, sus pequeñas orejas redondas, patas cortas y cola no visible ⁽¹²⁾.

Dos actividades antropogénicas sobresalen como los principales factores causales de la extinción del zacatucho, las cuales son la cacería y la fragmentación del hábitat. La cacería indiscriminada ha tenido un severo impacto, causando el decremento de las poblaciones ⁽¹¹⁾. Actualmente el principal factor de riesgo para los mamíferos en general es la fragmentación del hábitat, ya que más del 50% de los ambientes naturales han desaparecido por la agricultura y urbanización, y el resto está muy fragmentado. El hábitat del zacatucho se ha fragmentado en 16 zonas en un periodo relativamente corto

(90 años). Este proceso de fragmentación está estrechamente vinculado con el crecimiento de la ciudad de México ⁽¹²⁾.

Es predecible que de continuar o incrementarse las graves tendencias de deterioro ambiental en el Estado de México, haya consecuencias más severas en los mamíferos en particular y en la biodiversidad en general. De no tomarse medidas de manejo y conservación adecuadas como una protección adecuada de las áreas ya consideradas como parques nacionales y áreas de protección especial, así como el uso racional planificado de los recursos naturales que existen en el área de distribución del zacatuche, en las próximas dos décadas es indudable que se extinguirá esta especie ⁽¹²⁾.

1.4 Importancia del cautiverio en la conservación de las especies

La importancia de realizar investigaciones en animales de fauna silvestre es fundamental para mantener a las especies y evitar su extinción. Esto se puede realizar en estudios de campo y con poblaciones cautivas. Ambos trabajos se complementan entre sí. Los estudios con poblaciones silvestres pueden confirmar hipótesis desarrolladas durante estudios de individuos cautivos y viceversa ⁽¹³⁾.

Debido a lo difícil que resulta estudiar a los zacatuches en su hábitat natural, las observaciones en cautiverio pueden ser una opción válida para conocer algunos aspectos de la biología de esta especie. Con el mantenimiento de individuos en cautiverio, en buenos recintos, se puede obtener información valiosa, sobre comportamiento y reproducción. Esto ya ha sido demostrado con muchos aspectos biológicos del zacatuche, como por ejemplo el período de gestación y la interacción entre los individuos ⁽¹¹⁾.

En el periodo de 1977 a 1983 se realizaron tres expediciones al Estado de México a la región de Juchitepec, donde se recolectaron 26 ejemplares, los cuales se mandaron a la Universidad de Hokkaido en Japón, con la finalidad de realizar estudios sobre mantenimiento, alimentación y reproducción ⁽¹¹⁾.

Actualmente en México los únicos núcleos en cautiverio, se hallan en el Zoológico de Chapultepec y en el Zoológico de Los Coyotes, los cuales, descienden de un número reducido de fundadores. Durante este tiempo no se ha evaluado las características espermáticas de los individuos para monitorear la salud reproductiva que se tiene en la

colonia. La evaluación de las características seminales de los ejemplares adultos nos da una idea muy clara del estatus reproductivo de una colonia.

No cabe duda, que la cría en cautiverio ha permitido conocer más sobre la vida del zacatuche. Además estos centros sirven como "aulas ambientales" para que mucha gente pueda conocer a la especie y preocuparse por promover su conservación. Sin embargo, lo más importante es mantener las poblaciones silvestres y su hábitat para garantizar la supervivencia de la especie.

1.5 Biología reproductiva del zacatuche

El dimorfismo sexual es común en lagomorfos, generalmente los machos son más pequeños que las hembras, los machos sexualmente activos presentan testículos escrotados y el glande del pene extrusible. En promedio, los testículos miden 17.5 mm de largo por 9.7mm de ancho, estas dimensiones no parecen mostrar relación directa con el tamaño del individuo o la época del año. El periodo reproductivo del zacatuche comprende todo el año, aunque es más intenso durante el verano, y disminuye durante el invierno ⁽⁸⁾.

No se conoce con exactitud el proceso de maduración espermática en el zacatuche, pero sabemos que en el conejo adulto la duración de la espermatogénesis es de 38 a 41 días, la producción diaria de espermatozoides es de 30 a 40 millones por gramo de testículo. Durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides sufren un proceso de maduración, el paso por el epidídimo dura de 8 a 10 días, permaneciendo 2 días en la cabeza, 2 en el cuerpo y 5 a 6 en la cola ⁽¹⁴⁾.

La espermatogénesis se lleva a cabo como consecuencia de la estimulación por las hormonas gonadotróficas de la hipófisis, la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante, esta última estimula la secreción de testosterona por medio de las células de Leydig que rodean a los túbulos espermáticos, los cuales están formados de células somáticas y células germinales. Entre las células somáticas se encuentran las células de Sertoli, siendo su presencia determinante para el desarrollo de las células germinales ⁽¹⁵⁾.

El epidídimo, está constituido por túbulo altamente contorneado que recibe el nombre de conducto epididimario, el cual ha sido dividido en tres regiones principales que son cabeza, cuerpo y cola debido a sus características celulares, diámetro del túbulo y área superficial del lumen ⁽¹⁵⁾.

El epitelio epididimario está formado por diferentes tipos celulares, cada uno de los cuales se especializa en una función en particular, entre ellas se encuentran: la absorción, eliminación y secreción de fluidos, partículas y moléculas orgánicas. Otra función del epitelio es el transporte de espermatozoides, durante el cual las células espermáticas deben mantenerse viables. Entre las principales funciones del epidídimo, se pueden citar la eliminación de espermatozoides defectuosos o muertos, su maduración y el almacenamiento, entre la región cefálica, media y caudal ⁽¹⁵⁾.

Al centrifugarse el semen se separa en dos partes; el plasma seminal y los espermatozoides. El plasma seminal está formado por la mezcla de secreciones del epidídimo y de las glándulas anexas, estos tejidos producen grandes cantidades de sustancias biológicamente importantes como: Prostaglandina, Espermina, Fructosa, Ácido Cítrico y altas concentraciones de Zinc. Proteínas y enzimas específicas como inmunoglobulinas, Proteasas, Esterasas y Fosfatasa ⁽¹⁶⁾

1.5.1 Madurez reproductiva

El zacatuche alcanza la madurez sexual entre los 4 y 5 meses, se ha observado que la condición corporal influye directamente sobre el mismo, mientras mejor alimentado este más rápido llegara a la pubertad. Se considera que un zacatuche es adulto a partir de los 7 meses ⁽⁸⁾.

Las primeras montas se observan a la edad de cinco a seis meses, las hembras no presentan un ciclo estral definido, permanecen en estado constante de aceptación sexual una vez en pubertad. El apareamiento puede realizarse en cualquier momento ya que presentan ovulación inducida ⁽¹⁷⁾.

1.5 Técnicas de recuperación espermática

Las técnicas de recuperación espermática en animales domésticos y silvestres son de suma importancia ya que nos ayudan a obtener semen de buena calidad y utilizarlo en animales donde la monta directa no es posible, para caracterización espermática, congelación y almacenamiento del mismo ⁽¹⁸⁾.

En los animales domésticos se pueden utilizar diferentes técnicas para la recuperación de espermática, ya que se realiza un entrenamiento de los machos para poder obtener semen de forma rutinaria, las técnicas más empleadas son: post-coital, electroeyaculación, manual y vagina artificial ⁽¹⁸⁾.

La obtención de semen en el conejo se realiza habitualmente con vagina artificial, la cual consta de un receptáculo que trata de proporcionar al órgano copulador estímulos térmicos, mecánicos y de elasticidad necesarios para la eyaculación, una de las ventajas es que este método es económico y sencillo de utilizar ⁽¹⁴⁾.

La obtención de semen en animales silvestres no es tan sencilla como en animales domésticos, ya que estos ejemplares no están acostumbrados al manejo humano y es necesario recurrir a técnicas de electroeyaculación bajo anestesia quirúrgica, recuperación postmortem o vagina artificial (paquidermos) ⁽¹⁹⁾.

La técnica de electroeyaculación es segura, con riesgos mínimos, y se ha empleado ya en muchas especies animales ⁽¹⁸⁾.

La electroeyaculación se basa en la estimulación eléctrica sobre los centros erector y eyaculador; lo que provoca la eyaculación del ejemplar sin el esfuerzo físico que implica el apareamiento, permitiendo la colección del semen. ⁽¹⁸⁾.

El pene está compuesto por tres formaciones eréctiles; los cuerpos cavernosos dorsales y el cuerpo esponjoso de la uretra, dichas estructuras cuentan con espacios recubiertos por endotelio vascular, el cual rodea a la arteria cavernosa y drena hacia un plexo venoso periférico. Las estructuras eréctiles están rodeadas por una vaina fibrosa, denominada fascia peneana, que recubre el plexo venoso antes mencionado, de modo

que favorece la erección porque comprime las estructuras venosas, facilitando la estasis de la sangre ⁽²⁰⁾

La estimulación comienza con la menor frecuencia y voltaje posibles para producir una discreta contracción de la musculatura dorsal con encorvamiento. Se aplican estímulos de mayor voltaje hasta obtener erección y observar la salida de líquido seminal. Se aumentan los estímulos hasta que se completa la evaginación y haya salida de semen ⁽¹⁸⁾.

El semen obtenido por electroeyaculación, es de igual calidad al que se recolecta mediante vagina artificial, pero el volumen, pH y concentración pueden variar debido a que pudieran ser más diluidas por tener mayor cantidad de secreciones de las glándulas accesorias ⁽²¹⁾.

Es también posible obtener espermatozoides a partir de animales muertos. Pueden recuperarse espermatozoides viables del epidídimo hasta varias horas (o unos pocos días) después de la muerte. La obtención de espermatozoides epididimales (EE), potencialmente fértiles, almacenados en la cola del epidídimo puede ser la única opción para preservar el material genético de un macho de alto valor reproductivo, luego de la muerte o castración por motivos médicos. Esta posibilidad tiene grandes ventajas a la hora de conservar material genético de especies silvestres en las que lamentablemente no es inusual encontrar animales atropellados en las carreteras. También puede ser de gran utilidad para disponer del germoplasma de especies de las que se obtienen muestras como resultado de actividad cinegética. Los espermatozoides obtenidos del epidídimo pueden suspenderse en una solución salina o en medio de cultivo y se procesan y emplean de manera similar a los obtenidos mediante electroeyaculación ⁽²²⁾.

En el caso del zacatuche, Contreras *et al*; describe una técnica en la cual sacrifica a 3 ejemplares para poder profundir los testículos y el epidídimo a través de la arteria espermática con 1 ml de diluyente. Las regiones del epidídimo se delimitan por dobles ligaduras y se cortan entre ellas para separar cabeza, cuerpo y cola con el conducto deferente, posteriormente los espermatozoides contenidos en la cola del epidídimo se recuperan por retro-perfusión con 1 ml de diluyente, a través del conducto deferente. Finalmente los espermatozoides se lavan y se evalúa sus características siguiendo el método establecido por la Organización Mundial de la Salud ⁽²³⁾.

Se realizó un estudio en la DGZVS en donde se utilizaron 5 zacetuches machos entre 2 y 4 años de edad, los cuales se anestesiaron por medio de halotano y se intentó obtener semen por medio de electroeyaculación. Se mandó fabricar una sonda previamente probada en conejos y cuyos siguiendo la técnica de Ponce *et al*, 1998 para chinchillas (*Chinchilla lanígera*). Lamentablemente no se obtuvieron resultados con esta técnica por lo que se optó por realizar la recuperación espermática por medio la técnica postmortem.

La electroeyaculación como método de obtención de semen en el zacatuche, no se ha realizado con anterioridad, sin embargo, es una nueva opción para la recuperación espermática en el laboratorio. Los médicos encargados del Bioma Templado en el Zoológico de Chapultepec nos han informado que el zacatuche es un ejemplar muy nervioso y resulta muy difícil su manejo, por lo que sería muy riesgoso entrenarlo para que utilice una vagina artificial.

1.7 Características del semen en conejos

El esperma del conejo es un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento o grisáceo. A medida que suceden los saltos en una misma jornada, el líquido se hace más claro por disminución de la concentración espermática ⁽¹⁴⁾.

El volumen del eyaculado varía ampliamente, desde 0.3 a 6ml, en función de la secreción de las glándulas anexas. La concentración espermática es entre 50 y 500 millones de espermatozoides por ml. El pH se mide rápidamente tras recoger el eyaculado, y es un buen estimador de la calidad del semen y varía entre 6.8 y 7.3 ⁽¹⁴⁾.

La motilidad de los espermatozoides es un elemento importante para determinar la calidad del esperma. Los espermatozoides se mueven gracias a la contracción del filamento axial de la cola que obtiene la energía del ATP almacenado ⁽¹⁴⁾.

Es importante evaluar la motilidad, ya que es un indicador del estado general de los espermatozoides. Se puede distinguir entre motilidad masal e individual. La motilidad masal se refiere a la proporción de espermatozoides que tienen algún tipo de movimiento

y a las que se le concede un porcentaje estimado que es determinando de modo subjetivo por el operador. Así la motilidad de dicho semen se valora asignando un índice del 0 al 5 de acuerdo con la proporción de espermatozoides móviles (0 al 100 %). También se puede evaluar la motilidad individual, el movimiento típico de los espermatozoides del conejo es progresivo y rectilíneo, considerándose el movimiento circular o las vibraciones sin desplazamiento, como movimientos defectuosos que disminuyen la calidad del semen. Dicha motilidad individual también se aprecia de manera subjetiva, valorando la calidad del movimiento en distintos campos visuales de la muestra. Un semen de buena calidad debe poseer un mínimo de 60-70% de espermatozoide móviles ⁽¹⁴⁾.

La concentración expresa el número de espermatozoides por mm³, el método más utilizado es usando una cámara de New Bauer, el cual se expresa en millones. La concentración varía considerablemente según la raza e individuo, pudiendo oscilar entre 150 – 900 x 10⁶ esp/ml y siendo óptima a partir de 250 x 10⁶ ⁽¹⁴⁾.

La morfología se realiza con preparaciones coloreadas mediante las cuales se observan anomalías morfológicas que pueden afectar aislada o simultáneamente a la cabeza, cuello y cola ⁽¹⁴⁾.

La cabeza puede presentar anomalías de forma, dimensión duplicación, posición y estructura acrosómica. Las anomalías del cuello afectan a la implantación de la cabeza, cola y persistencia de la gota citoplasmática. Esta gota indica una maduración insuficiente del espermatozoide y cuando aparece en un 2-3 % de estos, indica alteraciones en la espermatogénesis, trastornos testiculares o epididimarios recientes o eyaculaciones demasiado frecuentes ⁽¹⁴⁾.

La cola puede presentar anomalías de estructura, longitud, estar enroscada sobre si misma o rodeando a la cabeza. En los machos poco fértiles suelen aparecer células de descamación del epitelio prepucial, leucocitos, espermocitos y espermátidas. Un eyaculado se acepta para la inseminación artificial cuando el semen no contiene más de un 30% total de espermatozoides anormales ⁽¹⁴⁾.

Para el conteo de los espermatozoides vivos, se coloca una gota de muestra espermática en la porción distal del porta-objetos y sobre esta se coloca una gota de

colorante Eosina – Negrosina y se realiza un frotis. Los espermatozoides vivos tienen la membrana plasmática intacta, por lo que no se tiñen, mientras que los espermatozoides muertos al tener la membrana plasmática dañada se tiñen de color morado ⁽¹⁴⁾.

En conclusión hay muy poca información sobre el zacatuche, es de suma importancia detener el deterioro ambiental antes de que esta especie llegue a su extinción, y tomar medidas de conservación adecuadas realizando proyectos de investigación para así poder ayudar para evitar su extinción.

I. JUSTIFICACION

En la actualidad es muy escasa la información que hay sobre la biología reproductiva del zacatuche, únicamente se ha descrito una técnica de recuperación espermática en la cual se sacrificaron ejemplares para obtener el semen por perfusión a través de la arteria espermática.

Se realizó un estudio anterior en la DGZVS, en el cual por medio de electroeyaculación se intentó obtener semen en ejemplares previamente anestesiados sin éxito alguno.

Debido a que el sacrificio de los ejemplares es la única técnica descrita para la obtención de semen en el zacatuche, es necesario diseñar otras técnicas de recuperación que sirvan para evaluar las características del mismo. Una vez obtenido esto se podrá contribuir a su conservación y crear información o para poder realizar un banco de semen en un futuro.

II. OBJETIVOS

- Obtener el semen de cadáveres de zacatuches adultos, mediante la técnica de recuperación del epidídimo.
- Determinar las características microscópicas del semen (motilidad, concentración y viabilidad) obtenidas por recuperación de epidídimo de zacatuches adultos.

I. MATERIAL Y METODOS

4.1. Lugar de Estudio

Se recuperaron los testículos de 6 cadáveres de zacatuches (*Romerolagus diazi*) entre 2 y 4 años de edad, ubicados en el Bioma de Bosque Templado del Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera", localizado en la 3ra sección del Bosque de Chapultepec en la ciudad de México. El cual cuenta con una población total de de 185 zacatuches.

4.2. Albergue

En este albergue se encuentran cuatro colonias, una de ellas es el exhibidor, el cual está a la vista del público y tres encierros al aire libre. Tanto el exhibidor como los tres albergues cuentan con piso de tierra, comederos, bebederos y se plantan continuamente zacatonos para que los ejemplares tengan refugio y puedan construir sus nidos. Dentro del albergue se encuentra un cuarto techado con piso de concreto donde se ubican 35 jaulas de alambre de acero (40cm x 57cm x 35cm), provistas de comedero y bebedero, en las cuales se alojan animales heridos o hembras con sus crías.

4.3. Alimentación

Se utilizo una dieta a base de alfalfa fresca (24kg), zanahoria (13kg) y alimento comercial balanceado para conejo domestico (Purina Agribrands Conejina N, 15.5% Proteína cruda) (6kg) y agua *ad libitum*. Estas cantidades son divididas entre las cuatro colonias y varían dependiendo del número ejemplares, en promedio cada ejemplar consume 160g de alfalfa, 86g zanahoria y 40g concentrado, el alimento se les ofrece por separado en comederos de madera. Son alimentados una vez al día entre las 9:00 y las 10:00 am.

Aporte nutricional de la dieta

MS (%)	70.69	FDN (%)	24.75
HUMEDAD (%)	29.31	FDA (%)	17.14
PC (%)	14.02	LIG (%)	3.81
Grasa (%)	2.72	Ca (%)	0.44
FC (%)	20.94	P (%)	0.04
CEN (%)	8.86	Relación Ca:P	11:1

4.4. Clima

El tipo de clima predominante es C(w) templado sub-húmedo con lluvias en verano, la temperatura media es de 15.4°C, y la precipitación promedio anual es de 769.2 mm.

4.5. Procedimiento

Obtención y evaluación de gónadas

1.- Los ejemplares fueron recolectados a las 7am, que es cuando se realiza el recorrido del médico encargado, por lo que se considera que los ejemplares remitidos al área de patología no tenían más de 12 hrs. de haber fallecido.

2.- Los cadáveres ingresaron al área de patología de la DGZVS por muertes no asociadas con el sistema reproductivo, durante el periodo del 2 Marzo al 20 Abril del 2007. Las gónadas se extrajeron de la bolsa escrotal y se disecaron junto con el epidídimo y los conductos deferentes. Posteriormente, se colocaron en bolsas de polietileno limpias y debidamente identificadas por gónada, individuo, fecha y hora de recolección, para luego ser remitidas al Laboratorio de Reproducción de la DGZVS lo más pronto posible.

3.- Los testículos de cada ejemplar se pesaron por separado en una balanza digital; también se midió la amplitud y la longitud desde la cola hasta la cabeza del epidídimo con un vernier y se calculó el volumen con la siguiente fórmula $V = 0.52 (L) * (W)^2$, en donde L es la longitud, W es el radio del ancho testicular y 0.52 es una constante matemática ⁽²⁴⁾.

Recuperación de semen del epidídimo

Se separó el epidídimo del testículo, posteriormente se midió el largo total del epidídimo y se pesó. Se tomó el epidídimo y se colocó en una caja Petri estéril previamente calentada a 37° C, entonces se separó la porción de la cola del epidídimo. Posteriormente éste se segmentó en 10 cortes transversales con una hoja de bisturí, y se adicionó 1ml de diluyente a base de yema de huevo y Triladyl® previamente calentado a 37° C, esta mezcla se centrifugó a 2,000rpm durante 10min, obteniendo así un botón espermático, se retiró el sobrenadante y se le agregó un ml de diluyente a base de yema de huevo y Triladyl® ⁽²⁵⁾.

Evaluación de la muestra espermática.

El examen microscopio se realizó a través de un microscopio óptico, evaluando sus características de motilidad individual, concentración y viabilidad ⁽¹⁴⁾

Para evaluar la motilidad se tomó con una pipeta 5µl de esperma directamente de la caja de petri y se depositó sobre un porta temperado (37º 38º C) y posteriormente se puso un cubre – objetos. Cuando el porta-objetos estuvo situado en el microscopio, con el objetivo de 100 aumentos se procedió a la valoración. Se evaluó la motilidad individual, en el conejo el movimiento típico es progresivo y rectilíneo, considerándose el movimiento circular o las vibraciones sin desplazamiento como movimientos defectuosos que disminuyen la calidad del semen. La motilidad se evaluó como lo indica Alvaríño, 1993.

La concentración se midió utilizando una cámara de Neu Bauer. Se tomó una muestra con la pipeta mezcladora de hematíes realizando así una dilución 1/200, posteriormente se llenó la cámara de Neu Bauer y se procedió a la valoración como lo indica Alvaríño, 1993.

La concentración se expresó en mililitro y se dividió entre el peso epididimario, expresando el resultado en millones por gramo de epidídimo. De los ejemplares estudiados se obtuvo el promedio de peso testicular y epididimario y el promedio de producción espermática.

Para el conteo de los espermatozoides vivos, se colocó una gota de muestra espermática en la porción distal del porta-objetos y sobre esta se colocó una gota de colorante Eosina – Negrosina y se realizó un frotis. Una vez seca la muestra se observó en el microscopio. Los espermatozoides vivos tienen la membrana plasmática intacta, por lo que no se tiñen, mientras que los espermatozoides muertos al tener la membrana plasmática dañada se tiñen de color morado. Se realizó el conteo de 100 espermatozoides y se expresó en porcentaje ⁽¹⁴⁾.

Los resultados obtenidos se expresaran directamente en tablas. En las cuales se podrá apreciar: 1. Edad y peso del ejemplar, 2. Dimensiones y pesos de los testículos, 3. Dimensiones y pesos de los epidídimos, 4. Concentración, motilidad y viabilidad, 5. Número de espermatozoides por ml y espermatozoides por gramo de epidídimo.

V. RESULTADOS

Se obtuvieron 6 cadáveres entre 2 y 6 años de edad, los cuales pesaron en promedio 424.8g. La edad no corresponde a un mayor desarrollo corporal, como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Edad y peso de 6 ejemplares de *Romerolagus diazi*.

EJEMPLAR	EDADA (años)	PESO (g)
1	2	479
2	4	390
3	2.1	428
4	2.8	520
5	4.5	441
6	4.9	300

Se evaluó la longitud, amplitud, volumen, consistencia y peso de cada testículo, y longitud, amplitud y peso de cada epidídimo, obteniendo así los promedios de cada uno, en los seis ejemplares se observó que los valores son mayores tanto para el testículo izquierdo como para el epidídimo izquierdo como se observa en la Tabla 2 y 3. Se observó también que el peso del epidídimo aumenta conforme aumenta el peso del testículo como se observa en las Tablas 2 y 3, pero el peso del ejemplar no corresponde a un aumento en el peso de los testículos como se observa en la Tabla 3.

Tabla 2. Dimensiones y pesos de los testículos de 6 ejemplares de *Romerolagus diazi*

Ejemplar	Longitud (cm)	Amplitud (cm)	Vol. (cm³)	Peso Testículo (g)	M. Test. % M. Corp
T. Derecho					
1	3.33	1.1	2.1	2.1	0.44
2	1.46	0.77	0.45	0.6	0.15
3	1.53	0.84	0.56	0.9	0.21
4	1.39	0.77	0.43	0.7	0.13
5	2.63	0.89	1.09	1.31	0.29
6	1.5	0.77	0.46	0.5	0.16
Promedio	1.97(± 0.81) ¹	0.85(±0.12) ¹	0.85(±0.66) ¹	1.01(±0.60) ¹	0.23(±0.11) ¹
T. Izquierdo					
1	3.11	1.12	2.04	2.1	0.44
2	1.7	0,88	0.69	0.7	0.17
3	1.49	0.74	0.42	0.9	0.21
4	1.58	0.7	0.40	0.7	0.13
5	2.83	1.07	1.6	1.3	0.29
6	1.44	0.67	0.33	0.6	0.2
Promedio	2.02(±0.74) ¹	0.86(±0.19) ¹	0.93(±0.74) ¹	1.05(±0.57) ¹	0.24(±0.11) ¹

M. Test: Masa Testicular / T. derecho: Testículo derecho

M. Corp: Masa Corporal / T. izquierdo: Testículo izquierdo

¹μ(± Desv. Est)

Tabla 3. Dimensiones y pesos de epidídimos de 6 ejemplares de *Romerolagus diazi*

Ejemplar	Longitud (cm)	Amplitud (cm)	Peso (g)
T. Derecho			
1	1,96	0,65	0,58
2	0,88	0,37	0,15
3	0,81	0,32	0,26
4	0,65	0,21	0,18
5	1,5	0,52	0,36
6	0,8	0,22	0,12
Promedio	1.1(±0.51) ¹	0.38(±0.17) ¹	0.27(±0.17) ¹
T. Izquierdo			
1	1,99	0,62	0,57
2	0,93	0,49	0,19
3	1,02	0,48	0,24
4	0,67	0,42	0,19
5	1,5	0,45	0,35
6	0,82	0,22	0,16
Promedio	1.15(±0.49) ¹	0.44(±0.13) ¹	0.28(±0.16) ¹

T. Derecho: Testículo derecho

T. Izquierdo: Testículo izquierdo

¹μ(± Desv. Est)

Evaluación del recuperado espermático

El número de espermatozoides recuperados del epidídimo (reserva espermática) se calculó con relación al número de espermatozoides concentrados por gramo de epidídimo. La concentración total fue de 914×10^6 .

El porcentaje de motilidad fue mayor en el testículo derecho ($38.8 \pm 13\%$) que en el izquierdo ($33 \pm 19\%$). Mientras que la viabilidad mostro no ser significativamente diferente para el testículo derecho ($59 \pm 5.7\%$) que para el testículo izquierdo ($55 \pm 6.0\%$) como lo muestra la Tabla 4.

Tabla 4. Evaluación de las características seminales de seis ejemplares de *Romerolagus diazi*.

	Derecho	Izquierdo
Concentración (g / epidídimo)	973(± 571) ¹	855(± 456) ¹
Motilidad %	38.8(± 13) ¹	32(± 1.9) ¹
Vivos	59(± 5.7) ¹	55(± 6.0) ¹
Muertos	41(± 5.7) ¹	45(± 6.0) ¹

Los números expresan el promedio \pm desviación estándar de los datos obtenidos de 6 ejemplares.

¹ $\mu(\pm$ Desv. Est)

Los valores obtenidos de la concentración expresados en gramo / epidídimo mostraron diferencias tanto entre ejemplares como entre el mismo individuo, Los ejemplares 2, 5 y 6 mostraron más concentración espermática en el testículo derecho, mientras que el 1 y el 3 mostraron más concentración en el testículo izquierdo y los valores del ejemplar 4 fueron similares entre ambos testículos (Tabla 5).

Tabla 5.

Ejemplar	Esp. / g epidídimo (x 10⁶)	Esp. / epidídimo Reserva espermática (x 10⁶)
T. Derecho		
1	637	369
2	1400	182
3	942	244
4	316	56
5	1875	675
6	66	79
Promedio	872.66 (±678) ¹	267(±229) ¹
T. Izquierdo		
1	954.4	545
2	957.8	181
3	1354	324
4	311	56
5	1257	439
6	312.5	49
Promedio	857(±451) ¹	265(±204) ¹

Esp. /g epidídimo: Espermatozoide por gramo de epidídimo

Esp. / Epidídimo: Espermatozoide por epidídimo: RESERVA ESPERMATICA

¹ μ(± Desv. Est)

Tabla 6. Motilidad y viabilidad de 6 ejemplares de *Romerolagus diazi*.

Ejemplar	Motilidad (%)	Viabilidad (%)
T. Derecho		
1	65	58
2	35	59
3	32	56
4	29	62
5	35	67
6	33	50
Promedio	38 (± 13) ¹	58 (± 5) ¹
T. Izquierdo		
1	67	58
2	32	58
3	41	56
4	21	51
5	16	62
6	20	45
Promedio	32(± 19) ¹	55(± 6) ¹

¹ $\mu(\pm$ Desv. Est)

VI. DISCUSIÓN

Antes de iniciar con la recuperación de semen de epidídimo del zacatuche (*Romerolagus diazi*) se intentó por medio de electroeyaculación, lamentablemente no se obtuvo una muestra espermática.

La electroeyaculación de los cinco ejemplares (*Romerolagus diazi*) fue realizada de 0 a 7 volt por periodos no más largos a 45 minutos cada uno. Una sonda fue diseñada y fabricada especialmente para la especie (0.5cm de diámetro y 8cm de largo) con tres electrodos longitudinales de 1 cm de largo. Como referencia para diseñar el protocolo de electroeyaculación de los zacatuches, se tomó en consideración el estudio de Busso *et al.* 2004 ⁽²⁶⁾, en chinchillas utilizando ketamina / xilazina como anestésicos y realizando un total de 200 estímulos eléctricos divididos en 10 conjuntos de 20 estímulos cada uno, con un periodo de 5 minutos de descanso entre cada conjunto de estímulos. El voltaje utilizado fue desde 0 hasta 7 V.

En el caso de los zacatuches se utilizó anestesia inhalada (Halotano) debido a que los ejemplares presentaron una considerable baja de la frecuencia respiratoria, el médico encargado decidió disminuir el tiempo de anestesia, por lo que el protocolo de electroeyaculación se redujo utilizando en promedio 100 estímulos por ejemplar divididos en 10 conjuntos de 10 estímulos cada uno. Esta modificación al protocolo inicial pudo ser la causa por la cual no se obtuvo éxito en la electroeyaculación.

Por cuestiones relacionadas al manejo de la colonia de Zacatuches en el Zoológico, los machos utilizados en la electroeyaculación no tuvieron contacto alguno con hembras durante 3 ó 4 meses previos al estudio, por lo que esto pudo influir también en una pobre estimulación sexual que sea un factor decisivo en la producción de semen, ya que se ha comprobado que en otras especies de mamíferos, incluyendo los conejos, las feromonas producidas por las hembras en estro pueden servir como un sistema de alarma para la reproducción teniendo un efecto ⁽²⁷⁾.

Únicamente se ha descrito una técnica para la recuperación espermática en el zacatuche, que es la retroperfusión del epidídimo en gónadas de cadáveres (Ambriz *et al* 2003). Ésta técnica consiste en la separación del epidídimo del testículo, las regiones de los epidídimos se delimitan por dobles ligaduras y se separan en sus tres porciones, realizando posteriormente un lavado con medio Brackett Oliphant (*Bracket and Oliphant 1975, citado por Ambriz, et al 2003*) por un extremo de la cola del epidídimo de forma que sirva como un tubo, el cual dejará caer los espermatozoides por el otro extremo. En nuestra experiencia, ésta técnica es muy difícil de utilizar debido a que el epidídimo de los zacatuches es muy pequeño. Por tal motivo se decidió utilizar una técnica descrita en ovinos y caprinos, en la cual se realizan múltiples cortes a la cola del epidídimo, facilitando así la recolección ⁽²⁵⁾.

Al realizar la recuperación postmortem y evaluar las características externas de los ejemplares (peso del animal, edad, pesos de los testículos y peso del epidídimo) observamos que el peso del ejemplar no está influenciado por la edad del mismo y el tamaño corporal no es proporcional al de los testículos ni del epidídimo. Al calcular la concentración de espermatozoides en el epidídimo pudimos observar que el tamaño del mismo no influyó sobre las reservas espermáticas almacenadas en él y que el tamaño de los testículos no es proporcional a la cantidad de espermatozoides en epidídimo.

En éste caso las reservas espermáticas no dependen del tamaño ni de la edad del animal o del tamaño del epidídimo o del testículo, lo que nos puede ser de gran ayuda al no dejarnos influenciar por las características físicas al momento de seleccionar a un macho como semental o de introducirlo a una nueva colonia.

En éste estudio la motilidad y la viabilidad fueron bajas comparadas con lo que se ha reportado en conejos, donde un semen de buena calidad debe poseer un mínimo de 60% de motilidad y más del 80% de viabilidad. Cabe mencionar que no existen reportes en el zacatuche donde se puedan comparar los resultados, se puede especular que la baja de los valores obtenidos en este estudio se debe a que no se sabe el tiempo exacto que transcurrió desde que los ejemplares murieron hasta la recolección de las gónadas, ya que la motilidad y la viabilidad son parámetros que se tienen que evaluar inmediatamente después de obtener una muestra espermática, siendo que estos comienzan a disminuir

conforme transcurre el tiempo después de la recolección.

La concentración espermática obtenida en éste estudio, es mayor a la reportada para el conejo doméstico, cabe mencionar que existen reportes de Ambriz *et al.* 2003 donde por medio de la retro perfusión de cadáveres de vida libre obtuvieron una concentración por gramo de cola de epidídimo menor que la nuestra, hay que recordar que en nuestro estudio los espermatozoides se obtuvieron de todo el epidídimo y no solo de la cola.

Ya que existe muy poca información acerca de los hábitos reproductivos del zacatuche, éste estudio puede ser de gran utilidad para próximas investigaciones

VIII. CONCLUSIONES

No existe una metodología publicada para llevar a cabo la electroeyaculación en el zacatuche. En éste caso no se logro obtener semen por factores probablemente asociados a diferencias en el efecto de los agentes anestésicos, tiempo del estímulo, intensidad y estímulo directo de las hembras.

Podemos concluir que el método que se utilizó para la evaluación de las características seminales de cadáveres, fue uno de los más adecuados en esta especie debido al tamaño tan pequeño del epidídimo, ésta técnica permitió evaluar de forma certera las características espermáticas. Una de las desventajas es que los valores de concentración, motilidad y viabilidad no son comparables a los obtenidos por medio de una eyaculación.

Al calcular la concentración de espermatozoides en el epidídimo pudimos observar que el tamaño del mismo no influyó sobre las reservas espermáticas almacenadas en él y que el tamaño de los testículos no es proporcional a la cantidad de espermatozoides en epidídimo.

Cabe mencionar que no existen reportes en el zacatuche donde se puedan comparar los resultados de motilidad y viabilidad, se puede especular que la baja de los valores obtenidos en este estudio se debe a que no se sabe el tiempo exacto que transcurrió desde que los ejemplares murieron hasta la recolección de las gónadas.

Las gónadas de los cadáveres estudiados, mostraron que el estado reproductivo de la colonia es bueno, debido a que se encontró una concentración mayor a la concentración por gramo de cola de epidídimo reportada con animales en vida libre (Ambriz y Contreras, 2003).

La información generada en este estudio ayudará a comprender mejor la biología reproductiva de esta especie y así poder contribuir al diseño de estrategias que puedan mejorar su estado de conservación. Así mismo, sirva para contribuir a la toma de decisiones en cuanto su manejo reproductivo en cautiverio.

IX. ANEXOS

Fig 1. Alojamiento



Fig. 2 Recolección de Gónadas



Fig. 3 Gónadas



Fig. 4 Identificación

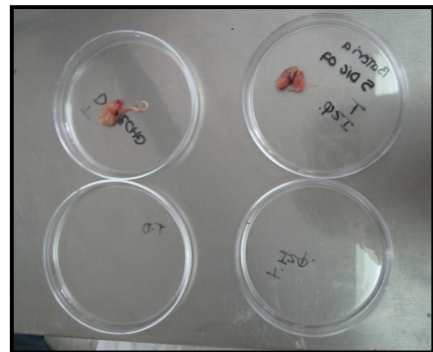


Fig. 5 Balanza Digital



Fig. 6 Medición con vernier



Fig. 7 Cortes con bisturí

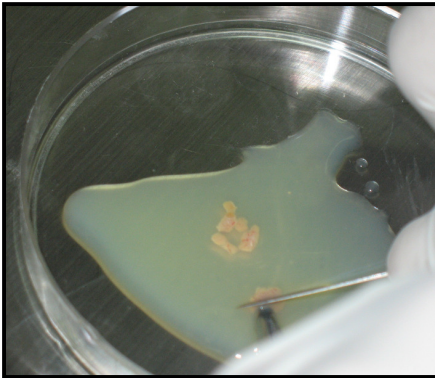
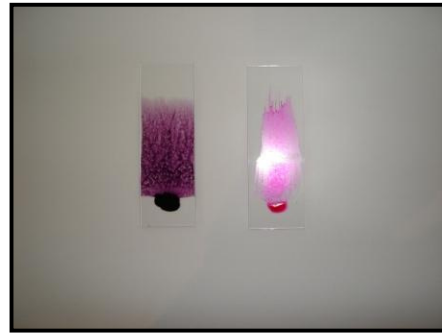


Fig. 8 Tinciones



X. BIBLIOGRAFIA

1. Cervantes, F. A. y González, F. X. 1996. I. Los conejos y liebres silvestres de México. En: Velásquez A., Romero F. J, y López-Paniagua J. (Comp.). Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. Fondo de Cultura Económica, México D.F. pp. 17-25.
2. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora [homepage on the internet]. Ginebra: CITES c 2006. [actualizado 2006 Jun 14; cited 2007 Jan 21]. Disponible en: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>.
3. Chávez, C y Ceballos, G. *Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, 04510 México D. F.*, México.
4. Ceballos, G. y P. Rodríguez. 1993. Diversidad y conservación de los mamíferos de México: II Patrones de endemidad. P. 97-108, En: Avances en el estudio de los mamíferos de México (R. A. Medellín y G. Ceballos, eds). Publicaciones especiales No. Uno 1, Asociación Mexicana de Mastozoología A. C., México, D. F.
5. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Red List of Threatened Species [homepage on the internet]. United Kingdom: IUCN c 1995-2006. [actualizado 2007 Jan 19; cited 2007 Jan 21]. Disponible en : <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/19742/summ>.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Marzo, 6, 2002.
7. Asociación Mexicana para la Conservación y Estudio de los Lagomorfos A.C. (AMCELA). Conejo Zacatuche (*Romerolagus diazi*). 2003. [Citado 5 Jun 2005]: [1 página]. Disponible en: URL: <http://www.ibiologia.unam.mx/amcela/>
8. Cervantes, F. A. y Martínez-Vázquez, J. 1996. II. Historia natural del conejo zacatuche o teporingo (*Romerolagus diazi*). En: Velásquez A, Romero F, López-Paniagua J.

- (Comp.). Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. Fondo de Cultura Económica, México D.F. pp. 29-40.
9. Velázquez, A. Romero, F.J. y López-Paniagua, J. 1996. VII. Distribución y Hábitat del conejo zacatuche, Ecología y Conservación del conejo zacatuche y su Hábitat. Fondo de cultura Económica, México D.F. pp. 89-101.
 10. Matsuzaki, T. Kamiya, M. Suzuki, H. Nombra, T. y Velásquez, A. IV. Reproducción en el laboratorio del conejo zacatuche. En: Velázquez A, Romero F, López-Paniagua J. (Comp.). Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. Fondo de Cultura Económica, México D,F. pp. 51 - 66.
 11. Ceballos, G. y C. Galindo (1984), Mamíferos silvestres de la Cuenca d México, Limusa, México, D.F., 300pp.
 12. Velásquez, A. y Romero, F. 1993. VI. Fragmentación del hábitat del conejo zacatuche. En: Velázquez A, Romero F, López-Paniagua J. (Comp.). Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. Fondo de Cultura Económica, México D,F. pp. 73 - 86.
 13. Goldstein, I. Torres, DA. El oso frontino en Venezuela, Cría en cautiverio. [Citado 29 Marzo del 2009]: disponible en: <http://www.cecalc.ula.ve/bioinformatica/oso/cautiverio.htm>
 14. Alvarino R. M, Control de la reproducción en el conejo. Ed. Mundi prensa, Madrid 1993, pp 23 – 42
 15. Parra, R. Del Sol, M. Estudios histológicos e histoquímicos del epidídimo del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) Rev. Chil. Anat., 20(3): 269-274, 2002.
 16. Sanz, E. Avila, LM. Gaitan, P. Escobar, M. Santos, AM. Fernandez A. Ruiz JA. y Madero, JI. Importancia de las glándulas sexuales accesorias en el eyaculado. Medicina Reproductiva 2009.
 17. Smidt, D. Ellendorff, F. Endocrinología y fisiología de la reproducción de los animales zootécnicos. Instituto de genética y producción animal de la Universidad de Gottinga, Ed. Acribia. España. 1982. pp 264 – 266.

18. Zemjaniz, R. Reproducción animal diagnostic y técnicas terapéuticas. 10a ed. Mexico: Limusa, 1987, pp 158.
19. Mar KU, Schimidt MJ, Khaing AT, Win S. Semen collection in Asian Bull Elephants by electroejaculation and artificial vagina. En: 13th Int Cong Anim Reprod and AI 1996; 2 pp9-11
20. Rovriere, H. Delmas, A. Anatomía descriptiva, topográfica y funcional, 11a ed. Disevier 2004, pp 621.
21. Peláez, J, Domínguez, J.C; Peña, F.J ; Alegre, B.; González, c.; García, M.A. La conservación de los animales salvajes en peligro de extinción: utilidad potencial de las técnicas de reproducción asistida. Med Vet 2000, vol. 17 (9): 202 -212.
22. Roldan, E.R.S. Garde, J.J. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), e Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM) Albacete. Madrid. 2009; 14: pp 307.
23. Ambriz-García D, Contreras-Montiel J, Pérez OH, Pichardo EM, Cervantes FA, García AR. Estudio comparativo de los testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y espermatozoides en tres especies de lagomorfos (*Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctulagus cuniculus*). Acta Zool. Mex 2003; pp 88:257-269.
24. Crudeli, Gustavo A. Pochon, D.O. Pellerano, G.S. Garcia, D. Amuchastegui, F. Análisis de las variables biométricas circunferencia escrotal y volumen testicular en toros de la raza Braford. Resumen V-051. Año 21. N° 53, Enero-Diciembre 2005.
25. Arriola, J. Gómez, R.A. Yañez, R.A. Villareal, M. Criopreservación de espermatozoides del epidídimo del toro de lidia. En Memorias VI Congreso Latinoamericano de buiatria, ed. UNAM, México D.F.1987; pp 95-99.
26. Busso, J.M. Ponzio, M.F. Chiaraviglio, M. y Ruiz, R.D. Electroejaculation in the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*): effects of anesthesia on seminal characteristics. [Vol. 78:1](#), Febrero 2005, pp 93-97.

27. Jaramillo, M.T. Olivera, J.I. Velázquez, J. Reproducción y manejo de Fauna Silvestre.
Ed. UAM Iztapalapa. México. 2001; pp 53 a 55.