
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**MORFOFISIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE *DE Gallus gallus* EN
EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO Y DE LA HEMBRA**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

Jorge Antonio González Santos

COMITÉ TUTORAL

Director: Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez.

Co-Director: Dr. José Antonio Herrera Barragán.

Asesor: Dr. José Antonio Martínez García.

Ciudad de México a 16 de julio de 2019.

MORFOFISIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE *DE Gallus gallus* EN EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO Y DE LA HEMBRA

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del comité tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ TUTORAL:



Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez
Director.



Dr. José Antonio Herrera Barragán
Co-Director.



Dr. José Antonio Martínez García
Asesor.

MORFOFISIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE *DE Gallus gallus* EN EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO Y DE LA HEMBRA

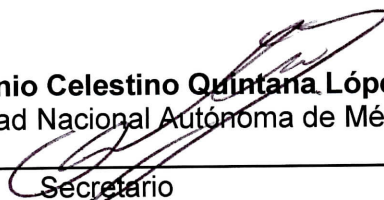
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

SINODALES



Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Presidente
reyna@xanum.uam.mx



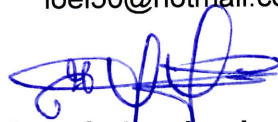
Dr. José Antonio Celestino Quintana López
FMVZ. Universidad Nacional Autónoma de México

Secretario
quintanajose98@yahoo.com.mx



Dra. Elvia López Pérez
Universidad Autónoma de Chapingo-Dpto. Zootecnia

Vocal
loel50@hotmail.com



Dr. José Germán Lombardero Goldaracena
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Vocal
drlombardero@hotmail.com



Dra. Edith Arenas Ríos
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal
editharenas2000@yahoo.com.mx

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción y en el Laboratorio de Necropsias, pertenecientes al Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

El Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y cuenta con el apoyo del mismo consejo.

Durante el trabajo realizado en el programa del Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la UAM-Xochimilco, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), otorgó una beca con número de becario/CVU 417462, durante el periodo 2014-2017 a Jorge Antonio González Santos, autor de la presente tesis.

Agradecimientos

A mis tutores:

A mi Director, **Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez** por la oportunidad brindada y la confianza. Por su ejemplo a seguir como docente y como persona, porque gracias a su apoyo he logrado muchas satisfacciones académicas.

A mi Co-Director, **Dr. José Antonio Herrera Barragán** por guiarme en este proyecto, por trasmitirme y fomentarme la enseñanza-aprendizaje en todo momento, científicamente como personalmente y llevándome a límites que no conocía de mí, gracias por la gran motivación y guía.

A mi tutor, **Dr. José Antonio Martínez García** porque desde la carrera me enseñó a no quedarme solo con el conocimiento dado en el aula, sino ir siempre por más y no solo con una licenciatura, gracias por ayudarme y aconsejarme, agradezco las enseñanzas.

A mis sinodales:

A la **Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**, al **Dr. José Antonio Celestino Quintana López**, la **Dra. Elvia López Pérez**, el **Dr. José Germán Lombardero Goldaracena** y la **Dra. Edith Arenas Ríos**, les agradezco el tiempo que dedicaron a la revisión de éste trabajo, con sus comentarios, sugerencias y por darle el punto final de calidad a mi tesis.

A la Universidad Autónoma Metropolitana:

A la Unidad Xochimilco por abrirme las puertas y poder cursar una Licenciatura, una Maestría y hoy un Doctorado.

Al Doctorado de Ciencias Agropecuarias perteneciente al PNPC por darme un lugar en su aula, por sus experiencias de vida y conocimientos, permitiéndome crecer y desarrollarme como profesional.

Al **Dr. Germán D. Mendoza Martínez** por apoyarme, por sus consejos y guiarme desde la Maestría y hoy en el Doctorado, es un placer conocer seres humanos como usted con su experiencia, trayectoria académica y científica.

Al CONACyT:

Por el otorgamiento de una beca con número CVU 417462, durante el periodo 2014-2017 mientras cursaba el Doctorado en Ciencias Agropecuarias.

Al Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción:

A la **Dra. Ana María Rosales Torres**, por brindarme las facilidades para realizar mis experimentos, por sus aportaciones, por ser un ejemplo a seguir académicamente, científicamente y personalmente.

Al **Dr. Adrián Guzmán Sánchez**, por transmitir y fomentar la investigación, por su ayuda en el análisis de esta tesis y sugerencias.

A la **Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado**, por su gran amistad, por su confianza, por sus consejos científicos y personales, por alentarme a seguir creciendo académicamente.

A la coordinación de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Por brindarme el acceso a la Sala de Necropsia para realizar parte de mi muestreo y manejo de material biológico.

Dedicatorias

A mis padres **Ana** y **Arturo** por apoyarme incondicionalmente, por los valores y por haberme dado la oportunidad de tener una educación en mi vida, pero sobre todo por ser mi ejemplo a seguir, gracias.

Con mucho aprecio, admiración y agradecimiento a mis tutores, el **Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez** y el **Dr. José Antonio Herrera Barragán**, porque me supieron guiar por el buen camino, porque me abrieron las posibilidades de crecer como persona y profesionalmente, gracias por la oportunidad, por creer en mí, por su gran amistad y por tomarme como un miembro más de su familia.

A mi **Diana**, por ser parte importante de mi vida, porque me ha apoyado incondicionalmente desde el día que la conocí, porque está conmigo en las buenas y en las malas, por su paciencia, amor incondicional y por seguir escribiendo una historia juntos, gracias mi gran compañera de vida.

A mis hermanos por estar ahí en todo momento, por alentarme a ser alguien preparado, por llenar mi vida de alegrías y de amor, gracias por su apoyo.

A mis abuelos **Hilario** y **María**, que, aunque ya no estén físicamente son y serán parte importante en mi motivación y mi vida, porque el sin dudar siempre creyeron en mí.

A mi padrino **Rubén**, por seguir ahí para mí y por sus grandes consejos de vida.

Agradezco de todo corazón, Jorge González (Bull)

Resumen

En este estudio se analizaron las características morfofisiológicas de los espermatozoides de gallo en los segmentos del tracto reproductor del macho y una vez depositados en la hembra hasta llegar al sitio de la fertilización. Se trabajó con gallos y gallinas *Rhode Island Red*, se obtuvieron eyaculados por medio de la técnica de masaje dorso-ventral y para la recuperación de espermatozoides de los diferentes segmentos de macho y hembra, se sacrificaron las aves. Se realizaron evaluaciones espermáticas básicas (movilidad, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de anormalidades y morfometría) a las muestras obtenidas. También se procesaron tinciones con clortetraciclina para la determinación de presencia de Ca^{2+} y con lectina WGA junto con isotiocianato de fluorescencia para determinar N-Acetil glucosamina en la superficie de la membrana del espermatozoide.

En los segmentos del aparato reproductor del macho como el testículo, conducto deferente (craneal, medial caudal): el promedio de movilidad fue de 54.6 %, en el eyaculado de 90 % con un porcentaje de espermatozoides vivos en los segmentos de 94.6 y 96.4 en el eyaculado. Con respecto a la movilidad dentro de los segmentos 67.8 % y 94.1 % de espermatozoides vivos. Los resultados obtenidos con la tinción de CTC indican una disminución de espermatozoides intactos durante su paso por los diferentes segmentos, encontrando un 44.7 % en testículos y disminuyendo hasta un 18.1 % en el eyaculado, el porcentaje de espermatozoides capacitados se mantiene en todos los segmentos, encontrando en testículo 23.6 % y en el eyaculado 26.1 %, para los espermatozoides con

reacción acrosomal se observa un aumento conforme pasan del testículo con un 23.5 % a los diferentes segmentos hasta ser eyaculados 57.1 % y esto mismo ocurre con la evaluación de lectina WGA, apareciendo el mismo comportamiento de los espermatozoides en los segmentos del macho y del eyaculado. En el caso de los segmentos del aparato reproductor de la hembra, el promedio de movilidad obtenida fue de 67.8 %, el promedio de espermatozoides vivos 94.1 %. Para las evaluaciones con CTC disminuyó el porcentaje de espermatozoides intactos del segmento útero-vagina (22.2 %) al infundíbulo (17.7 %), en cuanto a espermatozoides capacitados sucede el mismo comportamiento que los espermatozoides intactos y para los espermatozoides con reacción acrosomal va aumentando este porcentaje al llegar al lugar de la fertilización. Con la evaluación con lectina WGA sucede lo mismo en los diferentes segmentos del oviducto.

A lo largo del tracto reproductor del gallo ocurren procesos de maduración que implican cambios morfofisiológicos relacionados con la adquisición de la capacidad fertilizante en los espermatozoides y una vez dentro del oviducto la hembra tiene la capacidad de mantener esta capacidad fertilizante hasta que el espermatozoide llegue a fecundar al ovocito.

Abstract

In this study, the morphophysiological characteristics of rooster sperm were analyzed in the segments of the male reproductive tract and once deposited in the female until reaching the site of fertilization. We worked with roosters and chickens Rhode Island Red, ejaculated by means of the technique of dorsal-ventral massage and for the recovery of sperm from the different segments of male and female, birds were sacrificed. Basic sperm evaluations (mobility, percentage of live sperm, percentage of abnormalities and morphometry) were made to the samples obtained. Staining with chlortetracycline was also processed for the determination of the presence of Ca^{2+} and with WGA lectin together with fluorescence isothiocyanate to determine N-acetyl glucosamine on the surface of the sperm membrane.

In the segments of the male reproductive system such as the testicle, vas deferens (cranial, medial caudal): the average mobility was 54.6%, in the ejaculate 90% with a percentage of live sperm in the segments of 94.6 and 96.4 in the ejaculate. With respect to mobility within the segments 67.8% and 94.1% of live sperm. The results obtained with the CTC stain indicate a decrease of intact sperm during its passage through the different segments, finding 44.7% in testes and decreasing up to 18.1% in the ejaculate, the percentage of trained sperm is maintained in all segments, finding in the testis 23.6% and in the ejaculate 26.1%, for the sperm with acrosome reaction an increase is observed as they pass from the testicle with 23.5% to the different segments until they are ejaculated 57.1% and this same thing happens with the WGA lectin evaluation, The same behavior of the

spermatozoa appears in the segments of the male and the ejaculate. In the case of the segments of the female reproductive system, the average mobility obtained was 67.8%, the average live sperm 94.1%. For the evaluations with CTC, the percentage of intact spermatozoa of the uterus-vagina segment (22.2%) decreased to the infundibulum (17.7%). As for capacitated spermatozoa, the same behavior as the intact sperm and sperm with acrosomal reaction increases this percentage when arriving at the place of fertilization. With the WGA lectin evaluation the same happens in the different segments of the oviduct.

Throughout the reproductive tract of the rooster, maturation processes occur involving morphophysiological changes related to the acquisition of fertilizing capacity in the sperm and once inside the oviduct, the female has the ability to maintain this fertilizing capacity until the sperm reaches fertilization to the oocyte.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Aparato reproductor del gallo	2
2.2 Aparato reproductor de la gallina	4
2.3 Espermatogénesis en aves	6
2.4 Morfología espermática	7
2.5 Ultraestructura espermática	8
2.6 Fisiología espermática	10
2.6.1 Maduración espermática	10
2.6.2 Capacitación y RA espermática en aves	10
2.7 Almacenamiento de espermatozoides en la hembra	13
2.8 Evaluación seminal <i>in vitro</i>	14
2.8.1 Movilidad espermática	14
2.8.2 Espermatozoides vivos y morfología espermática	14
2.8.3 Evaluación de la capacidad fecundante	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	18

6. OBJETIVOS	18
6.1 General	18
6.2 Particulares	18
7. MATERIAL Y MÉTODOS	19
7.1 Localización	19
7.2 Aves	19
7.3 Obtención de espermatozoides	19
7.3.1 Macho	19
7.3.2 Hembra	20
7.4 Evaluación espermática básica	21
7.5 Morfometría espermática	21
7.6 Presencia y distribución de Ca^{2+}	22
7.7 Determinación de N-acetil-glucosamina	22
7.8 Capacidad de RA	23
7.9 Análisis estadístico	23
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
8.1 EN MACHO	24
8.1.1 Evaluación espermática básica	24
8.1.2. Evaluación morfométrica	26

8.1.3. Presencia y distribución de Ca^{2+}	27
8.1.4. Presencia y distribución de N-acetil- β -D-glucosamina	31
8.2 EN HEMBRA	35
8.2.1 Evaluación espermática básica	35
8.2.2. Presencia y distribución de Ca^{2+}	37
8.2.3. Presencia y distribución de N-acetil- β D- glucosamina	39
9. CONCLUSIONES	40
10. LITERATURA CITADA	41

Índice de cuadros y figuras

Figura 1. Aparato reproductor del macho en <i>Gallus gallus</i>	3
Figura 2. Aparato reproductor de la hembra en <i>Gallus gallus</i>	5
Figura 3. Espermatozoide de <i>Gallus gallus</i>	7
Figura 4. Ultraestructura del espermatozoide de <i>Gallus gallus</i>	9
Figura 5. Túbulos de almacenamiento de espermatozoides en la unión útero-vaginal	13
Figura 6. Patrones de distribución de Ca^{2+} determinados con clortetraciclina en espermatozoides de <i>Gallus gallus</i>	29
Figura 7. Patrones determinados con lectina WGA para N-acetil-B-D-glucosamina en espermatozoides de <i>Gallus gallus</i>	34

Cuadro 1. Evaluación de los parámetros espermáticos en fresco evaluados <i>in vitro</i> en eyaculado y en diferentes secciones del conducto deferente	25
Cuadro 2. Evaluación de la morfometría espermática en eyaculado y en diferentes secciones del conducto deferente	27
Cuadro 3. Porcentajes de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal determinados en fresco <i>in vitro</i> con CTC y con MPV	29
Cuadro 4. Porcentajes de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal determinados <i>in vitro</i> con WGA, en fresco y con MPV	33
Cuadro 5. Parámetros de evaluación básica en espermatozoides de diferentes segmentos del oviducto y del eyaculado	37
Cuadro 6. Espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal evaluados en fresco <i>in vitro</i> con CTC	38
Cuadro 7. Espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal evaluados en fresco <i>in vitro</i> con WGA.....	39

1. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides deben llevar a cabo su maduración, capacitación y reacción acrosomal (RA) para obtener su capacidad fertilizante. Sin embargo, en los espermatozoides de las aves estos procesos aún no han sido plenamente caracterizados. La RA es un proceso que los espermatozoides deben cumplir para poder penetrar al ovocito e iniciar el proceso de fertilización. Los espermatozoides que llegan a la reacción acrosomal son capaces de penetrar la membrana perivitelina que rodean al ovocito por medio de diferentes enzimas y de esta manera lograr la fertilización (Gibbons et al., 2005; Nixon et al., 2006; Lemoine et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento se ha estudiado que estos procesos ocurridos en espermatozoides de mamíferos, para el caso de las aves, presentan diversas particularidades, como la morfología del espermatozoide; ya que es filiforme y cuenta con un *perforatum* en la región sub-acrosomal (Herrera et al., 2005; Long, 2006; Barbas et al., 2009), el almacenamiento de estos espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra específicamente en la unión útero-vaginal y en el infundíbulo (Bakts, 2011; Sasanami et al., 2012) y por último la fecundación, ya que el espermatozoide debe de atravesar una membrana vitelina (Bellairs et al., 1963; Kido y Doi, 1988), considerada análoga a la zona pelúcida en mamíferos, destacando además los tiempos en los cuales sucede la maduración espermática desde la espermatogénesis en el testículo, hasta que logra la capacidad fertilizante en el infundíbulo de la hembra (Munro, 1938; Howart, 1970; Lemoine et al., 2009; Ahammand et al., 2011a).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Aparato reproductor del gallo

Los testículos en el gallo (*Gallus gallus*) se encuentran dispuestos simétricamente a los lados de la línea media del celoma, ventrales a los riñones y su borde cóncavo se encuentra a los lados de la línea media; poseen forma de habichuela y su color varía del blanco amarillento (macho inmaduro) al blanco puro durante la actividad sexual. En el macho adulto y sexualmente activo, los testículos miden de 3,25 a 5,6 cm de largo y unos 2,5 cm de grosor; el peso de cada testículo es de 25 a 35 g; normalmente el izquierdo es 0,5 a 3 g más pesado que el derecho, con una correlación positiva entre el peso del ave y el tamaño del testículo (Rospigliosi y Figueroa, 2003, Herrera et al., 2005).

El conducto deferente es un tubo muy contorneado que en su extremo distal se dilata ligeramente, discurren en forma de zigzag con una longitud aproximada de 10 cm, van paralelos a la línea media y entran en la pared en la cloaca (urodeum) y su abertura final es a través de una corta papila inmediatamente ventral a la abertura de los uréteres (Figura 1). La anatomía de los conductos excretores (conductos deferentes) ha sido estudiada ampliamente, no así sus funciones, sin embargo, se conoce que los espermatozoides adquieren proteínas secretadas durante su pasaje a través de estos conductos (Aire, 2002).



Figura 1. Aparato reproductor del macho en *Gallus gallus*.

Fuente: González, 2018.

Los espermatozoides testiculares, no son móviles ni tienen poder fecundante, se encuentran en estado de “maduración”, la movilidad la adquieren en los conductos deferentes. Además, en las aves, en estas mismas vías, elaboran el plasma seminal, transformando el fluido testicular y añadiéndole sus propias secreciones, ya que las aves carecen de glándulas anexas (Ricaurte, 2006).

2.2 Aparato reproductor de la gallina

En las gallinas la maduración sexual ocurre entre los 150-160 días de edad (21-23 semanas). Su aparato reproductor es impar, pues solo se desarrolla el ovario izquierdo que se sitúa en la parte central del cuerpo, entre la porción terminal de los pulmones y el borde anterior del riñón izquierdo.

El aparato reproductor (Figura 2) está formado por dos partes esenciales, el ovario y el oviducto. En el ovario se encuentran los folículos, que en una pollita pueden contarse hasta 4,500. Los folículos maduran paulatinamente a lo largo de la puesta y la vida de la gallina. Cuando están totalmente maduros, amarillos, y tienen el tamaño de la yema del huevo, pasan al oviducto donde termina de formarse el huevo. El oviducto está formado por cuatro partes (infundíbulo, mágnium, istmo y útero). El folículo desarrollado (yema) cae en el infundíbulo donde termina de formarse la membrana vitelina, en el mágnium ocurre la secreción de las proteínas del albumen, seguidamente en el istmo se forman las membranas que recubren el albumen, y en el útero ocurre la hidratación del albumen y la formación de la cáscara. Durante la puesta del huevo una porción vaginal del oviducto se proyecta al exterior a través de la cloaca, con lo cual el huevo se pone limpio. Finalmente, la cutícula que envuelve a la cáscara se endurece al contacto con el aire y evita de esta forma que puedan penetrar bacterias en el interior del huevo.

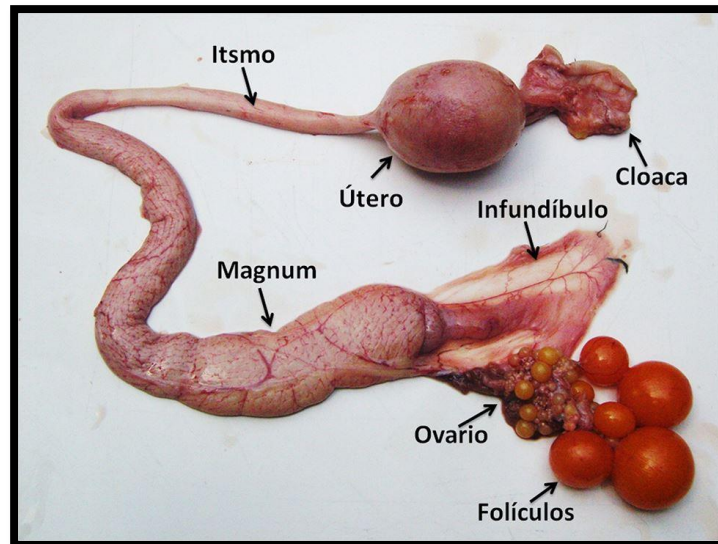


Figura 2. Aparato reproductor de la hembra de *Gallus gallus*.

Fuente: (Herrera et al., 2013).

La formación del huevo sigue un patrón cíclico que dura por término medio entre 24 y 26 horas, desde la ovulación hasta que el huevo es expulsado por la cloaca, no coinciden dos huevos dentro del oviducto, debido a que siempre hay un retraso de 20 a 30 minutos entre puestas. Este fenómeno se repite cíclicamente, permitiendo que una gallina ponga un huevo diario durante 3, 4 ó 5 días o más días. A este conjunto de días consecutivos de puesta se le denomina serie de puesta. Una vez transcurrida una serie de puesta la gallina deja de poner entre 2 y 3 días, denominándose a estos días, periodo de descanso o pausa (Caravaca et al., 2003).

2.3 Espermatogénesis en aves

La secuencia de eventos en el desarrollo del espermatozoide desde la espermatogonia se llama espermatogénesis y se divide en tres fases:

1. Espermatocitogénesis, proceso en el cual una espermatogonia madura pasa a espermatocito.
2. Meiosis, división natural de los espermatocitos que da lugar a espermátides con un número reducido (haploide) de cromosomas y
3. Espermioagénesis, proceso de transformación de las espermátidas en espermatozoide (Martínez-Moreno et al., 2011).

Esta secuencia programada de pasos involucra tipos de células específicas (espermatogonia, espermatocitos y espermátidas) que persisten por periodos que suceden de minutos a días en distintas especies de aves. Es un proceso complejo de proliferación celular, reducción haploide del genoma nuclear y diferenciación celular, y en aves galliformes se ha descrito a partir de estudios realizados con codorniz japonesa y se calcula que la duración de la espermatogénesis es de 12 días codorniz. También se sabe que la eficiencia de la espermatogénesis en el gallo es de 80 a 120 X 10⁶ espermatozoides por gramo de testículo y en aves la espermatogénesis ocurre a temperatura central del cuerpo (40-41°C). La espermatogénesis culmina con la liberación de espermatozoides inmóviles del epitelio seminífero, de allí son llevados por una corriente de líquido de los túbulos seminíferos que fluye por la luz de éstos hacia los conductos excretores de los testículos, formándose un semen viscoso debido a la absorción de esa fracción

líquida de los túbulos seminíferos a nivel de los conductos excretores y donde los espermatozoides adquieren la habilidad de moverse (Martínez-Moreno et al., 2011).

2.4 Morfología espermática

Los espermatozoides de las aves son de forma alargada y se subdividen en cabeza, pieza media y cola como se muestra en la Figura 3. Con longitud de 80 a 90 μm (Long, 2006). El espermatozoide es haploide, se encuentra desprovisto de citoplasma, constituido por un núcleo alargado, con cromosomas altamente condensados que impiden la actividad transcripcional para remplazar proteínas, un acrosoma que permite al espermatozoide interactuar y a su vez penetrar al ovocito y fertilizarlo, también cuenta con 20 a 60 mitocondrias situadas en la parte anterior del flagelo (Long, 2006; Barbas et al., 2009).

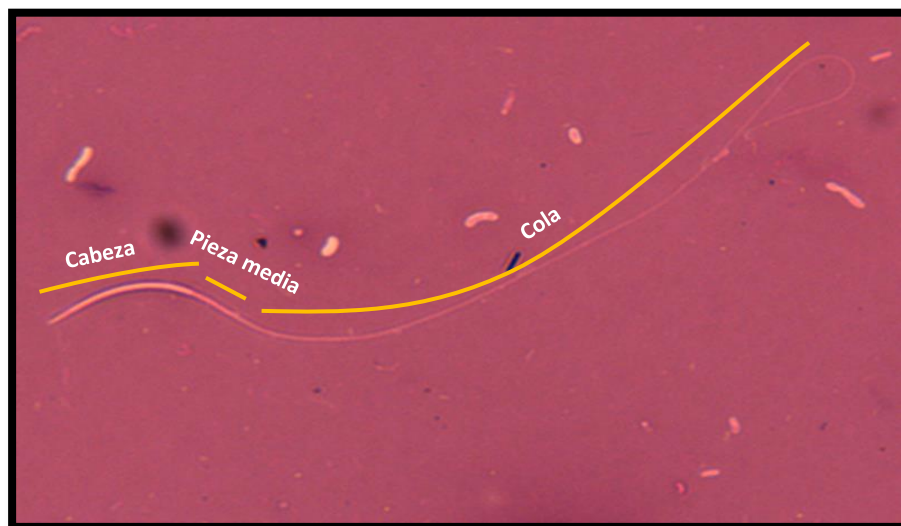


Figura 3. Espermatozoide de *Gallus gallus*.

Fuente: González, 2019.

2.5 Ultraestructura espermática

El espermatozoide de ave es filiforme, en la cabeza se observa el acrosoma con sus membranas acrosomales externa e interna, exteriormente se observa la membrana plasmática. En el núcleo muestra la cromatina muy compactada, ceca del núcleo hay microtúbulos que alargan la cabeza del espermatozoide y ayudan a compactar la cromatina, también se describe la presencia de un perforatorio (*perforatum*) o filamento acrosómico (Figura 4). La región del cuello incluye los centríolos proximal y distal, el centríolo distal ubicado a continuación, ensambla el axonema actuando como centro organizador de microtúbulos, este axonema, es el componente motor de la cola, se origina en el centríolo distal y a su alrededor hay unas 30 mitocondrias que forman el segmento medio; el anillo citoplasmático denso marca la frontera distal del segmento medio y la proximal del segmento principal; sin embargo, carece de la vaina fibrosa y las fibras densas externas observadas en los mamíferos; pero el axonema está envuelto en una vaina amorfa (Peralta et al., 2002).

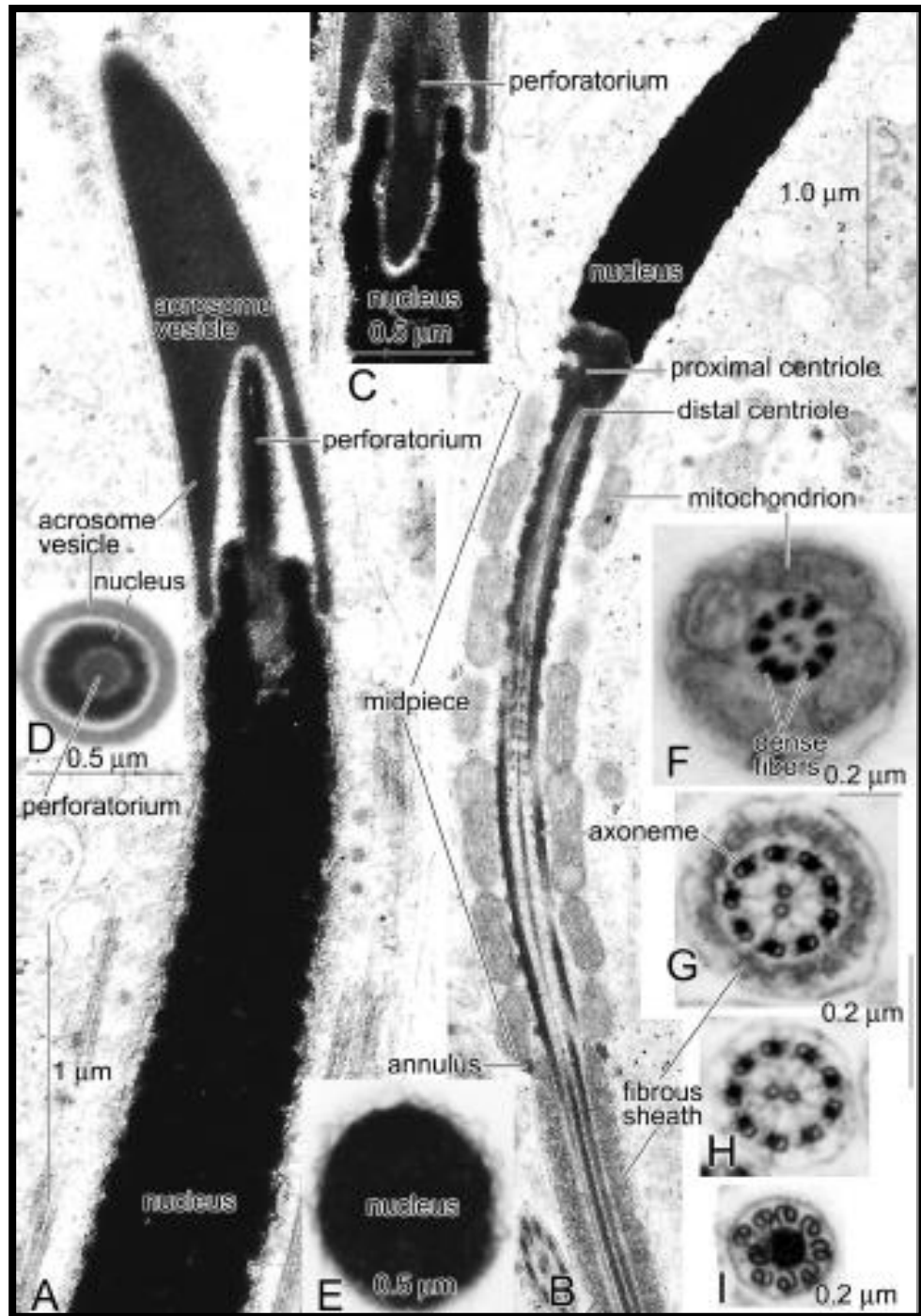


Figura 4. Ultraestructura del espermatozoide de *Gallus gallus*

Fuente: Peralta et al., (2002).

2.6 Fisiología espermática

El metabolismo de los espermatozoides puede funcionar en ambientes aerobios o anaerobios, se ha establecido que obtienen la energía requerida para su movilidad por medio de la respiración oxidativa y no por la glucólisis (Long, 2006). La respiración espermática se ve influenciada fuertemente por las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , sustancia que reactiva a los espermatozoides (McLean et al., 1998).

2.6.1 Maduración espermática

En las aves este proceso de maduración se realiza en los conductos deferentes, donde obtienen una mayor movilidad durante su tránsito por estos conductos, también en los conductos deferentes adquieren su forma definitiva ya que sufren cambios morfológicos, como la pérdida de la gota citoplasmática. Además, las aves están desprovistas de glándulas accesorias, por lo que, los conductos deferentes elaboran el plasma seminal y se encargan de almacenar (Ahammad et al., 2011a,b).

2.6.2 Capacitación y RA espermática en aves

Los estudios *in vitro* indican que los espermatozoides de aves de corral y pavos no requieren un período de capacitación en el tracto de la hembra con el fin de fertilizar un ovocito (Howarth, 1970; Howarth y Palmer, 1972).

La RA puede ser inducida mediante la incubación de los espermatozoides *in vitro* en la presencia de membrana perivitelina y calcio extracelular (Horrocks et al., 2000; Lemoine et al., 2008). Sin embargo, Lemoine et al. (2009), encontraron que

la proteína quinasa A está involucrada en la estimulación de la RA y la fosforilación de las proteínas en espermatozoides de aves, se ha estudiado de igual forma esta semejanza con la capacitación de espermatozoides de codorniz.

Esponda y Bedford (1985), mostraron que un subconjunto de proteínas que se unen a la superficie de los espermatozoides, permanecen adheridas aún después de estar en tracto reproductor de la hembra.

De igual manera Ahammad et al. (2011b), demostraron que la movilidad de los espermatozoides de ave está directamente involucrada en el proceso de fertilización, por lo que hipotetizan que los espermatozoides de ave se ven sometidos a un proceso de maduración y obtención de capacidad fecundante en el tracto reproductor del gallo (Ahammad et al., 2011a).

Cuando el espermatozoide llega al ovocito se liberan las enzimas acrosómicas (hialuronidasa y acrosina), que se encargan de desdoblar las distintas capas celulares del ovocito, en este momento en la estructura del espermatozoide cuenta con un elemento rígido y membranoso que es el "*Perforatum*", que comienza a romper las paredes y va avanzando a medida que las células se degradan, así el espermatozoide se moviliza hasta que se fusiona con el ovocito (Donoghue, 2000).

La RA implica la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, resultando en la liberación del contenido del acrosoma. Las enzimas contenidas en el acrosoma permiten a los espermatozoides hidrolizar la membrana que rodea al ovocito, resultando en huecos que permiten el paso de uno o varios espermatozoides (Singh, 2013).

La RA de espermatozoides de ave puede ser inducida muy rápidamente *in vitro* en un medio salino simple que contiene sólo Ca^{2+} y la capa interna perivitelina (CIPV) (Horrocks et al., 2000; Lemoine et al., 2008).

En la fecundación de las aves, el espermatozoide atraviesa la membrana perivitelina (MPV) que está compuesta por una capa de glicoproteínas y la CIPV que rodea el ovocito (Bellairs et al., 1963; Kido y Doi, 1988). Esta capa puede ser considerada análoga a la zona pelúcida de los mamíferos y se ha demostrado que una glicoproteína de aproximadamente 34 kDa tiene un alto grado de homología con los mamíferos a la proteína de la zona pelúcida 3 (Waclawek et al., 1998), la cual actúa como la proteína de unión de los espermatozoides (Bleil y Wassarman, 1980). También se ha demostrado que los oligosacáridos aislados de aves, glicoproteínas de la CIPV son capaces de inducir RA en espermatozoides de aves de corral (Horrocks et al., 2000).

2.7 Almacenamiento de espermatozoides en la gallina

La hembra almacena espermatozoides dentro del aparato reproductor, específicamente en la unión útero-vaginal y el infundíbulo (Figura 5), conocidos como túbulos de almacenamiento de espermatozoides (TAE) (Bord et al., 1964; Holt, 2011).

En los TAE de las gallinas los espermatozoides pueden permanecer y sobrevivir de 2 a 15 semanas (Bakts, 2011). Aunque ya se han estudiado los TAE desde su descubrimiento en 1960, se sabe poco sobre el proceso de capacitación de los espermatozoides en estas estructuras, su mantenimiento y su liberación (Sasanami et al., 2012).

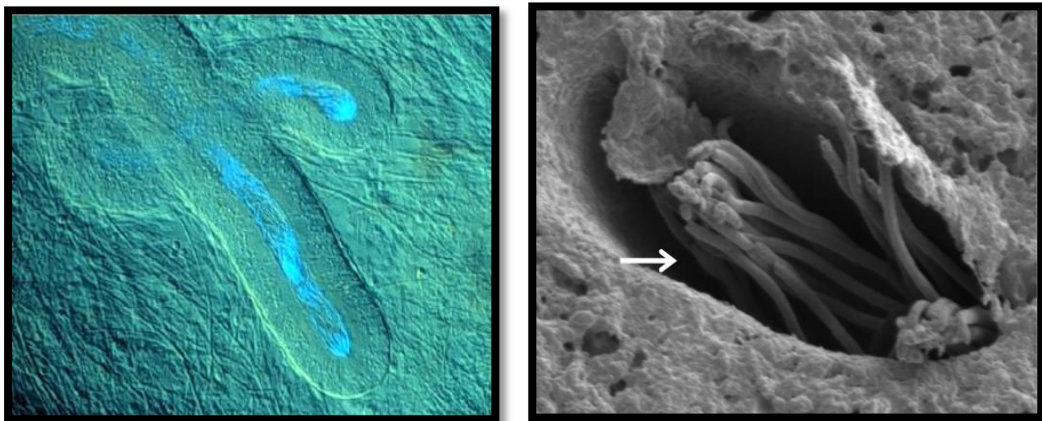


Figura 5. Túbulos de almacenamiento de espermatozoides en la unión útero-vaginal. Fuente: Sasanami et al., (2012).

2.8 Evaluación seminal *in vitro*

La evaluación seminal debe efectuarse en condiciones adecuadas de temperatura y manejar lo más rápido posible; el material necesario para la evaluación, debe encontrarse limpio, seco y a la temperatura correspondiente. Los resultados de una evaluación de semen son válidos solamente durante cierto tiempo, debido a que las características seminales varían bajo la influencia de diversos factores (Ball y Olson, 1981).

2.8.1 Movilidad espermática

La movilidad espermática debe evaluarse lo más rápidamente posible después de la obtención del semen y en las mejores condiciones posibles; determinándose como parámetro de movilidad progresiva. La valoración de la movilidad individual es cuantitativa y cualitativa, es decir, se valora el porcentaje de espermatozoides en movimiento (Herrera et al., 2005).

2.8.2 Espermatozoides vivos y morfología espermática

Este parámetro se puede valorar con diferentes medios de coloración, el más usado es la tinción Eosina-Nigrosina. Una vez hecha la extensión sobre un portaobjetos de la mezcla de una gota de tinción con una gota de semen, se observa con un microscopio de campo claro, los espermatozoides sin teñir corresponden a los vivos y los espermatozoides teñidos corresponden a los muertos (Herrera et al., 2005).

En el eyaculado de las aves se pueden encontrar espermatozoides anormales, en la cabeza de éste pueden presentarse las siguientes anomalías: acrosomas

cortos, cabezas hinchadas, cabezas desprendidas, vacuolares, nódulos en la cabeza y hasta dobles cabezas; la pieza intermedia puede ser doble, filiforme, doblada, etc., en la cola pueden presentarse anomalías como: cola enrollada, torcida, rota, enrollada (Lacke, 1957).

En los espermatozoides de las aves se admite como normal cierta inflexión entre el acrosoma y el cuello cefálico, flexión que aparece como síntoma de maduración. De acuerdo con Lacke (1957), es una anomalía que se aprecia en los espermatozoides que han permanecido varios días en el tracto del macho antes de ser eyaculados; se ha observado también con frecuencia la alteración morfológica del cuello doblado que no implica la pérdida de capacidad fecundante.

2.8.3 Evaluación de la capacidad fecundante

La capacidad de fecundación exige una correcta movilidad e integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, así como la propiedad de capacitarse normalmente. Una de las pruebas de evaluación del estado de capacitación espermática, es la tinción fluorescente con clortetraciclina (CTC); en esta tinción, las propiedades fluorescentes de la CTC son utilizadas para evaluar el estado de capacitación y la integridad del acrosoma. (Herrera et al., 2015). Para ello, los espermatozoides son incubados *in vitro* en un medio estimulante de la capacitación y la exostosis acrosomal, como es el caso del ionóforo de calcio (A23187); verificándose tras un periodo de incubación, diferentes patrones de distribución de la CTC.. Estos patrones son: no-capacitado y acrosoma intacto

(DasGupta et al., 1993). Estos patrones de fluorescencia de la CTC reflejan las alteraciones asociadas a los niveles del Ca^{2+} intra-citoplasmáticos.

La RA puede ser determinada por varias técnicas: como la tinción de azul de Coomasie, o el uso de lectina *Pisum sativum* aglutinina marcada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC) y con otra lectina que es Con-A (*Concanavalina ensiformis*) ya que las células pueden ser identificadas por las estructuras presentes en su superficie, en particular por los carbohidratos membranales, localizados generalmente en la periferia de estructuras proteínicas y lipídicas. Una manera de demostrar la presencia de azúcares en la superficie celular, es utilizando proteínas llamadas lectinas, que tienen afinidad específica y se unen a carbohidratos, y que son ampliamente utilizadas para identificar y aislar moléculas de la membrana plasmática que contiene carbohidratos (Montoya et al., 2008). Por ejemplo las lectinas PSA-FITC y Con-A tienen afinidad por los residuos de manosa y galactosa de las glicoproteínas presentes en la membrana plasmática del dominio acrosomal de la cabeza del espermatozoide, es una tinción negativa que permite determinar la ausencia de la membrana plasmática debido a que durante la RA se desaparece el dominio acrosomal del espermatozoide; por otro lado, el anti-CD-46 unido a un fluorocromo, es una coloración positiva, debido a que la proteína CD46 está localizada únicamente en la membrana interna acrosomal y sólo los espermatozoides que sufren RA completa pueden ser marcados (Montoya et al., 2008; Herrera et al., 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

En aves existen limitaciones debido a la escasa información sobre los posibles lugares donde el espermatozoide se madura y adquiere su capacidad fertilizante, ya que este tipo de información nos ayudaría a explicar los procesos por los que pasa el espermatozoide, de igual manera sería un gran aporte para recuperar espermatozoides de aves que hayan muerto y que tengan gran importancia por encontrarse en peligro de extinción o con un valor genético alto y utilizar las técnicas de reproducción asistida en aves para un mejor aprovechamiento de éstos, ya sea realizando la crioconservación o la inseminación artificial *in vivo* o *in vitro*.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿En qué condiciones morfofisiológicas se encontraran los espermatozoides durante su paso por el tracto reproductor del gallo y de la gallina?

5. HIPOTESIS

En el tracto reproductor de macho y la hembra ocurren cambios morfofisiológicos importantes para los espermatozoides de *Gallus gallus* relacionados con su capacidad fertilizante, debido a las condiciones celulares y cambios fisiológicos que suceden en diversos segmentos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Conocer los cambios morfofisiológicos que se relacionan con la capacidad fertilizante de espermatozoides obtenidos de diferentes segmentos del tracto reproductor del macho y de la hembra de *Gallus gallus*.

6.2 Objetivos específicos

- ❖ Evaluar los indicadores espermáticos básicos en eyaculado y en diferentes segmentos del tracto reproductor del macho y hembra de *Gallus gallus*.
- ❖ Determinar la cantidad de espermatozoides capacitados y con RA en los segmentos del tracto reproductor del gallo y gallina.
- ❖ Determinar la distribución de N-acetil-B-D-glucosamina en espermatozoides de los segmentos del tracto reproductor del macho y hembra.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Localización

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, ubicada en Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, CDMX; México.

7.2 Aves

Las muestras se obtuvieron de 15 gallos Rhode Island Red con fertilidad probada, revisando el porcentaje de huevos fértiles. Se cumplió con la norma NOM-062-ZOO-1999 para manejo de aves, cuidado y bienestar animal. El sacrificio de los gallos se realizó apegado a la norma NOM-033-ZOO-1995.

7.3 Obtención de espermatozoides

7.3.1 Macho

Los espermatozoides fueron obtenidos por masaje dorso-ventral (Burrows y Quinn, 1937; Herrera et al., 2005), después de la eyaculación el semen se recolectó directamente de la cloaca. Este procedimiento se realizó después de tres días consecutivos de eyacular a los gallos, con el propósito, de no obtener espermatozoides acumulados de días anteriores en el tracto del macho.

Después de obtener los eyaculados de cada gallo, se sacrificaron cumpliendo con la NOM-062-ZOO-1999, para obtener el testículo, y las secciones del conducto deferente (craneal, medial y caudal). Cada segmento se lavó con solución salina

fisiológica para eliminar la mayor cantidad de sangre. Posteriormente cada sección se cortó en fragmentos de 0.5 cm y se colocaron en cajas Petri con 500 µl de solución Lake (Lake y Steward, 1978) para permitir que los espermatozoides se separaran en el medio líquido por “swim up”. Después de tres minutos, se retiró el tejido y los espermatozoides se homogenizaron para evitar aglutinaciones (Herrera et al., 2005), se mantuvieron a una temperatura de 5 °C (Santiago et al., 2011) para las evaluaciones espermáticas básicas.

7.3.2 Hembra

Se utilizaron 10 gallinas Rhode Island Red de 18 semanas de edad y fueron alojadas en jaulas individuales de 200 x 200 x 100 cm, con una temperatura ambiente de 25-28 °C y cama de paja, con agua y alimento *ad libitum* (18% de PC, 2% grasa, 88% de MS, 0.85 de Ca²⁺ y 0.55 de P).

El semen para inseminar artificialmente (IA) a las gallinas, se obtuvo mediante masaje dorso-ventral, se diluyó con medio Lake y se inseminó con una concentración de 10×10^6 de espermatozoides.

A los 5 días después de la IA y cumpliendo con la NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de animales de laboratorio, se sacrificaron las gallinas para recuperar los espermatozoides directamente de los diferentes segmentos del tracto reproductor de las gallinas. Se realizó la disección del oviducto dividiéndolo en secciones (Infundíbulo, magnum, istmo, útero y vagina), cortando a la mitad cada sección y lavando con 2 ml de medio Lake (0.09 M glutamato de sodio, 0.04 M fructuosa, 0.003 M acetato de magnesio y 0.05 M acetato de potasio) (Lake,

1984), dejando reposar por 10 min sobre una platina térmica a 40 °C y por “swim up” se recuperaron los espermatozoides de cada sección (Herrera et al., 2005).

De cada sección del oviducto, se recuperaron alícuotas con al menos 10×10^6 espermatozoides, en los que se determinó su porcentaje de movilidad, estimando un rango entre cero y 100 % para movilidad individual progresiva (Morisson et al., 1997). También se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y su morfología, mediante tinción con eosina-nigrosina, se contaron doscientos espermatozoides por preparación (Santiago-Moreno et al., 2011) en un microscopio óptico Olympus BX51 con objetivo de 100X.

7.4 Evaluación espermática básica

La movilidad se determinó estimando el porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo (Váradi et al., 2013) en una preparación y vista al microscopio en 40X. En un frotis teñido con eosina-nigrosina, observado a 100X, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y con alteraciones (Herrera et al., 2005), contando 100 espermatozoides por preparación.

7.5 Morfometría espermática

Para describir la morfometría espermática se midió la longitud total, de cabeza, cuello y flagelo considerando las regiones descritas por Tabatabaei et al., en 2009. En el mismo frotis con eosina-nigrosina observado en un microscopio óptico Olympus BX51 con el software Image-Pro plus versión 6.2.1, se midieron al menos 100 espermatozoides de cada preparación.

7.6 Presencia y distribución de Ca^{2+}

Se incubaron alícuotas de 5×10^6 de espermatozoides con clortetraciclina 0,9 M (CTC) con un volumen final de 500 μl , en oscuridad a 38 °C por 10 min. Posteriormente de cada alícuota, se hicieron preparaciones sobre portaobjetos para observar con un microscopio de fluorescencia a 100X, a longitud de onda 488 nm y excitación de 560 nm, las imágenes se evaluaron con el software Image-Pro plus versión 6.2.1. Se contaron 200 espermatozoides por muestra y se determinó la distribución de Ca^{2+} , identificando tres patrones, A) espermatozoide intacto con fluorescencia en cabeza, pieza media y flagelo, B) espermatozoide capacitado, fluorescencia en el acrosoma, en la zona post-ecuatorial y pieza media, patrón C) con RA presenta poca fluorescencia en pieza media y flagelo (Ochoa et al., 2014, Herrera et al., 2017).

7.7 Determinación de N-acetil- β -D-glucosamina

Se incubaron alícuotas de 5×10^6 de espermatozoides con 10 μl de lectina WGA-FITC a una dilución de 1:50, un volumen final de 500 μl en oscuridad por 30 min a 37 °C, posteriormente fueron centrifugados (2897 G x 1 min) para retirar el sobrenadante y re suspender el paquete celular con 5 μl etanol a 2 °C hasta la evaluación. Posteriormente de cada alícuota, se hicieron preparaciones sobre porta objetos para observar con un microscopio de fluorescencia a 100X, a longitud de onda 488 nm y excitación de 560 nm, las imágenes se evaluaron con el software Image-Pro plus versión 6.2.1. Se contaron 200 espermatozoides por muestra y se determinó la distribución de N-acetil- β -D-glucosamina.

7.8 Capacidad de RA.

Para la inducción de la RA se colocaron en un tubo Eppendorf 20 μ l de muestra con espermatozoides de las diferentes secciones, 50 μ l de CTC y 50 μ l de membrana perivitelina, se homogenizó y se mantuvo sobre una platina térmica marca Tokai Hit cubriéndolos de la luz, se procedió a incubar por 20 min a 37 °C, pasado el tiempo de incubación se evaluó tomando 10 μ l de esta mezcla sobre un portaobjetos, se expandió dejando secar para después cubrirlo con un cubre objetos y evaluándolo posteriormente en el microscopio de fluorescencia, se contaron 100 espermatozoides determinando tres patrones diferentes: espermatozoides intactos, espermatozoides capacitados y espermatozoides con RA (Ochoa et al., 2014; Herrera et al., 2017).

7.9 Análisis estadístico

Se utilizó un modelo al azar, y una prueba de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad y prueba de Levene para homocedasticidad. Para evaluar los cambios en el patrón de fluorescencia con CTC y con MPV+CTC se realizó un análisis de varianza y cuando se observaron diferencias se aplicó una prueba de Tukey. Las diferencias del efecto de las regiones para la evaluación básica y los patrones de fluorescencia con los patrones de WGA y MPV+WGA fueron estimados con una prueba de Kruskal-Wallis. Los datos fueron analizados usando el programa RStudio (Macintosh; Intel Mac OS X 10_11_1, versión 0.99.484-© 2009-2015 RStudio, Inc.) con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

8.1. EN MACHO

8.1.1. Evaluación espermática básica

La movilidad espermática mostró diferencias significativas entre las regiones del tracto reproductor (Cuadro 1), los valores encontrados demuestran que los espermatozoides aumentan su movilidad durante su paso por el conducto deferente hasta su eyaculación, este aumento en la movilidad es importante para que el espermatozoide pueda fertilizar un ovocito (Mocé et al., 2010; Ahammad et al., 2011b). Sin embargo, este incremento de la movilidad espermática les ocasiona un desgaste energético, debido al limitado número mitocondrial que poseen (Etches, 1996) hasta llegar al movimiento de hiperactivación, característico de espermatozoides capacitados (Ochoa et al., 2014). Esta hiperactivación puede ser detenida sugiriendo un proceso descapacitante en los TAE en el tracto de la gallina como lo menciona Sasanami et al., 2012. La movilidad en aumento por el conducto deferente también lo describe Nixon et al., 2014 en *Coturnix japonica*, encontrando un 20% de movilidad en testículo y un 80% en la parte caudal del conducto deferente, en esta investigación se obtuvo un 11.33% en espermatozoides de testículo y 78% en la parte caudal del conducto deferente en gallo. Esto confirma que se puede tomar como modelo experimental al *G. gallus* para recuperar espermatozoides con movilidad en otras especies de aves y ser utilizados con fines reproductivos o de conservación.

Cuadro 1. Evaluación de los parámetros espermáticos en fresco evaluados *in vitro* en eyaculado y en diferentes secciones del conducto deferente. Valores representados en media y DE.

Parámetro	Testículo	Conducto deferente			Eyaculado
		Craneal	Medial	Caudal	
Movilidad (%)	11.3 ± 2.2 ^e	56.3 ± 4.8 ^d	73.0 ± 4.5 ^c	78.0 ± 3.1 ^b	90.0 ± 5.3 ^a
Vivos (%)	91.4 ± 5.6 ^d	93.9 ± 2.7 ^{cd}	95.6 ± 1.9 ^{bc}	97.8 ± 1.2 ^a	96.4 ± 1.4 ^b
Morfología normal (%)	89.2 ± 5.4 ^b	84.6 ± 6.2 ^c	90.8 ± 3.6 ^b	94.8 ± 3.8 ^a	91.4 ± 5.2 ^{ab}

^{a,b,c,d,e} Literales diferentes sobre la misma fila muestran diferencia significativa entre secciones (P<0.05) (n=15).

El porcentaje de espermatozoides vivos fue diferente entre las distintas regiones, encontrando un 91.40% en los espermatozoides recuperados del testículo y conforme se dirigen a la parte caudal del conducto deferente aumenta el porcentaje encontrando un 97.86% en esta última región, observándose la capacidad que tienen los espermatozoides a posibles cambios bioquímicos y anatómicos durante su paso por el conducto deferente, sin embargo, el objetivo de evaluar la movilidad y la viabilidad, es la valoración de estos para predecir la capacidad fertilizante y los porcentajes obtenidos fueron similares a los encontrados por Santiago-Moreno et al., 2011 y Herrera et al., 2005, donde al obtener estos porcentajes de viabilidad se pueden realizar técnicas como la fertilización *in vitro* (FIV) a pesar de que se utilicen bajas concentraciones de espermatozoides para fertilizar un ovocito (Mizushima et al., 2014).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con morfología normal, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre regiones. Los parámetros de morfología espermática encontrados en esta investigación presentaron 89.2% de espermatozoides normales en testículo y un 91.40% en eyaculado, estos porcentajes fueron similares a los reportados por Tabatabaei et al., 2009, que obtuvo un 89.8% de espermatozoides con morfología normal en el eyaculado de *G. gallus*. En ambas evaluaciones de viabilidad y morfología espermática normal en esta investigación el medio utilizado Lake mostró ser adecuado para mantener estas variables, debido a su composición, baja osmolaridad, pH y esto concuerda con otros autores que lo han utilizado (Umapathy et al., 2005; Herrera et al., 2005).

8.1.2. Evaluación morfométrica

Los indicadores de morfometría espermática tuvieron diferencias ($P < 0.05$) en todas las regiones como se muestra en la Cuadro 2, encontrando una longitud total 105.54 μm en espermatozoides que fueron eyaculados, aumentando la longitud de cabeza, cuello y cola conforme los espermatozoides pasan por el conducto deferente hasta ser eyaculados. De igual manera en esta investigación en el parámetro de morfometría espermática la información obtenida es relevante, demostrando que los espermatozoides tienen una maduración y cambios anatómicos conforme pasan del testículo al conducto deferente y por último hasta ser eyaculados. Long, 2006, reportó un tamaño de 80 a 90 μm en *G. gallus* en eyaculado y en el presente trabajo de investigación se obtuvo 15 μm más de longitud.

Cuadro 2. Evaluación de la morfometría espermática en eyaculado y en diferentes secciones del tracto reproductor. Valores representados en media y DE.

Parámetro de longitud	Testículo	Conducto deferente			Eyaculado
		Craneal	Medial	Caudal	
Cabeza	17.5 ± 3.0 ^a	16.4 ± 3.0 ^b	15.8 ± 1.4 ^c	16.3 ± 0.7 ^b	16.3 ± 0.6 ^b
Cuello	4.7 ± 0.9 ^a	4.5 ± 0.9 ^b	4.0 ± 0.4 ^{bc}	3.9 ± 0.5 ^c	4.7 ± 0.9 ^a
Cola	69.4 ± 16.5 ^b	55.2 ± 22.2 ^{cb}	67.7 ± 20.7 ^b	70.6 ± 20.2 ^b	85.0 ± 3.6 ^a
Total	91.4 ± 14.4 ^{dc}	76.2 ± 21.9 ^c	87.6 ± 21.2 ^b	90.9 ± 20.3 ^b	105.5 ± 3.6 ^a

^{a,b,c,d,e} Literales diferentes sobre la misma fila muestran diferencia significativa entre secciones (P<0.05) (n=500).

8.1.3. Presencia y distribución de Ca²⁺

Se observaron tres patrones de distribución de Ca²⁺: patrón A (espermatozoides intactos) fluorescencia en cabeza, pieza media y flagelo; patrón B (espermatozoides capacitados) fluorescencia en el acrosoma, en la zona post-euatorial y pieza media; patrón C (RA) presenta poca fluorescencia en pieza media y flagelo Figura 6.

Con la co-incubación de los espermatozoides con membrana perivitelina se modificó la proporción de patrones encontrados en el tracto reproductor del gallo. De acuerdo con la clasificación anterior se muestran los porcentajes de espermatozoides intactos, capacitados y con RA en fresco e incubados con MPV en el Cuadro 3. Se observa que hay un mayor porcentaje de espermatozoides intactos al ser eyaculados a diferencia de las demás regiones del tracto reproductor con un 66.71%. En cuanto al porcentaje de espermatozoides capacitados se encontró un porcentaje mayor en la región caudal con un 31.57% y

al ser eyaculados solo un 18.14% observándose que la región caudal pudiera tener una función almacenadora donde si los espermatozoides de esa región no son eyaculados tienen cambios anatómicos y bioquímicos. Para el porcentaje de espermatozoides con RA se encontró que en la porción caudal se obtuvo un 28% y un 14.57%, lo que explica que desde que los espermatozoides son producidos en el testículo van obteniendo cambios morfofisiológicos importantes, en el conducto deferente hasta ser eyaculados, suponiendo que en estos conductos hay células especializadas que le van dando al espermatozoide estos cambios en su anatomía y fisiología. Para los porcentajes de espermatozoides capacitados y con RA en fresco utilizando la tinción de CTC, se encontró un porcentaje de espermatozoides intactos en un 57.77% en todo el tracto reproductor hasta el eyaculado, un 25.68% de capacitados y un 19.28% de espermatozoides con RA, sin embargo, estos porcentajes cambian al ser co-incubados con MPV obteniendo en todas las regiones un promedio de intactos del 18.42%, capacitados en un 28.65% y con RA 51.74%. Estos resultados muestran que los espermatozoides de *G. gallus* se encuentran con capacidad fertilizante desde el testículo, como lo demostró Howarth, 1983 realizando inseminación intra-maginal en gallinas.

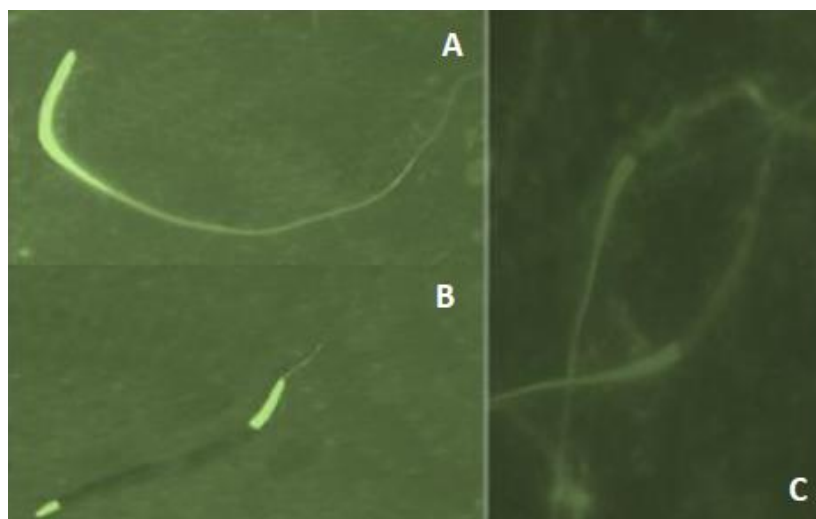


Figura 6. Patrones de distribución de Ca^{2+} determinados con clortetraciclina en espermatozoides de *Gallus gallus*. A) Espermatozoide intacto, B) espermatozoide capacitado C) espermatozoide con reacción acrosomal.

Cuadro 3. Porcentajes de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal determinados en fresco y post co incubación con membrana perivitelina (MPV).

Región	Tratamiento	Espermatozoides (%)		
		Intactos	Capacitados	Reaccionados
Testicular	Fresco	62.57±6.74 ^a	24.14±3.71	14.57±3.37 ^a
	MPV	19.57±3.51 ^b	30.57±2.33	45.00±5.15 ^b
Conducto deferente	Craneal Fresco	54.71±4.73 ^a	28.42±3.28	19.00±3.87 ^a
	Craneal MPV	22.28±2.27 ^b	33.57±3.89	43.57±5.22 ^b
	Media Fresco	59.42±4.61 ^a	26.14±2.29	18.71±2.57 ^a
	Media MPV	21.57±2.39 ^b	25.28±3.06	52.28±3.77 ^b
	Caudal Fresco	45.43±7.62 ^a	31.57±2.37	28.00±3.94 ^a
	Caudal MPV	16.14±1.18 ^b	27.00±2.04	57.29±2.43 ^b
Eyaculado	Fresco	66.71±3.37 ^a	18.14±1.94 ^a	16.14±3.08 ^a
	MPV	12.57±1.39 ^b	26.86±3.31 ^b	60.57±3.31 ^b

^{a,b} Literales distintas dentro de la fila por tratamiento por cada región, son diferentes ($P < 0.05$)

De igual manera se corrobora la hipótesis de que los espermatozoides de ave no necesitan entrar en contacto con el tracto reproductor de la hembra para poder llevar a cabo los procesos que lo lleven a fertilizar un ovocito (Lemoine et al., 2009; Ahammand et al., 2011a). Al recuperar espermatozoides de las distintas regiones del aparato reproductor del macho podemos utilizarlos en distintas técnicas de reproducción asistida en aves en peligro de extinción o con un valor genético y comercial, ya que se contará con un porcentaje alto de espermatozoides intactos capaces de criopreservar si se requiere, así como, espermatozoides capacitados y reaccionados para ser utilizados en FIV o en la IA. En cuanto a la comparación en fresco e incubados con MPV para inducir RA los resultados se muestran en la Cuadro 3, donde se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos en fresco y con MPV entre espermatozoides intactos y reaccionados en la región testicular, craneal, medial, caudal y en eyaculados. Solo en el porcentaje de espermatozoides capacitados no se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre las regiones testicular, craneal, medial y caudal. También observamos que se logró el aumento de espermatozoides con RA utilizando la MPV en comparación con los espermatozoides evaluados en fresco, confirmando los patrones encontrados en los dos tratamientos.

8.1.4. Presencia y distribución de N-acetil-β-D-glucosamina.

La evaluación con lectina WGA permitió observar tres patrones de fluorescencia que se describen a continuación: Patrón A: espermatozoide con fluorescencia completa, expresando una membrana intacta; patrón B, espermatozoide con fluorescencia en acrosoma, parte media, se clasificó como un espermatozoide en proceso de capacitación; patrón C: espermatozoide con fluorescencia en cabeza, se observa con mayor intensidad en la zona acrosomal, se identificó con RA (Figura 7).

En el Cuadro 4, se observa el porcentaje de espermatozoides intactos en el tratamiento en fresco como incubados con MPV mostraron diferencias ($P < 0.05$) en las regiones testicular, craneal, medial y caudal, pero sin encontrar diferencias en el eyaculado. Para el porcentaje de capacitados no se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en ninguna de las regiones con el tratamiento en fresco como con MPV y por último el porcentaje de espermatozoides con RA solo mostró diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos en las regiones testicular, caudal y medial, dejando a la región caudal y al eyaculado sin diferencias entre tratamientos. De igual manera se observa que cuando los espermatozoides permanecen mayor tiempo en el conducto deferente, el porcentaje de espermatozoides intactos disminuye y da paso al aumento de espermatozoides con RA (Cuadro 4), lo que indica que en este conducto deferente existen regiones específicas donde los espermatozoides van tomando una madurez, así como, cambios fisiológicos en la estructura de su membrana y cambios morfológicos. Con respecto a la utilización de lectina WGA se logró la identificación de N-acetil-B-D-glucosamina en espermatozoides de gallo, los patrones encontrados indican la distribución de este carbohidrato, donde

los espermatozoides intactos muestran fluorescencia en toda su estructura lo que señala que los receptores a N-acetil-B-D-glucosamina se encuentran todavía en la membrana plasmática dentro de los almacenamientos internos (Cardona-Maya et al., 2005), los espermatozoides con fluorescencia en el acrosoma y en la zona post-ecuatorial se identificaron como capacitados. Los niveles de colesterol en la membrana plasmática del espermatozoide regulan los receptores de este carbohidrato, debido a que durante el proceso de capacitación, existe la salida de colesterol por la presencia de moléculas aceptoras de colesterol, creando un estado favorable para la salida de los receptores hacia la membrana plasmática externa y por último los espermatozoides con RA, presentando fluorescencia solo en la cabeza, donde los receptores se encuentran en la membrana plasmática propiciando el reconocimiento espermatozoide-ovocito la fertilización (Cardona-Maya et al., 2005).

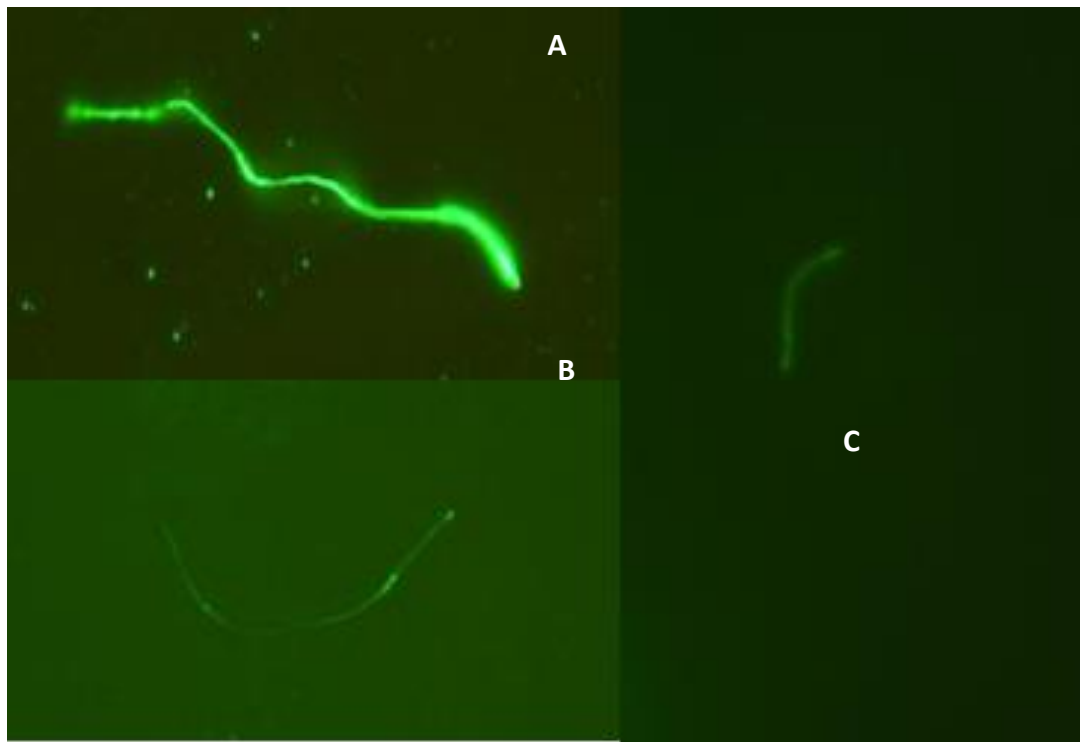
Lo obtenido es indicativo de que los espermatozoides de gallo no necesitan tener un lugar de almacenamiento donde se puedan incorporar estos carbohidratos responsables del reconocimiento espermatozoide-ovocito, ya que se demostró que aun estando en testículo estos espermatozoides cuentan con receptores a N-acetil-B-D-glucosamina, lo que indica que los espermatozoides de gallo ya cuentan con una capacidad fertilizante, de menor a mayor porcentaje durante su paso por el tracto reproductor del macho y se puede decir que los espermatozoides se pueden recuperar de las regiones del tracto reproductor del gallo para ser utilizados en técnicas reproductivas en aves, con fines comerciales o con un mayor campo de oportunidad como las especies silvestres en peligro de extinción.

Cuadro 4. Porcentajes de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal determinados *in vitro* con WGA, en fresco y con MPV. Valores representados en media y DE.

Región	Tratamiento	Espermatozoides (%)		
		Intactos	Capacitados	Reaccionados
Testicular	Fresco	44.71±4.32 ^a	23.86±3.85	23.57±2.35 ^a
	(X±EE) MPV	14.86±2.52 ^b	18.29±2.52	55.71±9.60 ^b
Conducto deferente	Craneal Fresco	49.42±4.77 ^a	29.00±3.71	13.86±1.71 ^a
	(X±EE) MPV	13.71±1.04 ^b	29.43±5.99	55.29±5.04 ^b
	Media Fresco	41.00±7.79 ^a	27.71±5.95	10.14±1.89 ^a
	(X±EE) MPV	16.57±3.13 ^b	35.29±5.79	56.14±5.49 ^b
	Caudal Fresco	13.29±1.44 ^a	25.71±4.40	47.71±7.22
	(X±EE) MPV	20.86±2.67 ^b	23.71±6.03	57.29±4.46
Eyacuado	Fresco	18.14±1.90	26.14±5.09	57.14±5.04
	(X±EE) MPV	16.29±2.62	31.57±5.49	52.00±4.97

^{a,b} Literales distintas dentro de la fila por tratamiento por cada región, son diferentes (P < 0.05)

Figura 7. Patrones determinados con lectina WGA para N-acetil- β -D-glucosamina en espermatozoides de *Gallus gallus*.



A) Espermatozoide con estado fisiológico intacto, **B)** espermatozoide con estado fisiológico capacitado **C)** espermatozoide con estado fisiológico con reacción acrosomal.

8.2. EN HEMBRA

8.2.1. Evaluación espermática básica

Los resultados obtenidos para la evaluación básica se observan en el Cuadro 5, la movilidad, la morfología normal, así como para los espermatozoides vivos y muertos utilizando la tinción de eosina-nigrosina mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro secciones del aparato reproductor de la gallina (Infundíbulo, magnum, istmo y útero-vaginal) y el eyaculado, a diferencia de una movilidad en semen de eyaculado de 90 %. En el oviducto de la hembra la movilidad disminuye hasta un 68 % en las cuatro secciones, sin embargo, desde su llegada en la sección útero-vaginal aumenta, hasta llegar al sitio de fertilización en el infundíbulo, esta inhibición en la movilidad es debido a un metabolismo bajo resultado en la disminución del consumo de ATP, evitando la generación de especies reactivas de oxígeno y reduciendo el daño a los espermatozoides durante su almacenamiento (Nguyen et al., 2014).

Cabe resaltar la importancia de mantener la movilidad dentro del tracto reproductor de la gallina gracias a los tubos de almacenamiento de espermatozoides (TAE), que se encuentran en la unión útero-vaginal y que en aves los espermatozoides pueden durar de 2 a 15 semanas resguardados (Bakts, 2011). También se han estudiado los mecanismos que tienen estos TAE sobre la movilidad de los espermatozoides, donde se explica que dentro de éstos los espermatozoides tienen una supresión de la movilidad a través de la interacción de proteínas quinasas flagelares y fosfatasa, de igual manera con la interacción con el calcio intracelular, debido a estas interacciones es que los espermatozoides

puedan seguir vivos y móviles dentro del oviducto para posteriormente llegar al sitio de la fertilización (Holt y Fazeli, 2016).

También el resultado a resaltar es la temperatura; ya que, aunque Thomson y Wishart (1991) mencionan que los espermatozoides se vuelven inmóviles a 41 °C, nosotros encontramos que al emplear una temperatura de 39 °C se consiguió mantener la movilidad espermática en todo el oviducto, coincidiendo con lo descrito por Tomohiro (2013), que reporta que el almacenamiento de espermatozoides en especies de aves se produce a una temperatura corporal elevada, es decir, a 41 °C y a pesar de que la naturaleza de las moléculas responsables del mantenimiento a largo plazo del esperma quede por aclararse, sus hallazgos indican que las secreciones de la unión útero-vaginal posee capacidad de reducir la movilidad del espermatozoide y prolongar su supervivencia *in vitro*.

En cuanto a al porcentaje de espermatozoides vivos encontrados en el oviducto y en el eyaculado hubo diferencias significativas, la sobrevivencia de los espermatozoides y su mantenimiento por varias semanas es gracias a proteínas implicadas en el mantenimiento de los espermatozoides como: anhidrasa carbónica, avidina, acuaporinas y la fosfatasa alcalina, sin ser responsables de su almacenamiento en los TAE (Sánchez, 2012). Otro factor importante por el cual los espermatozoides pueden sobrevivir en el oviducto de la hembra es la defensa anti-esperma, ya que esta respuesta inmune del oviducto reconoce a los espermatozoides, ya que si no fueran reconocidos se tomarían como cuerpos extraños dentro del oviducto y serían eliminados. El reconocimiento de los espermatozoides por el sistema inmune se da por el factor de crecimiento

transformable β (TGF β), el cual, suprime la inmunoreacción anti-esperma, ayudando al mantenimiento y sobrevivencia de los espermatozoides (Sánchez, 2012). En la morfología normal no hubo diferencias entre el eyaculado y las zonas del oviducto, entendible por los procesos ya explicados.

Cuadro 5. Parámetros de evaluación básica en espermatozoides de diferentes segmentos del oviducto.

Indicador Espermático	Útero-vagina	Istmo	Magnum	Infundíbulo
Movilidad (%)	66.8 $\pm$ 2.45 ^b	67.2 $\pm$ 1.70 ^b	68.6 $\pm$ 1.79 ^b	68.6 $\pm$ 2.78 ^b
Espermatozoides vivos (%)	94.3 $\pm$ 0.36 ^{ba}	94.2 $\pm$ 0.38 ^b	94.6 $\pm$ 0.50 ^{ba}	93.4 $\pm$ 0.82 ^b
Morfología normal (%)	85.1 $\pm$ 2.63	82.1 $\pm$ 2.43	82.0 $\pm$ 3.18	82.0 $\pm$ 3.2 3

^{a,b} Literales diferentes sobre la misma fila son diferentes (P < 0.05). (n=10)

8.2.2. Presencia y distribución de Ca²⁺

Para la determinación del estado funcional de la membrana del espermatozoide se utilizó la técnica de CTC, debido a que en esta prueba se identifican diferentes patrones de distribución de la CTC mismos que reflejan las alteraciones asociadas a los niveles de calcio intra-citoplasmáticos. La evaluación de la integridad de la membrana plasmática proporciona una valiosa información sobre los métodos de procesamiento del semen y la identificación de los puntos del proceso que más contribuyen a las alteraciones de la membrana del espermatozoide.

También la integridad de la membrana plasmática es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil. El espermatozoide con la membrana plasmática

afectada no es capaz de mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y de cofactores esenciales como el nucleótido adenina, imprescindible para el movimiento flagelar (De Leeuw et al., 1991).

En el Cuadro 6, se muestra el estado fisiológico en el que se encuentran los espermatozoides, utilizando CTC, mostrando tres patrones como intactos, capacitados y con RA. El porcentaje de espermatozoides intactos va disminuyendo conforme estos van a llegar al infundíbulo, sin mostrar diferencias significativas entre las secciones. Los espermatozoides capacitados aumentan en todas las secciones encontrando diferencia significativa con el eyaculado, pero dentro del oviducto se mantiene un promedio de 94 % de capacitados, lo que nos indica que saliendo de los TAE en la unión útero-vaginal no existe una región donde pasen a un proceso de capacitación.

Cuadro 6. Espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal evaluados en fresco *in vitro* con CTC.

Indicador espermático	Útero-vagina	Istmo	Magnum	Infundíbulo
Intactos (%)	22.27 ± 1.39 ^b	19.54 ± 1.49 ^b	20.36 ± 1.66	17.72 ± 1.22
Capacitados (%)	30.00 ± 1.02 ^b	30.72 ± 2.27 ^b	30.90 ± 1.81	27.18 ± 1.87
Reaccionados (%)	48.09 ± 1.85 ^b	50.45 ± 2.05 ^b	48.54 ± 2.26	53.90 ± 2.57

^{a,b} Literales diferentes sobre la misma fila son diferentes (P < 0.05). (n=10)

8.2.3. Presencia y distribución de N-acetil-β D- glucosamina.

Los espermatozoides que presentaron RA, mostraron diferencias ($P < 0.05$) entre las secciones y el eyaculado. Este porcentaje va aumentando conforme se acerca al sitio de la fertilización, como lo demuestra el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal evaluados con lectina WGA que identifica al carbohidrato N-acetil-β-D-glucosamina, glicoproteína encontrada en la membrana del espermatozoide encargada del reconocimiento entre gametos y este incremento en espermatozoides con RA se debe a la regulación del ciclo ovulatorio, a las concentraciones de Ca^{2+} en el fluido oviductual y de progesterona (P4), esta última implicada en la señalización para que los espermatozoides salgan de los TAE para seguir su recorrido por el oviducto y llegar al sitio de fertilización (Holt y Fazeli, 2016; Sasanami et al., 2012) y liberada en mayor concentración todavía 5 horas antes de la próxima ovulación (Long et al., 2003).

Cuadro 7. Porcentajes de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal determinados con lectina WGA.

% Espermatozoides	Útero-vagina	Istmo	Magnum	Infundíbulo
Intactos (%)	19.27 ± 1.99	14.63 ± 1.16	16.36 ± 2.44	17.45 ± 1.22
Capacitados (%)	31.54 ± 4.04	28.09 ± 3.04	31.63 ± 3.57	31.81 ± 4.79
Reaccionados (%)	49.90 ± 3.04	57.18 ± 3.19	51.90 ± 3.89	50.54 ± 3.06

^{a,b} Literales diferentes sobre la misma fila son diferentes ($P < 0.05$). (n=10)

9. CONCLUSIONES

Los espermatozoides obtenidos de diferentes regiones del tracto reproductivo del gallo, demuestran *in vitro* una capacidad de reacción del acrosoma “sin requerir” una condición previa de capacitación espermática, que puede estar relacionado con la capacidad fertilizante inmediata de los eyaculados. Por lo tanto, los espermatozoides recolectados de diferentes secciones del tracto reproductivo del gallo pueden usarse en diferentes técnicas de reproducción asistida sin requerir una capacitación previa.

También se demostró que el espermatozoide de ave tiene cambios en su membrana plasmática durante su paso por el oviducto para llevar a cabo la fertilización del ovocito, posiblemente asociados a las condiciones presentes en los TAE (almacenamiento y supervivencia), las proteínas y el sistema inmune en el oviducto, ya que, aunque sean almacenados por varias semanas no pierden esta capacidad fertilizante. Por lo tanto, la hipótesis planteada en este estudio se comprobó.

Los resultados de este estudio demostraron diferencias fisiológicas a nivel membranal, principalmente en el tracto de la hembra, a diferencia de las determinaciones observadas en el tracto del macho. Estas diferencias pueden estar asociadas a condiciones y/o características espermáticas de capacitación, descapitación y RA.

10. LITERATURA CITADA

1. Ahammad, M.U., C. Nishino, C., H. Tatemoto, H., N. Okura, N., Y. Kawamoto, Y., S. Okamoto, S. and T. Nakada, T. 2011a. Maturational changes in motility, acrosomal proteolytic activity, and penetrability of the inner perivitelline layer of fowl sperm, during their passage through the male genital tract. *Theriogenology*. 76: 1100–1109.
2. Ahammad, M.U., C. Nishino, H. Tatemoto, N. Okura, Y. Kawamoto, S. Okamoto, and T. Nakada. 2011b. Maturational changes in the survivability and fertility of fowl sperm during their passage through the male reproductive tract. *Anim Reprod Sci*. 128: 129–136.
3. Aire, T. 2002. Morphology changes in the efferent ducts during the main phases of the reproductive cycle of birds. *J Morphol*. 253 (1) pp. 64-75.
4. Bakst, MR. 1994. Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult Sci Rev*, 5: 117–143.
5. Bakst, M.R. 2011. Physiology and endocrinology symposium: role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *J Anim Sci*. 89 (5):1323-9.
6. Bakst, M.R. 2011. Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *J Anim Sci*. 89: 1323–1329.
7. Burrows, W. and J. Quinn. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult Sci*. 16: 19-24.
8. Cardona-Maya, W.D., J.A. Berdugo-Gutiérrez, J. de los Ríos, A.P. Cadavid-Jaramillo. 2005. Functional evaluation of sperm in Colombian fertile men. *Arch Esp Urol*. 60: 827-31.

9. Caravaca Rodríguez F.P., Castel Genís J:M., Guzmán Guerrero J:L., Delgado Pertiñez M., Mena Guerrero Y., Alcalde Aldea M.J. y González Redondo P.(2003). Reproducción de aves en: Bases de la producción animal. Ed. Servicio de publicaciones Universidad de Córdoba y Universidad de Sevilla.
10. De leeuw, A.M; Den daas, J.H; Woelders, H. 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. J Androl. 12: 112-118.
11. Esponda P & Bedford JM 1985 Surface of the rooster spermatozoon changes in passing through the Wolffian duct. J Exp Zool. 234 441–449.
12. Etches, J. R. 1996. Artificial insemination. In Reproduction in poultry. Edited by international, C. Cambridge. Ontario Canada, CAB. 234-261.
13. Herrera, J.A., Calderón, G., Guzmán, A., Vargas, A.K., Ávalos, A. y Rosales, A.M. 2017. Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved semen of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*). Austral J Vet Sci. 49, 39-43.
14. Herrera, J.A., J.A. Quintana, M.A. López, M. Betancourt, y R. Fierro. 2005. Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. Arch Androl. 51: 353-360.
15. Holt, W. y Lloyd, R. 2010. Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? Theriogenology. 73, 713–722.
16. Holt, W. y Fazeli, A. 2016. Sperm storage in the female reproductive tract. Annu Rev Anim Biosci. 4:291–310.
17. Holt, W.V. 2011. Mechanism of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. Reprod Dom Anim. 46: 68–74.

18. Howarth, B. Jr. 1983. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis epididymis and vas deferens following intramaginal insemination. *Biol Reprod.* 28: 586–590.
19. Lake, P.E. 1984. The male in reproduction. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Vol. 3. Academic Press. 1411–1447.
20. Lemoine, M., J. Dupont, V.J. Guillory, V.S. Tesseraud, and E. Blesbois. 2009. Potential involvement of several signaling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction. *Biol Reprod.* 81: 657–665.
21. Long, E.L., Sonstegard, T.S., Long, J.A., Tassell, C.P.V., Zuelke, K.A. 2003. Serial analysis of gene expression in turkey sperm storage tubules in the presence and absence of resident sperm. *Biol Reprod.* 69: 469–474.
22. Long, J. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges. *Poult Sci.* 85: 232-236.
23. Mizushima, S., Hiyama, G., Shiba, K., Inaba, K., Dohra, H., Ono, T., Shimada, K., Sasanami, T. 2014 The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development.* 141:3799-3806.
24. Mocé, E., P.H. Purdy, y J.K. Graham. 2010. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci.* 118:236-247.
25. Morisson, M., A. Bordas, J.M. Petit, C. Jayat-Vignoles, R. Julien y F. Minvielle. 1997. Associated effects of divergent selection for residual feed consumption on reproduction, sperm characteristics and mitochondria of spermatozoa. *Poul Sci.* 76: 425-431.

26. Munro, S.S. 1938. Fowl sperm immobilization by a temperature-media interaction and its biological significance. *Q J Exp Psychol.* 27: 281–287.
27. Nguyen, T.M.D., Alves, S., Grasseau, I., Metayer-Coustard, S., Praud, C., et al. 2014. Central role of 5-AMPactivated protein kinase in chicken sperm functions. *Biol of Reprod.* 91:121.
28. Nixon, B., K.A. Ewen, K.M. Krivanek, J. Clulow, G. Kidd, H. Ecroyd and R.C.Jones. 2014. Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction.* 147, 265–277.
29. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, publicada el 22 de agosto del 2001, en el Diario Oficial de la Federación.
30. Ochoa, F., D. Val, A. Juárez, I. Toscano, I. Olivo, and J. Conejo. 2014. Determination of functional status of plasmatic membrane in native turkey during cryopreservation process. *AICA* 4:123-125.
31. Rospigliosi, J. y Figueroa, E. 2003. Desarrollo anatomo-histológico del testículo del nacimiento a la madurez de la codorniz (*Coturnix coturnix*) variedad japonesa. *Rev Inv Vet Perú.* 14 (1) pp.74-78.
32. Sánchez, E.R. 2012. Chaperoning steroidal physiology: lessons from mouse genetic models of Hsp90 and its cochaperones. *Biochim Biophys Acta* 1823:722–29.
33. Santiago-Moreno-Moreno, J., C. Castaño, A. Toledano-Díaz, M.A. Coloma, A. López-Sebastián A, et al. 2011. Semen cryopreservation for the creation of a

- Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. Poult Sci. 90: 2047–2053.
34. Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S., Hiyamm, G. 2013. Sperm storage in the female reproductive tract in birds. J Reprod Develop. 59:334–338.
35. Tabataei, S., Batavani, R. A. Y Talebi, A. R. 2009. Comparison of semen quality in indigenous and ross broiler breeder roosters. J Anim Vet Adv 8:90-93.
36. Thomson, M.F. y Wishart, G.J. 1991. Temperature-mediated regulation of calcium flux and motility in fowl spermatozoa. J Reprod Fertil. 93 385-391.
37. Umapathy, G., S. Sontakke, A. Reddy, S. Ahmed, y S. Shivaji. 2005. Semen characteristics of the captive Indian White-Backed Vulture (*Gyps bengalensis*). Biol. Reprod. 73: 1039–1045.

