

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**SECRECIONES DE LA UNIÓN ÚTERO VAGINAL Y SU EFECTO EN  
LOS PARÁMETROS DE CAPACITACIÓN Y DESCAPACITACIÓN  
ESPERMÁTICA *IN VITRO* DE *Gallus gallus*.**

**TESIS**

(Idónea comunicación de resultados)

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

**MVZ. ANA KAREN VARGAS IBARRA**

**Comité Tutorial**

Director de Tesis: Dr. José Antonio Herrera Barragán.

Asesor: Dr. José Antonio Quintana López

Asesor: Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez.

**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2018**

## **COMITÉ TUTORAL**

---

### **DIRECTOR**

**Dr. José Antonio Herrera Barragán**

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, DCBS, DPAA,  
Profesor investigador Titular "C"**

### **ASESOR**

**Dr. José Antonio Quintana López**

**Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia, Dpto. de Medicina y Zootecnia de Aves. Profesor Titular "C"**

### **ASESOR**

**Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez**

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, DCBS, DPAA,  
Profesor investigador Titular "C"**

La Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, pertenece al padrón de posgrados de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó una beca al estudiante del posgrado de la Maestría en Ciencias Agropecuarias Ana Karen Vargas Ibarra con número (CVU/Becario): 793369.

Jurado designado por la Comisión académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana para la tesis titulada: **“SECRECIONES DE LA UNIÓN ÚTERO VAGINAL Y SU EFECTO EN LOS PARÁMETROS DE CAPACITACIÓN Y DESCAPACITACIÓN ESPERMÁTICA IN VITRO DE *Gallus gallus*”**. Que presentó:

MVZ. Ana Karen Vargas Ibarra

### **JURADO DEL EXAMEN**

#### **PRESIDENTE**

**Dr. José Antonio Celestino Quintana Lopez**

**Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Dpto. de Medicina y Zootecnia de Aves.**

#### **SECRETARIO**

**Dr. Celso López López**

**Producción e Investigación en Aves del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.**

#### **VOCAL**

**Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez**

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, DCBS, DPAA,  
Profesor investigador Titular “C”**

## DEDICATORIA

---

Con amor y respeto dedicado a mi madre que ha sido siempre mi motor de vida y mi más grande inspiración. Gracias por siempre estar a mi lado apoyándome, llenándome de consejos y de amor, ese amor puro que solo una madre puede brindar.

A don Jaime, mi papá no de sangre pero si lo es de corazón, gracias por todo el apoyo que siempre me ha brindado, por toda su comprensión, jamás se habría logrado tanto sin su ayuda.

Hasta el cielo dedico esta tesis a mi papá y a mi abuelita Inés, ellos siempre han sido unos ángeles en mi camino y un motivo más para luchar día a día, esperando siempre que desde donde se encuentran se sientan orgullosos.

A mi querido Daniel por apoyarme durante esta etapa importante de mi vida, alentándome siempre a seguir adelante, por aconsejarme, escucharme, confiar en mí, ser paciente, por brindarme su amor, comprensión y por estar siempre para mí desde la secundaria siendo mi mejor amigo, novio y compañero de aventuras.

A mi familia que siempre han creído en mí y han estado conmigo en todos los momentos importantes de mi vida, en especial a mi tía Silvia que a pesar de la distancia siempre está pendiente; a mis tíos (Viky, Sotero, primitivo y su esposa) por creer en mí y siempre recibirme con una sonrisa en su hogar.

A mis mejores amigos, Gema que es como la hermana que no tuve, gracias por siempre estar presente en cada momento de mi vida, por brindarme esa amistad sincera e incondicional. A Lalo que siempre ha estado apoyándome y sacándome una sonrisa. Gracias a ambos por ser esa familia que se escoge con el corazón.

## AGRADECIMIENTOS

---

Con admiración y respeto doy gracias a mi tutor Dr. José Antonio Herrera Barragán por sus consejos y ayuda en la realización de la tesis, por ser un buen guía durante estos dos años y contribuir en mi formación como profesional siguiendo su ejemplo de disciplina y perseverancia. Gracias por la amistad que también me fue brindada.

Agradezco a mis asesores Dr. José Antonio Quintana, por la confianza y el apoyo brindado durante la maestría, además por el libro y revistas obsequiadas de gran utilidad en mi formación. Al Dr. Alejandro Avalos por su apoyo y por hacer amenas las revisiones y pláticas por estos dos años. Al Dr. Juan José Pérez Rivero por siempre recibirme con una sonrisa al llegar al cubículo, por tener buena disposición a ayudarme y por esas pláticas que hicieron más placentera la estancia durante el posgrado.

También mi más sincera gratitud a mis compañeros de laboratorio y cubículo Samantha, Ricardo, Fernanda, Juan y José Manuel (Junior) por hacer grata toda mi estancia, por sacarme una sonrisa siempre, brindarme su amistad y por ayudarme cada vez que lo necesite con buena actitud.

A mis compañeros de la generación 22, los cuales siempre me recibieron con buena energía y disposición a debatir en clase para nutrirnos mutuamente durante la estancia en el posgrado. A mis profesores de posgrado que me ayudaron en la formación académica. Gracias a la Dra. Marcela coordinadora de la Maestría en Ciencias Agropecuarias por todo su apoyo y disposición durante los dos años del posgrado.

La elaboración de esta tesis no se habría logrado sin el apoyo del laboratorio Bioquímica de la Reproducción, del Departamento de Producción Agrícola y Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco; a cargo de la Dra. Ana María Rosales Torres. A la Dra. Cyndi y Diana por recibirme en el laboratorio con buena disposición y una sonrisa.

Agradecimiento especial a las empresas:

**Granja Jocef y OVALAB SA DE CV.**

Jilotepec, Edo. De México

Representadas por el Ing. Magdiel Gómez Salinas, Gerente de producción

## RESUMEN

Existen invaginaciones tubulares especializadas, que se denominan túbulos de almacenamiento de espermatozoides (SST), que se encuentran en la Unión Útero Vaginal (UUV) de la gallina. Debido a la presencia de estos SST, el espermatozoide una vez que ha entrado en el aparato reproductor de la hembra, puede sobrevivir entre 2-15 semanas en aves domésticas. Por lo cual, el objetivo es evaluar el efecto de las secreciones de la unión útero vaginal en los parámetros de capacitación y descapacitación *in vitro* de espermatozoides de *Gallus gallus*. Se realizaron 25 evaluaciones de pool seminal se suplementaron con secreciones de la unión útero vaginal (SUUV). Se realizó una evaluación espermática básica y se evaluó presencia y distribución de  $Ca^{2+}$  para determinar los porcentajes de espermatozoides descapacitados, capacitados y con reacción acrosomal; se conservaron en fresco y criopreservación; para la inducción de la reacción acrosomal se utilizó membrana perivitelina (MPV). La movilidad espermática a las 6 horas y 24 horas, fueron menores ( $P < 0.05$ ) comparados con espermatozoides recién eyaculados y conservados por 40 minutos; en semen post descongelado siempre fue menor ( $P < 0.05$ ), comparada con semen recién eyaculado. La viabilidad en espermatozoides conservados a las 6 horas y 24 horas mostro diferencias ( $P < 0.05$ ) con respecto a espermatozoides recién eyaculados en los porcentajes de 0%, 30% y 60% de SUUV. Los espermatozoides descapacitados en los porcentajes de 0%, 10% y 90% de SUUV muestran diferencias ( $P < 0.05$ ) a las 6 horas y 24 horas de conservación en comparación con el tiempo 0. En los porcentajes de 30% y 60% de SUUV mostro diferencias ( $P < 0.05$ ) en los espermatozoides descapacitados a los 40 minutos y 24 horas. En los espermatozoides con reacción acrosomal en el tiempo 6 horas y 24 horas de conservación en comparación con el tiempo 0 mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) esta tendencia se observa en los porcentajes de 0%, 10% y 90% de las SUUV. Cuando se co-incubaron con MPV los espermatozoides descapacitados en 0% de las SUUV muestran diferencias ( $P < 0.05$ ) desde los 40 minutos, 6 h y 24 h. Los espermatozoides con reacción acrosomal en el tiempo 6 h y 24 h de conservación en el porcentaje de 0% de SUUV mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ). Después de la criopreservación se observó que entre semen recién descongelado y semen descongelado co-incubado con MPV mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ). Podemos concluir que los resultados obtenidos en el presente estudio demuestra que hay evidencia para afirmar nuestra hipótesis ya que las secreciones de la unión útero vaginal indujo cambios fisiológicos en los espermatozoides incrementando la descapacitación y la viabilidad durante su conservación *in vitro*, hay evidencia de que las secreciones la unión útero vaginal proporcionan a los espermatozoides sustancias que tienen factores descapacitantes es decir que tienen la capacidad de inactivar la capacitación de los espermatozoides de manera reversible ya que cuando se co-incubaron con membrana perivitelina tenían la capacidad de llevar a cabo el proceso de reacción acrosomal.

Palabras claves: SST, UUV, semen, descapacitación y movilidad

## ABSTRACT

There are specialized tubular invaginations referred to as sperm storage tubules (SST) that are found in the uterovaginal junction (VUU). Due to presence of these SST, sperm once it has entered into the female reproductive tract, can survive between 2-15 weeks in domestic poultry. Therefore, the objective is to evaluate the effect of secretions of the uterovaginal junction in the capacitation and in vitro decapacitation parameters of sperm of *Gallus gallus*. 25 seminal pool evaluations were carried out, supplemented with secretions of the uterovaginal junction (SUUV). A basic spermatoc evaluation was performed and the presence and distribution of CA2 + was assessed to determine the percentages of sperm decapacitated, capacitated and with acrosome reaction; they were preserved in fresh and cryopreservation; for the induction of acrosome reaction, perivitelline membrane (MPV) was used. The sperm motility at 6 hours and 24 hours was lower ( $P < 0.05$ ) compared with freshly ejaculated sperm and preserved for 40 minutes; in post-thawed semen it was always lower ( $P < 0.05$ ), compared with freshly ejaculated semen. The viability in sperm preserved at 6 hours and 24 hours showed differences ( $P < 0.05$ ) with respect to freshly ejaculated sperm in the percentages of 0%, 30% and 60% of SUUV. Decapacitated sperm in the percentages of 0%, 10% and 90% of SUUV show differences ( $P < 0.05$ ) at 6 hours and 24 hours of conservation compared to time 0. In the percentages of 30% and 60% of SUUV showed differences ( $P < 0.05$ ) in decapacitated sperm at 40 minutes and 24 hours. In the sperm with acrosome reaction in time 6 hours and 24 hours of conservation compared to time 0 showed differences ( $P < 0.05$ ) this tendency is observed in the percentages of 0%, 10% and 90% of SUUV. When the decapacitated sperm were co-incubated with MPV in 0% of the SUUV, they showed differences ( $P < 0.05$ ) from 40 minutes, 6 h and 24 h. The sperm with acrosome reaction in time 6 h and 24 h of conservation in the percentage of 0% of SUUV showed differences ( $P < 0.05$ ). After cryopreservation, it was observed that between freshly thawed semen and thawed semen co-incubated with MPV showed differences ( $P < 0.05$ ). We can conclude that the results obtained in the present study demonstrate that there is evidence to affirm our hypothesis since the secretions of the uterovaginal junction induced physiological changes in the sperm, increasing the decapacitation and viability during its in vitro conservation, there is evidence that secretions the uterovaginal junction provide sperm substances that have decapacitation factors, i.e. they have the capacity to inactivate the capacitation of sperm in a reversible way since when they were co-incubated with perivitelline membrane they had the ability to perform the acrosome reaction process.

Keywords: SST,UUT, semen, decapacitation and motility



## ÍNDICE

RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. MARCO TEÓRICO .....	11
2.1. Aves domésticas ( <i>Gallus gallus</i> ) .....	11
2.2. Sistema reproductor de las aves .....	12
2.3. Sistema reproductor del macho .....	12
2.4. Sistema reproductor de la hembra .....	17
2.5. Técnicas de reproducción asistida en aves domesticas.....	21
2.5.1. Obtención seminal .....	22
2.5.2. Conservación seminal .....	22
2.5.3. Inseminación artificial .....	26
2.5.4. Evaluación seminal .....	27
2.5.4.1. Evaluación básica .....	27
2.5.4.2. Evaluación de la reacción acrosomal .....	28
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	29
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. General .....	29
4.2. Específicos:.....	29
5. HIPÓTESIS:.....	29
6. METODOLOGÍA .....	30
6.1. Diseño experimental.....	30
6.2. Uso de animales .....	31
6.3. Obtención y recolección seminal.....	31
6.4. Obtención y recolección de SUUV .....	32
6.5. Conservación seminal .....	32
6.6. Determinación de porcentajes de SUUV .....	32
6.7. Criopreservación .....	32
6.8. Evaluación espermática básica .....	34
6.9. Determinación de parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal .....	34
6.10. Análisis estadístico. ....	36
7. RESULTADOS .....	37

7.1. Evaluación seminal básica.....	37
7.2. Parámetros de descapitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides conservados en fresco.....	40
7.2.1. Parámetros de espermatozoides descapitados, capacitados y con reacción acrosomal sin co-incubación con MPV.....	40
7.2.2. Parámetros de descapitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides co-incubados con MPV.....	42
7.3. Efecto de la criopreservación en los parámetros de descapitación, capacitación y reacción acrosomal. ....	43
7.4. Capacidad de Reacción Acrosomal <i>in vitro</i> co-incubación con MPV .....	44
8. DISCUSIÓN.....	45
8.1. Parámetros de evaluación espermática básica.....	46
8.2. Parámetros de descapitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides conservados en fresco.....	48
8.3. Parámetros de descapitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides co-incubados con MPV. ....	50
8.4. Efecto de la criopreservación en espermatozoides conservados con suplementación de las SUUV. ....	51
9. CONCLUSIONES .....	53
10. REFERENCIAS.....	55

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria avícola se ha caracterizado por ser una de las ramas del sector pecuario con mayor crecimiento por su bajo costo de producción; el huevo y la carne de pollo son la fuente de proteína de origen animal con mayor aceptación a nivel mundial (Almaraz y Alvarez, 2014); en México mantiene un crecimiento constante, tanto en la producción como en el consumo, consolidándose como una actividad estratégica para el país, tanto en el ámbito alimentario como económico (FIRA, 2015). La avicultura es la actividad que se encarga de la producción de pollos y pavos bajo rigurosos procesos de cuidado y alimentación para mantener la calidad que caracteriza a México. Esta industria genera alrededor de un millón de empleos directos e indirectos y beneficia al comercio nacional e internacional (Secretaria de Agricultura, 2015). La avicultura mexicana durante 2012, aportó el 0.77% en el PIB total, el 19.7% en el PIB agropecuario y el 40.9% en el PIB pecuario. El sector avícola mexicano participa con el 63.6% de la producción pecuaria; 34.7% aporta la producción de pollo, 28.8% la producción de huevo y 0.10% la producción de pavo. Del 100% de la carne de ave, el pollo aporta el 78%, aves de desecho el 20% y pavo 2% (Ortega *et al.*, 2014).

La producción de pollo depende de la capacidad de la población reproductora de generar la población requerida de pollitos, y ésta a su vez, del mantenimiento de unos niveles óptimos de fertilidad. Sin embargo, se ha venido observando una reducción progresiva de la fertilidad, o al menos mayores dificultades en mantenerla a niveles óptimos, especialmente en líneas seleccionadas para alto rendimiento (Estevez y Neiker, 2015). El porcentaje de huevos fértiles es uno de los parámetros que de manera más importante influyen en el rendimiento económico del lote de gallinas reproductoras. Un embrión, por supuesto, sólo puede desarrollarse de un huevo fértil (Lange, s.f.).

Los problemas de infertilidad temprana se han explicado frecuentemente como un efecto “secundario” no deseado, resultado de la intensa selección genética. Así, por ejemplo, se ha especulado que la selección genética ha podido desencadenar una reducción indirecta del lívido, cambios hormonales o problemas debidos al incremento de peso lo que podría explicar las mayores dificultades en mantener niveles de fertilidad óptimos (Estevez y Neiker, 2015).

Además, los estudios experimentales reportados por Bilcik, Estevez, y Russek-Cohen en el 2005 no encontraron relación alguna entre calidad espermática (volumen, concentración o velocidad) y fertilidad en aves seleccionadas para rendimiento. Aunque es innegable la relevancia de la calidad espermática sobre la fertilidad en condiciones de inseminación artificial controladas, la gran variabilidad respecto a la calidad espermática encontrada, así como la falta de evidencias sobre su efecto en condiciones de reproducción naturales evidencian los múltiples factores que determinan el éxito reproductivo en el gallo doméstico en general, y en líneas pesadas en particular. No obstante, una buena calidad espermática sí podría conferir cierta ventaja reproductiva a individuos que aparentemente no son tan “activos” a través de mecanismos de competencia espermática.

Las investigaciones de la anatomía aviar datan de mucho tiempo atrás, pero los mecanismos de acciones hormonales, que regulan la madurez y el funcionamiento de los órganos reproductivos y de la postura en el caso de las hembras, aún son motivo de investigaciones (Peralta y Miazzo, 2002).

Por lo tanto, este conocimiento es crítico para poder establecer prácticas de manejo que permitan una mayor eficiencia reproductiva, así contribuyendo al conocimiento de la conservación espermática para su aplicación en protocolos de reproducción asistida.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Aves domésticas (*Gallus gallus*)**

*Gallus gallus* es probablemente el ave doméstica más numerosa del planeta. Dado su dimorfismo sexual tan acentuado, se le llama gallina a la hembra y gallo al macho; por extensión, al juvenil se le llama pollo/polla. Pertenece al orden de las Galliformes y a la familia Phasianidae. Su uso principal es para producir carne y huevo y algunas razas utilizadas para pelea. Probablemente son originarias del sureste asiático. Desde su lugar de origen, la gallina doméstica fue llevada al mundo por dos rutas. Por el oriente hacia China, Japón y Mongolia; hacia el occidente por Persia, Asia Menor, Fenicia y desde ahí a Egipto (donde hubieron granjas especializadas en su cría), África del Norte, por un lado y los países del Mediterráneo, Rusia, Europa Central y del Norte,

por el otro. Finalmente llegó a América en 1492. En la edad media era considerada como carne fina (Mariaca, 2013).

Esta especie inicia el apareamiento al mostrar un comportamiento de cortejo. La frecuencia de apareamiento sigue un patrón diurno; llega a su pico al principio y al final del día. Puede copular de 10 a 30 veces, dependiendo de la disponibilidad de las gallinas y la competencia de otros gallos. Sin embargo, el número de espermatozoides por eyaculación es pocas veces menor a 100 millones, que es el mínimo requerido para mantener una alta fertilidad. La estación de reproducción comienza en primavera y se prolonga hasta el verano. Las gallinas ponen cada día durante varios días un huevo en el que se desarrolla el embrión, y lo incubarán hasta que nazca, proporcionando calor y rotando su posición durante 21 días (Clements, 2007).

## **2.2. Sistema reproductor de las aves**

Las aves son animales vertebrados complejos y como tales se reproducen sexualmente. Lo hacen a través de huevos, es decir, son ovíparas y además destacan por tener comportamientos y rituales alrededor de la reproducción bastante más complejos que los de otros vertebrados. Las aves cuentan con sexos separados y la fecundación siempre es interna. A diferencia de otros animales, no disponen de órganos reproductores externos por lo que la fecundación tiene lugar a través del contacto entre las cloacas del macho y la hembra (Gil, 2016).

La anatomía y fisiología reproductiva de las aves es compleja y distinta en comparación a otros vertebrados y principalmente en mamíferos (Peralta, 2016). En la ausencia de un ciclo estral como el de los mamíferos para la sincronización de la copulación con la ovulación, las aves dependen de almacenamiento espermático en el oviducto (Bakst, 2010).

## **2.3. Sistema reproductor del macho**

En las aves, el aparato reproductor del macho está constituido por tres unidades morfo funcionales: los testículos, los conductos deferentes y el órgano copulador (Peralta, 2016).

**Testículos:** Son órganos pares, de forma arriñonada, internos, situados entre la base de los pulmones y el segmento intermediario de los riñones. Aunque está próximo a los sacos aéreos, su temperatura es la misma que la temperatura corporal del animal (41 - 43° C). En consecuencia, la espermatogénesis tiene lugar a esa temperatura y no a una inferior, como ocurre en algunos mamíferos (Peralta y Miazzo, 2002). Los

tubos seminíferos se terminan en la proximidad inmediata del cordón testicular, donde se conectan con los túbulos de la rete testis, que se comunican a su vez con los conductos eferentes.

**Conductos deferentes:** donde se realiza la maduración de los espermatozoides. Este desemboca, a través de la vesícula espermática, en el urodeo. Cada una de las dos vesículas espermáticas concluye en una papila eyaculadora con estructura de pene (Peralta, 2016).

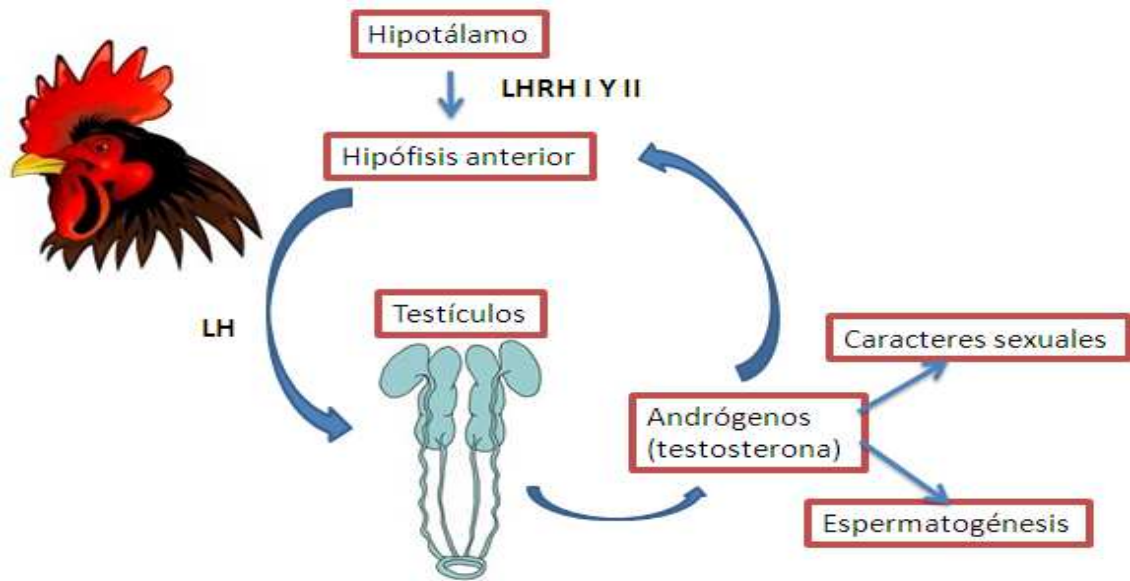
**Órgano copulador:** Esta denominación abarca el conjunto de los repliegues linfáticos de la cloaca, el falo y los cuerpos vasculares paracloacales. Estos últimos son cuerpos ovoides, incrustados en la pared de la cloaca, que se llenan de linfa en el momento de la erección. Dicha linfa transuda en la cloaca, a través de los repliegues linfáticos, en forma de un fluido transparente, que puede mezclarse con el semen. En el momento de la erección, los repliegues redondeados de la cloaca se hinchan, formando una ligera protuberancia hacia el exterior de la cloaca y constituyen un pequeño canal por donde se expulsa el eyaculado (Peralta y Miazzi, 2002).

### **2.3.1. Fisiología reproductiva del macho**

El desarrollo testicular y la espermatogénesis se realiza en dos etapas del ave: prepúber y púber. Las edades en que tiene lugar una y otra etapa, sin embargo, depende de varios factores: condiciones del medio (especialmente la iluminación), origen genético de los gallos, presentándose además variaciones entre uno y otro individuo (Peralta, 2016).

Durante la madurez sexual, el peso testicular y el número de espermatozoides están en su apogeo, produciéndose paralelamente una evolución en la calidad de los gametos (la capacidad de fecundación, motilidad y duración de la supervivencia *in vitro* son mayores). Esta etapa corresponde aproximadamente a las 20 semanas de vida del gallo. Todos estos procesos están regulados por hormonas descritos en la Figura 1, estando controlados por el eje hipotálamo hipófiso-gonadal (Peralta, 2016).

Figura 1. Hormonas en el aparato reproductor del gallo:



Esquema de las funciones de las hormonas que intervienen en la reproducción del gallo.

Dentro de las gonadotropinas, en el macho, la Hormona Luteinizante (LH) controla la producción de esteroides en las células de Leydig, alcanzándose las concentraciones más altas en la madurez sexual, mientras que la hormona folículo estimulante (FSH) modula la función de las células de Sertoli, interviniendo indirectamente en la maduración de la línea germinal. Entre las hormonas testiculares, la Testosterona es la más importante, y junto con otros Andrógenos tiene su acción en el epitelio seminífero, función que culmina con la producción de los espermatozoides. A la vez, los andrógenos regulan la secreción de gonadotropinas hipofisarias, mediante mecanismos de retroalimentación negativos, así como la actividad de los órganos del aparato copulador, y los caracteres sexuales secundarios del macho (crecimiento de la cresta y gárgolas en los gallos, canto típico del macho) (Peralta, 2016).

#### 2.3.1.1. Semen de las aves

El volumen de los eyaculados y su concentración espermática varían considerablemente en función de:

- La especie y la estirpe.
- El individuo y su estado fisiológico.
- Las condiciones y el método de recolección, este último puede ser por masaje abdominal, con “ordeño” de la cloaca, o por interrupción de la cópula natural.

En el gallo la concentración espermática es de hasta  $2 \times 10^9$  espermatozoides por eyaculado.

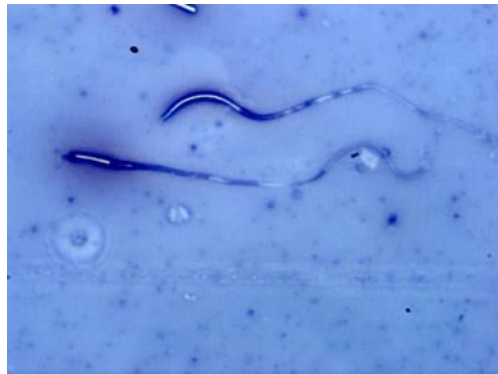
### 2.3.1.2. Espermatogénesis

Podemos definir espermatogénesis como el conjunto de transformaciones sufridas por las células germinales desde las espermatogonias hasta los espermatozoides, procesos que ocurren en el epitelio seminífero. Estas transformaciones se efectúan en estrecha relación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli y están bajo control de las hormonas gonadotropas hipofisarias. Brevemente, la espermatogénesis tiene lugar en 3 fases consecutivas: divisiones espermatogoniales, meiosis y espermiogénesis. Durante estas fases, las espermatogonias producen varias generaciones de espermatogonias, y de la última de ellas se originan los espermatocitos que, a su vez, se transforman en espermátides, para finalmente dar origen a los gametos del macho, los espermatozoides (Galina *et al.*, 2010 y Peralta, 2016).

### 2.3.1.3. Espermatozoide

Son de forma alargada y se subdividen en cabeza, cuerpo y cola (Figura 2) (Herrera *et al.*, 2005). Con longitud de 80 a 90  $\mu\text{m}$ , la cabeza es alargada y mide de 12 a 13  $\mu\text{m}$ , se corona por el acrosoma de 2  $\mu\text{m}$  de largo (Long, 2006).

Figura 2. Espermatozoides de gallo.



Observación en microscopio de campo claro (x1000) (Herrera *et al.*, 2005).

El acrosoma contiene enzimas proteolíticas principalmente hialuronidasa y acrosina que son requeridas durante la fertilización. La parte media tiene 4  $\mu\text{m}$  de largo y contiene mitocondrias, y el resto de la cola, con una longitud de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , a lo largo de ésta se extienden fibras centrales, relacionadas con el centriolo proximal y distal. En su parte más ancha, el espermatozoide mide cerca de 0.5  $\mu\text{m}$ . El núcleo está empaquetado en la cabeza espermática y los cromosomas están altamente condensados durante la espermatogénesis.



La actividad metabólica del espermatozoide está relacionada en particular con el flagelo, mediante mecanismos químicos y electromecánicos que inducen movimientos coordinados entre los microtúbulos que integran el flagelo (Etches, 1996).

Los espermatozoides de aves que llegan a la reacción acrosomal desde el eyaculado son capaces de penetrar la membrana perivitelina que rodea al ovocito por medio de diferentes enzimas y de esta manera lograr la interacción de membranas entre gametos y poder realizar la fertilización del ovocito (Lemoine, 2011).

#### **2.3.1.4. Capacitación, descapitación y reacción acrosomal**

La capacitación espermática en aves ocurre en periodos muy cortos y se produce *in vivo* en el tracto reproductor de la hembra, sin embargo algunos autores señalan que este proceso no es requerido para lograr la fertilización del ovocito (Lemoine, 2011). Este proceso implica diferentes mecanismos celulares que dan lugar a la desestabilización de la membrana del espermatozoide, el espermatozoide sufre un proceso de hiper-activación. También se puede lograr por incubación de los espermatozoides en un medio salino que contiene sólo iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) y membrana perivitelina (Lemoine, 2009). Así mismo, se ha reportado que al momento de obtener un eyaculado una gran proporción de los espermatozoides ya cuentan con este proceso fisiológico (Arenas *et al.*, 2010). Sin embargo, también existen factores descapitantes que son moléculas que se originan en las secreciones de la unión útero vaginal, que funcionan protegiendo a los espermatozoides durante su periodo de almacenamiento.

En la reacción acrosomal se fusionan la membrana plasmática y la membrana acrosomal del espermatozoide, esta fusión da como resultado la liberación de enzimas que ayudan a hidrolizar la membrana perivitelina del ovocito, auxilia al espermatozoide a penetrarlo y realizar la fertilización (Lemoine, 2008). La membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal interna del mismo, se fusionan con la membrana perivitelina del óvulo para liberar el núcleo del espermatozoide y la varilla subacrosomal dentro del ovocito como se muestra (Etches, 1998).

Estudios realizados por Lemoine *et al.*, (2009; 2011), indican que los espermatozoides de las aves no requieren del proceso de capacitación o el proceso de hiperactivación para lograr la reacción acrosomal y su capacidad fertilizante. Cuando el espermatozoide entra en contacto con la membrana perivitelina, existe una liberación espermática de enzimas, principalmente hialuronidasa y acrosina, lo cual sugiere que la membrana perivitelina tiene receptores especializados para la inducción de la

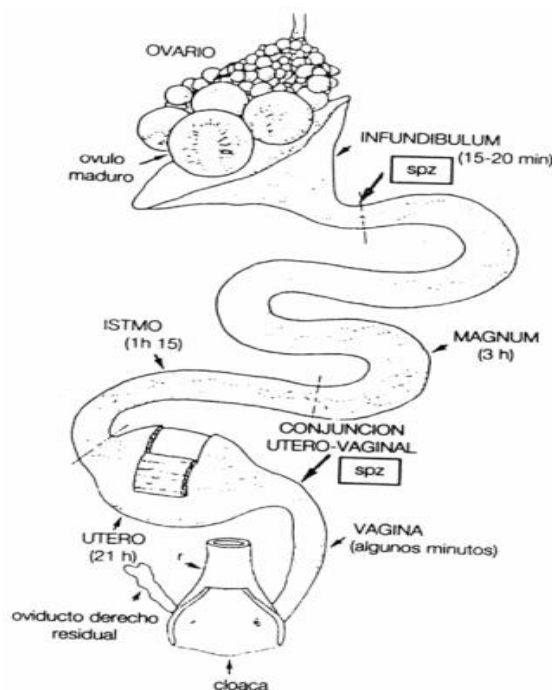
reacción acrosomal. Para inducirla se requiere  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, elevación intracelular de AMPc y una disminución del pH intracelular con esto se genera una hiperactivación en el espermatozoide y poder inducir la reacción acrosomal (Arenas *et al.*, 2010).

#### 2.4. Sistema reproductor de la hembra

Está compuesto por dos partes esenciales: ovario y oviducto izquierdos, encontrándose atrofiados las estructuras del lado derecho. En la formación del huevo intervienen dos estructuras anatómicas diferentes: el ovario, para la yema, y el oviducto, para la clara y la cáscara. La ovulación es la que permite el paso del ovocito al oviducto. El proceso se completa (cuando se trata de huevos para incubar) con la necesaria fecundación del ovocito, la cual se produce en interior de la hembra (fecundación interna) (Peralta, 2016).

El oviducto se puede dividir en 5 partes, netamente diferentes una de otra, desde proximal a distal, se divide en infundíbulo, magnum, istmo, útero y vagina. Entre el útero y la vagina se encuentra la conjunción útero vaginal, es ahí donde se almacenan los espermatozoides en el tracto de la hembra (Figura 3).

Figura 3. Aparato reproductor de la hembra



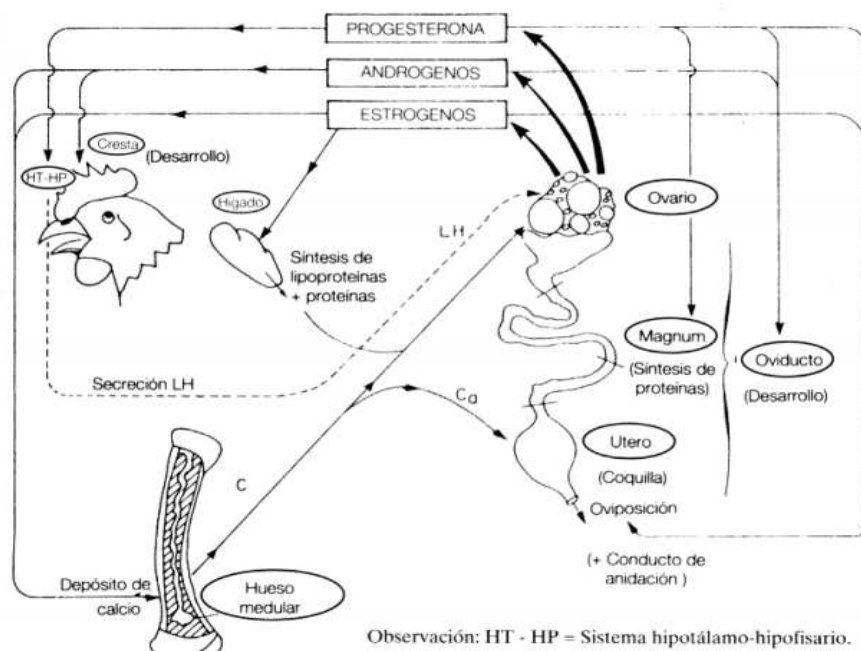
Esquema del oviducto de la gallina. (spz: zonas de almacenamiento de espermatozoides) (Peralta, 2016).

### 2.4.1. Fisiología reproductiva de la hembra

Al igual que en el macho, la luz ejerce una acción importante en la madurez del ave. El desarrollo del ovario y ovogénesis tiene lugar en la pollita, gracias a la acción de las hormonas esteroides, las cuales dependen, a su vez, de las hormonas hipofisarias LH y FSH, que están integrando el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Peralta y Miazzo, 2002).

Dentro de las gonadotrofinas, la LH es responsable del desarrollo del ovario, de la secreción ovárica de esteroides sexuales y, sobre todo, de la ovulación. Por su parte, la FSH regula el desarrollo de los folículos del ovario y la actividad secretora de éste. El ovario de las aves, al igual que el de los mamíferos, secreta 3 tipos principales de esteroides sexuales: estrógenos, andrógenos y progesterona (Figura 4). Esta secreción es cíclica, de acuerdo con el desarrollo de la ovulación, aunque siempre se mantienen niveles basales. Por otro lado, estos esteroides juegan un rol importante ejerciendo un efecto retroactivo negativo sobre la liberación de la LH. Los estrógenos son sintetizados por las células intersticiales de las tecas foliculares, desapareciendo la capacidad de síntesis de estas hormonas la víspera de la ovulación de ese folículo. Las funciones de los estrógenos son muy importantes, puesto que participan prácticamente en el control de la formación del huevo (Peralta, 2016).

Figura 4. Hormonas en el aparato reproductor de la gallina.



Esquema de las principales funciones de las hormonas que intervienen en la reproducción de la gallina (Peralta, 2016).

#### **2.4.1.1. Fertilización**

Es el proceso por el cual los gametos del macho y la hembra se fusionan para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos progenitores. Los propósitos principales de la fecundación son la combinación de genes derivados de ambos progenitores y la generación de un nuevo individuo, para ello los espermatozoides deben someterse a la reacción del acrosoma para así penetrar la membrana perivitelina y fertilizar el óvulo. Las enzimas hialuronidasa y acrosina liberadas permiten que el espermatozoides hidrolice la membrana perivitelina interior que rodea el ovocito, y esto da como resultado orificios que permiten el paso de uno o varios espermatozoides a través de la membrana perivitelina (Lemoine *et al.*, 2008). La membrana perivitelina puede ser considerarse hasta cierto punto como análoga a la zona pelúcida (ZP) en el ovocito de los mamíferos. La cual se compone de glicoproteínas, las cuales tienen un papel clave en la unión del espermatozoide y la inducción acrosómica (Okumura *et al.*, 2004).

Los espermatozoides de las aves pueden almacenarse hasta 15 semanas en el tracto de la hembra, en la unión útero vaginal del tracto antes de llegar al sitio de la fertilización y someterse a la reacción del acrosoma para penetrar la membrana perivitelina que contiene el vitelo y rodea al ovocito (Lemione *et al.*, 2009).

#### **2.4.1.2. Tubos almacenadores de espermatozoides en la unión útero vaginal**

En la ausencia de un ciclo estral como el de los mamíferos para la sincronización de la copulación con la ovulación, las aves dependen de almacenamiento espermático en el oviducto (Bakst, 2010). En las aves, existen invaginaciones tubulares especializadas en los pliegues de la lámina de la mucosa, que se denominan túbulos de almacenamiento de espermatozoides (TAE), que se encuentran en la unión útero vaginal (UUV) y en el infundíbulo que es el sitio de fertilización (Sasanami, 2013).

Debido a la presencia de estos TAE, el espermatozoide una vez que ha entrado en el aparato reproductor de la hembra, puede sobrevivir entre 2-15 semanas en aves domésticas, como gallinas y pavas (Sasanami, 2013); en contraste con la relativamente corta duración de la vida espermática de no más de una semana en mamíferos. Aunque existen investigaciones sobre la función de los TAE, se sabe poco sobre los mecanismos específicos implicados en la capacidad de almacenamiento espermático, la cual se propone puede estar relacionada con actividad metabólica

espermática y liberación controlada de los espermatozoides al lumen oviductal (Bakst, 2007 y Froman, 2003).

Sasanami en el 2013 y Bakst en el 2015, sugieren que los espermatozoides almacenados en los TAE son típicamente inmóviles y por lo tanto se cree que es metabólicamente quiescente como resultado del consumo de ATP rebajado. Sin embargo, se sugiere que los espermatozoides mantienen su posición en contra de una corriente de fluido hacia el exterior en los TAE a través de la motilidad de los espermatozoides generada por la oxidación de los ácidos grasos exógenos liberados a partir de células epiteliales de los TAE, para ser el resultado de la reducción de la velocidad de los espermatozoides debido a la escasez de la suplementación de energía de la mitocondria al espermatozoide. Además, varias proteínas incluyendo la anhidrasa carbónica, avidina, acuaporinas y la fosfatasa alcalina; La Anhidrasa Carbónica presenta una actividad de liasa, es decir, enzimas que catalizan reacciones de eliminación no hidrolítica, no oxidante o la lisis de un sustrato (Monroy y Vargas, 2010). La Avidina es una glicoproteína tetramérica, producida en el oviducto de aves y depositada en la clara de sus huevos (Fernández, 1985). Acuaporinas: proteínas mediadoras del transporte de agua (Sánchez, 2003). La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuida que hidroliza el enlace fosfoéster entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico liberando fosfato inorgánico (Ruiz *et al.*, 2015).

Se ha sugerido que tienen posibles funciones en el mantenimiento de espermatozoides en los TAE, aunque no tiene incidencia directa en el almacenamiento de espermatozoides. Si bien la cuestión de cómo los espermatozoides sobreviven dentro de los túbulos almacenadores de espermatozoides (TAE) por períodos prolongados de tiempo aún no se ha explicado definitivamente, se supone que el espermatozoide residente metaboliza de manera endógena ácidos grasos u otros lípidos derivados de las microvellosidades apicales de los TAE (Bakst, 2010; Long, 2012 y Sasanami, 2013).

Bakst en el 2015, examinó el origen de microvellosidades (MVBs) en la punta apical de las células epiteliales de los TAE, y su posible papel en la supervivencia de los espermatozoides. Se sugiere que los MVBs contribuyen al almacenamiento de espermatozoides por los TAE por el suministro de lípidos y proteínas utilizados por los espermatozoides residentes, que sirven para suprimir funciones posiblemente asociadas a la re capacitación espermática y su capacidad fertilizante, además de

estabilizar el plasmalema del espermatozoide, y que actúa como vesículas de transporte, donde se transportan activamente el líquido de las células epiteliales de los TAE al lumen (Freedman, 2001; Marzesco *et al.*, 2009 y Bakst, 2015).

La relación de los fosfolípidos con los espermatozoides, tienen una función relativa a su maduración, las propiedades de la motilidad y la capacidad antioxidante. En particular, con su alto contenido de colesterol, se han propuesto para inhibir la capacitación y la reacción del acrosoma (Bakst, 2015 y Long y Conn, 2012).

Sasanami en el 2013, investigó el mecanismo de almacenamiento del espermatozoide en la codorniz japonesa; donde se prepararon extractos de la unión útero vaginal (UUV) con espermatozoides, se incubaron en presencia o ausencia de los extractos UUV. El movimiento flagelar de los espermatozoides fue grabado usando una cámara de alta velocidad. Cuando los espermatozoides se incubaron en ausencia de los extractos UUV, se observó un movimiento flagelar vigoroso. Sin embargo, en presencia de los extractos UUV, se encontró que los movimientos flagelares eran relativamente quiescentes, y que la amplitud del movimiento flagelar, así como la velocidad lineal de los espermatozoides, disminuyó. Más importante aún, la adición de extractos UUV extendió la vida útil de los espermatozoides *in vitro*. En presencia de extractos UUV, los espermatozoides aun contaban con una movilidad considerable incluso después de 48 h de incubación, mientras que en ausencia de los extractos, murieron dentro de las primeras 5 h. Estos resultados indican la posibilidad de que existan moléculas desconocidas responsables del mantenimiento del espermatozoide en los extractos de UUV.

## **2.5. Técnicas de reproducción asistida en aves domesticas**

Las técnicas reproductivas se han usado desde hace muchos años en animales domésticos y en seres humanos. Técnicas como la inseminación artificial, y la conservación de semen mediante refrigeración o congelación, se emplean de rutina en la industria ganadera desde hace más de 50 años (Roldán y Garde, s.f.). En la actualidad la avicultura de especies domesticas no se puede concebir sin la aplicación de conocimientos y tecnologías innovadoras de reproducción asistida. Esto incluye la inseminación artificial (IA) *in vivo* e *in situ*, con semen fresco, diluido o criopreservado y la fertilización *in vitro* de ovocitos. En la industria avícola como en la ganadería, el uso de estas técnicas presenta ventajas como es el mantenimiento y reproducción de líneas puras de reproductores primarios. Las Técnicas de reproducción asistida que

se conocen en las aves son: Obtención de semen, conservación seminal, inseminación artificial e incubación (Herrera *et al.*, 2013).

### **2.5.1. Obtención seminal**

La obtención de semen en aves, se realiza mediante varias técnicas, que abarcan desde la electro-eyaculación, eyaculación voluntaria y eyaculación por masaje dorso ventral (Burrows y Quinn 1937 y Blanco *et al.*, 2002).

#### **Masaje dorso ventral**

Pioneros en la reproducción avícola asistida fueron Burrows y Quinn (1937), quienes desarrollaron el método de masaje dorso abdominal en gallos para la extracción y recolección de semen. La fácil recolección de semen y el procesamiento, ha permitido su utilización de forma extensiva en la inseminación artificial (IA). Esta técnica ha demostrado ser de gran ayuda para la inseminación artificial en pavos y gallos, su única desventaja radica en que el masaje también estimula el coprodeo y urodeo, ocasionando que ciertos porcentajes de los eyaculados se contaminen con heces, ácidos úricos o ambos (Duchi *et al.*, 2009).

### **2.5.2. Conservación seminal**

Durante la conservación seminal debe mantenerse la movilidad espermática si es que se quieren obtener altos niveles de fertilidad. La conservación seminal en aves puede dividirse en dos técnicas, la conservación en fresco y en congelado. El principio de la técnica se basa en que la disminución de la temperatura fisiológica de los espermatozoides de 41°C a 4°C ocasiona una disminución de la actividad metabólica, que a su vez aumenta la vida de los espermatozoides (Barbas y Mascarenhas, 2009).

#### **2.5.2.1. En fresco**

En términos generales el almacenamiento del semen líquido en fresco es una práctica frecuente que involucra la dilución del semen en amortiguadores a baja temperatura (5°C aproximadamente) para ser utilizado en la inseminación artificial (IA). Se ha demostrado que dependiendo de los ingredientes utilizados para hacer un diluyente, éste tendrá diferente capacidad para conservarlo (Sexton, 1988). La fácil recolección de semen y el procesamiento, han permitido su utilización de forma extensiva en la IA con semen fresco, (Lake, 1984 y Donoghue y Wishart, 2000). El semen descongelado tiene baja fertilidad comparado con el semen fresco y/o refrigerado (Duchi *et al.*, 2009).

## **Diluyentes**

La dilución o no del semen fresco va a depender del tiempo que va a transcurrir hasta que se utilice. Si su utilización se va a llevar a cabo entre 30 y 45 minutos después de su obtención no es necesario diluirlo. Si el plazo es mayor interesa diluirlo y refrigerarlo. Un objetivo importante de la dilución del semen es extender su volumen para así facilitar su manejo y de ser posible, inseminar un mayor número de hembras. El diluyente sirve además para poder preservar la capacidad fertilizante del semen durante períodos más largos. El semen sin diluir de gallo no puede mantener toda su capacidad fertilizante fuera de la vagina más allá de unos 45 minutos. La dilución a campo mantiene la capacidad fertilizante de los espermatozoides durante unas 6 horas, lo que permite, en el caso de los pavos, poder transportarlo de la granja de sementales a la de las hembras (ABAD, 2003 y Herrera *et al.*, 2005).

Existen diversos medios de conservación de semen descritos en la Tabla 1 como BHSV, FEB, LAKE, LAKE C (Lake, 1984) y BPSE (Sexton, 1977), sin embargo dos son los más utilizados, el medio BPSE y LAKE ambos usados en diferentes especies de aves.

Los diluyentes seminales deben contar con una sustancia buffer y una osmolaridad adecuadas, que ayudarán a proteger en su momento a las células espermáticas de sufrir daños y además de aumentar el volumen de la muestra (Barbas *et al.*, 2009). En estudios recientes en aves se ha demostrado que la reacción acrosomal puede ser inducida *in vivo* por diferentes compuestos salinos,  $Ca^{2+}$  o compuestos derivados del huevo, por esta razón debe prestarse mucha atención a los reactivos utilizados para el diluyente que se ocupará para conservar el semen en fresco o criopreservado. Un aspecto importante es que la movilidad de los espermatozoides es muy sensible a los factores que componen el plasma seminal y a las modificaciones que los diluyentes sintéticos le ocasionan (Lemoine *et al.*, 2008).



Tabla 1. Composición original de los diluyentes para semen utilizados en aves domésticas (Calderón, 2015).

Composición (g/L)	BHSV	FEB	LAKE PC	LAKE C	BPSE
Glucosa	5.0				
Fructosa		8.0	8.0	6.0	5.0
Glutamato de sodio	28.5	19.2	19.2	19.2	8.67
Acetato de potasio	5.0	5.0	5.0		
Acetato de magnesio	0.7		0.8	0.8	
Acetato de sodio				5.1	4.3
Citrato de potasio				1.28	0.64
Clorhidrato de magnesio					0.34
Difosfato de potasio					12.70
Potasio monofosfato					0.65
Sulfato de protamina		0.32			
*N-TRIS					1.95
Inositol	2.5				
Polivinilpirolidona		3.0			
pH	7.15	7.0	7.1	7.2	8.6**
Osmolaridad (mOsm)	380	330	340	330	380
Referencia	Von Hubner, 1988	Tselutin et al. 1999	LAKE and Ravie , 1984	LAKE and Steward, 1978	Sexton, 1977

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

\*\* Determinado en condiciones de laboratorio

### **2.5.2.2. Criopreservación**

El potencial de esta técnica es enorme, sobre todo en cuanto a la creación de bancos de semen, lo cual permitiría conservar la variabilidad genética de las aves y reducir los costos de la manutención y bioseguridad de las múltiples poblaciones de estirpes no comerciales que las casas de genética conservan para su uso potencial en el futuro. Además se podría flexibilizar y simplificar la reproducción de las aves. En gallinas se han logrado niveles de fertilidad >90% realizando la IA con semen congelado (ABAD, 2003).

La criopreservación involucra la suspensión del semen en diluyentes con sustancias crioprotectoras, esta técnica permite su almacenamiento de manera “indefinida” en nitrógeno líquido, permitiendo la creación de un banco de genes, con un fácil manejo posterior (Herrera *et al.*, 2005).

#### **Crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias químicas que están incluidos generalmente en un diluyente, sirven para reducir los daños físicos y químicos en los espermatozoides derivados del enfriamiento, protegen la membrana plasmática de los espermatozoides para reducir el efecto de la excesiva concentración extracelular de solutos y evitar o disminuir la formación de cristales intra y extra celulares. Los crioprotectores se dividen en dos grupos, los que atraviesan la membrana celular (intracelulares) y los que actúan desde el exterior de la célula (extracelulares) (Herrera *et al.*, 2005; Blesbois, 2007; Barbas *et al.*, 2009 y Purdy *et al.*, 2009).

El primer grupo está compuesto por los crioprotectores intracelulares aquellos que son capaces de atravesar las membranas, ocasionan una reorganización de las proteínas y lípidos, causando una mayor fluidez membranal y deshidratación a bajas temperaturas, que a su vez evita la formación de hielo generando una mayor tasa de supervivencia espermática tras el descongelamiento (Blanco *et al.*, 2010); dos ejemplos son: el glicerol y el DMSO (Barbas *et al.*, 2009). El segundo grupo está compuesto por los crioprotectores extracelulares que no atraviesan las membranas y solo actúan extracelularmente, son hidrófilos, no tóxicos y ayudan a estabilizar la concentración de solutos internos bajo ambientes de estrés osmótico (Blanco *et al.*, 2010), también evitan la formación de hielo; algunos ejemplos de ellos son: la clara de huevo, glucosa, lactosa, sacarosa y rafinosa. Estos azúcares interactúan con los fosfolípidos de la membrana plasmática, aumentando la sobrevivencia de los espermatozoides a la criopreservación (Barbas *et al.*, 2009).

### **2.5.3. Inseminación artificial**

Fue desarrollada para aves en la década de los 30's, con la implementación de una metodología no invasiva y específica para la obtención del semen de gallos. En procesos sistematizados con objetivos previamente establecidos, mediante la evaluación seminal como rutina de un programa de Inseminación artificial. Es una herramienta de la reproducción animal asistida que permite un mayor campo de acción, sin embargo en las aves a diferencia de los mamíferos, una vez lograda la fertilización existe el reto de incubar los huevos fértiles y posteriormente criar a los polluelos. Para obtener resultados favorables mediante la Inseminación artificial es necesario definir un protocolo o estrategia para realizarla ya que se ha observado que únicamente el 1 % de los espermatozoides depositados en el tracto de la hembra son seleccionados para completar este proceso, observándose principalmente dos factores que se involucran en este proceso. El primero está relacionado con el almacenamiento de los espermatozoides en el tracto de la hembra, por ejemplo en intervalos de ovoposición e Inseminación artificial, y el segundo está relacionado con factores que afectan la liberación espermática, como la edad de las hembras (Donoghue *et al.*, 2000).

El intervalo entre inseminaciones necesario para que la fertilidad se mantenga al máximo nivel depende de la capacidad de la hembra para almacenar espermatozoides viables en los nidos espermáticos y de la cantidad de espermatozoides inseminados. Este periodo se denomina periodo fértil aunque en realidad se trataría de un periodo fecundo para los espermatozoides. Sin embargo, tras una dosis única de inseminación, la fertilidad desciende de manera sigmoidea. Ello significa que, en gallinas, tras 6-8 días post IA la fertilidad desciende muy rápido. En las pavas la fertilidad se mantiene a un buen nivel hasta los 14-15 días post inseminación. Por lo anterior, trabajando a nivel comercial, y para mantener buenos niveles de fertilidad, las gallinas deben inseminarse una vez por semana. Las pavas podrían inseminarse una vez cada dos semanas, pero en la práctica también se inseminan semanalmente para facilitar la organización del trabajo (ABAD, 2003).

#### **2.5.4. Evaluación seminal**

La evaluación del semen es requerida por que proporciona información de la calidad del semen. El objetivo de la evaluación es predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides, avalado con el análisis de la viabilidad, morfología y actividad metabólica (Umapathy *et al.*, 2005). Los indicadores anteriores evaluados en conjunto se conocen como índice de calidad espermática, lo cual se relaciona de manera positiva con la predicción de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Parker *et al.*, 2002).

##### **2.5.4.1. Evaluación básica**

#### **Volumen y concentración seminal**

El volumen seminal que se obtenga, en conjunto con la concentración espermática, son requeridos para determinar las tasas de dilución apropiadas. Las concentraciones de espermatozoides son de gran importancia, ya que nos permite conocer si el volumen del eyaculado, puede diluirse y dispersarse pronto entre las secreciones del oviducto (Umapathy *et al.*, 2005).

#### **Movilidad**

La movilidad espermática es evaluada comúnmente, los espermatozoides deben mostrar un movimiento rectilíneo y progresivo, varios estudios previos señalan que el éxito de la fertilización depende principalmente de la movilidad espermática (Ahammad *et al.*, 2013).

#### **Morfología espermática normal.**

El espermatozoide debe tener la cabeza alargada, sin defectos en el cuello, pieza media y cola. Estas características morfológicas de normalidad se establecen a partir del aspecto que presentan los espermatozoides. Se deben tener en cuenta las tres partes en las que se divide el espermatozoide: cabeza, parte media y cola (Herrera *et al.*, 2005 y Umapathy *et al.*, 2005).

#### **2.5.4.2. Evaluación de la reacción acrosomal**

Se ha incrementado el uso de técnicas *in vitro* para determinar la capacidad fertilizante del espermatozoide, entre estas están: la morfología por microscopía de luz y electrónica, movilidad, prueba de resistencia osmótica, tasa de utilización de oxígeno, niveles de ATP, peroxidación de lípidos, integridad de membrana plasmática, viabilidad por tinción y penetración *in vitro* de proteínas en la membrana perivitelina e inducción de la reacción acrosomal (Lemoine *et al.*, 2008), también se han evaluado los parámetros de metabolismo energético como la actividad mitocondrial y cambios en la proporción y composición de fosfolípidos membranales (Herrera *et al.*, 2005).

#### **Presencia y distribución de $Ca^{2+}$**

El uso de Clortetraciclina (CTC) para tinción con fluorescencia: Es un antibiótico con un componente fluorescente que puede usarse para visualizar el curso de la capacitación espermática y reacción acrosomal. Usando CTC es posible discriminar entre acrosomas intactos capacitados y no capacitados, hechos que no ofrecen otros métodos, que sólo diferencian entre presencia o ausencia de acrosoma. La técnica está basada en la transferencia de CTC a través de las membranas del espermatozoide penetrando en los compartimientos intercelulares, que contienen altos niveles de calcio libre, donde ioniza un anión y se une al calcio, produciendo como resultado la fluorescencia (Tsien, 1989). En la reacción acrosomal se fusionan la membrana plasmática y la membrana acrosomal, esta fusión da como resultado la liberación de enzimas como la hialuronidasa y acrosina que ayudan a hidrolizar la membrana perivitelina del óvulo, auxilia al espermatozoide a penetrarlo y realizar la fertilización (Lemoine *et al.*, 2008). La membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal interna del mismo, se fusionan con la membrana perivitelina del óvulo para liberar el núcleo del espermatozoide y la varilla subacrosomal dentro del óvulo. La envoltura nuclear se desintegra cuando el espermatozoide entra al óvulo (Etches, 1998).

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Los componentes presentes en la unión útero vaginal, incrementarán los parámetros de descapacitación de los espermatozoides conservados *in vitro*?

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. General**

Evaluar el efecto de las secreciones de la unión útero vaginal en los parámetros de capacitación y descapacitación *in vitro* de espermatozoides de *Gallus gallus*.

#### **4.2. Específicos:**

- Evaluar diferentes porcentajes para suplementar con secreciones de la unión útero vaginal el medio para mantener la viabilidad espermática *in vitro*.
- Determinar parámetros de descapacitación, capacitación, y capacidad de reacción acrosomal en espermatozoides conservados en fresco con suplemento de secreciones de la unión útero vaginal.
- Determinar los parámetros de descapacitación, capacitación, y reacción acrosomal en espermatozoides descongelados que se criopreservaron con suplemento de secreciones de la unión útero vaginal.

#### **5. HIPÓTESIS:**

Las secreciones de la unión útero vaginal inducirán *in vitro* cambios fisiológicos en el espermatozoide, incrementando los parámetros de descapacitación para mantener su viabilidad.

## 6. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el laboratorio Bioquímica de la Reproducción, del Departamento de Producción Agrícola y Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, ubicada en Calzada Del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México.

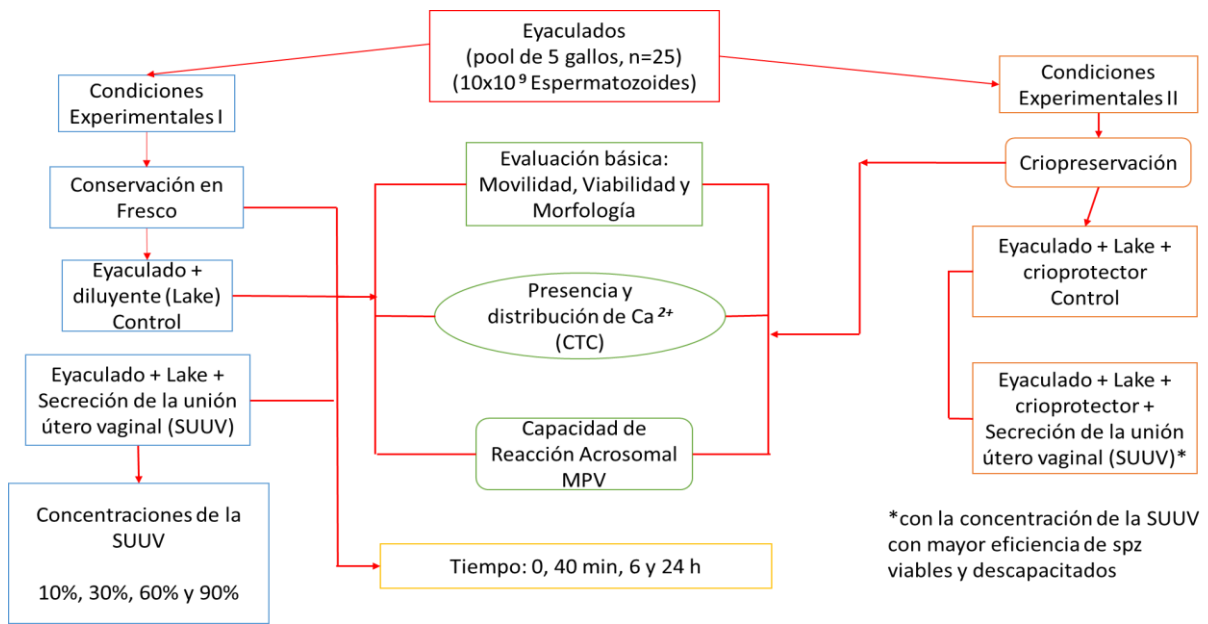
### 6.1. Diseño experimental

Se realizaron 25 evaluaciones de pool seminal obtenido a partir de 5 machos y para la obtención del exudado de la unión útero vaginal, se utilizaran 5 hembras *Gallus gallus* de la raza reproductora Rhode Island de 32 semanas de edad, clínicamente sanos.

Se realizó un diseño experimental completamente al azar para determinar los parámetros de evaluación espermática básica e indicadores de descapacitación espermática y capacidad de reacción acrosomal *in vitro*, en las siguientes condiciones de evaluación:

- A) Semen fresco (**control**).
- B) Semen fresco incubado con secreciones de la unión útero vaginal (**Condición de descapacitación espermática**).
- C) Semen incubado con membrana perivitelina (**Condición de descapacitación y reacción acrosomal**).
- D) Semen criopreservado recién descongelado.
- E) Semen descongelado criopreservado con secreciones de la unión útero vaginal (**Condición de descapacitación espermática**).

## • DISEÑO EXPERIMENTAL



### 6.2. Uso de animales

Se realizó de acuerdo con los protocolos de cuidado y bienestar animal señalados en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales, mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales. Proporcionando alimento comercial balanceado (18% de proteína) y agua *ad libitum*, el alojamiento de cada ejemplar fue en jaulas metálicas de 70x70x90 cm, provistas de bebedero y comedero.

### 6.3. Obtención y recolección seminal

Los eyaculados se obtuvieron por medio de la técnica de masaje dorso-ventral descrita para aves domésticas (Burrows y Quinn, 1937 y Herrera *et al.*, 2005). Esta técnica se basa en la acción desencadenante de la eyaculación que produce el masaje dorso abdominal posterior, al estimularse las terminaciones nerviosas que se encuentran en la zona de la cloaca.

**Descripción de la técnica:** El macho se mantiene con las extremidades haciendo un ángulo recto aproximado con su cuerpo mientras su vientre y dorso se masajean suavemente un par de veces. La mano que da masaje al dorso se lleva luego a la zona de cloaca de tal forma que el dedo pulgar y el índice se localicen en la parte lateral de cloaca y ligeramente anterior a la abertura. Se aplica una ligera presión para extraer el semen de los conductos deferentes sin forzar el líquido a través de los



pliegues del falo. Los eyaculados se recolectaron directamente de la cloaca por aspiración con una micropipeta graduada con un rango de 100 a 1000  $\mu$ l (SL-1000, RANIN™, USA), para ser depositados en tubo eppendorf.

#### **6.4. Obtención y recolección de SUUV**

Para la recolección de las secreciones de la unión útero vaginal, se realizó por sondeo realizando un lavado interno de la unión útero vaginal (Sasanami, 2013), se utilizó el mismo diluyente para la conservación seminal.

**Descripción de la técnica:** Con la utilización de una sonda para alimentación de plástico transparente, estéril y desechable. Calibre 8 Fr. y de longitud 38.5 cm. Se introduce a la cloaca de la gallina inclinando hacia el lado izquierdo para ser introducida al orificio de proctodeo, se introducen 3 mililitros del diluyente, para aspirar el exudado del oviducto. Se recolecto en un tubo falcón a 5 °C.

#### **6.5. Conservación seminal**

Las muestras se conservaron *in vitro* en diluyente LAKE y se depositaron a 5 °C, en el diluyente, para posteriormente realizar alícuotas con  $5 \times 10^6$  espermatozoides, Para cuantificar las alícuotas se realizaron diluciones y por medio de la cámara de Neubauer se realizó el conteo. Para su evaluación recién eyaculado, 40 min, por ser un tiempo considerado mínimo para lograr la capacitación, y posteriormente a las, 6 y 24 horas que son tiempos para su utilización en la inseminación artificial (Herrera *et al.*, 2005 y Santiago *et al.*, 2011).

#### **6.6. Determinación de porcentajes de SUUV**

Se realizaron incubaciones de espermatozoides con diferentes porcentajes de las secreciones de la unión útero vaginal, se utilizaron porcentajes de 0% (control), 10%, 30%, 60% y 90%. Se incubaran a 37.7°C, para posteriormente realizar una evaluación básica de las muestras por microscopía óptica (40x), esto se realizó en diferentes tiempos, en tiempo cero, a los 40 minutos, a las 6 y 24 horas posteriormente.

#### **6.7. Criopreservación**

Para la criopreservación se utilizó Dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, debido a su rápida penetración en la membrana espermática, siguiendo la técnica utilizada por Herrera *et al* en el 2005.

### **Protocolo de criopreservación:**

Se congelaron en un volumen final de 50  $\mu$ l, el semen que fue diluido con el medio a utilizar y DMSO al 10%, Posteriormente los espermatozoides se sometieron al siguiente protocolo de criopreservación:

- 1.- En un tubo eppendorf se depositó el diluyente con un volumen de 40  $\mu$ l, posterior se adiciono DMSO al 10% y un volumen de eyaculado de 5  $\mu$ l.
- 2.- Se equilibró a una temperatura de 25°C durante 3 minutos (Santiago *et al*, 2011).
- 3.- Se introdujeron la muestra en una pajilla de 0.25 ml, sellada con alcohol polivinilico y se depositó en hielo durante 3 minutos (Peláez *et al*, 2011).
- 4.- Las pajillas se sometieron a vapores nitrógeno líquido por 10 minutos (Santiago *et al.*, 2011).
- 5.- Finalmente se sumergen las pajillas en nitrógeno líquido a -196°C y así permanecerán hasta su descongelación (Herrera *et al.*, 2005).

### **Protocolo de descongelación:**

- 1.- Previo a la descongelación en una platina a 35°C se colocaron tubos Eppendorf, portaobjetos y cubreobjetos.
- 2.- Se tomó la pajilla del tanque de nitrógeno, para permanecer a temperatura ambiente por 3 segundos.
- 3.- Se introdujo la pajilla en agua a 35°C por 30 segundos.
- 4.- El contenido de dos pajillas se depositaron en un tubo eppendorf, los cuales deben tomarse de la platina a 35°C.
- 5.- Se utilizó 10  $\mu$ l para estimar el porcentaje espermatozoides vivos y 10  $\mu$ l para evaluar la movilidad espermática.
- 6.- El resto fue utilizado para evaluar los parámetros de capacitación, descapitación y reacción acrosomal, mediante las técnicas de distribución y presencia de  $Ca^{2+}$ .

### **6.8. Evaluación espermática básica**

Se determinaron los porcentajes de movilidad observándose en un microscopio óptico el movimiento de los espermatozoides, la viabilidad y morfología espermática se determinaron utilizando la tinción vital eosina-nigrosina, contando en total 100 células observadas en un microscopio óptico (40x) (Umapathy *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2015 y Ricart *et al.*, 2015).

**Movilidad espermática:** Se tomaron 10µl de muestra del eyaculado, se depositaron sobre un porta objetos a 37°C, para observarse en un microscopio óptico a 40x, la proporción de espermatozoides que mostraron movimiento rectilíneo y progresivo (Herrera *et al.*, 2005)

**Viabilidad espermática:** Se colocaron 10 µl de semen diluido y 1 µl de eosina/nigrosina (1:5) en un portaobjetos, se homogeniza la muestra y se deja secar por 5 minutos. La muestra se observó en un microscopio óptico a 40x, se contaron 100 células, los espermatozoides teñidos se contabilizaron como muertos y los que no se tiñeron como vivos (Ricart *et al.*, 2015).

**Morfología espermática:** Con la misma laminilla con la que se observó la viabilidad de los espermatozoides, se contabilizaron los espermatozoides con deformidades en cabeza, cuello y cola. Se observaron en un microscopio óptico a 40x, contando 100 células (Ricart *et al.*, 2015).

### **6.9. Determinación de parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal**

- ***Presencia y distribución de Ca<sup>2+</sup>***

Utilizando clortetraciclina (CTC) ya que es un compuesto fluorescente que presenta fluorescencia a la luz ultravioleta y tienen la capacidad de quelar el calcio, y los procesos de capacitación y reacción acrosomal depende de la presencia y localización del Ca<sup>2+</sup>, al ser expuestas al láser de un microscopio de fluorescencia emiten un color amarillo. (Ochoa *et al.*, 2014 y Ricart *et al.*, 2015). Para inducir la capacidad de reacción acrosomal, se realizó mediante la co-incubación con Membrana Perivitelina (MPV) (Ochoa *et al.*, 2014).

**Los patrones de espermatozoides a evaluar serán:**

**PATRON A: Espermatozoide intacto o descapitado.** El espermatozoide Presenta fluorescencia uniforme en toda su morfología (Figura 5).

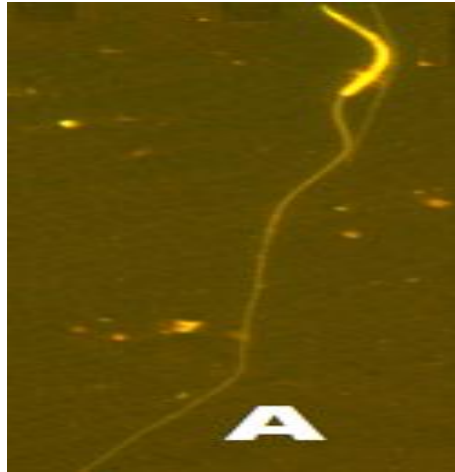


Figura 5. Espermatozoide Intacto o descapitado, visto con microscopia de fluorescencia.

**PATRON B: Espermatozoide Capacitado.** Presentan fluorescencia distintiva, particularmente sobre la región acrosomal anterior de la cabeza. Se observa claramente una banda de fluorescencia brillante en la región ecuatorial (Figura 6).

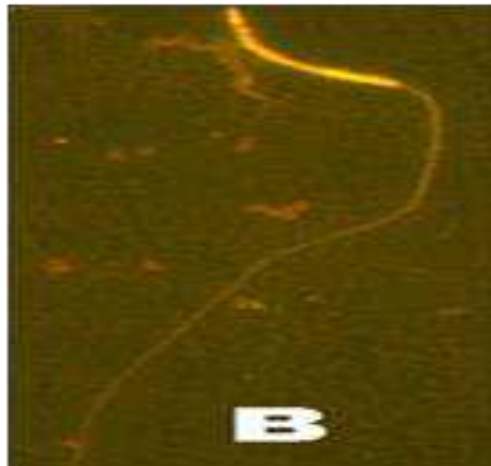


Figura 6. Espermatozoide Capacitado, visto con microscopia de fluorescencia.

**PATRON C: Espermatozoide con Reacción Acrosomal.** La falta de fluorescencia o la presencia de solamente una banda fluorescente en región ecuatorial indica la pérdida de membranas acrosomales (Figura 7).

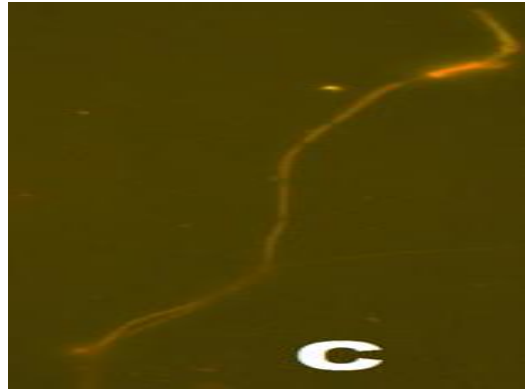


Figura 7. Espermatozoide con Reacción Acrosomal, visto con microscopia de fluorescencia.

#### **6.10. Análisis estadístico.**

Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para normalidad de los datos, se obtuvieron estadísticos descriptivos de cada evaluación en porcentajes y fueron expresados como medias  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos, siguiendo el siguiente modelo matemático:

$$y_{ij} = \mu + t_j + \epsilon_{ij}$$

De encontrarse diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey para la diferencia de medias. En caso de que no se encontrara evidencia estadística suficiente que indicara que los datos se pudieran modelar de forma normal se utilizó una prueba de Kruskal Wallis para la comparación de medianas.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa estadístico PAleontological STatistics (PAST) Versión 3.18.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Evaluación seminal básica.

Los parámetros de movilidad espermática que se observaron en este estudio, se describen en la Tabla 2, en la cual se detalla la comparación los porcentajes en diferentes tiempos de conservación, en los cuales se observó que los valores determinados en espermatozoides recién eyaculados comparado con los valores determinados a 40 min de su conservación en fresco, en todos los casos cuando se utilizaron diferentes porcentajes de SUUV (0%, 10%, 30%, 60% y 90%) para su conservación no existió diferencia estadística ( $P > 0.05$ ). A diferencia de lo anterior, los porcentajes de movilidad espermática determinados a las 6 horas y 24 horas, en ambos casos fueron menores ( $P < 0.05$ ) comparados con porcentajes de movilidad de espermatozoides recién eyaculados y conservados por 40 min.

La comparación de movilidad espermática en los diferentes porcentajes de las SUUV (0%, 10%, 30%, 60% y 90%) siempre fueron similares ( $P > 0.05$ ) independientemente de los diferentes tiempos de evaluación (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas). La movilidad espermática post descongelación siempre fue menor ( $P < 0.05$ ), comparada con aquella que se determinó en espermatozoides recién eyaculados.

Tabla 2. Movilidad espermática de los diferentes porcentajes de la unión útero vaginal (SUUV) en diferentes tiempos de conservación en fresco.

% DE INCLUSIÓN DE SUUV	SEMEN RECIEN EYACULADO $\bar{X} \pm EE$	SEMEN FRESCO			SEMEN POST-DESCONGELACIÓN $\bar{X} \pm EE$
		TIEMPO DE EVALUACIÓN			
		40 minutos $\bar{X} \pm EE$	6 horas $\bar{X} \pm EE$	24 horas $\bar{X} \pm EE$	
0%	72 ± 1,22 <b>a<sup>1</sup>α</b>	67 ± 4.63 <b>a<sup>1</sup></b>	41 ± 7.14 <b>a<sup>2</sup></b>	31 ± 5.56 <b>a<sup>2</sup></b>	62,14 ± 3,0 <b>β</b>
10%	71 ± 1.87 <b>a<sup>1</sup></b>	55 ± 7.07 <b>a<sup>1</sup></b>	46 ± 8.27 <b>a<sup>12</sup></b>	26 ± 7.31 <b>a<sup>2</sup></b>	
30%	69 ± 1 <b>a<sup>1</sup>α</b>	55 ± 5.24 <b>a<sup>12</sup></b>	44 ± 5.09 <b>a<sup>2</sup></b>	23 ± 5.14 <b>a<sup>3</sup></b>	57,50 ± 1,64 <b>β</b>
60%	72 ± 2 <b>a<sup>1</sup></b>	67 ± 3.39 <b>a<sup>1</sup></b>	50 ± 5.47 <b>a<sup>2</sup></b>	26 ± 4 <b>a<sup>3</sup></b>	
90%	69 ± 3.31 <b>a<sup>1</sup>α</b>	56 ± 4 <b>a<sup>12</sup></b>	41 ± 6.40 <b>a<sup>2</sup></b>	20 ± 3.16 <b>a<sup>3</sup></b>	40,36 ± 6,36 <b>β</b>

- Al comparar la misma variable entre diferentes porcentajes de inclusión de las secreciones de la unión útero vaginal, diferente literal (**a**, **b**) indica diferencia estadística.
- En los diferentes porcentajes de SUUV al comparar la diferencia a través del tiempo de conservación (0, 40m, 6 y 24h), diferente número (**1,2,3**) indica diferencia estadística.
- Al comparar semen recién eyaculado contra semen descongelado, diferente símbolo (**α**, **β**) indica diferencia estadística.

Con respecto a los **parámetros de viabilidad espermática** (Tabla 3); se detalla que cuando se utilizaron diferentes porcentajes de secreciones de la unión útero vaginal los espermatozoides recién eyaculados comparados con los espermatozoides conservados a los 40 minutos en todos los casos no mostraron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ). La viabilidad en espermatozoides conservados a las 6 horas y 24 horas mostro diferencias ( $P < 0.05$ ) con respecto a espermatozoides recién eyaculados en los porcentajes de 0%, 30% y 60% de SUUV. En los porcentajes de 10% y 90% de SUUV no mostraron diferencias estadísticas entre los tiempos de conservación en fresco ( $P > 0.05$ ).

La comparación de viabilidad espermática en los diferentes porcentajes de las SUUV (0%, 10%, 30%, 60% y 90%) siempre fueron similares ( $P > 0.05$ ) independientemente de los diferentes tiempos de evaluación (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

La viabilidad espermática post descongelación siempre fue similar en todos los casos ( $P > 0.05$ ), comparada con aquella que se determinó en espermatozoides recién eyaculados.

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de espermatozoides conservados por tiempo con diferentes porcentajes de inclusión de las secreciones de la unión útero vaginal (SUUV).

% DE INCLUSIÓN DE SUUV	SEMEN RECIEN EYACULADO $\bar{X} \pm EE$	SEMEN FRESCO			SEMEN POST-DESCONGELACIÓN $\bar{X} \pm EE$
		TIEMPO DE EVALUACIÓN			
		40 minutos $\bar{X} \pm EE$	6 horas $\bar{X} \pm EE$	24 horas $\bar{X} \pm EE$	
0%	98,6 ± 0,74 <b>a<sup>1</sup>α</b>	96 ± 0.94 <b>a<sup>12</sup></b>	94.2 ± 1.35 <b>a<sup>2</sup></b>	94.4 ± 0.67 <b>a<sup>2</sup></b>	98,29 ± 0,71 <b>α</b>
10%	97.4 ± 0.67 <b>a<sup>1</sup></b>	96 ± 0.63 <b>a<sup>1</sup></b>	93.8 ± 1.31 <b>a<sup>1</sup></b>	94.8 ± 1.24 <b>a<sup>1</sup></b>	
30%	98.2 ± 0.66 <b>a<sup>1</sup>α</b>	97 ± 0.70 <b>a<sup>12</sup></b>	94 ± 0.70 <b>a<sup>23</sup></b>	91.6 ± 1.20 <b>a<sup>3</sup></b>	97,07 ± 1,14 <b>α</b>
60%	97.6 ± 0.81 <b>a<sup>1</sup></b>	95.8 ± 0.73 <b>a<sup>12</sup></b>	89.4 ± 4.62 <b>a<sup>2</sup></b>	92 ± 1.70 <b>a<sup>2</sup></b>	
90%	97.4 ± 1.20 <b>a<sup>1</sup>α</b>	91 ± 3.46 <b>a<sup>1</sup></b>	93.4 ± 1.72 <b>a<sup>1</sup></b>	94.6 ± 1.43 <b>a<sup>1</sup></b>	98,21 ± 0,90 <b>α</b>

- Al comparar la misma variable entre diferentes porcentajes de inclusión de las secreciones de la unión útero vaginal, diferente literal (**a**, **b**) indica diferencia estadística.
- En los diferentes porcentajes de SUUV al comparar la diferencia a través del tiempo de conservación (0, 40m, 6 y 24h), diferente número (**1,2,3**) indica diferencia estadística.
- Al comparar semen recién eyaculado contra semen descongelado, diferente símbolo (**α**, **β**) indica diferencia estadística.

Los porcentajes de espermatozoides con **morfología normal** (Tabla 4) cuando se utilizaron 0%, 10%, 30% y 90% de los porcentajes de inclusión de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV) no mostraron diferencias estadísticas ( $P>0.05$ ) entre los diferentes tiempos de conservación seminal en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas), ya que la morfología normal se encuentra en un rango de 89% y 96%. En cuanto al porcentaje de inclusión de 60% de SUUV mostro diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ) en el tiempo 40 minutos ( $91.6 \pm 0.92$ ) y 6 horas ( $91 \pm 1.58$ ) de conservación en fresco.

Cuando se realizó la comparación de morfología normal en los diferentes porcentajes de las SUUV (0%, 10%, 30%, 60% y 90%) siempre fueron similares ( $P>0.05$ ) independientemente de los diferentes tiempos de evaluación (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas). Al comparar la morfología normal de los espermatozoides post descongelación siempre fue similar en todos los casos ( $P>0.05$ ), comparada con aquella que se determinó en espermatozoides recién eyaculados. En todos los casos desciende un 3% la morfología normal de los espermatozoides en comparación con el semen recién eyaculado.

Tabla 4. Porcentajes de Morfología normal de los espermatozoides con diferentes porcentajes de las secreciones de la unión útero vaginal (SUUV) en diferentes tiempos de conservación en fresco.

% DE INCLUSIÓN DE SUUV	SEMEN RECIEN EYACULADO $\bar{X} \pm EE$	SEMEN FRESCO			SEMEN POST-DESCONGELACIÓN $\bar{X} \pm EE$
		TIEMPO			
		40 minutos $\bar{X} \pm EE$	6 horas $\bar{X} \pm EE$	24 horas $\bar{X} \pm EE$	
0%	$93,2 \pm 1,62$ <b>a<sup>1</sup>α</b>	$96.6 \pm 0.81$ <b>a<sup>1</sup></b>	$92.8 \pm 1.2$ <b>a<sup>1</sup></b>	$92.4 \pm 1.36$ <b>a<sup>1</sup></b>	$90,57 \pm 0,64$ <b>α</b>
10%	$93.8 \pm 0.86$ <b>a<sup>1</sup></b>	$92.8 \pm 1.35$ <b>a<sup>1</sup></b>	$89 \pm 0.70$ <b>a<sup>1</sup></b>	$91.6 \pm 1.72$ <b>a<sup>1</sup></b>	
30%	$92.8 \pm 0.37$ <b>a<sup>1</sup>α</b>	$92.4 \pm 1.50$ <b>a<sup>1</sup></b>	$91.8 \pm 1.24$ <b>a<sup>1</sup></b>	$90.8 \pm 1.28$ <b>a<sup>1</sup></b>	$89,79 \pm 1,91$ <b>α</b>
60%	$95.4 \pm 0.50$ <b>a<sup>1</sup></b>	$91.6 \pm 0.92$ <b>a<sup>2</sup></b>	$91 \pm 1.58$ <b>a<sup>2</sup></b>	$93 \pm 1.22$ <b>a<sup>1</sup></b>	
90%	$93.6 \pm 1.69$ <b>a<sup>1</sup>α</b>	$90.6 \pm 2.11$ <b>a<sup>1</sup></b>	$91.6 \pm 2.24$ <b>a<sup>1</sup></b>	$91.2 \pm 1.24$ <b>a<sup>1</sup></b>	$90,43 \pm 0,93$ <b>α</b>

- Al comparar la misma variable entre diferentes porcentajes de inclusión de las secreciones de la unión útero vaginal, diferente literal (**a, b**) indica diferencia estadística.
- En los diferentes porcentajes de SUUV al comparar la diferencia a través del tiempo de conservación (0, 40m, 6 y 24h), diferente número (**1,2**) indica diferencia estadística.
- Al comparar semen recién eyaculado contra semen descongelado, diferente símbolo (**α, β**) indica diferencia estadística.



## 7.2. Parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides conservados en fresco

Se realizó una comparación de los porcentajes de espermatozoides descapacitados, capacitados y con reacción acrosomal determinados *in vitro* en los diferentes porcentajes (0%, 10%, 30%, 60% y 90%) de las SUUV y en los diferentes tiempos (0, 40 minutos, 6 y 24 horas) de conservación en fresco, sin co-incubación con MPV y co-incubados con MPV.

### 7.2.1. Parámetros de espermatozoides descapacitados, capacitados y con reacción acrosomal sin co-incubación con MPV

En la Figura 8 se observan los parámetros de espermatozoides descapacitados en los porcentajes de 0%, 10% y 90% de SUUV los cuales muestran diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) a las 6 horas y 24 horas de conservación en fresco en comparación con el tiempo 0 (control). En los porcentajes de 30% y 60% de SUUV mostro diferencias ( $P < 0.05$ ) en los parámetros de espermatozoides descapacitados a los 40 minutos y 24 horas de conservación en fresco en comparación al tiempo 0 (control).

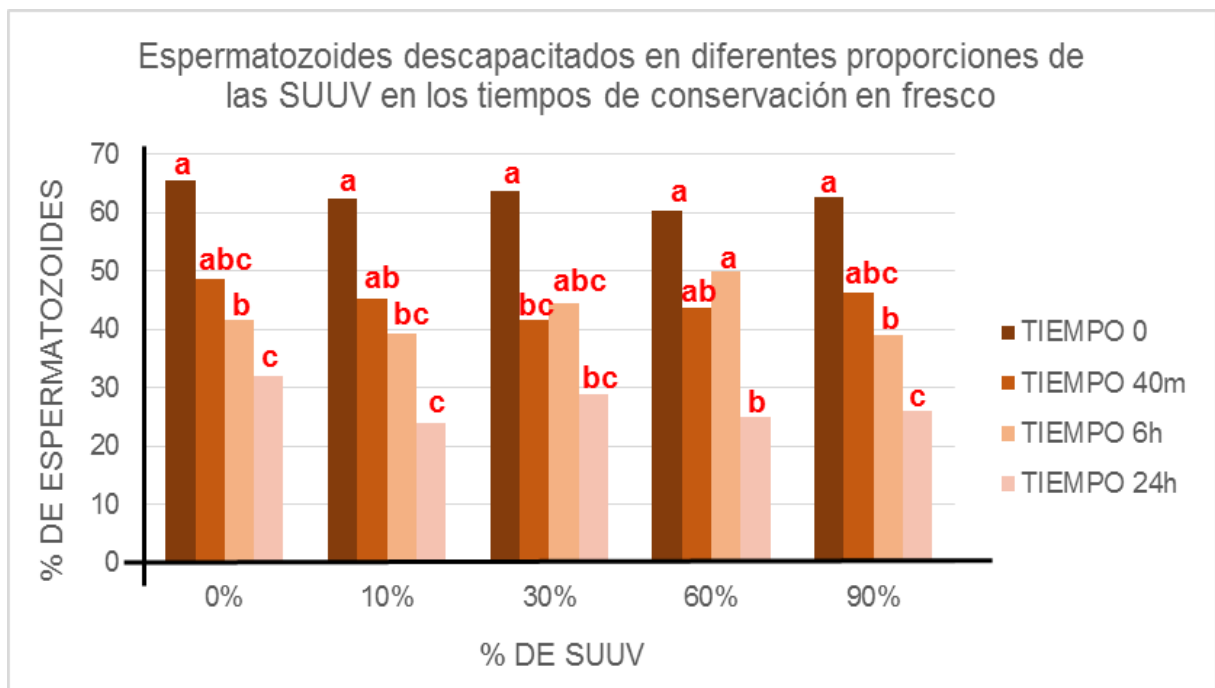


Figura 8. Porcentaje de espermatozoides descapacitados en los porcentajes (0%, 10%, 30% y 90%) de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV). Diferentes literales (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos de conservación en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

En la figura 9 se observan los porcentajes de espermatozoides capacitados, los cuales mostraron similitud ( $P > 0.05$ ) en todos los porcentajes de las SUUV (0%, 10%, 30%, 60% y 90%) entre los diferentes tiempos de conservación en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

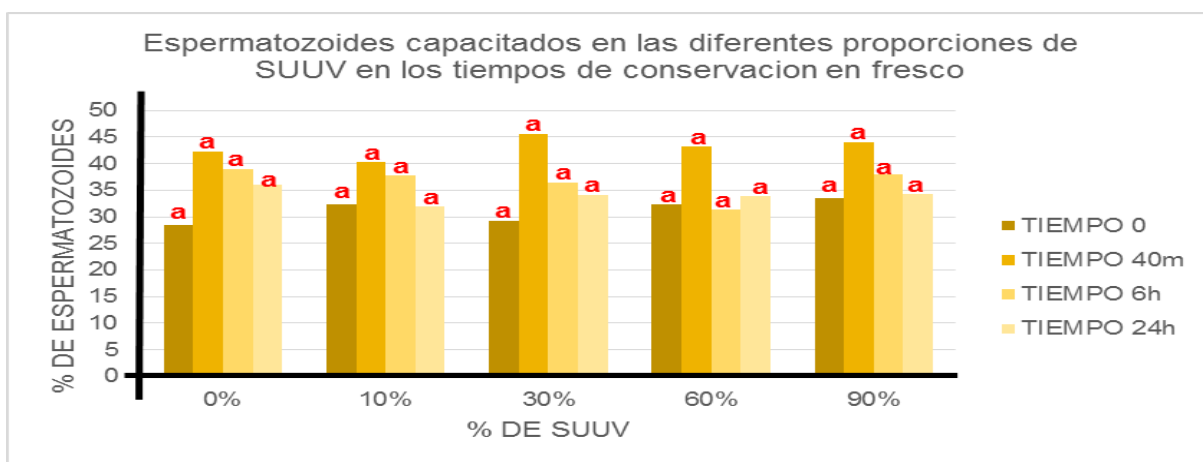


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides capacitados en los porcentajes (0%,10%,30% y 90%) de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV). Diferentes literales (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos de conservación en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

En los espermatozoides con reacción acrosomal en el tiempo 6 horas y 24 horas de conservación en fresco en comparación con el tiempo 0 (control) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) esta tendencia se observa en los porcentajes de 0%, 10% y 90% de las SUUV. Al 30% y 60% de SUUV se observan diferencias ( $P < 0.05$ ) en espermatozoides con reacción acrosomal a las 24 horas de conservación en fresco en comparación al tiempo 0 (control), 40 minutos y 6 horas (Figura 10).

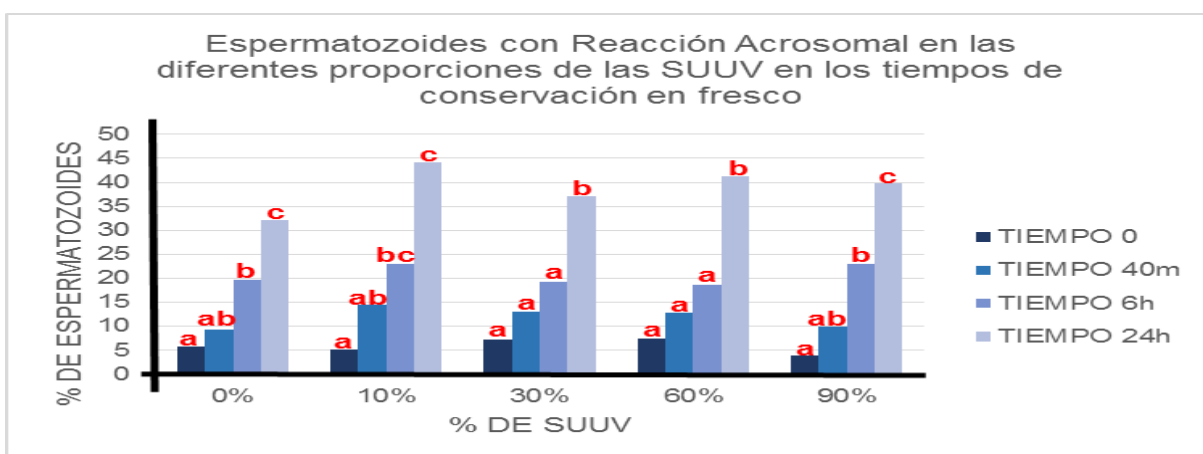
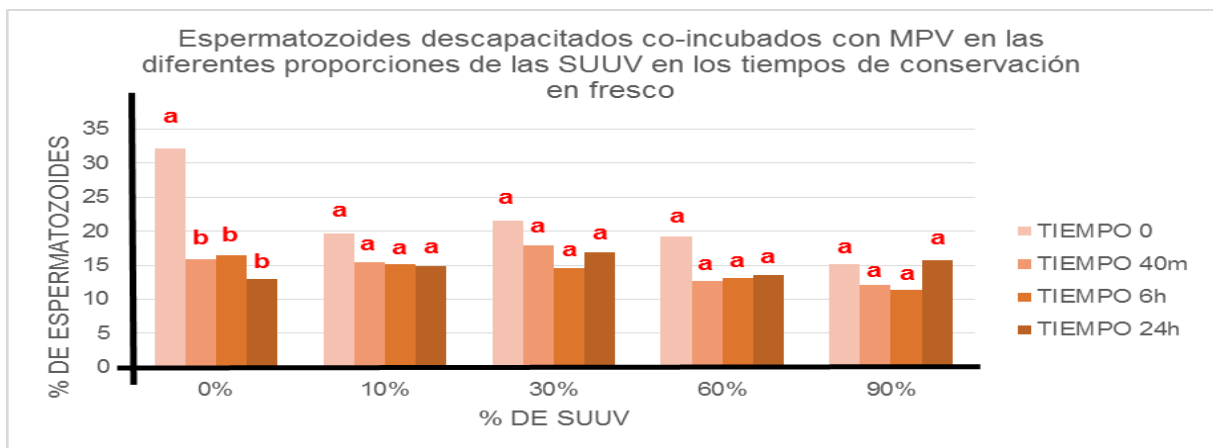


Figura 10. Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal en los porcentajes (0%,10%,30% y 90%) de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV). Diferentes literales (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos de conservación en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

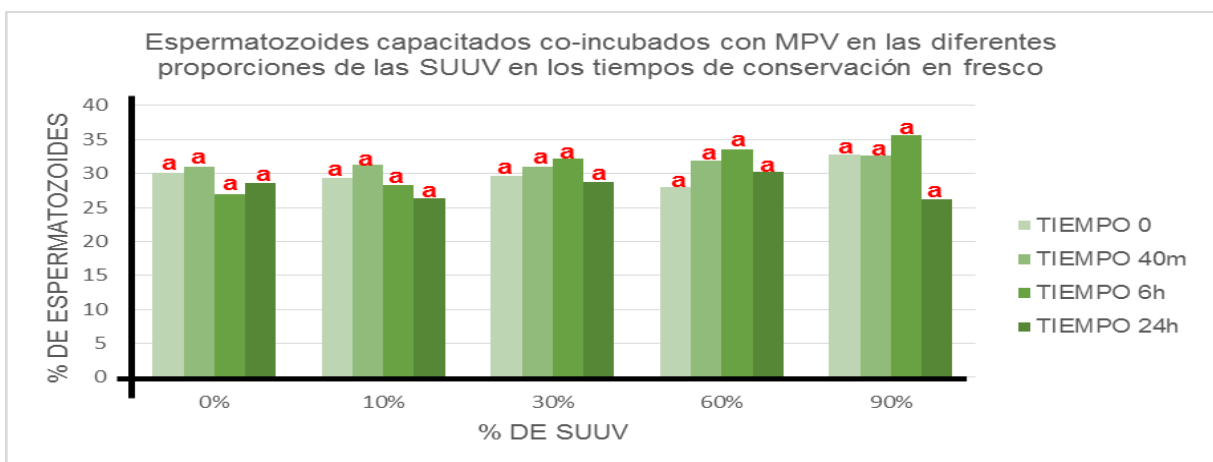
### 7.2.2. Parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides co-incubados con MPV

En la Figura 11 se observan los porcentajes de espermatozoides descapacitados en el porcentaje de 0% de las SUUV los cuales muestran diferencias ( $P < 0.05$ ) desde los 40 minutos, a las 6 horas y 24 horas de conservación en fresco en comparación con el tiempo 0 (control). En los porcentajes de 10%, 30%, 60% y 90% de SUUV se observaron que los espermatozoides descapacitados se comportaron muy similares ( $P > 0.05$ ) en los diferentes tiempos de conservación en fresco.



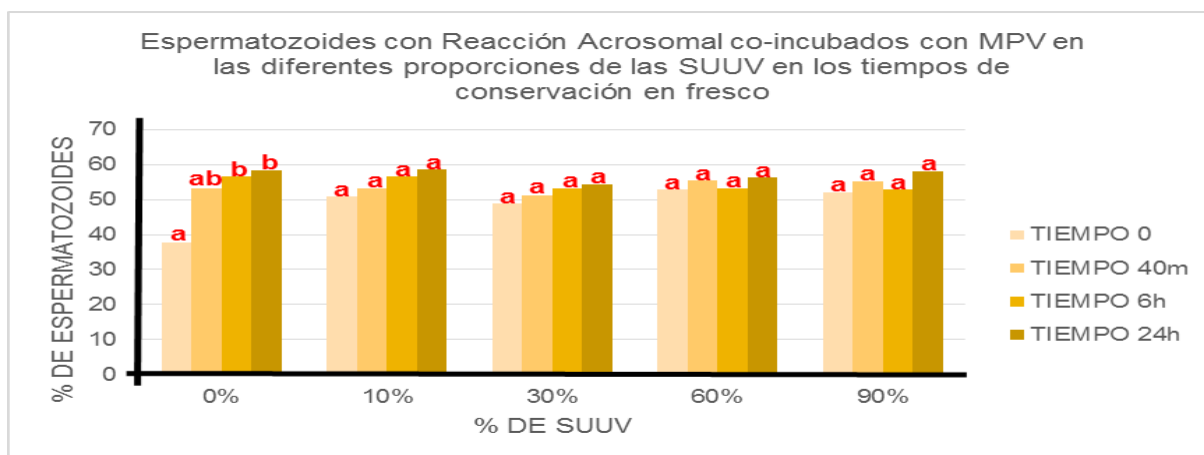
**Figura 11.** Porcentaje de espermatozoides descapacitados co-incubados con membrana perivitelina (MPV) en los porcentajes (0%,10%,30% y 90%) de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV). Diferentes literales (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos de conservación en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

En los espermatozoides capacitados en todos los porcentajes de las SUUV (0%, 10%, 30%, 60% y 90%) entre los diferentes tiempos (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas) de conservación en fresco mostraron similitud ( $P > 0.05$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentaje de espermatozoides capacitados co-incubados con membrana perivitelina (MPV) en los porcentajes (0%,10%,30% y 90%) de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV). Diferentes literales (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos de conservación en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

El porcentaje de espermatozoides con Reacción Acrosomal determinada después de la co-incubación con Membrana Perivitelina (MPV) en el tiempo 6 horas y 24 horas de conservación en fresco en comparación con el tiempo 0 (control) en el porcentaje de 0% de SUUV mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). En los porcentajes de 10%, 30%, 60% y 90% de SUUV mostraron la misma tendencia de similitud ( $P > 0.05$ ) en espermatozoides con reacción acrosomal en los diferentes tiempos de conservación en fresco (Figura 13).



**Figura 13.** Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal co-incubados con membrana perivitelina (MPV) en los porcentajes (0%,10%,30% y 90%) de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV). Diferentes literales (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos de conservación en fresco (tiempo 0, 40 minutos, 6 horas y 24 horas).

### 7.3. Efecto de la criopreservación en los parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal.

Después de la criopreservación se observó que entre semen recién descongelado y semen descongelado co-incubado con membrana perivitelina (MPV) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) (Tabla 5).

En los porcentajes de 0%, 30% y 90% de SUUV los espermatozoides descapacitados descongelados co-incubados con MPV fueron menores ( $P < 0.05$ ) en aproximadamente 20% al semen recién descongelado; los espermatozoides capacitados en semen descongelado co-incubado con MPV fue menor ( $P < 0.05$ ) en aproximadamente 15% al semen recién descongelado. En los espermatozoides con reacción acrosomal en semen recién descongelado con membrana perivitelina fue menor ( $P < 0.05$ ) al semen recién descongelado en todos los porcentajes de las SUUV (0%, 30% y 90%).

En cuanto al porcentaje de inclusión de secreciones de la unión útero vaginal (SUUV) mostraron similitud ( $P > 0.05$ ) entre los diferentes porcentajes (0%, 30% y 90%) en semen recién descongelado y en semen descongelado co-incubado con membrana perivitelina.

Tabla 5. Porcentajes de espermatozoides descapacitados, capacitados y con reacción acrosomal después de la criopreservación y co-incubados con Membrana Perivitelina (MPV).

% DE INCLUSIÓN DE SUUV	PARAMETROS	SEMEN RECIÉN DESCONGELADO $\bar{X} \pm EE$	SEMEN DESCONGELADO CO-INCUBADO CON MPV $\bar{X} \pm EE$
0%	DESCAPACITADOS	67,36 $\pm$ 1,84 <b>a</b>	43,93 $\pm$ 2,59 <b>b</b>
30%	DESCAPACITADOS	67 $\pm$ 2,58 <b>a</b>	41,93 $\pm$ 3,23 <b>b</b>
90%	DESCAPACITADOS	69,64 $\pm$ 1,84 <b>a</b>	46,71 $\pm$ 2,81 <b>b</b>
0%	CAPACITADOS	27,64 $\pm$ 1,76 <b>a</b>	12,57 $\pm$ 2,31 <b>b</b>
30%	CAPACITADOS	31 $\pm$ 2,56 <b>a</b>	15,07 $\pm$ 3,73 <b>b</b>
90%	CAPACITADOS	26,43 $\pm$ 1,81 <b>a</b>	13,21 $\pm$ 2,92 <b>b</b>
0%	RA	5 $\pm$ 1,94 <b>a</b>	43,5 $\pm$ 2,76 <b>b</b>
30%	RA	2 $\pm$ 0,91 <b>a</b>	43 $\pm$ 4,57 <b>b</b>
90%	RA	3,93 $\pm$ 1,33 <b>a</b>	40,07 $\pm$ 2,03 <b>b</b>

- Al comparar la misma variable entre semen recién descongelado y semen descongelado incubado con membrana perivitelina, diferente literal (**a**, **b**) indica diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

#### 7.4. Capacidad de Reacción Acrosomal *in vitro* co-incubación con MPV

Cuando se compararon los porcentajes de espermatozoides intactos, capacitados y con reacción acrosomal entre espermatozoides evaluados sin MPV vs aquellos que fueron co-incubados con MPV. En los parámetros de espermatozoides intactos y con reacción acrosomal se encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) esta tendencia se presentó en todas las condiciones de almacenamiento *in vitro* (Proporciones de las Secreciones de la Unión Útero Vaginal (SUUV)) y durante los diferentes tiempos de conservación en fresco. En los parámetros de espermatozoides capacitados se comportaron similares ( $P < 0.05$ ) en todas las condiciones y tiempos de almacenamiento.

## 8. DISCUSIÓN

En la actualidad la avicultura de especies domesticas no se puede concebir sin la aplicación de conocimientos y tecnologías innovadoras de reproducción asistida. En la industria avícola como en la ganadería, el uso de estas técnicas presenta ventajas como es el mantenimiento y reproducción de líneas puras de reproductores primarios (Herrera *et al.*, 2013). La evaluación del semen es requerida para tener información de la calidad seminal. El objetivo de la evaluación es predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Umapathy *et al.*, 2005).

Una característica peculiar e importante de la fisiología reproductiva en las aves es la capacidad de las hembras para almacenar espermatozoides durante períodos prolongados. Esto se debe a la presencia de túbulos de almacenamiento de espermatozoides (TAE), que son invaginaciones epiteliales localizadas principalmente en la unión útero vaginal del oviducto, pero también presentes en cantidades más pequeñas en el infundíbulo. Los espermatozoides que se transfieren a la vagina mediante cópula o inseminación artificial se mueven a través de la vagina y ascienden a los túbulos de almacenamiento de espermatozoides en la mucosa de la unión útero vaginal. Aquí los espermatozoides ingresan a las microvellosidades de células epiteliales de los túbulos de almacenamiento de espermatozoides por períodos variables, dependiendo de la especie, el estado reproductivo y la edad de la hembra. Los espermatozoides almacenados se liberan a lo largo del tiempo cuando la hembra está produciendo ovocitos para garantizar que los espermatozoides estén presentes en el sitio de la fertilización (Bakst *et al.*, 2015).

Poco se sabe sobre los mecanismos celulares y moleculares responsables de la subsistencia del espermatozoide en la luz de los túbulos de almacenamiento de espermatozoides (TAE), por lo cual en el presente estudio se pretendió evidenciar el efecto de las secreciones de los túbulos de almacenamiento de espermatozoides de la unión útero vaginal en la conservación *in vitro* de espermatozoides y los cambios fisiológicos en el espermatozoide en cuanto a movilidad, viabilidad, capacitación, descapacitación y capacidad de reacción acrosomal.

### **8.1. Parámetros de evaluación espermática básica**

En el presente estudio se determinaron los parámetros de la evaluación básica donde se evaluaron porcentajes de movilidad espermática el cual es un elemento esencial para la fertilización exitosa en animales cuyos espermatozoides tienen flagelos alimentados con ATP. Se observó que la movilidad de los espermatozoides descendía conforme transcurría el tiempo de conservación *in vitro* descendió de 10% a 30% a los 40 minutos, 6 y 24 horas de conservación en fresco en el control donde se incubaron los espermatozoides con diluyente Lake y en los tratamientos con la adición de diferentes porcentajes (10%, 30%, 60% y 90%) de las secreciones de la unión útero vaginal (SUUV); de igual forma se observaron que los porcentajes de movilidad en espermatozoides conservados con las secreciones de la unión útero vaginal fueron menores en comparación con los espermatozoides sin presencia de las secreciones de la unión útero vaginal, lo cual nos indica que hay evidencia de que las SUUV de manera *in vitro* disminuyen la movilidad de los espermatozoides como se ha observado que sucede de manera *in vivo* en los túbulos de almacenamiento de espermatozoides en la unión útero vaginal, lo cual fue reportado por Sasanami, *et al.*, 2013 y Bakst *et al.*, 2015, los cuales reportan que los espermatozoides almacenados en los túbulos de almacenamiento espermático (TAE) son típicamente inmóviles y por lo tanto se cree que es metabólicamente quiescente es decir que se encuentran inactivos como resultado del consumo de ATP rebajado. Esto también es favorable para la supervivencia de los espermatozoides porque conduce a una producción reducida de especies reactivas de oxígeno mediante la respiración de los espermatozoides. Sin embargo, se sugiere que los espermatozoides mantienen su posición en contra de una corriente de fluido hacia el exterior en los SST, para ser el resultado de la reducción de la velocidad de los espermatozoides debido a la escasez de la suplementación de energía de la mitocondria al espermatozoide. Matsuzaki, *et al.*, 2017 asegura que aunque se desconoce el mecanismo subyacente al transporte de espermatozoides a los TAE, se informa que se requiere una movilidad espermática vigorosa para la invasión de espermatozoides en los TAE. Sin embargo, una vez que los espermatozoides han ingresado en los TAE, se vuelven inactivos en términos de movilidad por posibles mecanismos desconocidos y se almacenan hasta su uso para la fertilización. En los TAE, la liberación masiva de ácido láctico de las células, que se produjo en condiciones hipóxicas, se usa inevitablemente para la inactividad de los espermatozoides. Lo anterior mencionado concuerda con lo obtenido en este estudio

ya que con la suplementación de las SUUV de los TAE disminuyó el porcentaje de movilidad de un 72% hasta un 20%, esto puede estar influido por el suministro de lípidos de los TAE a los espermatozoides durante su almacenamiento. Froman y Rhoads (2013) afirmaron que los ácidos grasos endógenos de cadena larga estimulan la movilidad de los espermatozoides dentro de la vagina, mientras que los ácidos grasos exógenos de cadena larga apoyan la movilidad de los espermatozoides dentro de la luz de la TAE.

En cuanto a la viabilidad espermática se observó que los porcentajes de espermatozoides vivos iba disminuyendo conforme transcurría el tiempo de conservación *in vitro* sin embargo se mantuvieron en rangos aceptables por arriba del 90% en todos los casos; con la suplementación de las SUUV de los TAE mostraron porcentajes de espermatozoides vivos en un rango de 91% a 98%, lo cual nos sugiere que la movilidad espermática se mantiene a través del tiempo de conservación en fresco, como lo reportado por Sasanami en el 2013, el cual investigó el mecanismo de almacenamiento del espermatozoide en la codorniz japonesa; donde se prepararon extractos de la unión útero vaginal (UUV) con espermatozoides, se incubaron en presencia o ausencia de los extractos UUV; donde la adición de extractos UUV extendió la vida útil de los espermatozoides *in vitro*.

Otro estudio que concuerda con lo obtenido es de Ahammad y colaboradores en el 2013 donde este autor proporcionó evidencia directa de que cuando los espermatozoides se almacenaban en solución de Lake, más de la mitad de los espermatozoides perdían su viabilidad en 2 horas a 41 °C. Por el contrario, la viabilidad de los espermatozoides no se vio afectada significativamente por el almacenamiento en secreción de grasa (PF) o secreción de líquido calcificante (CF) del útero de la gallina durante 4 h, y la mayoría de los espermatozoides almacenados permanecieron viables durante un período de almacenamiento de 6 h, lo que indica que el fluido de la unión útero vaginal proporciona un entorno adecuado para el mantenimiento de la supervivencia espermática, como lo reportado en este estudio donde después a las 24 horas de conservación en fresco la viabilidad se mantuvo por arriba del 90%.



## **8.2. Parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides conservados en fresco.**

La capacitación es un proceso del espermatozoide que comprende una serie de cambios previos a la fecundación y requiere de la comunicación entre el espermatozoide y los ambientes que recorre en su tránsito hacia el sitio de fertilización. El espermatozoide sufre un proceso de hiper movilidad, que es un movimiento especial del flagelo, el cual facilita su desplazamiento, la penetración de las cubiertas del ovocito y finalmente la unión con este (Arenas, 2010). Cuando se une al ovocito, se induce otro proceso denominado reacción acrosomal (exocitosis). La capacidad de los espermatozoides de gallo a someterse a la reacción acrosómica es muy importante para el éxito de la fertilización pero esta capacidad se cree que está afectada por el tratamiento del semen *in vitro*. Algunos autores (Lemoine, 2011; Sasanami, 2013 y Bakst, 2015) sugieren que a diferencia de los mamíferos, los espermatozoides recién eyaculados de gallo no requieren un período de capacitación para fertilizar un óvulo *in vitro*.

En este estudio se determinaron parámetros de espermatozoides descapacitados por medio de la presencia y distribución de iones de calcio, para así rechazar o aceptar nuestra hipótesis, donde sugerimos que las secreciones de la unión útero vaginal inducirán *in vitro* cambios fisiológicos en el espermatozoide incrementando los espermatozoides descapacitados ya que se cree que en los túbulos de almacenamiento espermático proporcionan al espermatozoide moléculas que protegen al espermatozoide durante su almacenamiento sin perder su capacidad fertilizante. En los resultados obtenidos en este estudio se puede evidenciar que los porcentajes de espermatozoides descapacitados en semen recién eyaculado se encuentran por arriba del 60% en todos los casos con la suplementación de los diferentes porcentajes de las secreciones de la unión útero vaginal a los 40 minutos e conservación en fresco disminuyeron aproximadamente un 20% y con la suplementación de 30% y 50% de las SUUV a las 6 horas de conservación en fresco aumentaron el porcentaje de espermatozoides descapacitados y a las 24 horas volvieron a disminuir en todos los casos, con lo cual podemos decir que los espermatozoides tienen la capacidad de hiper-activarse e inhibir la hiper-activación sin perder su capacidad fertilizante. En cuanto a los porcentajes de espermatozoides capacitados con la suplementación de las SUUV se mantienen en rangos de 30% a

38% en semen recién eyaculado, a las 6 y 24 horas de conservación en fresco independiente mente del porcentaje de suplementación de las SUUV, pero a los 40 minutos aumenta el porcentaje de espermatozoides capacitados hasta un 45%, lo cual concuerda con lo anterior mencionado; por lo cual surge la duda, ¿es necesario el proceso de capacitación para llegar a la reacción acrosomal en espermatozoides de aves sin afectar su capacidad fertilizante?. En los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal mostraron porcentajes menores a 20% en tiempo 0 recién eyaculados, a los 40 minutos y 6 horas de conservación en fresco, independientemente del porcentaje de inclusión de las SUUV, sin embargo a las 24 horas de conservación en fresco los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal se dispararon hasta 44%; esto se debe al tiempo prolongado de conservación *in vitro*, esto nos sugiere que la presencia de las SUUV no afectan la capacidad de reacción acrosomal en los espermatozoides y por el contrario induce una posible descapitación espermatoca.

Bakst en el 2015 sugiere que las microvellosidades de células epiteliales de los túbulos de almacenamiento de espermatozoides suministran sustratos metabólicos utilizados por los espermatozoides residentes, que proporcionan macromoléculas exógenas para suprimir de forma reversible las funciones espermatoca asociadas con la fertilización siendo una posible ¿descapitación? y estabilizar el plasmalema del espermatozoide. Se ha sugerido que los espermatozoides que residen en las TAE sufren una supresión reversible de la actividad metabólica, motilidad, y la actividad de la reacción acrosomal. Además, la integridad funcional del espermatozoide se mantiene mediante la supresión de la formación de especies reactivas de oxígeno, que parecen ser la base de la disminución de la viabilidad espermatoca después del almacenamiento de esperma *in vitro* durante más de 6 horas. Dado lo anterior, Bakst y Akuffo aludieron a la posibilidad de que los espermatozoides dentro de la luz TAE se encuentren en un estado similar a la descapitación y alcancen un estado capacitado cuando se liberan de las TAE y entran en el útero, se puede asociar un alto contenido de colesterol, que al fusionarse con los espermatozoides puede inhibir la capacitación y la reacción acrosomal.

### **8.3. Parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides co-incubados con MPV.**

En las aves, el ovocito está rodeado por una capa de glicoproteína conocida como capa perivitelina interna, que es análoga a la zona pelúcida de los mamíferos y, como tal, es el sitio de la unión inicial del espermatozoide y la inducción de la reacción acrosomal (Horrocks *et al.*, 2000).

Para determinar la capacidad de los espermatozoides de llegar a la reacción acrosomal *in vitro* se utilizó como inductor a la membrana perivitelina (MPV); donde se observó que el porcentaje de espermatozoides descapacitados co-incubados con membrana perivitelina se encuentran por debajo de 21% en los diferentes tiempos de conservación en fresco en todos los casos del porcentaje de inclusión de las SUUV; en el control sin presencia de las SUUV se observó que en tiempo 0 recién eyaculados tubo el mayor porcentaje de espermatozoides descapacitados de 32%. Podemos inferir que las SUUV tienen efecto en inhibir la capacitación sin embargo es un proceso reversible ya que tienen la capacidad de capacitarse por efecto de la MPV; como Bakst en el 2015 donde sugiere que las microvellosidades de las células epiteliales de los SST tienen funciones principales que incluyen servir como una fuente de sustratos metabólicos utilizados por espermatozoides residentes, que actúa como una fuente de macromoléculas que alteran las funciones espermáticas asociadas con factores de descapacitación, que confieren protección contra el estrés oxidativo y actúan como vesículas de transporte que mueven fluido desde las células epiteliales de la TAE hasta la luz TAE.

En espermatozoides capacitados se observó que se comportan muy similares en los diferentes porcentajes de inclusión de SUUV y en los tiempos de conservación en fresco encontrándose en un rango de 26% a 35%. Sin embargo en los espermatozoides con reacción acrosomal aumentaron hasta un 58% y se observa que los porcentajes de espermatozoides fueron mayores en las diferentes porcentajes de inclusión de las SUUV en comparación con el control que es en ausencia de las SUUV, por lo cual podemos decir que la adición de las SUUV ayudan a la capacidad del espermatozoide de llegar a la reacción acrosomal al estar en contacto con la membrana perivitelina. La MPV tiene ese efecto inductor de la reacción acrosomal como lo reportado por Matsuzaki y colaboradores en el 2017 donde los oligosacáridos aislados de las glicoproteínas de la MPV de gallina son capaces de inducir la reacción

acrosómica en los espermatozoides de gallo. Sugieren que el factor inductor de la reacción acrosómica es probablemente un oligosacárido ligado a N con residuos terminales de N-acetil-glucosamina.

#### **8.4. Efecto de la criopreservación en espermatozoides conservados con suplementación de las SUUV.**

##### **Evaluación básica de semen post-descongelación**

Los procedimientos de congelación causan daños dramáticos en la membrana de los espermatozoides de pollo, resultando en la muerte de más del 50% de las células espermáticas, motilidad alterada de las células supervivientes y concentraciones disminuidas de diversos factores metabólicos, incluida la concentración de ATP (Lemoine, 2011).

En los parámetros de evaluación básica después de la criopreservación en los porcentajes de movilidad se observa que en semen descongelado disminuyó la movilidad un 10% y 20 % en comparación con el semen fresco recién eyaculado. Cabe destacar que la movilidad en semen post-descongelados se mantiene por arriba del 50%. En cuanto a la viabilidad de los espermatozoides post-descongelamiento los porcentajes de espermatozoides vivos se mantuvieron en rangos aceptables de 97% a 98% en comparación con los porcentajes de espermatozoides vivos de semen recién eyaculado se comportan similares compartiendo los mismos rangos independientemente de los porcentajes de inclusión de las SUUV. Lo mismo sucede con los porcentajes de espermatozoides con morfología normal en semen post-descongelado se comportaron similares a los porcentajes de espermatozoides con morfología normal de semen recién eyaculado.

Se reportaron resultados similares a este trabajo en el estudio de Lemoine y colaboradores en el 2011, donde después de la criopreservación la proporción de células móviles, viables y morfológicamente normales disminuyó en solo un 10-20% en semen post-descongelado.

## **Parámetros de descapacitación, capacitación y reacción acrosomal de semen post-descongelación**

En las aves los espermatozoides no parecen experimentar la capacitación o el proceso de hiper activación de la motilidad antes de la fertilización, a pesar del largo tiempo que pasan en el oviducto de la hembra antes de la penetración del ovocito (hasta tres semanas en la gallina, dos o tres meses en el pavo ) Sin embargo, el almacenamiento de semen también puede tener efectos nocivos sobre las características de los espermatozoides, incluida la integridad y motilidad de la membrana espermática y, por lo tanto, puede disminuir el potencial de fertilización. La criopreservación de espermatozoides es una herramienta importante para la preservación de la diversidad genética existente en cada clase de animal, incluidas las aves. Sin embargo, los procedimientos de congelación causan daños dramáticos en la membrana de los espermatozoides de aves, resultando en la muerte de más del 50% de las células espermáticas, sin embargo, aún no se estudia a profundidad los efectos de la congelación en la inducción de la reacción acrosómica en las aves (Lemoine *et al.*, 2010).

En el presente estudio se determinaron los parámetros de espermatozoides descapacitados después de la criopreservación donde se observó que los porcentajes espermatozoides descapacitados en semen pos-descongelado se encontraron en 67% y 69% en los diferentes porcentajes de inclusión de las SUUV y sin presencia de las SUUV; al comparar con los porcentajes de espermatozoides descapacitados de semen post-descongelado co-incubados con MPV para determinar la interacción de los espermatozoides con la MPV y su capacidad fertilizante se observa que disminuyo el porcentaje aproximadamente 20%; en los espermatozoides capacitados se observa que en semen post-descongelado se encuentra en porcentajes de 26%, 27% y 31% en los diferentes porcentajes de SUUV y en comparación con semen post-descongelado co-incubado con MPV disminuyo el porcentaje de espermatozoides capacitados en aproximadamente 15%.

Tanto en espermatozoides descapacitados y capacitados mantuvieron la misma tendencia que por efecto de la MPV disminuyen su porcentaje, lo cual nos dice que los espermatozoides están sufriendo cambios membranales y se preparan para la reacción acrosomal; por lo cual se observa que los porcentajes con reacción

acrosomal en semen post-descongelado es menor (2%, 3% y 5%) en comparación con el semen post-descongelado co-incubado con MPV ya que aumenta el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal hasta un 43% lo cual nos indica que después de la criopreservación los espermatozoides son capaces de llevar a cabo la reacción acrosomal al estar en contacto con la MPV y así garantizar su capacidad fertilizante ya que el éxito de la fertilización depende de varios parámetros, incluida la capacidad de los espermatozoides para experimentar la reacción acrosomal en el sitio de fertilización.

Lemoine en el 2011 evaluó el efecto de la criopreservación en la reacción acrosomal de espermatozoides de gallo donde dice que el porcentaje de espermatozoides que reaccionan a los acrosomas se correlaciona positivamente con los parámetros de la calidad del espermatozoide; en cuanto a la capacidad de los espermatozoides para someterse a la reacción acrosomal puede diferir según el tipo de almacenamiento del semen. Esta capacidad se ve dramáticamente afectada por el almacenamiento *in vitro* y que los efectos variables se obtienen después de la criopreservación. Esto se debe a que la criopreservación produce una disminución de la fluidez, la relación colesterol/fosfolípidos y los perfiles de fosfolípidos, así como cambios en la composición de ácidos grasos y actividad metabólica del espermatozoide de gallo.

## **9. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestra que hay evidencia para afirmar nuestra hipótesis ya que las secreciones de la unión útero vaginal indujo cambios fisiológicos en los espermatozoides incrementando la descapacitación e incrementar la viabilidad durante su conservación *in vitro*, hay evidencia de que las SUUV proporcionan a los espermatozoides sustancias que tienen factores descapacitantes es decir que tienen la capacidad de inactivar la capacitación de los espermatozoides de manera reversible ya que cuando se co-incubaron con membrana perivitelina tenían la capacidad de llevar a cabo el proceso de reacción acrosomal, por lo cual nos surge la duda si es indispensable el proceso de capacitación en los espermatozoides de las aves para llevar a cabo la reacción acrosomal como en los mamíferos donde estos procesos se encuentran muy marcados en los espermatozoides. Otra hipótesis es que este proceso de capacitación sucede muy

rápido o simplemente el espermatozoide es capaz de reaccionar sin necesidad de la hiper activación. En cuanto a la viabilidad de los espermatozoides se muestra evidencia del efecto de las SUUV en los porcentajes de espermatozoides vivos ya que hasta las 24 horas e conservación en fresco se encontraron en porcentajes por arriba del 90%, así mismo después de la criopreservación los espermatozoides mantuvieron una viabilidad similar a la del semen recién eyaculado, por lo cual podemos sugerir que las moléculas presentes en las SUUV protegen a los espermatozoides de sufrir daños membranales por medio del suministro de lípidos y proteínas. Esto mismo ocurrió con la movilidad de los espermatozoides ya que disminuyo gradualmente con respecto al tiempo de almacenamiento en fresco y por efecto de las SUUV ya que actúan en os espermatozoides disminuyendo la movilidad y evitar así el desgaste energético, como sucede de manera *in vivo* en los túbulos de almacenamiento de espermatozoides en la unión útero vaginal.

Finalmente con el presente estudio podemos aportar información valiosa de los mecanismos celulares del almacenamiento de los espermatozoides en los túbulos de almacenamiento espermático de la unión útero vaginal, ya que aún no se conocen por completo estos mecanismos se plantea seguir investigando ya que al comprender los mecanismos celulares y moleculares en los espermatozoides de las aves podríamos proporcionar información sobre el desarrollo de métodos novedosos para el almacenamiento de espermatozoides a temperatura ambiente o corporal, lo cual sería beneficioso para la reproducción asistida, como la inseminación artificial y la fertilización *in vitro*. Además ayudar a la investigación sobre la formulación de diluyentes de espermatozoides de aves nuevos y efectivos, que llegaran hacer especie específicos.

## 10. REFERENCIAS

- ABAD, J. (2003). Reproducción e Incubación en Avicultura. Biblioteca de Avicultura. *Real Escuela de Avicultura. España.*
- Ahammad, M., Nishino, C., Tatemoto, H., Okura, N., Okamoto, S., Kawamoto, Y., & Nakada, T. (2013). Acrosome reaction of fowl sperm: Evidence for shedding of the acrosomal cap in intact form to release acrosome enzyme. *Poultry Science Association*, 798-803.
- Almaraz, G., & Alvarez, G. (2014). Panorama de la Industria Avícola a Nivel Mundial. *Los Avicultores y su Entorno*, 102: 102.
- Arenas, R. R. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS.*, 78, 5-11.
- Bakst, M. (2010). Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *Journal of animal*, 89: 1323-1329.
- Bakst, M. (2015). Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology*, 83: 1438-1444.
- Bakst, M., & Akuffo, V. (2007). Alkaline Phosphatase reactivity in the vagina and uterovaginal junction sperm-storage tubules of turkeys in egg production: implications for sperm storage. *British Poultry Science Journal*, 69: 248-253.
- Barbas, J., & Mascarenhas, R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10: 49-62.
- Bilcik, B. & Estevez, I. (2005). Impact of male-male competition and morphological traits on mating strategies and reproductive success in broiler breeders. *Applied Animal Behaviour Science*. 307-323.
- Bilcik, B., Estevez, I. & Russek-Cohen, E. (2005). Reproductive success of broiler breeders in natural mating systems: The effect of male-male competition, sperm quality and morphological characteristics. *Poultry Science Journal*. 1453-1462.
- Blanco, J., Gee, G., Wildt, D., & Donoghue, A. (2002). Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramaginal insemination approach. *Journal Zoo Wildlife Medical*, 33: 1-7.
- Blanco, J., Long, J., Gee, G., Wildt, D., & Donoghue, A. (2010). Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 123: 242-248.
- Blesbois, E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63: 213-222.



- Burrows, W., & Quinn, J. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science Journal*,16: 19-24.
- Calderón, C. G. (2015). Uso de los medios BPSE y LAKE, para la conservación seminal de Halcón Harris (Parabuteo unicinctus). *Tesis para obtener el grado en Maestría en Ciencias Agropecuarias*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Clements, J. (2007). The Clements Checklist of Birds of the World”,. (6. Edition., Ed.) *Cornell University Press*. Downloadable from *Cornell Lab of Ornithology*.
- Donoghue, A., & Wishart, G. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 213-232.
- Duchi, D. N., Almela, V. L., Peinado, R. B., & Poto, R. A. (2009). *Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana*. Recuperado el 10 Enero de 2017, de agroecologia.net:  
[http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae\\_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPREDSERVACION.pdf](http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPREDSERVACION.pdf)
- Estevez, I. & Neiker, T. (2015). Rasgos de fertilidad en machos reproductores. [En línea] Available at: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2765/rasgos-de-fertilidad-en-machos-reproductores-1/> consulta: 03 Noviembre 2016
- Etches, R. (1996). The male, En *Reproduction in poultry*, . Edited by *International, C. Cambridge. Ontario Canada, CAB International*, 208, 2033.
- Etches, R. (1998). *Reproducción aviar, Departament of animal and poultry science*. Acribia.
- Fernández, D. (1985). El complejo adivina-biotina y su uso en la biología molecular. *Interferón y biotecnología*(2), 137-141.
- FIRA. (2015). *Panorama Agroalimentario, avicultura carne 2015*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2015, de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61946/Panorama\\_Agroalimentario\\_Avicultura\\_Carne\\_2015.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61946/Panorama_Agroalimentario_Avicultura_Carne_2015.pdf)
- Freedman, S., Akuffo, V., & Bakst, M. (2001). Evidence for the innervation of sperm storage tubules in the oviduct for the turkey (Meleagris Gallopavo). *Reproduction*,121: 809-814.
- Froman, D. (2003). Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (gallus domesticus). *Biology Reproduction*,69: 248-253.

- Galina C, Valencia J, Saltiel A. 2010. Reproducción de los Animales Domésticos. Dpto. reproducción F.M.V y Z. U.N.A.M., México D.F.
- Gil, R. C. (2016). Reproducción de las aves. *Aves: Revista Digital Animales y Mascotas ISSN 2529-895X*.
- Herrera, B. J., Ávalos, R. A., Rodríguez, M. I., González, S. J., & Rosales, T. A. (2013). *Manual No. 41. Técnicas de Reproducción Asistida en aves Domésticas y Silvestres*. México, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
- Herrera, J., Betancourt, M., Quintana, J., & López, M. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives Andrology*, 51: 353-60.
- Horrocks A. Janet, Stewart Sarah, Jackson Lynn y Wishart Graham J (2000) Induction of Acrosomal Exocytosis in Chicken Spermatozoa by Inner Perivitelline-Derived N-linked Glycans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, 84-89. doi:10.1006/bbrc.2000.3766, available online at <http://www.idealibrary.com> on.
- Lake, P., & Ravie, O. (1984). An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science Journal*, 25: 145-150.
- Lange, G. d. (s.f.). *Pas Reform*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2016, de <https://www.pasreform.com/es/academia/perguntas-frecuentes/huevos-incubables/859-el-correcto-manejo-de-la-fertilidad-buenas-exhibiciones-de-aves-reproductoras.html>
- Lemoine M, D. J. (2009). Potential Involvement of Several Signaling Pathways in Initiation of the Chicken Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction*, 81: 657–665.
- Lemoine M., G. I. (2008). A reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction Science Journal*, 136, 391.
- Lemoine, M. S.-G. (2011). Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*, 75: 122-130.
- Long, D. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science Journal*, 85: 232-236.
- Long, J., & Conn, T. (2012). Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24hours. *Poultry Science Journal*, 91: 1990-1996.

- Mariaca, M. R. (2013). El conocimiento de la gallina (*Gallus gallus*) entre los tseltales y tsotsiles de los altos de Chiapas, México. *Etnobiología*, 11(1): 29 - 43.
- Marzesco A-M, W.-B. M., Janich, P., Langenfeld, K., Thiele, C., & al., e. (2009). Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol. *FEBS Lett*, 583, 897-902.
- Mei Matsuzaki, Shusei Mizushima, Yoshinobu Ichikawa, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba and Tomohiro Sasanami (2017). Effects of a Protein Kinase Inhibitor on Sperm Motility in the Japanese Quail. *Journal Poultry Science.*, 54: 73-79,
- Monroy, E., & Vargas, S. (2010). Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas. *Neumol Cir Tórax*, 4,69: 200-209.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ochoa F., Val D., Juárez A., Toscano I., Olivo I., Conejo J. (2014). Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo durante el proceso de criopreservación. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 4:123-125.
- Okumura, H., Kohno, Y., Iwata, Y., Mori, H., Aoki, N., Sato, C., . . . Matsuda, T. (2004). A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm-egg interaction. *Biochemical Journal*, 384: 191 - 199.
- Ortega, S. d., Ortiz, M. A., Castaño, M. V., Carmona, M. M., Gurria, T. F., Garcia, G. F., & Zuñiga, Q. V. (2014). *El sitio Avicola*. Recuperado en 20 enero de 2017. Obtenido de <http://www.elsitioavicola.com/articles/2613/produccion-avicola-mexicana-en-la-ultima-dacada/>
- Parker, H., Karaca, A., Yeatman, J., Frank, L., & McDaniel, C. (2002). Fertility of broiler breeders following categorization by the optibreed sperm quality index when hens inseminated with a constant number of sperm. *Poultry Science Journal*, 81: 239-245.
- Peláez J, Bongalhardo DC, Long JA. (2011). Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poultry Sci* 90: 435-443
- Peralta, M. F. (2016). *Bases de la Reproducción Aviar*. Universidad Nacional de Río Cuarto. Recuperado el 25 Enero de 2017, de researchgate.net: <https://www.researchgate.net/publication/304011245>
- Peralta, M. F., & Miazzi, R. (2002). Bases de la Reproducción animal: Reproducción Aviar. *El Sitio de la Producción Animal*, 1-11.

- Pukazhenthí, B., Pelican, K., Wildt, D., & Howard, J. (1999). Sensitivity of domestic cat sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biology Reproduction*, 61: 135-141.
- Pukazhenthí, B., Wildt, D., & Howard, J. (2001). The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal Reproduction Fertilization*, 57: 423-33.
- Purdy, P., Song, Y., Silversides, F., & Blackburn, H. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science Journal*, 88: 2184.
- Ricart MC, Breininger E, Rodríguez PC Beconi MT. (2015). Participation of membrane adenylyl cyclase in heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrología* 47:30-36
- Roldán, R. S., & Garde, J. J. (s.f.). *Bioteconología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción*. Recuperado el 20 Enero de 2017, de Los retos medioambientales del siglo XXI: [http://www.gebir.csic.es/descargas/Roldan\\_Garde\\_ReproTech\\_FBBVA.pdf](http://www.gebir.csic.es/descargas/Roldan_Garde_ReproTech_FBBVA.pdf)
- Ruiz, B., Concepción, G., Padilla, P., Martínez, G., & Díez, D. (2015). Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa*, 1407: 1-13.
- Sánchez, J. (2003). Acuaporinas: proteínas mediadoras del transporte de agua. *Colombia Medica*, 34: 220-227.
- Santiago MJ, Castaño C, Toledano DA, Coloma MA, López SA, Prieto TM, Campo LJ. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization freezing rate and equilibrium time. *Poultry Science* 90: 2047-2053
- Sasanami, T. M. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *The Journal of Reproduction and Development*, 59: 334.
- Secretaría de Agricultura, G. D. (2015). *Pollos, gallinas y la avicultura en México*. Recuperado en 10 noviembre de 2016, de [gob.mx: http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/pollos-gallinas-y-la-avicultura-en-mexico](http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/pollos-gallinas-y-la-avicultura-en-mexico)
- Sexton, T. (1977). New poultry semen extender. Effect of extension on fertility of chicken semen. *Poultry Science Journal*, 56: 1443-1446.
- Sexton, T. (1988). Comparison of diluents for holding turkey semen 24 hours at 5 °C. *Poultry Science Journal*, 67: 131-134.

- Tsien, R. (1989). Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part B: Quantitative fluorescence microscopy – Imaging and spectroscopy. *Taylor DL, Wang YL. New York: Academic Press*, 30: 127-156.
- Umapathy, G., Sontakke, S., Reddy, A., Ahmed, S., & Shivaji, S. ( 2005). Semen characteristics of the captive Indian white-backed vulture (*Gyps bengalensis*). *Biology Reproduction* , 1039–1045.

## Artículo científico

### Conservación espermática *in vitro* con secreciones del oviducto de *Gallus gallus*

<sup>1</sup>Vargas-Ibarra AK, <sup>2</sup>Avalos-Rodriguez A, <sup>2</sup>Rosales-Torres AM, <sup>2</sup>Rodríguez Hernández F, <sup>3</sup>Quintana-López JA, <sup>2</sup>Herrera-Barragán JA.

Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco: <sup>1</sup>Maestría en Ciencias Agropecuarias, <sup>2</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada de Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, México 04960. <sup>3</sup>UNAM, CU. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Dpto. Aves.

**Autor de correspondencia:** [jherrerab@correo.xoc.uam.mx](mailto:jherrerab@correo.xoc.uam.mx)

#### RESUMEN

En el oviducto de la gallina, se han identificado túbulos de almacenamiento espermático que mantienen la viabilidad espermática hasta por 15 semanas. El objetivo de este estudio fue evaluar los estados metabólicos de espermatozoides de gallo conservados *in vitro* con secreciones de la unión útero vaginal. Se utilizaron machos y hembras de raza Rhode Island. Se conservaron a 40 min, 6h y 24 h alícuotas espermáticas con medio Lake y con medio Lake suplementado con 10%, 30%, 60% y 90% de secreciones de la unión útero vaginal (UUV). Se realizó una evaluación espermática básica y se determinó el estado metabólico de los espermatozoides mediante la presencia y distribución de  $Ca^{2+}$ , utilizando Clortetraciclina y su capacidad de reacción acrosomal, mediante la co-incubación con membrana perivitelina (MPV) como inductor. Se determinó que la movilidad disminuye en espermatozoides conservados con suplemento de las secreciones de UUV a las 6h y 24h ( $P<0.05$ ) en comparación con 40min y semen recién eyaculado. El estado fisiológico de los espermatozoides mostró mayor porcentaje de descapacitación cuando se conservaron con secreciones de UUV ( $P<0.05$ ) a los 40 min, 6h y 24h en comparación con semen recién eyaculado. Con respecto a la capacidad de reacción acrosomal (RA), se observó de manera significativa un incremento ( $P<0.05$ ) en los porcentajes determinados en espermatozoides co-incubados con MPV, en todos los tratamientos con diferente porcentaje de secreciones de UUV. Se concluye que las secreciones de UUV indujeron cambios fisiológicos en los espermatozoides proporcionando un proceso de descapacitación, que puede incrementar la viabilidad espermática *in vitro*.

**Palabras claves:** Acrosoma, gallina, semen, túbulos.

## INTRODUCCIÓN

En las aves, aun no es claro cuál es el mecanismo de los túbulos almacenadores de espermatozoides (SST) (Bakst, 2010; Sasanami, 2013). Se ha reportado que en los SST, los espermatozoides se almacenan con viabilidad y capacidad fertilizante hasta por 15 semanas (Sasanami, 2013). Sin embargo se sabe poco sobre los mecanismos celulares o bioquímicos específicos implicados en la capacidad de almacenamiento espermático (Bakst, 2007); también se desconoce la condición fisiológica del espermatozoide, la cual es posible que pueda compararse con una condición de descapitación espermática sugerida por Bakst en el 2015. Se ha propuesto que los espermatozoides en los SST metabolizan de manera endógena ácidos grasos u otros lípidos derivados de las microvellosidades apicales de los SST (Bakst, 2010; Long, 2012; Sasanami, 2013). Bakst en el 2015, examinó el origen de microvellosidades (MVBs) en la punta apical de las células epiteliales de los SST, y su posible papel en la supervivencia de los espermatozoides, reporta que las MVBs suministran lípidos y proteínas utilizados por los espermatozoides residentes, que sirven para suprimir funciones posiblemente asociadas a la capacitación espermática y su capacidad fertilizante, además de estabilizar el plasmalema del espermatozoide y que actúa como vesículas de transporte del líquido de las células epiteliales de los SST al lumen (Bakst, 2015; Freedman, 2001; Marzesco *et al.*, 2009). Por otra parte, se sabe que los fosfolípidos están involucrados en la maduración de los espermatozoides y su motilidad. En particular, con su alto contenido de colesterol, se han propuesto para inhibir la capacitación, por lo cual se sugiere que el espermatozoide sufre un proceso de descapitación espermática y posteriormente puede capacitarse para lograr una reacción acrosomal asociada a su capacidad fertilizante (Bakst, 2015; Long, 2012). Por lo tanto las secreciones de la unión útero vaginal (UUV) de los SST es posible que *in vitro* causen cambios fisiológicos en el espermatozoide, incrementando los parámetros de descapitación para mantener su viabilidad. El objetivo de este estudio fue evaluar los estados metabólicos de espermatozoides de gallo conservados *in vitro* con secreciones de UUV.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Aves**

Para la obtención de semen y secreciones de la unión útero vaginal, se utilizaron 5 machos y 5 hembras de la raza Rhode Island de 32 semanas de edad, clínicamente sanos. Proporcionando alimento de acuerdo al National Research Council (NRC, 1984) y agua *ad libitum*. Se mantuvieron con fotoperiodo de 14 h luz y 10 h de oscuridad. Se cumplió con las normas oficiales de bienestar animal (NOM-062-ZOO-1999).

### **Obtención de semen y secreciones de la unión útero vaginal**

La obtención de los eyaculados se realizó mediante la técnica de masaje dorso ventral (Burrows y Quinn, 1937). El semen fue recolectado haciendo una dilución 1:3 con medio Lake, el cual contiene Glutamato de sodio, 0.46 M; acetato de sodio, 1.86 M; Fructosa, 22.2 M; Acetato de potasio, 25.47 M, con pH 7.0 y Osmolaridad de 7.1 (Lake y Ravie, 1984). Las secreciones de la unión útero vaginal se obtuvieron mediante un lavado interno con sonda de la unión útero vaginal con 3 ml del medio Lake, para recuperar 2 ml de este, se recolectó en un tubo falcón a 5°C (Sasanami, 2013).

### **Conservación espermática *in vitro***

Alícuotas de un pool seminal integrado con semen de cinco gallos con  $100 \times 10^6$  de espermatozoides en 500  $\mu$ l de medio Lake fueron conservadas a 5°C en las siguientes condiciones de estudio: Semen conservado en medio Lake que mantiene la capacitación espermática y que fue considerado como control del estudio. Semen conservado con 10%, 30%, 60% y 90%, de inclusión de las secreciones de UUV como condición de descapacitación espermática y para determinar la capacidad de reacción acrosomal se compararon los parámetros de RA en cada alícuota antes y después de su co-incubación con MPV

Se realizaron 25 evaluaciones de cada alícuota, en semen recién recolectado, a los 40 min, como tiempo de capacitación, y posteriormente a las, 6 y 24 horas que son tiempos aceptables para el uso de semen fresco en la inseminación artificial (Herrera *et al.*, 2005 y Santiago *et al.*, 2011).



## **Evaluación espermática básica**

En todas las alícuotas y en las diferentes condiciones y tiempos de conservación se determinó: The percentage of sperm with straight progressive motility in 10 µl semen aliquots was estimated by microscopy (OLYMPUS BX51) with a 40x objective (Herrera et al 2005, Ricart et al 2015). Moreover, sperms of a 10-µL-aliquots were stained with eosin-nigrosin (QCA, 996518, USA) and 100 spermatozoa from each simple were analysed using an optical microscope (OLYMPUS BX51) with a 100x objective to determine the percentage of live sperm (Blanco et al 2008, 2012 Ricart *et al* 2015).

## **Espermatozoides con capacitación, descapacitación y reacción acrosomal**

The pattern of the capacitation, descapacitation and AR of the sperm was determined in all the alícuotas (Ochoa et al 2014, Ricart et al 2015), using aliquots of  $5 \times 10^6$  sperm, which were incubated with 0.9 M chlortetracycline (CTC) in the dark at 38 °C (Lemoine *et al* 2011, Herrera *et al* 2017). For all conditions, aliquots were adjusted to 50 µL with the Lake diluents with or without PVL (20 µg) obtained from fresh egg of hen after removing the vitelo by washing with Lake medium, and incubated for 30 min. Then, 25 µL of CTC were added, and the mixture was incubated for 10 min (Lemoine et al 2008). After the incubation period in all experiments, slides were prepared to observe the samples under an Olympus BX51 fluorescence microscope with a 100x objective (488 nm excitation and > 560 nm emission). Image analysis was performed using the Image-Pro Plus software, version 6.2.1. Two hundred sperm per preparation were counted to determine the proportion of sperm that underwent an capacitation, descapacitation and AR (Ochoa et al 2014).

## **Análisis Estadístico**

Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para normalidad de los datos, se obtuvieron en cada evaluación porcentajes y fueron expresados como medias  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Se realizó una prueba de Tukey para la diferencia de medias. En los casos donde los datos no se pudieran modelar de forma normal se utilizó una prueba de Kruskal Wallis. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa estadístico PAleontological STatistics (PAST) Versión 3.18.

## **RESULTADOS**

### **Evaluación seminal básica.**

La movilidad espermática mostró porcentajes diferentes al comparar entre el tiempo de conservación o el porcentaje de suplemento utilizado de secreciones de UVV (Tabla 1). Al evaluar la movilidad espermática en cada tiempo de conservación (0 min, 40 min, 6 h o 24 h), no se observaron diferencias ( $P>0.05$ ), entre cada uno de los porcentajes de suplementación con secreciones UVV. Al comparar entre los diferentes tiempos de conservación, se observó a las 6h que los porcentajes de movilidad espermática disminuyeron ( $P<0.05$ ) en todas las alícuotas independientemente del porcentaje de suplemento con secreciones de UVV; en alícuotas conservadas hasta 24 h, con porcentajes del 30%,60% y 60% de secreciones de UVV la movilidad espermática disminuyo ( $P<0.05$ ) en mayor porcentaje.

Con respecto a los porcentajes de espermatozoides vivos, se observó comportamiento similar en las alícuotas conservadas sin suplementar y con 30 % y 60 % de secreciones de UVV, y de manera similar en alícuotas conservadas con 10 % y 90 % de secreciones de UVV. (Tabla 2). El porcentaje de espermatozoides vivos en cada tiempo de conservación (0 min, 40 min, 6 h o 24 h), no fue diferente ( $P>0.05$ ), entre cada uno de las alícuotas suplementadas con diferente porcentaje de secreciones de UVV. Sin embargo al comparar entre los diferentes tiempos de conservación, se observó en alícuotas sin suplemento y con 30% y 60 de secreciones de UVV una disminución ( $P<0.05$ ) en el porcentaje de espermatozoides vivos a los 40 min de conservación y el cual fue en mayor porcentaje ( $P<0.05$ ) a las 24 h de conservación; por otra parte en alícuotas con 10 % y 90 % de suplemento con secreciones de UVV, el porcentaje de espermatozoides vivos fue similar ( $P>0.01$ ) durante todos los tiempos de conservación.

### **Estados fisiológicos del espermatozoide**

En semen conservado con medio Lake, el porcentaje de espermatozoides con descapacitación, mostró una disminución aproximada del 30 % entre los porcentajes al tiempo cero minutos (T0) y hasta las 24h de conservación, encontrando diferencias ( $P<0.05$ ) en los porcentajes de espermatozoides conservados y suplementados con diferentes porcentajes de inclusión de secreciones de UVV. Por el contrario, cuando el semen fue co-incubado con MPV, con excepción del 32 % de espermatozoides

capacitados al T0, en todas las demás alícuotas, los porcentajes de descapacitación con un rango entre el 11 % y el 17 % no presentaron diferencias ( $P>0.05$ ). El porcentaje de espermatozoides capacitados que fueron conservados en medio Lake, mostró un rango entre 30% a 40%, no presentaron diferencia ( $P>0.05$ ) entre ninguna alícuota. En espermatozoides co-incubados con MPV el rango de espermatozoides capacitados de manera numérica fue ligeramente inferior entre 25 % a 35 % sin presentar diferencia ( $P>0.05$ ) entre ninguna alícuota. En espermatozoides conservados en medio Lake, se observó de manera evidente una tendencia a incrementar los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal en función del tiempo y de manera independiente del suplemento de secreciones de UUV, se observó porcentajes menores al 7%, en semen fresco y después de 24h se determinaron porcentajes superiores al 37% mostrando diferencia entre ellos ( $P<0.05$ ). De manera contraria, en semen co-incubados con MPV, se encontró 55% aproximadamente de espermatozoides con RA en porcentajes similares ( $P>0.05$ ), a los 40min, 6h y 24h. En semen que no se suplemento con secreciones de UUV, se encontró espermatozoides con 37% de RA al T0, con diferencia ( $P<0.05$ ) al 50% determinado en las demás alícuotas co-incubadas con MPV (Figura1).

## **DISCUSIÓN**

### **Evaluación espermática básica.**

Los porcentajes de movilidad en espermatozoides conservados con secreciones de UUV fueron menores en comparación con los espermatozoides conservados en medio Lake sin presencia de las secreciones de UUV, lo cual evidencia *in vitro* el efecto de las secreciones de UUV, para disminuir la movilidad de los espermatozoides como se ha observado que sucede de manera *in vivo* en los túbulos de almacenamiento de espermatozoides en la unión útero vaginal, lo cual fue reportado por Sasanami, *et al.*, 2013 y Bakst *et al.*, 2015, que reportan que los espermatozoides almacenados en los SST son típicamente inmóviles y por lo tanto se cree que es metabólicamente quiescente es decir que se encuentran inactivos como resultado del consumo de ATP rebajado. Matsuzaki, *et al.*, 2017 asegura que aunque se desconoce el mecanismo subyacente al transporte de espermatozoides a los SST, se informa que se requiere una movilidad espermática vigorosa para la invasión de espermatozoides en los SST. Sin embargo, una vez que los espermatozoides han ingresado en los SST, se vuelven

inactivos en términos de movilidad por posibles mecanismos desconocidos y se almacenan hasta su uso para la fertilización. Lo anterior mencionado concuerda con lo obtenido en este estudio ya que en los espermatozoides conservados en medio Lake el porcentaje de movilidad disminuyó de un 72% hasta un 20%, esto puede estar influido por el suministro de lípidos de los SST a los espermatozoides durante su almacenamiento. Froman y Rhoads (2013) afirmaron que los ácidos grasos endógenos de cadena larga estimulan la movilidad de los espermatozoides dentro de la vagina, mientras que los ácidos grasos exógenos de cadena larga apoyan la movilidad de los espermatozoides dentro de la luz de la SST.

Los porcentajes de espermatozoides vivos disminuyeron en función del tiempo de conservación *in vitro*, sin embargo se mantuvieron en rangos aceptables por arriba del 90% en espermatozoides conservados con medio Lake y cuando se suplementaron con los diferentes porcentajes de secreciones de UUV. Lo anterior es acorde a lo reportado por Sasanami en el 2013, que investigaron el mecanismo de almacenamiento de los espermatozoides en la codorniz japonesa; donde se prepararon extractos de UUV con espermatozoides, se incubaron en presencia o ausencia de los extractos de UUV; donde la adición de extractos de UUV extendió la vida útil de los espermatozoides *in vitro*.

### **Fisiología espermática**

El hallazgo que destacan los parámetros encontrados en nuestro estudio, demuestra, que los espermatozoides pueden inhibir su movimiento o hiper-activación como resultado *in vitro* de la adición de sustancias descapacitantes presentes en las secreciones de UUV o por el contrario de manera reversible inducir el movimiento o hiper-activarse como consecuencia de una capacitación *in vitro*. Se ha reportado en otras especies que los procesos de inhibición o hiperactivación del movimiento suceden durante la maduración espermática en el tracto reproductor de los machos, en los cuales se identifican estructuras de almacenamiento espermático como el epidídimo, en el cual se ha descrito la descapacitación espermática por efecto de sustancias como sustratos metabólicos (lípidos, glucosa, lactato y glicerol) y mecanismos de autorregulación como baja tensión de oxígeno, baja presión osmótica y reducida concentración extracelular de  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $HCO_3^-$  (Flores y Vilanova, 2015). Lo anterior es respaldado por el reporte de Bakst en el 2015, quien sugiere que las microvellosidades de los SST suministran sustratos metabólicos y

macromoléculas exógenas para suprimir de forma reversible las funciones espermáticas asociadas con la fertilización siendo una posible descapitación; Sugiere que los espermatozoides en los SST sufren una supresión reversible de la actividad metabólica, motilidad, y capacidad de RA. Nuestro estudio demuestra que las secreciones de UUV pueden inhibir *in vitro* la capacitación espermática de manera viable que ante un inductor natural como la MPV, estos espermatozoides descapitados pueden capacitarse y lograr parámetros de RA aceptables.

Con respecto a los parámetros de RA *in vitro*, se demostró que en medio Lake suplementado con secreciones de UUV, los parámetros de RA, son inversamente proporcionales a los parámetros de espermatozoides descapitados y que la viabilidad de estos, se demuestra después de su co-incubación con MPV, que induce porcentajes de RA, superiores a los determinados en los espermatozoides conservados en medio Lake y de manera homogénea en todas las alícuotas conservadas con secreciones de UUV y co-incubadas con MPV. Lo anterior coincide con lo reportado por Bakst y Akuffo (2007) quienes describieron la posibilidad de que los espermatozoides dentro de los SST se encuentren en un estado de descapitación y alcancen un estado capacitado cuando se liberan de los SST y entran en el útero, se puede asociar un alto contenido de colesterol, que al fusionarse con los espermatozoides puede inhibir la capacitación. Matsuzaki y colaboradores en el 2017 mencionan que los oligosacáridos aislados de las glicoproteínas de la MPV de gallina son capaces de inducir la reacción acrosómica en los espermatozoides de gallo. Sugieren que el factor inductor de la reacción acrosómica es probablemente un oligosacárido ligado a N con residuos terminales de N-acetil-glucosamina, el ácido siálico, manosa, glucosa, como parte de las glicoproteínas de reconocimiento gamético. También han reportado que la progesterona y otras sustancias como medio salino simple que contenga sólo  $Ca^{2+}$ , pueden inducir la RA (Lemoine *et al.*, 2011).

## CONCLUSIONES

Es posible inducir *in vitro* estados de descapacitación y capacitación espermática con el uso de las secreciones de UUV, de los cuales pueden demostrarse su viabilidad mediante la inducción de la RA, ya que es necesario que demuestren la capacidad fertilizante *in vivo*. Este estudio aporta información de los estados metabólicos de los espermatozoides durante su conservación *in vitro*, los cuales pueden estar asociados a los procesos de la unión útero vaginal; se plantea seguir investigando los mecanismos celulares en espermatozoides de aves y así proporcionar información sobre el desarrollo de medios de conservación mayormente eficaces para el almacenamiento de espermatozoides.

## REFERENCIAS

- Bakst, M., y Akuffo, V. (2007). Alkaline Phosphatase reactivity in the vagina and uterovaginal junction sperm-storage tubules of turkeys in egg production: implications for sperm storage. *British Poultry Science Journal*, 69: 248-253.
- Bakst, M. (2010). Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *Journal of animal*, 89: 1323-1329.
- Bakst, M. (2015). Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology*, 83: 1438-1444.
- Burrows, W., y Quinn, J. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science Journal*, 16: 19-24.
- Flores C. y Vilanova L. (2015). Metabolismo espermático. Gaceta de Ciencias Veterinarias Vol 20 N° 1 pp 23-32.
- Freedman, S., Akuffo, V., y Bakst, M. (2001). Evidence for the innervation of sperm storage tubules in the oviduct for the turkey (*Meleagris Gallopavo*). *Reproduction*, 121: 809-814.
- Froman D. y Rhoads D. (2013). Breeding and genetics symposium: A systems biology definition for chicken semen quality. *Journal of Animal Science*, Volume 91, 1: 523–529. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5681>
- Herrera, J., Betancourt, M., Quintana, J., y López, M. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives Andrology*, 51: 353-60.

- Herrera, JA., Calderón, G., Guzmán, A., Varga, AK., Ávalos, A. and Rosales AM. (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
- Lake, P., & Ravie, O. (1984). An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science Journal*, 25: 145-150.
- Lemoine, M. S.-G. (2011). Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*, 75: 122-130.
- Long, J. y Conn, T. (2012). Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24hours. *Poultry Science Journal*, 91: 1990-1996.
- Marzesco A-M, W.-B. M., Janich, P., Langenfeld, K. y Thiele, C. (2009). Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol. *FEBS Lett*, 583: 897-902.
- Matsuzaki Mei, Shusei Mizushima, Yoshinobu Ichikawa, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba and Tomohiro Sasanami (2017). Effects of a Protein Kinase Inhibitor on Sperm Motility in the Japanese Quail. *Journal Poultry Science.*, 54: 73-79.
- National Research Council. 1984. Nutrient Requirements of Poultry, Eighth Revised Edition. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ochoa F., Val D., Juárez A., Toscano I., Olivo I. y Conejo J. (2014). Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo durante el proceso de criopreservación. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 4:123-125.
- Ricart MC, Breininger E, Rodríguez PC. y Beconi MT. (2015). Participation of membrane adenylyl cyclase in heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrología* 47:30-36
- Santiago MJ, Castaño C, Toledano DA, Coloma MA, López SA, Prieto TM y Campo LJ. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization freezing rate and equilibrium time. *Poultry Science* 90: 2047-2053
- Sasanami, T. M. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *The Journal of Reproduction and Development*, 59: 334.

**Tabla 1.** Porcentajes de movilidad en espermatozoides conservados en medio suplementado con EUUV.

% SUUV	Tiempo de conservación			
	Suplementado 0 min	40 min	6 h	24 h
	$\bar{X} \pm EE$			
0 %	72 ± 1.2 <sup>a1</sup>	67 ± 4.6 <sup>a1</sup>	41 ± 7.1 <sup>a2</sup>	31 ± 5.5 <sup>a2</sup>
10%	71 ± 1.8 <sup>a1</sup>	55 ± 7.0 <sup>a1</sup>	46 ± 8.2 <sup>a1,2</sup>	26 ± 7.3 <sup>a2</sup>
30%	69 ± 1.0 <sup>a1</sup>	55 ± 5.2 <sup>a1,2</sup>	44 ± 5.0 <sup>a2</sup>	23 ± 5.1 <sup>a3</sup>
60%	72 ± 2.0 <sup>a1</sup>	67 ± 3.3 <sup>a1</sup>	50 ± 5.4 <sup>a2</sup>	26 ± 4.0 <sup>a3</sup>
90%	69 ± 3.3 <sup>a1</sup>	56 ± 4.0 <sup>a1,2</sup>	41 ± 6.4 <sup>a2</sup>	20 ± 3.1 <sup>a3</sup>

Al comparar porcentajes entre diferente columna en la misma hilera, diferente número (1, 2, 3), o en diferente hilera en la misma columna, distinta literal (a, b) indica diferencia estadística (P<0.05).

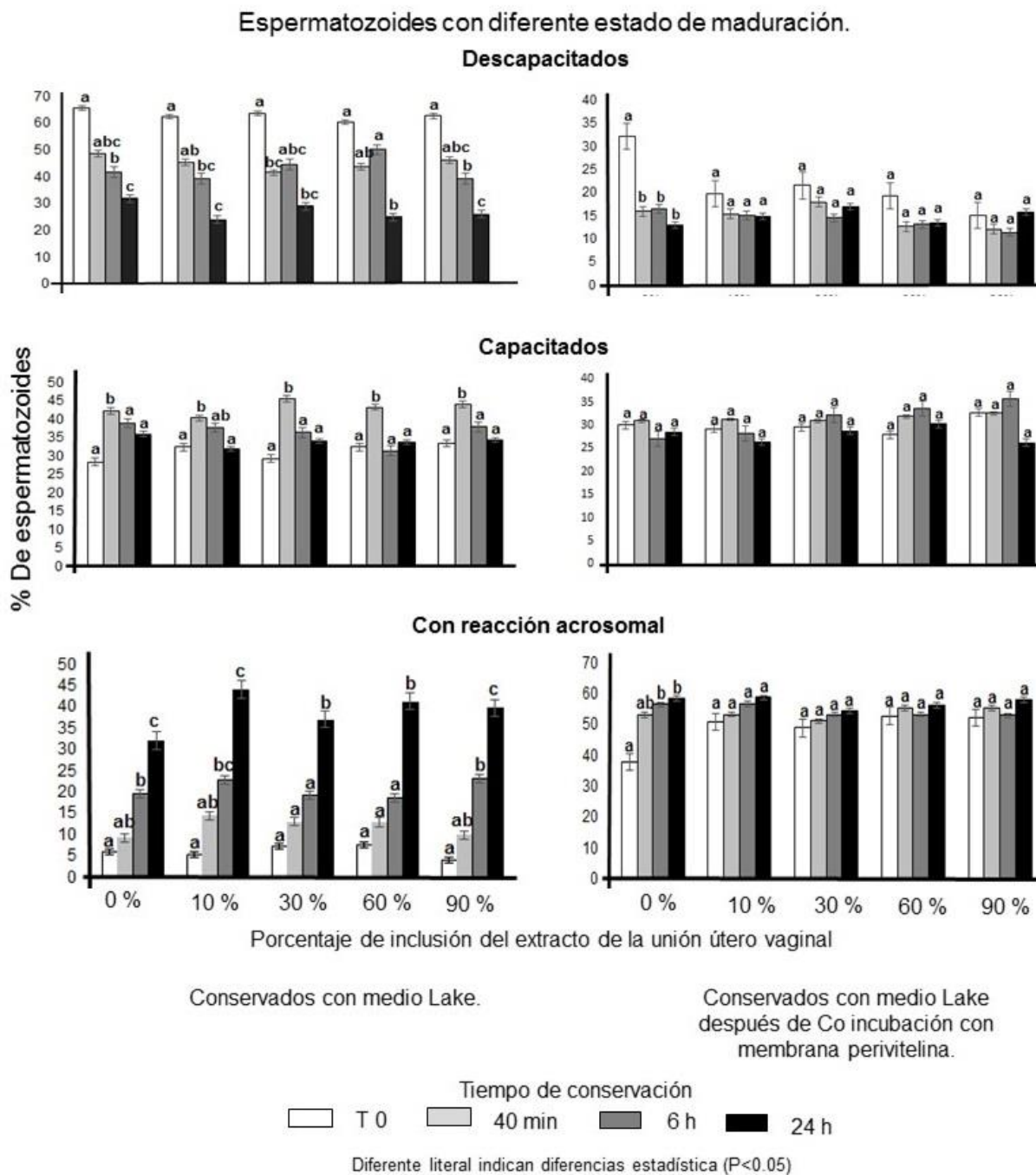
**Tabla 2.** Porcentajes de espermatozoides vivos conservados en medio suplementado con EUUV.

% SUUV	Tiempo de conservación			
	Suplementado 0 min	40 min	6 h	24 h
	$\bar{X} \pm EE$			
0 %	98.6 ± 0.7 <sup>a1</sup>	96.0 ± 0.9 <sup>a1,2</sup>	94.2 ± 1.3 <sup>a2</sup>	94.4 ± 0.6 <sup>a2</sup>
10%	97.4 ± 0.6 <sup>a1</sup>	96.0 ± 0.6 <sup>a1</sup>	93.8 ± 1.3 <sup>a1</sup>	94.8 ± 1.2 <sup>a1</sup>
30%	98.2 ± 0.6 <sup>a1</sup>	97.0 ± 0.7 <sup>a1,2</sup>	94.0 ± 0.7 <sup>a2,3</sup>	91.6 ± 1.2 <sup>a3</sup>
60%	97.6 ± 0.8 <sup>a1</sup>	95.8 ± 0.7 <sup>a1,2</sup>	89.4 ± 4.6 <sup>a2</sup>	92.0 ± 1.7 <sup>a2</sup>
90%	97.4 ± 1.2 <sup>a1</sup>	91.0 ± 3.4 <sup>a1</sup>	93.4 ± 1.7 <sup>a1</sup>	94.6 ± 1.4 <sup>a1</sup>

Al comparar porcentajes entre diferente columna en la misma hilera, diferente número (1, 2, 3), o en diferente hilera en la misma columna, distinta literal (a, b) indica diferencia estadística (P<0.05).



Figura 1. Espermatozoides conservados *in vitro* en los diferentes estados fisiológicos.



## PUBLICACIONES



*Austral J Vet Sci* 49, 39-43 (2017)

SHORT COMMUNICATION

### Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved semen of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*)

José A. Herrera<sup>a\*</sup>, Gustavo Calderón<sup>b</sup>, Adrián Guzmán<sup>a</sup>, Ana K. Vargas<sup>a</sup>,  
Alejandro Ávalos<sup>a</sup>, Ana M. Rosales<sup>a</sup>

**ABSTRACT.** Seminal storage, both fresh and cryopreserved, has contributed to the reproduction of wild birds in captivity, however, a method of predicting the fertilization capacity is needed. Indicators of the sperm acrosome reaction (AR) have been associated with its fertilization capacity. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* AR of fresh and cryopreserved Harris hawk sperm using Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) and Lake as diluents. 64 ejaculates were obtained and examined fresh and after thawing. The sperm basic evaluation for each ejaculate was made using eosin-nigrosin, while the ability of AR was assessed by co-incubation with perivitelline layer (PVL). Sperm motility of fresh semen was higher ( $P<0.05$ ) in fresh semen in BPSE ( $37.9\pm 1.7$ ) than in Lake ( $30.9\pm 1.7$ ) diluent. However, the motility decreased ( $P<0.05$ ) in both diluents after thawing. For fresh semen, the percentage of sperm that underwent an AR without incubation with PVL was higher ( $P<0.05$ ) with BPSE ( $14.1\pm 1.7$ ) than with Lake ( $6.8\pm 2.5$ ) diluent, however, AR was similar between tow diluents ( $P>0.05$ ) after thawing. The percentage of sperm that underwent an AR when incubated with PVL post thawing in Lake ( $45.4\pm 2.7$ ) was lower ( $P<0.05$ ) than that of fresh semen ( $55.3\pm 3.1$ ), whereas there were no differences ( $P>0.05$ ) with BPSE. It is concluded that Lake diluent was more efficient for fresh seminal storage, while BPSE diluent was more efficient for seminal cryopreservation in Harris hawk.

**Keywords:** acrosome, cryopreservation, sperm.

**RESUMEN.** El almacenamiento seminal *in vitro* ha contribuido a la reproducción de aves silvestres en cautiverio. Sin embargo es necesario predecir su capacidad fertilizante. Los indicadores de reacción acrosomal (RA) espermática se han relacionado con su capacidad fertilizante. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de reacción acrosomal *in vitro* en espermatozoides de halcón Harris, conservados en fresco y criopreservados. Se obtuvieron 64 eyaculados, los cuales fueron evaluados en fresco y posdescongelación, 32 se diluyeron con medio *Beltsville Poultry Semen Extender* (BPSE) y 32 utilizando medio Lake. Se evaluaron 64 eyaculados en fresco y posdescongelación; para la evaluación espermática básica se utilizó la tinción de eosina-nigrosina, y capacidad de RA fue mediante su inducción con membrana perivitelina (MPV). La movilidad espermática en semen fresco fue mayor ( $P<0,05$ ) cuando se usó el medio BPSE ( $37,9\pm 1,7$ ) en comparación con el medio Lake ( $30,9\pm 1,7$ ). Sin embargo, la movilidad en ambos diluyentes disminuyó ( $P<0,05$ ) posdescongelación. En semen fresco, el porcentaje de RA sin incubar con MPV fue mayor ( $P<0,05$ ) con medio BPSE ( $14,1\pm 1,7$ ) al porcentaje con medio Lake ( $6,8\pm 2,5$ ). En semen descongelado los promedios de RA fueron similares ( $P>0,05$ ). El porcentaje de espermatozoides con RA en el medio Lake, incubados con MPV posdescongelación ( $45,4\pm 2,7$ ), fue menor ( $P<0,05$ ), comparado en fresco ( $55,3\pm 3,1$ ). Se concluye que el diluyente Lake fue más eficaz para la conservación en fresco y el diluyente BPSE para la criopreservación seminal de halcón Harris.

**Palabras clave:** acrosoma, criopreservación, espermatozoide.

**Selección de Machos  
por Conformación  
de Pechuga**

**Metapneumovirus  
Aviar**  
Experiencia desde  
2014 en México

**Programas de  
Vacunación vs IA**  
Evaluación Epidemiológica



**Dra. Ana Karen Vargas Ibarra.**  
Maestría en Ciencias Agropecuarias



**Dr. José Antonio Herrera.**  
Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción  
Departamento de Producción Agrícola y Animal  
Correo: jherrab@correo.uca.mx

**Calderón CD.**  
Maestría en Ciencias Agropecuarias

**Avales RA.**  
Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción,  
Departamento de Producción Agrícola y  
Animal

**Camarrillo PR.**  
Maestría en Biología de la Reproducción,  
Animal, Universidad Autónoma Metropolitana

**Quintana LJA.**  
Departamento de Aves, Facultad de Medicina  
Veterinaria y Zootecnia, UNAM

## EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL EN LOS ESPERMATOZOIDES del Gallo

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad la avicultura de especies domésticas no se puede concebir sin la aplicación de conocimientos y tecnologías innovadoras de reproducción asistida. Esto incluye la inseminación artificial, con semen fresco, diluido o criopreservado, y la fertilización *in vitro* de óvulos. Una técnica utilizada de manera esencial es la obtención de semen, se realiza mediante varias técnicas, que abarcan desde el electro-eyaculación, eyaculación voluntaria y eyaculación por masaje dorso ventral, esta última técnica propuesta por Burrows y Quinn 1937 para aves domésticas (Figura 1).

En la industria avícola como en la ganadería, el uso de estas técnicas presenta ventajas como es el mantenimiento y reproducción de líneas puras (Herrera y col., 2013). Para lograr lo anterior es necesario conocer la biología reproductiva de cada especie y su manipulación *in vitro* e *in vivo*.

### BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

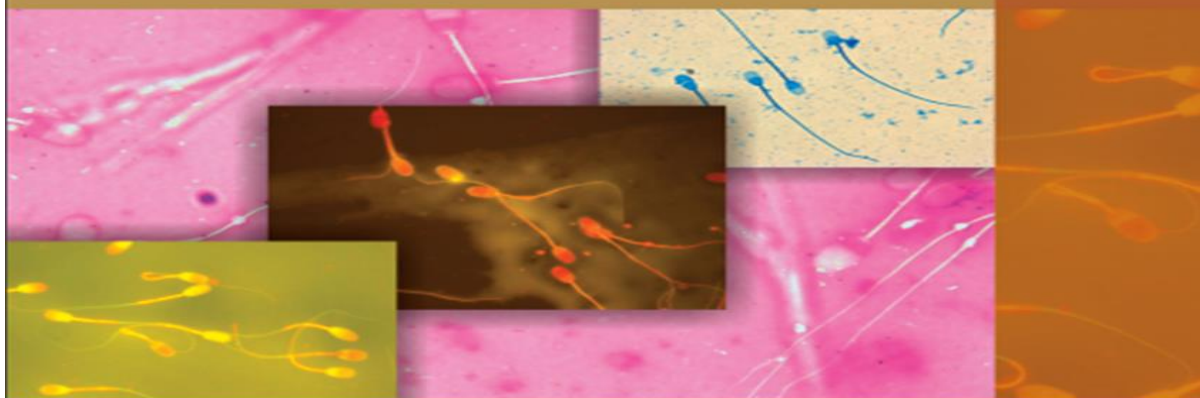
Las aves han desarrollado un comportamiento reproductor más complejo que la mayoría de los vertebrados. Se reproducen mediante fecundación interna y ovopositan sus huevos provistos de una cubierta calcárea dura denominada cascarrón (Cárdenas, 2004). En las aves domésticas se inicia el apareamiento con el cortejo y la frecuencia de apareamiento regularmente en el día. Los gallos pueden copular de 10 a 30 veces, dependiendo la disponibilidad de las gallinas y la competencia de otros gallos.



# Recolección y manipulación seminal

CBS 54

*in vitro*



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



9 776607 0 15994

Alejandro Ávalos Rodríguez  
Jorge Antonio González Santos  
Ana Karen Vargas Ibarra  
José Antonio Herrera Barragán

# Recolección y manipulación seminal

---

## *in vitro*

Alejandro Ávalos Rodríguez | Jorge Antonio González Santos  
Ana Karen Vargas Ibarra | José Antonio Herrera Barragán



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## CONGRESOS



### CONGRESO INTERNACIONAL CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE VIDA SILVESTRE

Otorga la presente

## Constancia

Al:

*C. José Antonio Herrera B., Ana Karen Vargas I., Rocío A. López Z., Samantha A. Carcoba P., Alejandro Avalos R., Ana M. Rosales Torres., Jorge A. González S.*

*Por su participación en modalidad de CARTEL con el tema "HEMATOLOGIA DE AVES RAPACES NOCTURNAS EN CAUTIVERIO" realizado en la Universidad Autónoma Chapingo el día 16 de noviembre de 2016.*

*Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre*

Dra. Elvia López Pérez  
Comité Organizador

Dr. Antonio Vázquez Alarcón  
Director del Departamento de Suelos



### CONGRESO INTERNACIONAL CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE VIDA SILVESTRE

Otorga la presente

## Constancia

Al:

*C. Sara E. Mora V., B. Aidee Soriano A., Ana K. Vargas I., Rocío A. López Z., Alejandro Avalos R., Jorge A. González S., Samantha A. Carcoba P.*

*Por su participación como PONENTE con el tema "EXPECTATIVA SOCIAL DE LA COTORRA ARGENTINA (Myiopsitta monachus) EN LA CIUDAD Y ZONA METROPOLITANA" realizado en la Universidad Autónoma Chapingo, el día 16 de noviembre de 2016.*

*Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre*

Dra. Elvia López Pérez  
Comité Organizador

Dr. Antonio Vázquez Alarcón  
Director del Departamento de Suelos



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

Otorgan la presente

**CONSTANCIA**

A


José Antonio Herrera Barragán, Ana Karen Vargas Ibarra,  
Ricardo Camarillo Flores, Fernanda Rodríguez Hernández,  
Samantha Anahí Cárcoba Pérez

Por su participación en la Segunda Reunión  
Científica Interinstitucional sobre Diversidad  
Biológica.

Con el cartel: **¿Acciones para la conservación?**

Ciudad de México, 26 de mayo de 2017.

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

  
M. en C. Dorys P. Orea Coria  
Presidenta del  
Comité Organizador



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

Otorgan la presente

**CONSTANCIA**

A

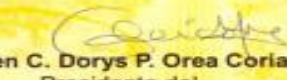
José Antonio Herrera Barragán, Ana Karen Vargas Ibarra,  
Ricardo Camarillo Flores. Fernanda Rodríguez Hernández,  
Samantha Anahí Cárcoba Pérez

Por su participación en la Segunda Reunión  
Científica Interinstitucional sobre Diversidad  
Biológica.

Con el cartel : **¿Conservación de psitácidos mexicanos?**

Ciudad de México, 26 de mayo de 2017.

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

  
M. en C. Dorys P. Orea Coria  
Presidenta del  
Comité Organizador





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

*División de Ciencias Biológicas y de la Salud*

*Otorga la presente*

*Educación  
Continua  
ECCBS*

## CONSTANCIA

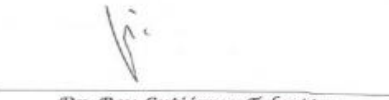


FOLIO 1975-17  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN  
AGRÍCOLA Y ANIMAL

**A:** Ana Karen Vargas Ibarra, Estefany Brenda Nochebuena Aguilar, Itzel Andrea Marín Tapia, Ana María Rosales Torres, Fernanda Rodríguez Hernández, Ricardo Camarillo Flores y José Antonio Herrera Barragán

Por participar con la presentación del cartel: "Extractos de la unión útero vaginal utilizados para la criopreservación espermática de Gallus gallus." en el "6° CONGRESO Y 2ª FERIA TÉCNICO-CIENTÍFICA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL 2017" realizado en esta Universidad del 18 al 20 de octubre de 2017 con duración de 24 horas.

  
Mtro. Rafael Díaz García  
Director  
División CBS

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

*División de Ciencias Biológicas y de la Salud*

*Otorga la presente*

*Educación  
Continua  
ECCBS*

## CONSTANCIA

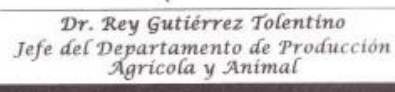


FOLIO 2033-17  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN  
AGRÍCOLA Y ANIMAL

**A:** Ricardo Camarillo Flores, Irma Jiménez Morales, Adrián Guzmán Sánchez, José Antonio Herrera Barragán, Ana María Rosales Torres, Prisma Itzel Navarro Guido, Fernanda Rodríguez Hernández, Ana Karen Vargas Ibarra y Samantha Anahí Cárcoba Pérez

Por participar con la presentación del cartel: "Densidad del líquido oviductal a diferentes horas de la ovoposición en gallinas de postura" en el "6° CONGRESO Y 2ª FERIA TÉCNICO-CIENTÍFICA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL 2017" realizado en esta Universidad del 18 al 20 de octubre de 2017 con duración de 24 horas.

  
Mtro. Rafael Díaz García  
Director  
División CBS

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

OK



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Otorga la presente

Educación  
Continua  
ECCBS

CONSTANCIA

A: Ana Karen Vargas Ibarra, Ana María Rosales Torres, Alejandro Ávalos Rodríguez, Fernanda Rodríguez Hernández, Ricardo Camarillo Flores, Samantha Anahí Cárcoba Pérez, José Antonio Quintana López y José Antonio Herrera Barragán



FOLIO 1976-17  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN  
AGRÍCOLA Y ANIMAL

Por participar con la presentación del cartel: "Secreciones de la unión útero vaginal vs conservación espermática in vitro de Gallus gallus." en el "6º CONGRESO Y 2ª FERIA TÉCNICO-CIENTÍFICA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL 2017" realizado en esta Universidad del 18 al 20 de octubre de 2017 con duración de 24 horas.

Mtro. Rafael Díaz García  
Director  
División CBS

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

92



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Otorga la presente

Educación  
Continua  
ECCBS

CONSTANCIA

A: Samantha Anahí Cárcoba Pérez, Ana Karen Vargas Ibarra, Ricardo Camarillo Flores, Fernanda Rodríguez Hernández, Alejandro Ávalos Rodríguez, Juan Jose Pérez Rivero CyC y José Antonio Herrera Barragán



FOLIO 2038-17  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN  
AGRÍCOLA Y ANIMAL

Por participar con la presentación del cartel: "El "aprovechamiento sustentable" de los psitácidos en México" en el "6º CONGRESO Y 2ª FERIA TÉCNICO-CIENTÍFICA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL 2017" realizado en esta Universidad del 18 al 20 de octubre de 2017 con duración de 24 horas.

Mtro. Rafael Díaz García  
Director  
División CBS

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

98



## ASESORIA EN SERVICIO SOCIAL



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

CONSTANCIA DE ACREDITACIÓN DE SERVICIO SOCIAL  
26 de Mayo, 2017.

CSS/DCBS/L-501/2017

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES  
Presente

Con fundamento en las normas establecidas por el Reglamento de Servicio Social a Nivel Licenciatura de la Universidad Autónoma Metropolitana esta División Académica hace constar que la alumna:

CINTHYA RIVERA FRANCO, Matrícula 2113025622

de la Licenciatura en MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, acreditó su Servicio Social en el proyecto: IDENTIFICACIÓN DE HEMOPARÁSITOS EN EJEMPLARES DE FAUNA SILVESTRE EN CAUTIVERIO, en la Dependencia UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - XOCHIMILCO, LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA REPRODUCCIÓN, bajo la asesoría del DR. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN y M.V.Z. ANA KAREN VARGAS IBARRA, que corresponde al sector EDUCATIVO con orientación a la actividad DESARROLLO SUSTENTABLE (AGRICULTURA, GANADERÍA Y RECURSOS NATURALES).

El alumno inició el Servicio Social el 4 de Julio de 2016 y lo concluyó el 7 de Enero de 2017, sin recibir estímulo económico.

Se expide la presente para los usos legales correspondientes.

Atentamente  
Casa abierta al tiempo

MTR. RAFAEL DIAZ GARCIA  
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN

Coordinación de Sistemas Escolares, UAM-X  
Coordinación de Servicio Social, CBS, UAM-X  
Interesado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL LEGAL  
IDENTIFICACIÓN DE HEMOPARÁSITOS EN EJEMPLARES DE FAUNA  
SILVESTRE EN CAUTIVERIO.

**Prestador del servicio social:**  
Cinthya Rivera Franco  
2113025622

**Asesor interno:**  
Dr. José Antonio Herrera Barragán  
NE: 25416

**Asesor externo**  
MVZ. Ana Karen Vargas Ibarra  
Ced. Prof. 9836652

Lugar de realización:  
Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción UAM-Xochimilco  
Fecha de inicio y de terminación:  
Del 4 de julio de 2016 al 04 de enero de 2017

	<b>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA</b> <b>UNIDAD XOCHIMILCO</b> División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia	
IDENTIFICACION DE HEMOPARÁSITOS EN EJEMPLARES DE FAUNA SILVESTRE EN CAUTIVERIO	
RIVERA FRANCO, CINTHYA	2113025622
<b>Asesores</b> Interno: HERRERA BARRAGAN, JOSE ANTONIO Externo: VARGAS IBARRA, ANA KAREN	
24 de Mayo de 2017	

#160