

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 DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

“ENSAYOS DE FERTILIDAD *IN VITRO* EN AVES”

Prestadora de Servicio Social:

Odalis Samantha Chávez Marín

Matrícula: 2162034015



Asesores internos:

Dr. José Antonio Herrera Barragán

No. económico: 25416



Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez.

No. económico: 26809



Lugar de realización: Laboratorio de Fisiopatología, UAM-X.

Fecha de inicio y de termino: 15 de marzo al 15 de septiembre de 2022

ÍNDICE

Resumen	2
1. Introducción	3
2. Marco teórico	4
3. Objetivos	6
4. Metodología	7
5. Actividades realizadas	7
6. Metas alcanzadas	8
7. Resultados y discusión	8
8. Conclusiones	10
9. Recomendaciones	10
10. Referencias	10

RESUMEN

La industria avícola comprende las etapas de mejoramiento genético, producción de aves reproductoras, producción de alimento balanceado, incubación, entre otros. 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. Algunas de las principales ventajas de estas tecnologías son la posibilidad de duplicar el número de aves por metro cuadrado y de disminuir el consumo energético en un 10%, así como la mejora en la salud de las aves, el incremento de la tasa de fecundidad y la disminución de los huevos sucios y rotos.

La inseminación artificial se considera como un sistema industrial de reproducción que incluye métodos especializados de cría-recría, así como de utilización de los reproductores, todo esto acompañado de una gestión técnica y económica particularmente rigurosa. La fertilización *in vitro* es una técnica basada en el cocultivo de espermatozoides y óvulos en condiciones controladas para generar huevos que inicien el desarrollo embrionario con fines de reproducción, investigación y producción de animales seleccionados.

No se encuentra relación alguna entre calidad espermática (volumen, concentración o velocidad) y fertilidad en aves seleccionadas para rendimiento, que aunque es innegable la relevancia de la calidad espermática sobre la fertilidad en condiciones de inseminación artificial controladas, 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.

Palabras clave: fertilización, inseminación, aves, *in vitro*, reproducción

1. INTRODUCCIÓN

La industria avícola comprende las etapas de mejoramiento genético, producción de aves reproductoras, producción de alimento balanceado, incubación, cría y recría de pollitas, crianza y beneficio de pollos de engorde, incluyendo la comercialización del producto final, carne y huevos. En el plano internacional, nuestro país es actualmente el sexto lugar en producción de pollo, el crecimiento en la producción de huevo en el lapso de 2009 a 2019 fue de 20%, con una Tasa de Crecimiento Media Anual de 1.81% (UNA, 2021).

Las biotecnologías reproductivas se utilizan de manera extendida en la industria avícola, principalmente en aves reproductoras y en pavos; en aves silvestres se ha convertido en una excelente herramienta dentro de programas de reproducción y conservación (Boeta, 2018).

Este conocimiento es crítico para poder establecer prácticas que permitan una mayor eficiencia reproductiva, así contribuyendo al conocimiento de la conservación embrionaria para su aplicación en protocolos de reproducción asistida y creación de modelos animales para la investigación.

Poco se menciona de la utilidad del huevo para el diagnóstico de enfermedades mediante la producción de aves libres de patógenos específicos (ALPES) y menos aún de su utilidad como modelo de investigación biomédica. Las ALPES se refiere a aves reproductoras que certificadamente no son portadoras de una lista de agentes infecciosos productores de enfermedades y que tampoco poseen anticuerpos contra estos agentes en su sangre (Aguirre, 2013).

El objetivo de la producción de ALPES es que se garantice a la industria farmacéutica el abasto de medios libres de patógenos para el diagnóstico, la investigación y la producción de biológicos, principalmente aviares, que coadyuven en los programas de salud animal y humana. Así mismo, para evitar la presencia de virus que comúnmente afectan a las aves, en especial Adenovirus, Coronavirus, Bronquitis Infecciosa Aviar, etc., o bien, bacterias de los géneros *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, etc. Las aves ALPES o SPF (por sus siglas en inglés)

se alojan en áreas de confinamiento, inyectadas con aire estéril climatizado y presurizado a través de turbinas y filtros absolutos. En estas unidades de aislamiento las aves nacen, producen y se reproducen (Aguirre, 2013).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Inseminación artificial en aves

La inseminación artificial (IA) en las aves se le denomina al depósito de espermatozoides en las vías genitales femeninas sin intervención directa del macho.

La posibilidad de duplicar el número de aves por metro cuadrado y de disminuir el consumo energético en un 10%, así como la mejora en la salud de las aves, el incremento de la tasa de fecundidad y la disminución de los huevos sucios y rotos son algunas de las principales ventajas que han llevado a la industria avícola a la introducción de la cría en jaula, con lo cual se inició la inseminación artificial en los reproductores.

Durante mucho tiempo, el estudio de la inseminación artificial se ha limitado a la técnica de la recogida del semen, aplicación a las reproductoras y formulación de los diluyentes. Actualmente esta situación ha cambiado y la inseminación artificial debe considerarse como un sistema industrial de reproducción que incluye además de los aspectos anteriores, métodos especializados de cría-recría, así como de utilización de los reproductores, todo esto acompañado de una gestión técnica y económica particularmente rigurosa (EcuRed, 2013).

2.1.1 Obtención de espermatozoides mediante estimulación dorso-abdominal

La obtención de semen se puede realizar mediante dos técnicas: Electroestimulación (EE) y estimulación dorso abdominal (EDA), siendo esta última involucrando una restricción simple del animal. De acuerdo con González (2019), se realiza sujetando las patas y alas tratando de dejar despejada la zona dorsal del ave ya que justo en esa zona se realiza el primer estímulo. Se comienza con un estímulo táctil firme desde la zona toracolumbar hasta el pigostilo, abarcando la zona de los testículos y los conductos deferentes. Seguido de esta acción debe existir tumescencia (erección) del falo, momento en el que se da la segunda fase.

En esta fase se realiza una estimulación en forma de apretón con las puntas de los dedos índice y pulgar alrededor de la cloaca. De esta forma se produce la expresión del semen a través de la papila externa del conducto deferente.

2.2 Fertilización *in vitro*

La fertilización *in vitro* se define como técnica de reproducción asistida que involucra fecundación extracorpórea (Bagnarello, 2015). Es una técnica para la reproducción asistida de mamíferos basada en el cocultivo de espermatozoides y óvulos en condiciones controladas para generar huevos que inicien el desarrollo embrionario con fines de reproducción, investigación y producción de animales seleccionados (Muñoz, 2005). De tal manera que, Giménez (2018) menciona que la fertilización *in vitro* mediante la adición de espermatozoides sobre la vesícula germinal provoca la fecundación y desarrollo embrionario en gallina y codorniz.

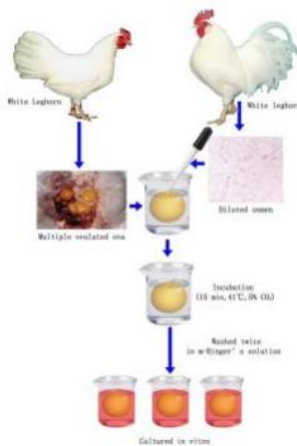


Imagen 1. Esquema de los pasos realizados en su ensayo de fecundación *in vitro*

Una de las técnicas mejor utilizadas es la descrita por Han (2013), en donde los óvulos son recogidos y colocados en solución tibia de m-Ringer a 41°C en un vaso de precipitados de 100 ml. Se añade cien µl de semen diluido, se insemina en el disco germinal de cada óvulo, seguido por una incubación de 15 min a 41°C en una incubadora de CO₂ al 5%. Los óvulos tratados se lavaron dos veces en solución de m-Ringer y se cultivan a 41°C durante 10 h en medio DME-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F12 HAM'S, HYCLONE) que contiene 20 % de albúmina líquida de huevos frescos.

Estos óvulos deberán ser fijados en solución de Bouin durante 24 h para luego se transferir a alcohol al 60%. el blastodisco se observa bajo el microscopio directamente o después de la tinción con violeta de genciana (Imagen 1).

2.2.1 Obtención de ovocitos

De acuerdo con Li et al. (2013) la adecuada obtención de ovocitos se puede llevar a cabo después del sacrificio, mediante una incisión quirúrgica de 5 a 7 cm entre las dos últimas costillas del lado izquierdo del abdomen así recuperando los ovocitos del infundíbulo, parte superior del magnum.

2.3 Evaluación in vitro de gametos

Para que el espermatozoide penetre al ovocito es necesario que se desencadene la reacción acrosomal, acción que ocurre cuando entra en contacto con unas glicoproteínas de la membrana perivitelina, denominadas Chiken ZPC (chZPC) (Boeta, 2018). Para espermatozoides de mamífero, existen diversos procedimientos para la evaluación de la reacción acrosomal in vitro, para determinar la capacidad fertilizante del espermatozoide. En el espermatozoide de gallo son pocas las técnicas utilizadas, sin embargo, de acuerdo con Vargas (2020), la reacción acrosomal en espermatozoides de gallo pueden ser inducida in vitro con membrana perivitelina. Las glicoproteínas ZP contribuyen a la interacción espermatozoide-óvulo en las etapas iniciales de fertilización en aves. Los N-glicanos con N-acetil-Dglucosamina terminal preparados enzimáticamente a partir de la capa perivitelina de pollo, pero no los O-glicanos, se ha informado que induce la reacción acrosómica (Tomohiro, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Comparar la eficiencia reproductiva de las técnicas de inseminación artificial y fertilización in vitro en aves.

3.2 Objetivos específicos

- Revisar artículos científicos sobre inseminación artificial con el método de estimulación dorso abdominal (EDA) en aves
- Revisar artículos científicos sobre la fertilización in vitro en aves

4. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiopatología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco mediante el análisis de artículos científicos sobre las técnicas de reproducción: inseminación artificial y fertilización in vitro en aves durante el periodo comprendido de abril a julio de 2022.

En cuanto a la revisión de artículos de inseminación artificial se verificó que se utilizara el método de estimulación dorso abdominal (EDA) y se evaluaran los parámetros de:

- Viabilidad %
- Motilidad %

Por otro lado, a la revisión de artículos de fertilización in vitro se verificó que se utilizara el método descrito por Han (2013), además de que se evaluaran los parámetros de:

- Numero de huevos fertilizados
- Número de huevos fertilizados que se desarrollaron a etapas
- Reacción acrosomal

Posteriormente se comparó la eficiencia de cada método para determinar una posible correlación entre los indicadores entre las diferentes técnicas.

5. ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante la estancia en el servicio social, las actividades realizadas como contribución de ser prestador de servicio social fueron:

- Asistencia a Reino Animal con el fin de observar la técnica de recolección de semen en águilas
- Asistencia a conferencias en la Universidad Nacional Autónoma de México acerca de reproducción en aves

6. METAS ALCANZADAS

Se logró realizar la búsqueda de artículos científicos con el fin de comparar la efectividad de las técnicas de reproducción (inseminación artificial y fertilización in vitro de ovocitos).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la técnica de inseminación artificial se encontró que González (2019) obtuvo valores de viabilidad (%) y motilidad (%) de 96.48 y 94.34, Vargas (2018) 96 y 67, Vargas (2020) 93-96 y 85-90 respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes obtenidos de viabilidad y motilidad en la técnica de inseminación artificial

	Viabilidad (%)	Motilidad (%)
González (2019)	96.48	94.34
Vargas (2018)	96	67
Vargas (2020)	93-96	85-90

Por lo tanto, no se observó ninguna diferencia entre los porcentajes de viabilidad y motilidad en la técnica de obtención de eyaculado por EDA, ya que se demostró ser efectiva para mantener la membrana espermática integra.

Gonzales (2019) menciona que con la técnica por EDA proporciona porcentajes más elevados en cuanto a motilidad y viabilidad en comparación con el uso de otro tipo de técnicas. Lo cual resulta benéfico debido a que Ahammad et al (2013) mencionan que el éxito de la fertilización depende principalmente de la motilidad espermática y Umopathy et al (2005) refieren que la viabilidad espermática es de gran importancia, ya que se relaciona de manera positiva con la predicción de la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

En cuanto a la fertilización in vitro se encontró que Han, Zhao y Li (2013) obtuvieron valores de 8 huevos fertilizados, de los cuales 4 se dividieron en 8 células, 2 en 32, 1 en 16 y 1 en 4; Por otro lado Vargas (2020) obtuvo valores de 10 huevos fertilizados, de los cuales 3 se dividieron en 8 células, 2 en 32, 5 en 16 y 1 en 4, además de un 8% de espermatozoides con reacción acrosomal (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros obtenidos mediante fertilización in vitro

		Han, Zhao y Li (2018)	Vargas (2020)
Huevos fertilizados		8	10
División celular	4 células	1	1
	8 células	4	3
	16 células	1	5
	32 células	2	2
% de espermatozoides con RA		-	8%

RA: Reacción acrosomal

Vargas menciona que con la técnica descrita por Han (2016) se puede determinar parámetros de espermatozoides con capacitación y con reacción acrosomal además de la de los espermatozoides de llevarla a cabo ante un inductor como la membrana perivitelina lo cual reafirma que es un método *in vitro* que contribuye a predecir su capacidad fertilizante *in vivo*.

Por lo que, de acuerdo con Lemoine, Grasseau y Billard (2008) en la reacción acrosomal se fusionan la membrana plasmática y la membrana acrosomal del espermatozoide, dando como resultado liberación de enzimas que ayudan a hidrolizar la membrana perivitelina del ovocito. De tal manera que auxilia al espermatozoide a penetrarlo y realizar la fertilización.

Siendo así que los estudios experimentales reportados por Bilcik, Estevez, y Russek-Cohen (2005) no encontraron relación alguna entre calidad espermática (volumen, concentración o velocidad) y fertilidad in vitro en aves seleccionadas para rendimiento. Lo cual concuerda con Vargas (2018) quien menciona que, aunque es innegable la relevancia de la calidad espermática sobre la fertilidad en condiciones de inseminación artificial controladas y las técnicas de fecundación in vitro, 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.

8. CONCLUSIONES

Las técnicas de reproducción en inseminación artificial y fecundación in vitro de ovocitos son benéficas puesto que hay relación a mayor eficiencia reproductiva y así contribuyendo al conocimiento de la conservación embrionaria para su aplicación en protocolos de reproducción asistida y creación de modelos animales para la investigación

9. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos experimentales más específicos sobre las diversas técnicas de reproducción asistida en aves a modo de comparación para seleccionar debidamente el método a elegir.

10. REFERENCIAS

- Aguirre, D. (2013). El objetivo de la producción de ALPES o Aves Libres de Patógenos Específicos es que se garantice a la industria farmacéutica el abasto de Medios Libres de Patógenos para el diagnóstico. Scribd. Recuperado 15 de septiembre de 2022 de <https://es.scribd.com/doc/175624201/El-objetivo-de-la-produccion-de-ALPES-o-aves-libres-de-patogenos-especificos-es-que-se-garantice-a-la-industria-farmaceutica-el-abasto-de-medios-libre>
- 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. Recuperado 26 enero 2023 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119395811>
- Bagnarello, F. (2015). Fertilización in vitro: Conceptualización. Revista Parlamentaria. Vol. 21, No. 1. Pp: 205-241. Recuperado 25 de enero de 2023 de <https://www.corteidh.or.cr/tablas/r34626.pdf>
- Bilcik, B., Estevez, I., Russek, E. (2005). Reproductive Success of Broiler Breeders in Natural Mating Systems: The Effect of Male-Male Competition, Sperm Quality, and Morphological Characteristics. Poultry Science. Vol. 84, pp: 1453-1462. Recuperado 26 de enero de 2023 de <http://dx.doi.org/10.1093/ps/84.9.1453>
- Boeta, M. (2018). Fisiología reproductiva de los animales domésticos. Primera edición. UNAM.

- EcuRed. (2013). Inseminación artificial en gallinas, Revista Cubana de ciencias Avícolas. Recuperado 15 de septiembre de 2022 de https://www.ecured.cu/Inseminaci%C3%B3n_artificial_en_gallinas
- Giménez, I. (2018). Efecto biológico de la fsh recombinante de codorniz común en la inducción del ciclo ovárico en aves. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, España. Recuperado 25 de julio de 2023 de <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/70731/Tesis%20doctoral%20Ignacio%20Gim%C3%A9nez%20Nebot.pdf?sequence=1>
- Gonzales, L. (2019). Comparación de dos técnicas de obtención de eyaculado en *Gallus gallus domesticus*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Recuperado 2 marzo de 2022 de <http://erecursos.uacj.mx/bitstream/handle/20.500.11961/5634/COMPARACI%C3%93N%20DE%20DOS%20T%C3%89CNICAS%20DE%20OBTENCI%C3%93N%20DE%20EYACULADO%20EN%20Gallus%20gallus%20domesticus%e2%80%9d.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Han, H., Zhao, C. y Li, Z. (2013). Multiple Ovulations and In vitro Fertilization in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). Asian-australasian Journal of Animal Sciences. Recuperado 3 marzo de 2022 de https://pdfs.semanticscholar.org/9d53/199ab667bee83c7d1ad633285bc846f0175e.pdf?_ga=2.76831382.2031780420.1646342036-956516819.1646342036
- Lemoine, M., Grasseau, Y., Billard, J. (2008). A reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction* (Cambridge, England), Vol. 136 (4), pp: 391–399. Recuperado 26 enero de 2023 de <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/136/4/391.xml>
- Li, B., Li, W., Chen, H., Zhang, Y., Zhang, Z., Wang, X., Gao, B., Dou, T. y Wang, K. (2013) The Influencing Factor of In Vitro Fertilization and Embryonic Transfer in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Reproduction in animals domestics*. Vol 48, No. 3.: 368-372. Recuperado 3 marzo de 2022 de <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02158.x>
- Muñoz, M. (2005). Fertilización in vitro en cerdos. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Posgrado en Biología Molecular. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. San Luis Potosí, SLP.
- Regional Interest, (2012). LPM 222: Producción avícola diversificada y conceptos actuales en la gestión y comercialización avícola. Gestión de la producción

ganadera. Recuperado 14 de septiembre de 2022 de <http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/page/view.php?id=61507>

- UACH. (2006). Huevos fértiles SPF: Una Eficaz Herramienta para la Investigación de Enfermedades de las Aves. Universidad Austral de Chile.
- Unión Nacional de Avicultores. (2021). Expectativas 2021. Recuperado 15 de septiembre de 2022 de <https://una.org.mx/industria/>
- Vargas, A. (2018). secreciones de la unión útero vaginal y su efecto en los parámetros de capacitación y descapacitación espermática in vitro de *gallus gallus*. Tesis de Maestría. UAM. Recuperado 25 de enero 2023 de <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2089/1/181652.pdf>
- Vargas, A. (2020). Evaluación de la reacción espermatozoides de gallo. BMeditores. Recuperado 4 marzo de 2022 de <https://bmeditores.mx/avicultura/evaluacion-de-la-reaccion-espermatozoides-del-gallo/>