

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



CRIOPRESERVACIÓN Y EVALUACIÓN FISIOLÓGICA Y REPRODUCTIVA  
DE ESPERMATOZOIDES DE TRES ESPECIES DE AVES.

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

JOSÉ ANTONIO HERRERA BARRAGÁN.

31 de Enero de 2005

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el convenio PFP-20-93

Este estudio se realizó en el laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

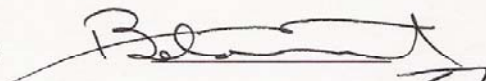
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco  
aprobó la tesis que presentó

JOSÉ ANTONIO HERRERA BARRAGÁN

El día 31 de enero de 2005.

Sinodales:

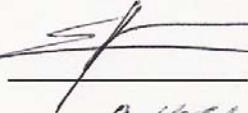
Dr. MIGUEL BETANCOURT RULE (Presidente)



Dr. JOSÉ ANTONIO QUINTANA LÓPEZ (Secretario)



Dra. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA (Vocal)



Dra. ELIA ROLDÁN REYES (Vocal)



Dr. GARY GARCÍA ESPINOSA (Vocal)



**COMITÉ TUTORIAL:**

**CO-DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA**

PROFESOR INVESTIGADOR TITULAR "C" DE LA UAM-I, MIEMBRO DEL  
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES.

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JOSE ANTONIO QUINTANA LÓPEZ**

PROFESOR INVESTIGADOR TITULAR "C" DE LA FMVZ-UNAM.

**ASESOR**

**DR. MIGUEL BETANCOURT RULE**

PROFESOR INVESTIGADOR TITULAR "C" DE LA UAM-I, MIEMBRO DEL  
SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES.

## DEDICATORIA

*De manera muy especial con admiración y agradecimiento, dedico esta tesis al Lic. Gonzalo Senosiáin Ruiloba, quien me brindo de manera incondicional y desinteresada la oportunidad de realizar mis sueños de la infancia, esto al permitirme iniciar mi vida profesional en el mundo de la fauna silvestre.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a Gabriela mi esposa, por todo su apoyo y paciencia para acompañarme en esta etapa de mi vida tan importante para mí. Además a Natalia que ha sido fuente inspiradora para continuar adelante día con día. Con respeto, agradezco a mis tutores Dra. Reyna Fierro, por sus consejos y apoyo durante la realización de esta tesis y Dr. José A Quintana, por la confianza para dirigirme en este trabajo, así también y de manera muy especial a mi asesor, Dr. Miguel Betancourt, quien me brindo la oportunidad de iniciarme como investigador y por su apoyo y consejos durante mi paso por la UAM-I. A la Dra. Elia Roldán y Dr. Gary García, por la revisión de la tesis. También mi mas sincera gratitud a todos los compañeros del laboratorio de Biología Celular de la UAM-I que hicieron mi estancia más placentera durante mi paso por el laboratorio, gracias Yvonne Ducoulomb, Eduardo Casas, Edmundo Bonilla, Cristina González, Humberto González. A mis amigos, Manuel López, Héctor Zayas, Jesús Conejo, Juan G Rivera, Demetrio Ambríz "*Deme*", Irma Jiménez y Armando Salguero, quienes además de ayuda y amistad contribuyeron para hacer mas placentera esta etapa de mi vida y formación. Los logros de la vida, inician desde la formación de los principios morales de cada persona, es por eso, que no puedo dejar de mencionar a mis padres Antonio Herrera y Dolores Barragán, quienes me moldearon como su obra, dándome el ejemplo diario. Así también a mis hermanos Enrique, Rocío e Idalia, compañeros de mi infancia. Particularmente quiero mencionar, mi agradecimiento a la familia Herrera Guarneros, al Sr. Armando, su esposa Sra. Lupita y sus hijos Armado y Lidia quienes me brindaron su apoyo y abrieron las puertas de su casa.

Esta tesis no hubiera sido posible, sin el apoyo de: Granja de la madera, de Lic Gonzalo S; Club de los animalitos, del MC Sergio Gómez; Rancho "los Prado" de Carlos Prado (Padre e hijo); CIVS-Los Reyes SEMARNAT México y al Dr. Ángel Ordaz del Zoológico de León en Gto. México.

## RESUMEN

La Inseminación Artificial (IA) se ha utilizado para la reproducción de aves. El uso de esta práctica se incrementó con el descubrimiento de los crioprotectores, ampliando su utilidad tanto en la producción de aves domésticas como en la conservación de especies silvestres. El objetivo de este estudio fue determinar los indicadores de evaluación espermática y distribución de carbohidratos en la superficie de espermatozoides en fresco y descongelados, en ejemplares de especies domésticas y silvestres. Se analizaron de gallo (*Gallus domesticus*) y de faisán (*Phasianus colchicus*), 20 eyaculados y 20 muestras heteroespérmicas de cada especie, también se analizaron 20 eyaculados de halcón (*Buteo jamaicensis*). Todas las muestras fueron analizadas en fresco, la mitad, se criopreservaron con dimetilsulfóxido (DMSO) y el resto con polivinilpirrolidona (PVP). Los valores encontrados al realizar la evaluación espermática mostraron que la técnica de criopreservación propuesta en este trabajo es igualmente eficiente para muestras heteroespérmicas y eyaculados de manera individual. Así mismo encontramos que el PVP es una alternativa en cuanto a crioprotectores ya que no se encontraron diferencias significativas al compararlo con el DMSO. Se evaluó la capacidad fertilizante de las muestras heteroespérmicas en fresco y criopreservadas, mediante la IA de gallinas y faisanas. Se demostró que es posible la reproducción en estas dos especies, utilizando la técnica de criopreservación propuesta en este trabajo.

**Palabras clave:** Criopreservación, *Gallus domesticus*, *Phasianus colchicus*, *Buteo jamaicensis*, dimetilsulfóxido, polivinilpirrolidona, espermatozoide, carbohidratos membranales, fertilización *in vitro*.



## ABSTRACT

The Artificial Insemination (AI) it has been used for the reproduction of birds. The use of this practice was increased with the discovery of the cryoprotectants, enlarging its utility so much in the production of domestic birds as in the conservation of wild species. The objective of this study was to determine the indicators of spermatoc evaluation and distribution of carbohydrates in the surface of sperms in fresh and defrosted spermatozoans, in copies of domestic and wild species. They were analyzed of rooster (*Gallus domesticus*) and of pheasant (*Phasianus colchicus*), 20 ejaculated and 20 heterospermic samples of each species, 20 were also analyzed ejaculated of red-tail hawk (*Buteo jamaicensis*). All the samples were analyzed in fresh and post cryopreservation. The half, you criopreservated with dimethylsulfoxide (DMSO) and the rest with polyvinylpirrolidone (PVP). The opposing values when carrying out the spermatoc evaluation showed that the cryopreservation technique proposed in this work is equally efficient for heterospermic samples and ejaculated in an individual way. Likewise we find that the PVP is since a good alternative as for cryoprotectants they were not significant differences when comparing it with the DMSO. The capacity fertilizer of the heterospermic samples was evaluated in fresh and post cryopreservation, by means of the AI of females *G. domesticus* and *P. colchicus*. It was demonstrated that it is possible the reproduction in these two species, using the cryopreservation technique proposed in this work.

## INDICE DE CONTENIDO.

<b>1. MARCO TEÓRICO.</b>	<b>12</b>
1.1. ESTRATEGIAS DE REPRODUCCIÓN EN LA AVICULTURA DE ESPECIES DOMÉSTICAS.....	12
1.1.1 Inseminación artificial en aves.....	13
1.2. ESTRATEGIAS DE REPRODUCCIÓN EN AVES SILVESTRES (EN CAUTIVERIO).....	14
1.3. APAREAMIENTO Y FERTILIZACIÓN EN AVES. ....	15
1.3.1 Aparato reproductor de la hembra. ....	16
1.3.2 Aparato reproductor del macho.....	17
1.3.2.1 Morfología espermática. ....	18
1.4. FERTILIZACIÓN IN VITRO EN AVES. ....	22
<b>2- ANTECEDENTES.....</b>	<b>23</b>
2.1. CONSERVACIÓN DE SEMEN. ....	23
2.1.1. Conservación en fresco.....	23
2.1.1.1. Diluyentes.....	25
2.1.2. Criopreservación.....	27
2.1.2.1. Crioprotectores.....	29
2.2. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA. ....	30
<b>3.- JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>4.- HIPÓTESIS. ....</b>	<b>34</b>
<b>5.- OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL. ....	35
5.1.1.- Objetivos particulares.....	35
<b>6.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
6.1. EXPERIMENTOS Y TRATAMIENTOS. ....	36
6.2. OBTENCIÓN DE SEMEN Y MUESTRAS HETEROESPÉRMICAS.....	36
6.3. EVALUACIÓN SEMINAL BÁSICA. ....	37
6.4. EVALUACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS MEMBRANALES. ....	37
6.5. EVALUACIÓN DE FERTILIDAD. ....	38
6.6. PROCEDIMIENTO DE CRIOPRESERVACIÓN (CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN). ....	38
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	39
<b>7.- RESULTADOS. ....</b>	<b>40</b>
7.1. EVALUACIÓN SEMINAL DE MUESTRAS HETEROESPÉRMICAS DE GALLO. ....	40
7.2. INDICADORES DE LA EVALUACIÓN SEMINAL DE EYACULADOS INDIVIDUALES DE GALLO.....	40
7.3. EVALUACIÓN SEMINAL DE MUESTRAS HETEROESPÉRMICAS DE FAISÁN.....	42
7.4. EVALUACIÓN SEMINAL DE EYACULADOS INDIVIDUALES DE FAISÁN. ....	42
7.5. INDICADORES DE LA EVALUACIÓN SEMINAL DE EYACULADOS INDIVIDUALES DE HALCÓN. ....	43
7.6. COMPARACIÓN DE LOS INDICADORES DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA, EN FRESCO Y POST CRIOPRESERVACIÓN, DE MUESTRAS HETEROESPÉRMICAS Y EYACULADOS INDIVIDUALES DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS. ....	44
7.7. COMPARACIÓN DE LOS INDICADORES DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA, EN FRESCO Y POST CRIOPRESERVACIÓN, DE MUESTRAS HETEROESPÉRMICAS Y EYACULADOS INDIVIDUALES DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS. ....	44
7.8. COMPARACIÓN DE LOS INDICADORES DE MORFOLOGÍA NORMAL, EN FRESCO Y POST CRIOPRESERVACIÓN, DE MUESTRAS HETEROESPÉRMICAS Y EYACULADOS INDIVIDUALES DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS. ....	46
7.9. CAPACIDAD FERTILIZANTE DEL SEMEN FRESCO DILUÍDO Y DESCONGELADO.....	47
7.10. PATRÓN DE FLUORESCENCIA Y PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES DE GALLO, TEÑIDOS CON WGA-FITC Y CON A-FITC. ....	48
7.11. PATRÓN DE FLUORESCENCIA Y PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES DE FAISÁN, TEÑIDOS CON WGA-FITC Y CON A-FITC. ....	50
7.12. PATRÓN DE FLUORESCENCIA Y PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES DE HALCÓN, TEÑIDOS CON WGA-FITC Y CON A-FITC. ....	53

<b>8.- DISCUSIÓN. ....</b>	<b>56</b>
<b>9.- CONCLUSIÓN. ....</b>	<b>64</b>
<b>10.- LITERATURA CITADA.....</b>	<b>65</b>
<b>11.- APÉNDICE.....</b>	<b>80</b>
<b>12.- DIFUSIÓN DE RESULTADOS. ....</b>	<b>81</b>

## **1. Marco teórico.**

### **1.1. Estrategias de reproducción en la avicultura de especies domésticas.**

En la avicultura de especies domésticas, con el propósito de lograr que los machos cubran de manera eficiente al mayor número de hembras, las granjas de reproductores cuentan con ejemplares en la proporción de un macho por cinco a diez hembras. Sin embargo, existe una gran variabilidad de los resultados, ya que en casos excepcionales, los machos que pueden cubrir más de 10 hembras. En la mayoría de las ocasiones, existe una gran variabilidad individual de frecuencia de cópulas, ya que algunos machos por motivos de conducta propios de cada especie, tienden a cubrir con preferencia a determinadas hembras, lo cual se refleja en la incidencia de huevos infértiles en algunas de ellas (Cecil y Bakst, 1990).

Se han identificado factores específicos que interfieren con el proceso reproductivo natural, como la incompatibilidad física de los ejemplares, por ejemplo el peso corporal de los pavos, ya que machos muy pesados pueden lastimar a las hembras, impidiendo el proceso natural de la cópula (Wambeke y Huyghebaert, 1989). Se ha observado también, que temperaturas elevadas en zonas semitropicales y/o tropicales interfiere con la producción espermática y capacidad copulatoria (Harpal, 1999; Donoghue y Wishart 2000). Otros factores que afectan la producción de semen y la fertilidad de las aves, son la edad, estación del año, cantidad de luz, temperatura, humedad relativa, nivel sobre el mar estado de nutrición, salud, condiciones de clima adverso, problemas de conducta y peso de las aves (Singh, 1999; Jocking, 1991; Onura, 1987).

En la actualidad, la avicultura de especies domésticas, no es posible concebirla sin el uso creciente de conocimientos innovadores e invenciones que faciliten la combinación de la tecnología con la producción (Amann, 1999). Es el caso de la Inseminación Artificial (IA) como metodología de rutina en un proceso de producción sistemático y se define como la transferencia de gametos del macho para llegar al ovocito por métodos realizados por el hombre y que son diferentes al apareamiento natural. Esto incluye la inseminación *in vivo* de la hembra, con semen fresco, diluido o criopreservado y la fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos, para su posterior transferencia a hembras receptoras

(Samour y col 1998; Lukaszewicz, 2001; Saint Jalme y col 2003; Blesbois y col 1999; Tanaka y col 1994; Long y Kulkarni, 2004).

### **1.1.1 Inseminación artificial en aves.**

La IA fue desarrollada para aves en la década de los años treinta del siglo pasado 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 IA, el avicultor puede comprobar de forma inmediata la eventual mejora de la calidad y producción de espermatozoides, ó su deterioro, permitiendo ajustar el número de espermatozoides necesarios para una dosis de IA, logrando una máxima dilución y distribución del semen de los machos más aptos para transmitir a su descendencia una característica deseada, y a eliminar machos improductivos, (Sauveur, 1992).

En la hembra, el procedimiento para la inseminación involucra un manejo considerable, ya que esta es sujeta para hacer presión en el abdomen, exponer la cloaca y el interior del orificio vaginal para depositar el semen a 3-4 cm de profundidad en el interior del orificio vaginal. La técnica de IA 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 (Donoghue y Wishart, 2000).

Los primeros reportes en aves señalan un trabajo de Burrows y Quinn, (1937). Hasta la fecha, las técnicas de masaje son efectivas sin embargo requieren de ciertas adecuaciones específicas para cada especie y ejemplar, esto debido a las características anatómicas de dimensiones y estructuras de la cloaca (Fujihara y Ohboshi, 1991).

En la industria avícola de especies domésticas, la técnica de IA representa ventajas similares a las obtenidas en la ganadería de mamíferos, como el mejor aprovechamiento de machos genéticamente superiores, reducción de la proporción de machos con respecto a las hembras, y la cruce entre diferentes líneas o especies, además no requiere la presencia de conducta de apareamiento permitiendo una gran presión genética para la selección de caracteres en pocas generaciones. También debido a que

fertilidad de los gallos declina en el segundo y tercer año de la vida, y que la producción de semen se incrementa durante el invierno y primavera y disminuye en el verano y otoño, declinando la fertilidad durante estas dos últimas estaciones. Con el uso de la IA se ha contribuido a solucionar parcialmente estos problema (Sauveur, 1992).

También se ha utilizado como un método para mantener y reproducir líneas puras de reproductores primarios (Etches, 1996; Pollock, 1999). También ha permitido conducir experimentos de manera controlada para determinar la capacidad fertilizante de diferentes líneas genéticas (Poivey y col 2001).

Para obtener resultados favorables mediante la IA 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 IA, y el segundo está con relacionado con factores que afectan la liberación espermática, como la edad de las hembras (Brillard, 1993; Birkhead y col 1993; Fisinin y col 2004). Además, se ha observado que el número de espermatozoides inseminados y la frecuencia con que se realiza, influye en los resultados de fertilidad (Saint Jalme y col 1994), así como en una mayor eficiencia al tener un método sistematizado que permita evaluar y ajustar el protocolo (Christensen y Bagley, 1989).

## **1.2. Estrategias de reproducción en aves silvestres (En cautiverio).**

Se ha demostrado que con las técnicas de reproducción asistida como la IA con semen fresco y/o criopreservado, es posible crear bancos de semen de ejemplares silvestres que están en cautiverio, y de esta manera contribuir a la conservación de las especies (Saint Jalme y col 2003).

El procedimiento de IA en aves se ha utilizado como una herramienta de la reproducción animal asistida que ayuda a la conservación de especies silvestres que pueden estar o no en peligro de extinción. Esto se logra

implementándose en centros de investigación y conservación, colecciones privadas y zoológicos, con programas de reproducción asistida. Esta técnica, se ha intentado en aquellos casos en los cuales la reproducción natural en cautiverio se dificulta por la falta de las condiciones ambientales adecuadas similares a aquellas que afectan la avicultura de especies domésticas. El no disponer en el mismo sitio de ejemplares de ambos sexos de una misma especie, por ser muy raros y/o difíciles de conseguir, conductas de monogamia relacionadas con la falta de ejemplares para lograr la formación de parejas y programas de reproducción dirigida para lograr principalmente diversidad genética y/o conservación de especies puras. También ha sido necesaria la implementación de otras metodologías como la obtención de semen de manera específica en cada especie y su conservación *in vitro* (Donald, 1991). Sin embargo son pocos los estudios que se han hecho debido a la falta de vinculación entre los centros de investigación y los avicultores de especies exóticas o silvestres. Se ha utilizado en especies como las aves rapaces en las cuales mediante la IA se han realizado cruza entre diferentes especies, que han dado origen a ejemplares con características particulares y deseadas por los cetreros.

### **1.3. Apareamiento y fertilización en aves.**

Las aves difieren de los mamíferos en que no tienen un ciclo de reproducción bien definido, que se divide en fases de estro y gestación, continuando el desarrollo folicular y la función oviductal al mismo tiempo (Gilbert, 1996).

Para que se lleve a cabo el proceso de fertilización, es necesario un conjunto de interacciones específicas de cada especie, tejido y célula, indispensables para la preservación de las especies (Chavarria, 1998). En las aves, dicho proceso inicia con un comportamiento de cortejo que es complejo y característico de cada especie, sin embargo, existe un ritmo diurno de apareamiento en los machos que se correlaciona con la producción de semen. Un gallo puede copular hasta 30 veces en un solo día, y se ha observado que los eyaculados diurnos tienen mayor concentración espermática. La óptima

fertilidad de los gallos (*Gallus domesticus*) se obtiene con una proporción de machos y hembras 1 a 7-14 respectivamente (Gilbert, 1996; Quintana, 1999).

Los espermatozoides sobreviven dentro de la hembra por largos periodos hasta 32 días en la gallina (*G domesticus*) y 70 en la pava (*Meleagris gallopavo*), aunque el periodo fértil es por lo general más corto. Esta longevidad de los espermatozoides se asocia al menos con una región especializada en el oviducto, la unión útero vaginal, en ésta se localizan las glándulas tubulares especializadas o “glándulas hospederas” de esperma (Gilbert, 1996). Conforme ocurre la fecundación pueden liberarse pequeños “paquetes” de espermatozoides de las glándulas al momento de la ovulación, ya que éstos pueden colectarse fácilmente de la luz oviductal en ese momento (Holm y Wishart, 1998).

### **1.3.1 Aparato reproductor de la hembra.**

En el tracto de la hembra, la movilidad espermática es significativa, aunque puede estar influenciada por las variaciones de pH a lo largo de éste, además las secreciones del oviducto, que ayudan al transporte del espermatozoide, ya que al exponerlos *in vitro* a extractos del mágnum, se ha demostrado un incremento de la actividad respiratoria y movilidad. Sin embargo, esta respuesta puede ser diferente en cada especie en condiciones similares como lo es la presencia de iones de calcio (Holm y Wishart, 1998). La movilidad es particularmente importante, ya que permite al espermatozoide llegar al sitio de fertilización y penetrar la membrana perivitelina (MPV) para lograr la fertilización (Gilbert, 1996; King y col 1999; Wishart y Wilson, 1999).

Las enzimas asociadas con el acrosoma del espermatozoide de gallo podrían ayudar en la penetración e iniciar la rotura de la MPV. La polispermia es común en las aves pero sólo un pronúcleo masculino se fusiona al pronúcleo femenino. Posiblemente la MPV no tiene mecanismos que prevengan la polispermia como en los mamíferos, y el cubrir rápidamente el óvulo con una capa gruesa de albúmina ayuda a evitarla (Donoghue, 2000; Gilbert, 1996; Robertson y col 2000).



### **1.3.2 Aparato reproductor del macho.**

En las aves los testículos están localizados en el centro de la cavidad corporal, ventrales a los riñones, se sostienen por ligamentos de la superficie dorsal, adyacentes a las glándulas adrenales (Etches, 1996a). Los túbulos seminíferos se ramifican y anastomosan libremente con la túnica albugínea. El tejido intersticial está ausente, pero contiene células de *Leydig* secretoras de andrógenos. En los machos inmaduros, los túbulos seminíferos se recubren con una capa de células de *Sértoli* y espermatogonias pedunculadas, y en machos maduros los túbulos son de forma irregular recubiertos de un epitelio germinal de varias capas (Gilbert, 1996).

Los espermatozoides pasan a través del testículo, epidídimo y conducto deferente siendo suspendidos en secreciones de estas estructuras que les proveen substratos y amortiguadores que posteriormente son reabsorbidos (Fujihara, 1992). Cuando el semen es recolectado por estímulo de masaje abdominal, éste es contaminado con uratos y heces, lo cual dificulta precisar la composición del plasma seminal de un eyaculado. En el cuadro 1, se muestra la concentración de los componentes de mayor presencia encontrados en el plasma seminal de gallos y pavos (*M gallopavo*) (Etches, 1996a).

La actividad metabólica del espermatozoide está relacionada en particular con el flagelo, esto, mediante mecanismos químicos y electromecánicos que inducen movimientos coordinados entre los microtúbulos que integran el flagelo (Katz, 1984).

La espermatogénesis parece estar regulada por la proliferación de las células de *Sértoli* que ocurre después de la madurez sexual y sucede a la temperatura corporal interna de 41°C (Etches, 1996). El tiempo requerido para la maduración de los espermatozoides en los testículos depende de la especie. En especies domésticas después de la vigésima semana, los testículos son capaces de producir espermatozoides en grandes cantidades. El ave carece del epidídimo característicamente convuelto y subdividido como se encuentra en la mayoría de los mamíferos. Los espermatozoides se almacenan principalmente en el conducto deferente y no hay órganos reproductivos accesorios como vesículas seminales, próstata, glándula de Cowper y glándulas uretrales (Froman y Engel, 1991; Gilbert, 1996).

**Cuadro 1** Concentración (mM) de los componentes más abundantes en el plasma seminal de gallos y pavos.

Componente	Plasma seminal de Gallos.	Plasma seminal de Pavos
Glucosa	0.18	
Cl <sup>-</sup>	46	23
Na <sup>+</sup>	145	140
K <sup>+</sup>	13	20
Ca <sup>+</sup>	1.4	0.3
Glutamato	75	88
Lactato	3.7	2.4
Piruvato	0.3	0.4
Alfa-cetoglutarato	0.4	0.2
Carnitina	3.2	1.7
Acetil carnitina	0.5-2.0	0.5-2.0
Proteína (gl-1)	8	22

(Etches, 1996).

Los túbulos seminíferos se unen con los de la red testicular y éstos a su vez con los conductillos eferentes, que se conectan en varios lugares con el corto epidídimo que se abre al conducto deferente, un tubo extensamente convultado que corre a todo lo largo del abdomen en la superficie del riñón. En su extremidad distal, el conducto se alarga antes de pasar a través de la papila eréctil, extendiéndose hasta la cloaca. No hay estructura comparable a la ampolla de los mamíferos. El macho no tiene pene, sino una papila eréctil que crece y hace contacto con la cloaca evertida durante la cópula (Gilbert, 1996). En algunas especies acuáticas el órgano copulatorio es más largo (2-5 cm), comparado con el de gallináceas (Etches, 1996).

El eyaculado de un gallo varía de 0.2 a 0.5 ml y tiene una densidad entre 3-7 X10<sup>9</sup> espermatozoides por ml (Garner, 2002; Gilbert, 1996). En el cuadro 2 se muestra la comparación de los indicadores normales del eyaculado de diferentes especies.

### 1.3.2.1 Morfología espermática.

El espermatozoide de las aves, en general es de forma alargada. La cabeza es en curva filamentosa y mide de 12 a 13 µm, se corona por el acrosoma de 2 µm de largo. Esta región contiene enzimas proteolíticas que son requeridas durante la fertilización. Parte media, con 4 µm de largo y contiene mitocondrias, y el resto de la cola, con una longitud de aproximadamente 100 µm, a lo largo de ésta se extienden fibras centrales, relacionadas con el

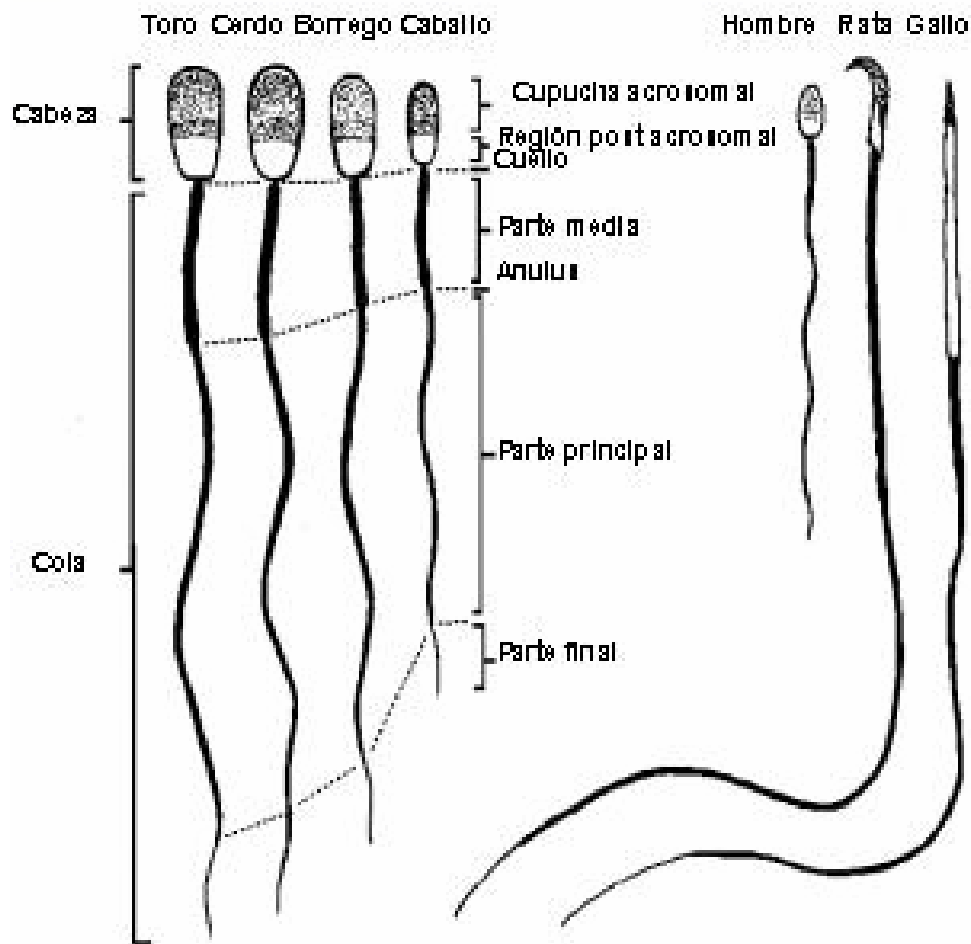
centriolo proximal y distal. En su parte más ancha el espermatozoide mide cerca de 0.5  $\mu\text{m}$  (Gilbert, 1996) (Figura 1). El núcleo está empaquetado en la cabeza espermática y los cromosomas están altamente condensados durante la espermatogénesis (Figura 2) (Etches, 1996; Gilbert, 1996).

El espermatozoide se rodea de una membrana citoplásmica. La membrana espermática está compuesta por moléculas lipídicas, fosfolípidos (glicofosfolípidos y esfingofosfolípidos), glucolípidos (cerebrósidos), gangliósidos esteroides (colesterol) y proteínas integrales y periféricas. Los fosfolípidos de la membrana están organizados en forma bilaminar asimétrica, lo cual significa que la composición de lípidos y proteínas de las dos monocapas difieren una de la otra (Etches, 1996a; Gilbert, 1996; Singer y Nicholson, 1972).

**Cuadro 2.** Características del semen de diferentes especies de animales.

Indicador	Toro	Borrego	Cerdo	Caballo	Gallo.
Volumen eyaculado (ml)	5-8	0.8-1.2	150-200	60-100	0.2-0.5
Concentración espermática (millones/ml)	800-2000	2000-3000	200-300	150-300	3000-7000
Espermatozoides $\times 10^9$ /eyaculado	5-15	1.6-3.6	30-60	5-15	.06-3.5
Movilidad espermática (%)	40-75	60-80	50-80	40-75	60-80
Morfología espermática normal (%)	65-95	80-95	70-90	60-90	85-90
Proteína (g/100 ml)	6.8	5.0	3.7	1.0	1.8-2.8
Ph	6.4-7.8	5.9-7.3	7.3-7.8	7.2-7.8	7.2-7.6

(Garner, 2002).



**Figura 1.** Estructura espermática (Garner, 2002).

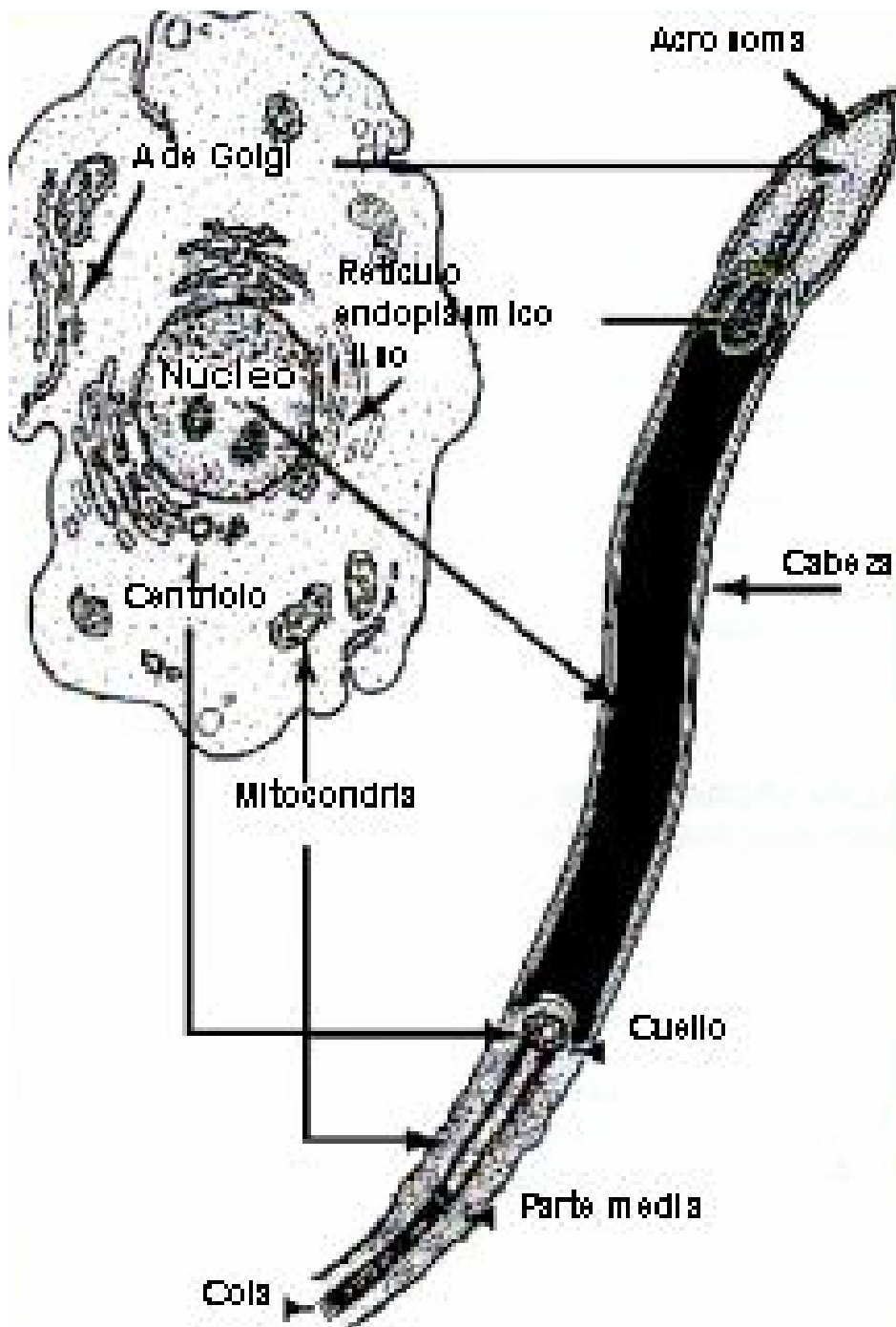


Figura 2. Morfología del espermatozoide de gallo (Howarth, 1995).

#### **1.4. Fertilización *in vitro* en aves.**

Con el estudio *in vitro* de los primeros eventos de la fertilización se demostró que los primeros pasos son similares, comparado con el proceso *in vivo*. Estos pasos son principalmente tres. La penetración de las capas protectoras del óvulo por el espermatozoide, seguido de la fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito y tercero, la fusión y formación pronuclear (Nakanishi y col 1990).

La implementación para evaluar la interacción *in vitro* con el ovocito de espermatozoides frescos y/o criopreservados, es una herramienta para determinar la capacidad fertilizante de los espermatozoides. En especies domésticas, ha permitido detectar ejemplares subfértiles que interfieran con los programas reproductivos (Herrera y col 2002; Jiménez y col 2002; Robertson y col 1998; Donoghue, 1999; Barbato y col 1998; Birkhead y col 1994).

La FIV requiere personal capacitado e infraestructura. Sin embargo es una alternativa para la producción animal, a pesar de realizarse con bajos resultados favorables, alrededor del 20 % en el modelo experimental de *G domesticus* en el cual la reproducción natural puede ser manipulada con mejores resultados (Tanaka y col 1994). Por otra parte, aunado a la técnica de FIV, es necesario el desarrollo de la técnica de trasplante embrionario aunque, este procedimiento puede emplearse como modelo en ejemplares domésticos para la producción de animales transgénicos y para ejemplares silvestres, con el propósito de contribuir a su conservación. Así también, es necesario el desarrollo de protocolos de conservación espermática eficientes, que contribuyan a la creación de bancos de semen, tanto de especies domésticas como silvestres (Long y Kulkarni, 2004).

## **2- Antecedentes.**

### **2.1. Conservación de semen.**

Existen dos maneras de conservar *in vitro* al semen. En términos generales el almacenamiento del semen líquido es una práctica frecuente que involucra la dilución del semen en amortiguadores a baja temperatura (5°C aproximadamente) para ser utilizado en la IA. Se ha demostrado que dependiendo de los ingredientes utilizados para hacer un diluyente, este tendrá diferente capacidad para conservarlo (Sexton, 1988). La criopreservación involucra la suspensión del semen en diluyentes con crioprotectores, ésta técnica permite su almacenamiento de manera “indefinida” en nitrógeno líquido permitiendo la creación de un banco de genes, con un fácil manejo posterior (Bakst, 1990; Wishart, 1989).

La conservación espermática en fresco y/o mediante la criopreservación es una herramienta de la reproducción asistida que se ha perfeccionando con ese propósito, sin embargo existen riesgos que están aunados a estas técnicas como lo es el aspecto higiénico y/o la transmisión de enfermedades, los cuales deben ser considerados (Thiber y Guerin, 2000).

#### **2.1.1. Conservación en fresco.**

Los espermatozoides de gallo pueden ser conservados con capacidad fertilizante hasta por 24 horas. Para esto, es necesario proporcionar al menos una provisión de oxígeno, suplir la fructosa o glucosa en el diluyente, mantener el pH en intervalos de 6.0 a 8.8, mediante amortiguadores con una mezcla de sales de fosfatos, citratos y/o amortiguadores orgánicos como el BES (N,N-bis(2 hidroxietil)-2-aminoetano de ácido sulfónico) y el TES (N-tris(hidroximetil) metil-2-aminoetano de ácido sulfónico) (Donoghue y Wishart, 2000). La osmolaridad del diluyente está asociada a cambios morfológicos de la estructura espermática y variaciones de ésta pueden presentarse durante el enfriamiento del semen. El intervalo ideal para espermatozoides de aves es entre 250 a 460 mOsm kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O y se debe mantener a temperatura de 5-7°C (Bakst, 1990; Etches, 1996). Se ha demostrado que el semen almacenado en líquido hasta por 6 horas (pavos) y 24 horas (gallos), presenta niveles de fertilidad comparables al realizar IA con semen fresco (Donoghue y Wishart,

2000). Aun cuando no es almacenado en las condiciones ideales, después de 4 h de conservación en fresco a 5°C tiene capacidad fertilizante, aunque reducida drásticamente (Bilgili y col 1987). Algunas de las causas reportadas, son la lisis y peroxidación de lípidos del espermatozoide y el plasma seminal debido al metabolismo endógeno del espermatozoide que puede inducir alteraciones en la movilidad, membrana plasmática, estructura y el metabolismo propio del espermatozoide (Douard y col 2004; Blesbois y col 1999; Douard y col 2000), así como su capacidad fertilizante (Long y Kramer, 2003). En pavos, también se ha observado que el incremento del pH debido a la alta tasa de respiración espermática, se refleja de manera negativa después de 4 h de conservación, reduciendo su capacidad fertilizante (Pinto y col 1984 y 1985). Se ha demostrado que la conservación en fresco en diluyentes, con el plasma seminal, este reduce la peroxidación de lípidos (Surai y col 1998).

La agitación durante ciertos periodos es un factor que también contribuye a conservar la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Bakst y Cecil, 1992). Otros, son la temperatura y el tiempo de conservación, ya que se ha demostrado que los espermatozoides de gallo y pavo, son capaces de mantener reservas de energía en forma de ATP, mediante la glucólisis y respiración, con valores óptimos de estos parámetros, a temperaturas de 5 °C y no así a 40 °C (Wambeke y Huyghebaert, 1989). En otro estudio con espermatozoides de gallo, se evaluó la viabilidad del semen fresco conservado a 4°C, en un periodo entre 0 y 24 h post eyaculación, observando una disminución de la viabilidad en un intervalo de 93 al 65 % aproximadamente (Chalah y Brillard, 1998).

Al evaluar en el semen de pingüinos (*Spheniscus magellanicus*) el efecto de la conservación en fresco a 4°C y 21°C, en el diluyente Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) (Sexton, 1977), se observó que en ambas temperaturas la viabilidad espermática se comportan de manera similar, con un valor del 90 % a las 0 h y del 75 % 3 h después, el porcentaje de morfología normal, en 55% a las 0 h y 35 % después de 3 h, sin encontrar diferencias por concepto de la temperatura a la que fueron conservadas las muestras (O'Brien y col 1999).



En patos (*Anas acuta*) se ha logrado la conservación espermática en fresco a 5 °C con capacidad fertilizante, mostrando ser una manera eficiente para almacenarlo por corto tiempo (Penfold y col 2001).

Otro factor que influye en la conservación en fresco de los espermatozoides es la tasa de dilución, es por esto, que se han realizado estudios para determinar la dilución óptima para obtener los mejores resultados de fertilidad. En espermatozoides de gallo, se ha demostrado que la mejor dilución fue en proporción de 1:2 semen-diluyente, conservándolo el menor tiempo posible (1 h) después de eyaculado. Los mejores resultados de fertilidad fueron de 84.8% vs 87.2%, para semen diluido y fresco respectivamente (Pereira y col 1999). Se determinaron porcentajes de fertilidad mayores del 88% con proporciones de dilución 1:4 semen diluyente BPSE conteniendo 100 millones de espermatozoides (Sexton, 1977). En pavos, se ha demostrado que con una dilución de 1:4 semen-diluyente se logra mantenerlo con capacidad fertilizante de manera óptima hasta por 6 h a 5 °C (Wambeke y Huyghebaert, 1989).

#### **2.1.1.1. Diluyentes.**

Los diluyentes son amortiguadores usados para mantener la viabilidad del espermatozoide *in vitro* y maximizar el número de hembras inseminadas (Donoghue y Wishart, 2000).

Se utilizan mezclas de fosfatos, citratos y moléculas orgánicas como el BES y TES para mantener el intervalo óptimo de pH y optimizar la concentración de iones de hidrógeno en el fluido de los espermatozoides (Donoghue y Wishart, 2000; Etches, 1996; Bakst, 1990), así como otros compuestos para regular la osmolaridad además de diferentes sustratos energéticos cuya composición tiene como modelo la del mismo plasma seminal, por ejemplo, la utilización del ácido glutámico, como principal constituyente aniónico, y que es un ingrediente común en estos diluyentes; su función biológica *in vivo* no se ha precisado, lo que sí se sabe es que ayuda a regular la presión osmótica del semen y actúa como quelante. Esto es particularmente importante si consideramos que el semen de las aves es

extremadamente viscoso y concentrado (de 3 a 7 X10<sup>9</sup> espermatozoides/ml) (Bakst, 1990).

Aunque el intervalo de tolerancia en pH para los espermatozoides de aves es amplio, un pH ácido, reduce la movilidad, la producción de ácido láctico y el consumo de oxígeno, mientras que un pH alcalino aumenta el metabolismo y en ambos casos se reduce sensiblemente la fertilidad de los espermatozoides (Donoghue y Wishart, 2000).

Con respecto a la osmolaridad, el semen de aves puede permanecer de 250 a 460 mOsm kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O, a menor osmolaridad los espermatozoides se deforman en la región de la cabeza, además de presentar cuellos doblados y a mayor osmolaridad, se deshidratan, en ambos casos esto ocasiona una disminución de su capacidad fertilizante (Donoghue y Wishart, 2000). También se ha demostrado que al mantener a los espermatozoides en condiciones extremas de osmolaridad, se ocasiona la remoción de proteínas superficiales, que pueden estar relacionadas con eventos específicos durante la fertilización (Steele y Wishart, 1996).

También se ha observado que al utilizar un diluyente con una viscosidad similar a la del semen, se obtienen mejores resultados de fertilidad, comparado con semen diluido de manera convencional (semen-diluyente 1:4) con diferente viscosidad (Bootwalla y Froman, 1988).

A pesar de que el diluyente BPSE fue desarrollado principalmente para la criopreservación, ha sido ampliamente utilizado para la conservación en fresco hasta por 24 h de semen diluido, tanto en especies domésticas como silvestres.

El semen de gallo, se ha mantenido con óptima movilidad y capacidad fertilizante, después de conservado por 36 h a 40 °C en un medio compuesto con un fluido de embrión de pollo de un cultivo de 5 días, sugiriendo que factores de bajo peso molecular (1 kDa) en el medio, afectan de manera negativa la estructura de la membrana plasmática del espermatozoide y que en los mismos indicadores, fracciones con alto peso molecular (50 kDa) conservan esta habilidad, proporcionándole estabilidad a la membrana plasmática del espermatozoide (Ashizawa y Katayama, 1992; Blesbois y Reviere, 1992).

También, se ha demostrado en los diluyentes convencionales utilizados para aves, que la adición de sustancias como la albúmina sérica bovina,

ayuda a mantener por mayor tiempo y con una alta calidad los valores de movilidad espermática del semen conservado en fresco a 7 °C por 24 h (Bakst y Cecil, 1992a).

En la actualidad, con los diluyentes desarrollados pueden conseguirse diferentes resultados de fertilidad, dependiendo de los ingredientes utilizados, tiempo de conservación, protocolo de IA, especie utilizada. Esto significa que en cada caso es necesario probar diferentes medios y condiciones, con el propósito de lograr los mejores resultados.

### **2.1.2. Criopreservación.**

La tecnología para la criopreservación espermática se ha desarrollado desde hace aproximadamente 50 años. Las diferencias fisiológicas de las células espermáticas entre las especies e incluso entre individuos, aún representa un problema sin resolver (Holt, 2000). A pesar de los esfuerzos realizados en el campo de la criopreservación espermática, pocas técnicas permiten supervivencias elevadas (Hofmo y Almlid, 1991).

La estandarización de un protocolo para la criopreservación espermática, es un requisito para la reproducción de líneas puras y mantener el germoplasma de generaciones en bancos de semen (Bakst 1990; Tselutin y col 1995). La preparación de los espermatozoides para la criopreservación requiere la implementación de la metodología para realizar dicho procedimiento, y la adición de criopreservadores a los diluyentes para la conservación en fresco (Etches, 1996). El proceso de criopreservación requiere: 1) Selección de un diluyente apropiado; 2) Selección de un crioprotector; 3) Determinación de las tasas de congelación y descongelación; 4) Procedimiento para remover sustancias que afecten la capacidad fertilizante (Buss, 1993).

La criopreservación expone al espermatozoide a bajas temperaturas no fisiológicas y los crioprotectores son sustancias que tienen un cierto efecto citotóxico. Ambos factores inducen cambios como la organización lipídica de la membrana plasmática, modificación de la cinética enzimática y alteración de proteínas membranales y carbohidratos en la superficie espermática. Estas modificaciones pueden interferir con el proceso de fertilización, ya que se ha demostrado que los carbohidratos tales como N-acetilglucosamina, ácido

siálico y manosa, juegan un importante papel en la interacción espermatozoide-ovocito en las aves (Watson 2000; Steel y Wishart, 1996; Robertson y col 2000; Xia y col 1988). Al evaluar en espermatozoides de gallo, criopreservados con etilenglicol (EG) y descongelados a 41°C, el efecto de la criopreservación en el metabolismo espermático, se observó que la oxidación de glucosa disminuye, el succinato se incrementa y el glutamato se mantiene (Ochkur y col 1994). Dependiendo de la técnica utilizada, será la alteración producida y se reflejará en el transporte eficiente en el tracto de la hembra y su capacidad fertilizante, observando diferencias entre especies, ya que los ambientes químicos y osmóticos son diferentes entre ellas (Holt, 2000a). Es importante señalar que el diseño del recipiente para conservar los espermatozoides en el proceso de congelación influye en la difusión de la temperatura lo cual se reflejará en la viabilidad espermática después de la descongelación (Weitze y col 1988).

Los espermatozoides de las aves tienen una gran tolerancia para soportar cambios bruscos de temperatura, conservando un nivel aceptable de movilidad espermática posterior a un "Shock térmico" de 40 °C a 3°C, y de -76°C hasta -196°C (Fujihara y Ohboshi, 1991). En contraste, se han descrito protocolos que utilizan una tasa de congelación de 1°C/min hasta -70 °C (Wishart, 1989; Fujihara y Buckland, 1987).

Se ha demostrado que el lavado post descongelación para retirar el crioprotector, no altera la capacidad fertilizante del semen, sin embargo su almacenamiento previo por 4 a 24 h, altera de manera negativa su capacidad fertilizante (Van Voorst y Lenstra, 1995).

La criopreservación es un procedimiento con alto interés para conservar el germoplasma, además de permitir diseminar el germoplasma de una mejor manera y hacer evaluaciones específicas previas del semen que se está conservando y se desea utilizar (Tajima y col 1990). Es importante mencionar que existen particularidades propias de cada especie y de cada ejemplar, como puede ser la edad, que permitirán obtener resultados diferentes en los espermatozoides criopreservados para conservar su capacidad fertilizante (Holt, 2000; Lukaszewicz, 2002). La criopreservación de muestras heteroespérmicas y eyaculados de manera individual es una práctica común que se realiza con los mismos protocolos y se utiliza en especies domésticas

(Tselutin y col 1995; Tselutin y col 1999; Douard y col 2000) y silvestres (Gee y Sexton, 1990; Lukaszewicz, 2001).

#### **2.1.2.1. Crioprotectores.**

En la actualidad, los crioprotectores conocidos se dividen en dos grupos, los que atraviesan la membrana celular tales como glicerol, eritritol, adonitol, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA) y los que actúan desde el exterior de la célula, como la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y polivinilpirrolidona (PVP), los cuales han sido estudiados únicamente en espermatozoides de mamífero (Bakst, 1990; De Leeuw y col 1993; Neubert y Menger, 1981; Wolfe y col 2001). El DMSO es uno de los más utilizados para la criopreservación del semen de aves silvestres como grullas (*Chlamydotis undulata*) (Hartley y col 1999), pingüinos (*Spheniscus magellanicus*) (O'Brien y col 1999), Gansos (*Anas spp*) (Tai y col 2001) y rapaces (*Falco peregrinus*, *Aquila adalberti* y *Hiernaetus fasciatus*) (Blanco y col 2000).

La función de los crioprotectores consiste en proteger 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 extracelulares durante la descongelación, los cuales pueden producir daños en la estructura espermática (Holt, 2000; Bakst, 1990; Mazur, 1984).

DMSO y glicerol son los crioprotectores mas utilizados para semen de aves domésticas, sin embargo con el uso del glicerol se daña la mucosa del tracto de la hembra (Hammerstedt y Graham, 1992), además de disminuir la tasa de movilidad espermática e incrementar el porcentaje de espermatozoides muertos y con morfología anormal en el tracto de la hembra mostrando entonces un efecto anticonceptivo (Spreen y col 1990; Long y Kulkarni, 2004; Gill y col 1996). Por otra parte, al evaluar la viabilidad del semen criopreservado con DMSO, en un intervalo de tiempo entre 0 y 24 h post descongelación, se determinó una disminución de la viabilidad del 55 al 40 % aproximadamente (Chalah y Brillard, 1998).

## **2.2. Evaluación espermática.**

La evaluación del semen es requerida en la IA por dos razones. Primero proporciona información de la calidad del semen y segundo, proporciona una idea de la concentración espermática en eyaculados posteriores. El objetivo de la evaluación es predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides, avalado con el análisis de la viabilidad, morfología y actividad metabólica (Donoghue y Wishart, 2000; Etches, 1996). 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 y col 2000 y 2002).

El volumen seminal que se obtenga, en conjunto con la concentración espermática, son requeridos para determinar las tasas de dilución apropiadas para la IA (Parker y McDaniel, 2003). La movilidad espermática es también evaluada comúnmente de manera general, aunque no necesariamente está correlacionada con la capacidad fertilizante (Etches, 1996). Las características de los espermatozoides son de gran importancia, ya que el plasma seminal, en el tracto de la hembra puede diluirse y dispersarse pronto entre las secreciones del oviducto. Aún más, los diluyentes artificiales se usan exitosamente en IA y el medio transportador puede diferir ampliamente del medio natural y aún ser efectivo. De ahí que el plasma seminal puede ser esencial o no, sólo para la supervivencia de los espermatozoides dentro del macho y actuar como medio para su transferencia hacia la hembra (Gilbert, 1996).

Se ha incrementado el uso de técnicas *in vitro* para determinar el efecto de la conservación como el daño por criopreservación y que además pueden estar correlacionadas con 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 unión (Donoghue, 1999; Donoghue y Wishart, 2000) y penetración *in vitro* de proteínas en la MPV (Barbato, 1998; Hammerstedt, 1996).

Por otra parte, en un estudio para seleccionar machos, en donde se analizó la movilidad espermática del eyaculado de 169 gallos, se concluyó que diferencias en la movilidad espermática entre machos, influyen en la fertilidad y almacenamiento (Donoghue y Donoghue, 1997).

En otro tipo de estudios, par evaluar el efecto *in vitro* de estrés hipo-osmótico, en espermatozoides de pavo, se observó que resultan en una susceptibilidad de daño membranal por efecto de la baja temperatura del almacenamiento (Donoghue y col 1996).

En espermatozoides de gallos (Blesbois y col 1999) y pavos (Douard y col 2000), se han demostrado cambios cuantitativos y cualitativos en la composición lipídica durante el almacenamiento a 5°C. Sugiriendo alteraciones del metabolismo endógeno y peroxidación que se reflejan en la calidad del semen durante su almacenamiento *in vitro*.

Por otra parte, se ha demostrado que los cambios en la composición y proporción de fosfolípidos en espermatozoides de gallo, se relaciona con la capacidad fertilizante, observando que la movilidad está correlacionada de manera positiva con el nivel de fosfolípidos y de manera negativa con el colesterol libre. La proporción total de fosfolípidos se incrementa hasta las 39 semanas de edad y después decrece significativamente (Cerolini y col 1997).

El contenido relativo de colesterol libre y triglicéridos no presenta cambios durante la edad y fertilidad. Los ácidos grasos libres y ésteres de colesterol se incrementan continuamente con la edad. La fosfatidil colina y fosfatidil serina están correlacionadas con la edad de manera positiva y con la fertilidad de manera negativa. La relación de fosfatidil etanolamida disminuye significativamente durante el periodo reproductivo, existiendo además una correlación positiva entre la fertilidad y el total de fosfolípidos. Los lípidos y composición de los ácidos grasos del espermatozoide son importantes para predecir la capacidad fertilizante (Cerolini y col 1997).

En las técnicas de criopreservación, comúnmente se evalúa el efecto de los crioprotectores, su concentración, tiempo de equilibrio y procedimiento para descongelar, mediante la evaluación espermática básica y capacidad fertilizante (Baks, 1980; Van Voorst y Leenstra, 1995a; Tselutin y col 1999; Wishart y Wilson, 1999), así como en indicadores de evaluación específica como parámetros de metabolismo energético como la actividad mitocondrial (Ochkur y col 1994) y cambios en la proporción y composición de fosfolípidos membranales (Blesbois y col 1999; Douard y col 2000).

### **3.- Justificación.**

La cacería para conseguir carne, plumas o pieles, la destrucción del hábitat natural, el tráfico ilegal de especies y la escasa educación ambiental, ha llevado a la extinción de muchas especies.

Por otra parte, aunque la reproducción asistida es una alternativa para contribuir a la reproducción eficiente de las especies domésticas y ayuda a la conservación de especies silvestres, aún no existen técnicas eficientes de criopreservación espermática. Se sabe que la criopreservación es significativamente letal para los espermatozoides, además de producir alteraciones morfológicas y fisiológicas que interfieren con su capacidad fertilizante y se requiere de la adaptación de esta técnica en particular para cada especie, además de lograr protocolos mas eficientes para conservar su integridad. Existen como en el caso de los mamíferos las técnicas de FIV, inseminación subzonal e inyección intracitoplásmica lo cual cuestiona el requerimiento de la integridad espermática (Holt, 2000). En las aves aún no están desarrolladas técnicas de este tipo por lo cual, se necesita hacer métodos de criopreservación eficientes. La criopreservación ha permitido la creación de bancos de semen de diferentes especies animales exóticas que pueden estar o no en peligro de extinción y en las cuales aún no se ha desarrollado plenamente la reproducción asistida (Tselutin y col 1995; Holt, 2000; Thiber y Guerin, 2000).

Existen investigaciones sobre este tema, sin embargo, no existen los suficientes trabajos que integren la evaluación básica que se realiza al semen en los centros de IA, con la fisiología espermática y la capacidad fertilizante de los espermatozoides recién eyaculados y/o criopreservados de aves. Con estos antecedentes surge la necesidad de proponer protocolos de criopreservación y la utilización de diferentes crioprotectores, que permitan conservar de manera viable los espermatozoides de las aves como los faisanes como especie alternativa de producirse de una manera intensiva, con ayuda de las técnicas de reproducción animal asistida, o como las aves rapaces, que están protegidas por la normatividad nacional y de la cual además existe un interés particular por los cetreros (Niesters, 2000; NOM-059-ECOL-1994). Por todo esto, se propone investigar este tema como proyecto de tesis.





#### **4.- Hipótesis.**

La movilidad, viabilidad, morfología espermática, se modificarán al someterse a condiciones físicas (temperaturas de 5°C a – 196°C) y químicas (crioprotectores: DMSO y PVP). Sin embargo, la proporción de esta modificación dependerá del efecto del crioprotector, por lo cual, los espermatozoides recién eyaculados y conservados con crioprotectores con diferente mecanismo de acción, mostrarán indicadores distintos lo cual se reflejará en la capacidad fertilizante de éstos.

La membrana plasmática de los espermatozoides criopreservados se modificará de diferente manera con cada uno de los crioprotectores utilizados y en cada una de las especies estudiadas.

## **5.- Objetivos.**

### **5.1. Objetivo general.**

Determinar los indicadores de evaluación básica y distribución de carbohidratos en la superficie de espermatozoides en fresco y descongelados de: Gallo (*Gallus domesticus*), Faisán de collar (*Phasianus colchicus*) y Halcón (*Buteo jamaicensis*); y capacidad fertilizante en espermatozoides de *G. domesticus* y *Ph. colchicus*.

#### **5.1.1.- Objetivos particulares.**

-Comparar los crioprotectores DMSO y PVP en espermatozoides de gallo, faisán y halcón.

-Comparar los indicadores de evaluación espermática, distribución de carbohidratos membranales y fertilidad de los espermatozoides.

-Determinar mediante la inseminación artificial, la capacidad fertilizante de los espermatozoides descongelados.

-Evaluar la criopreservación de espermatozoides de gallos, para utilizarse como modelo para espermatozoides de otras especies de aves.

-Comparar el efecto de criopreservar muestras heteroespérmicas o eyaculados individuales.

## **6.- Material y métodos.**

Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron cinco gallos y cinco gallinas (*G domesticus*), por existir antecedentes de diferentes técnicas de criopreservación y el uso de varios crioprotectores. Como representantes de especies silvestres, se utilizaron faisanes de collar (*P colchicus*), cinco machos y cinco hembras; también se utilizaron cuatro machos de halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*); en estas dos especies, no existen antecedentes de criopreservación espermática. Los ejemplares se alojaron individualmente, expuestos a fotoperiodo natural. Se alimentaron *ad libitum* gallos y faisanes con dieta comercial para aves de postura, los halcones, con alimentación convencional (200 g de pollo/día). La obtención del semen se realizó durante la estación reproductiva natural de gallináceas, febrero a mayo y halcones abril y mayo, en la región central de México.

Para la realización de los experimentos, todos los reactivos se adquirieron de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

### **6.1. Experimentos y tratamientos.**

**Experimento 1.-** Se determinaron los indicadores de evaluación espermática básica en espermatozoides en fresco y post descongelación con DMSO y PVP, de cada una de las especies estudiadas.

**Experimento 2.-** Se determinó la capacidad fertilizante *in vivo*, de los espermatozoides en fresco y descongelados de gallos y faisanes.

**Experimento 3.-** Se evaluó la distribución de los carbohidratos N-acetil glucosamina, ácido siálico y manosa, en la superficie membranal de los espermatozoides en fresco y criopreservados.

**Experimento 4.-** En gallos y faisanes, se comparó, el efecto de criopreservar con el mismo protocolo, muestras heteroespérmicas y eyaculados de manera individual de cada una de estas especies.

### **6.2. Obtención de semen y muestras heteroespérmicas.**

El semen se obtuvo con la técnica de masaje descrita para aves domésticas por Burrows y Quinn, (1937). Esta técnica se adaptó para faisanes

y halcones, realizando el masaje de manera más intensa en la región lumbar y en el contorno de la cloaca para ayudar a exponer la papila eréctil. Las muestras heteroespérmicas se prepararon mezclando en un mismo recipiente los eyaculados de cinco ejemplares de la misma especie y ajustando a un volumen de 500 µl para gallos y 100 µl para faisanes. El semen se obtuvo de cada ejemplar una vez por día, durante los 45 días que duró el estudio. Todos los eyaculados y muestras heteroespérmicas, se evaluaron en fresco. Únicamente se utilizaron eyaculados con evaluación básica dentro de los indicadores normales (Garner, 2002). Posteriormente, se mezclaron con el diluyente BPSE a 5°C (Sexton, 1977) para continuar con el proceso de criopreservación o ser utilizadas para la IA.

### **6.3. Evaluación seminal básica.**

El semen se colectó con una micropipeta graduada, con la cual se determinó el volumen eyaculado. La concentración se determinó por microscopía óptica, con una cámara de Neubauer y haciendo la relación con el volumen. La movilidad se evaluó a 400 aumentos en un microscopio invertido, en diferentes áreas del portaobjetos, para estimar un porcentaje. La viabilidad y morfología se evaluaron en una misma preparación, con una tinción vital de E-N (1% eosina y 5% nigrosina) haciendo una mezcla con tres partes de semen y una de colorante; en cada preparación, se evaluaron en diferentes áreas del porta objetos hasta contar 200 células con un microscopio óptico para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos) al momento de hacer la preparación a 400 aumentos. La morfología, se evaluó a 1000 aumentos, utilizando aceite de inmersión, las anomalías fueron: Micro y macro cabezas, distensión y/o doblamientos en cabeza o pieza media y colas enrolladas y/o dobladas (Bakst, 1980).

### **6.4. Evaluación de los carbohidratos membranales.**

La distribución de carbohidratos de membrana se evaluó por métodos microscópicos, siguiendo la técnica descrita por Fierro y col (1996). Se utilizaron lectinas conjugadas a isotiocionato de fluoresceína (FITC): *Triticum vulgare* aglutinina (WGA), que se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o

ácido siálico; y *Canavalina ensiformis* aglutinina (Con-A), específica para residuos de manosa. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente alícuotas de  $5 \times 10^6$  espermatozoides con 5  $\mu$ l de lectina a una dilución 1:50. Se lavaron con PBS, posteriormente se centrifugaron a 600g por 5 min para retirar el sobrenadante y fijar con paraformaldehído al 1 % el paquete celular. Se realizó un control negativo para cada muestra incubando a las lectinas con sus respectivos azúcares antes de ponerse en contacto con los espermatozoides. De este paquete marcado se hicieron preparaciones para ser analizadas al menos 100 células por preparación a 1000 aumentos en un microscopio de fluorescencia a 260 nm, y determinar los patrones de fluorescencia y la proporción de espermatozoides teñidos.

#### **6.5. Evaluación de fertilidad.**

Se inseminaron cinco gallinas y cinco faisanas con 0.5 ml cada una con semen fresco una vez por semana y con semen descongelado una vez cada tercer día. La IA se realizó durante el periodo natural de postura, durante tres semanas consecutivas. Todos los huevos obtenidos se incubaron a 37.7 °C durante siete días. Transcurrido este tiempo se confirmó la fertilidad mediante ovoscopia (Blake y col 1987; Van Voorst y Leenstra, 1995). Para esta prueba sólo se usaron muestras heteroespéricas.

#### **6.6. Procedimiento de criopreservación (congelación y descongelación).**

Los crioprotectores utilizados, fueron: DMSO por ser uno de los más utilizados en especies domésticas y exóticas. PVP que es un crioprotector con un mecanismo de acción distinto al anterior.

El procedimiento se hizo con base en dos técnicas (Hartley y col 1999; O'Brien y col 1999). El semen se congeló en una solución de BPSE al 3 % con DMSO ó 6% de PVP de eyaculados de cualquiera de las tres especies, o muestras heteroespéricas de gallo o faisán. El semen se diluyó con BPSE a 5°C en una proporción 1:4. Después de 15 minutos de equilibrio, se hizo una segunda dilución con BPSE y DMSO o PVP en una proporción 1:1, con 3 minutos de equilibrio a 5°C. Gotas de 150  $\mu$ l, se dejaron caer directamente en cavidades cóncavas de hielo seco a -76 °C. Las gotas congeladas se

depositaron en criotubos, para ser almacenadas a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. Las muestras se descongelaron en BPSE a  $5^{\circ}\text{C}$  durante cinco minutos.

### **6.7. Análisis estadístico.**

La comparación estadística de los porcentajes de movilidad, viabilidad, morfología espermática y distribución de los carbohidratos en la superficie membranal, entre las muestras, se realizó con la prueba *T. Student*, con el programa informático *STATISTICA* ®. La comparación de los indicadores de fertilidad, se realizó mediante la prueba de  $X^2$ .

## **7.- Resultados.**

Se colectaron 20 muestras heteroespérmicas de gallos y faisanes, también se colectaron de manera individual 20 eyaculados de cada una de las tres especies estudiadas. De cada uno de estos grupos, 10 fueron criopreservadas con DMSO y 10 con PVP. En todos los casos se analizaron en fresco y post criopreservación.

### **7.1. Evaluación seminal de muestras heteroespérmicas de gallo.**

El volumen de las muestras heteroespérmicas en todos los casos fue de 500  $\mu\text{l}$ , las cuales tuvieron una concentración de  $1.7 \pm 0.3 \times 10^9$  espermatozoides/ml. El promedio de la concentración espermática de las muestras criopreservadas fue de  $66.7 \pm 9 \times 10^9$  espermatozoides / 150  $\mu\text{l}$ . Con respecto a los indicadores de la evaluación espermática, en el cuadro 3 se observa que los indicadores en fresco fueron superiores con diferencia estadística con respecto a los determinados post criopreservación con cualquiera de los crioprotectores.

### **7.2. Indicadores de la evaluación seminal de eyaculados individuales de gallo.**

El volumen de cada eyaculado en promedio fue de  $135 \pm 13.1 \mu\text{l}$ , con una concentración espermática de  $2.4 \pm 0.2 \times 10^9$  espermatozoides / ml. Las muestras criopreservadas tuvieron una concentración promedio de  $51.6 \pm 11.6 \times 10^9$  espermatozoides / 150  $\mu\text{l}$ . En el cuadro 4 se muestran indicadores de evaluación espermática en los cuales se observó que los valores determinados en fresco fueron superiores a los determinados en las muestras post criopreservación. Los indicadores de viabilidad y morfología normal determinados en muestras descongeladas están dentro de los normales de cada especie.



**Cuadro 3.** Promedios de movilidad, viabilidad y morfología normal de muestras heteroespérmicas en fresco y post criopreservación, con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de gallo (*Gallus domesticus*).

Indicador/Variable (%)	Fresco $\bar{X} \pm DE$ (n = 20)	DMSO $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	PVP $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
<b>Movilidad</b>	80.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	52.5 ± 10.0 <sup>b</sup>	31.5 ± 2.4 <sup>c</sup>
<b>Viabilidad</b>	94.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	84.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	89.2 ± 1.5 <sup>c</sup>
<b>Morfología normal</b>	97.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	94.0 ± 1.3	94.2 ± 1.4

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )  
n = número de muestras heteroespérmicas. Cada muestra con semen de 5 ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos cuatro meses.

**Cuadro 4.** Promedios de movilidad, viabilidad y morfología normal, de eyaculados individuales en fresco y post criopreservación, con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de gallo (*Gallus domesticus*).

Indicador/Variable (%)	Fresco $\bar{X} \pm DE$ (n = 20)	DMSO $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	PVP $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
<b>Movilidad</b>	84.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	36.0 ± 3.9	36.0 ± 4.5
<b>Viabilidad</b>	98.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	94.8 ± 1.0	93.8 ± 0.9
<b>Morfología normal</b>	98.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	96.3 ± 1.5 <sup>ab</sup>	95.1 ± 1.1 <sup>b</sup>

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )  
n = número de eyaculados individuales y/o muestras, obtenidos de cinco ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos cuatro meses.

### 7.3. Evaluación seminal de muestras heteroespérmicas de faisán.

El volumen de las muestras heteroespérmicas en todos los casos fue de 100  $\mu\text{l}$ , las cuales tuvieron una concentración de  $1.5 \pm 0.1 \times 10^9$  espermatozoides / ml. El promedio de la concentración espermática de las muestras criopreservadas fue de  $21.2 \pm 3.8 \times 10^9$  espermatozoides / 150  $\mu\text{l}$ . Con respecto a los indicadores de la evaluación espermática, en el cuadro 5 se observa que la movilidad espermática se redujo aproximadamente un 50 % en las muestras descongeladas y los indicadores de viabilidad y morfología espermática, estuvieron dentro de los intervalos normales.

**Cuadro 5.** Promedios de movilidad, viabilidad y morfología normal, de muestras heteroespérmicas en fresco y post criopreservación, con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de faisán de collar (*Phasianus colchicus*).

Indicador/Variable (%)	Fresco	DMSO	PVP
	$\bar{X} \pm \text{DE}$ (n = 20)	$\bar{X} \pm \text{DE}$ (n = 10)	$\bar{X} \pm \text{DE}$ (n = 10)
Movilidad	84.0 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	40.5 $\pm$ 4.9	37.0 $\pm$ 4.2
Viabilidad	92.9 $\pm$ 2.1	83.5 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	89.8 $\pm$ 2.1
Morfología Normal	96.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	89.4 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>	93.9 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )  
n = número de muestras heteroespérmicas. Cada muestra con semen de 5 ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos cuatro meses.

### 7.4. Evaluación seminal de eyaculados individuales de faisán.

El volumen de cada eyaculado en promedio fue de  $17.6 \pm 2.2 \mu\text{l}$ , con una concentración espermática de  $2.3 \pm 0.3 \times 10^9$  espermatozoides / ml. Las muestras criopreservadas tuvieron una concentración promedio de  $34.8 \pm 13.1 \times 10^9$  espermatozoides / 150  $\mu\text{l}$ . En el cuadro 6, se muestra que los indicadores de movilidad, viabilidad y morfología normal presentaron indicadores inferiores con respecto a los valores de los eyaculados en fresco, estando dentro del intervalo normal los valores de viabilidad y morfología normal.

**Cuadro 6.** Promedios de movilidad, viabilidad y morfología normal, de eyaculados individuales en fresco y post criopreservación, con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de faisán de collar (*Phasianus colchicus*).

Indicador/Variable (%)	Fresco	DMSO	PVP
	$\bar{X} \pm DE$ (n = 20)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
<b>Movilidad</b>	82.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	42.0 $\pm$ 11.5	34.0 $\pm$ 4.5
<b>Viabilidad</b>	97.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	93.4 $\pm$ 1.2	94.7 $\pm$ 1.3
<b>Morfología normal</b>	97.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	95.3 $\pm$ 0.4	94.9 $\pm$ 1.5

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )  
n = número de eyaculados individuales y/o muestras, obtenidos de cinco ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos cuatro meses.

### 7.5. Indicadores de la evaluación seminal de eyaculados individuales de halcón.

Se analizaron en fresco 20 eyaculados individuales; se criopreservaron y analizaron diez eyaculados con cada uno de los crioprotectores. El volumen del eyaculado que se midió en todos los casos fue inferior a 5  $\mu$ l, con una concentración espermática entre 5 y 50  $\times 10^3$  espermatozoides/eyaculado. La concentración espermática de las muestras criopreservadas fue en promedio de 6.05  $\times 10^3$  espermatozoides/50  $\mu$ l. En el cuadro 7 se observa que los promedios de movilidad, viabilidad y morfología normal determinados en fresco fueron superiores comparados con los valores determinados post criopreservación con DMSO o PVP.

**Cuadro 7.** Movilidad, viabilidad y morfología normal, de eyaculados individuales en fresco y post criopreservación, con dimetilsulfóxido

(DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP) de halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*).

Indicador/Variable %	Fresco	DMSO	PVP
	$\bar{X} \pm DE$ (n = 20)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
<b>Movilidad</b>	67.0 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	34.0 $\pm$ 3.9	39.0 $\pm$ 7.3
<b>Viabilidad</b>	89.0 $\pm$ 4.5	82.0 $\pm$ 6.0	83.3 $\pm$ 2.8
<b>Morfología normal</b>	95.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	92.5 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	82.7 $\pm$ 3.2 <sup>c</sup>

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )

n = número de eyaculados individuales y/o muestras, obtenidos de cuatro ejemplares.

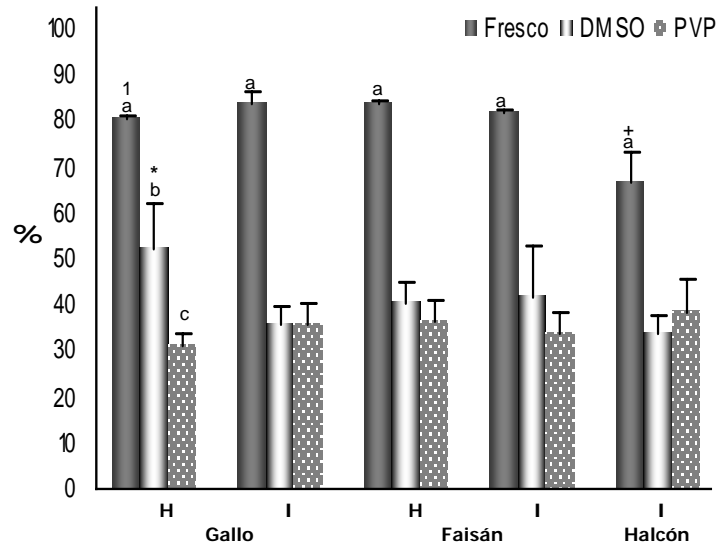
El tiempo de congelación fue de por lo menos cuatro meses.

### 7.6. Comparación de los indicadores de movilidad espermática, en fresco y post criopreservación, de muestras heteroespérmicas y eyaculados individuales de las especies estudiadas.

Los promedios de movilidad espermática en fresco de los eyaculados y muestras heteroespérmicas de gallo, faisán y halcón, mostraron valores superiores a los determinados post criopreservación con DMSO o PVP de gallo, faisán y halcón (Figura 3). En estos últimos se observa que de manera general se redujo el valor en aproximadamente un 50 % con respecto a los indicadores en fresco.

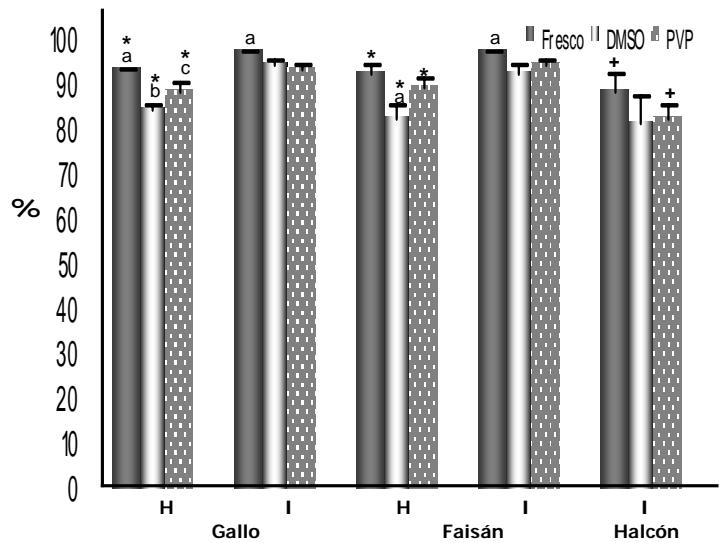
### 7.7. Comparación de los indicadores de viabilidad espermática, en fresco y post criopreservación, de muestras heteroespérmicas y eyaculados individuales de las especies estudiadas.

Los valores de viabilidad espermática en fresco, de los eyaculados y muestras heteroespérmicas de gallo y faisán, fueron superiores a los valores determinados en muestras criopreservadas con DMSO o PVP, respectivamente ( $p < 0.05$ ). (Figura 4). En halcones, los valores de viabilidad de muestras en fresco, fueron similares a los determinados en muestras descongeladas con DMSO o PVP.



**Figura 3.** Indicadores de movilidad espermática en eyaculados (I) y muestras heteroespéricas (H) de las especies estudiadas.

En la misma especie, muestras en fresco vs descongelaadas (Literal) y eyaculados individuales vs muestras heteroespéricas (\*); entre diferentes especies muestras heteroespéricas de gallo vs faisán (número) y eyaculados individuales de gallo vs faisán vs halcón (+) ( $p < 0.05$ ).

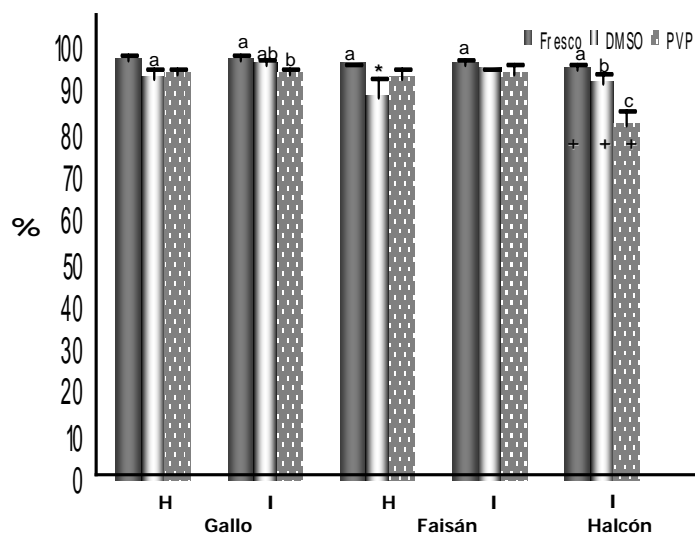


**Figura 4.** Indicadores de viabilidad espermática en eyaculados (I) y muestras heteroespéricas (H) de las especies estudiadas.

En la misma especie, muestras en fresco vs descongelaadas (Literal) y eyaculados individuales vs muestras heteroespéricas (\*); entre diferentes especies muestras heteroespéricas de gallo vs faisán (número) y eyaculados individuales de gallo vs faisán vs halcón (+) ( $p < 0.05$ ).

### 7.8. Comparación de los indicadores de morfología normal, en fresco y post criopreservación, de muestras heteroespérmicas y eyaculados individuales de las especies estudiadas.

Con respecto a la morfología espermática normal, los promedios en fresco de los eyaculados y muestras heteroespérmicas, respectivamente de gallo, faisán y halcón, tuvieron valores superiores con respecto a las muestras post criopreservación con DMSO o PVP, respectivamente de cada una de las especies ( $p < 0.05$ ) (Figura 5). Excepto los eyaculados criopreservados con DMSO de gallo en los cuales encontramos valores similares a los determinados en fresco.



**Figura 5.** Indicadores de morfología espermática en eyaculados (I) y muestras heteroespérmicas (H) de las especies estudiadas.

En la misma especie, muestras en fresco vs descongeladas (Literal) y eyaculados individuales vs muestras heteroespérmicas (\*); entre diferentes especies muestras heteroespérmicas de gallo vs faisán (número) y eyaculados individuales de gallo vs faisán vs halcón (+) ( $p < 0.05$ ).

### **Comparación entre eyaculados y muestras heteroespérmicas en fresco y post descongelación**

En gallos se encontró un valor inferior en cuanto a la movilidad espermática de los eyaculados criopreservados con DMSO con respecto a muestras heteroespérmicas. No se observaron cambios al comparar las otras variables.

Al comparar los promedios de viabilidad de los eyaculados en fresco, se encontraron en todos los casos, valores superiores con diferencia estadística con respecto al muestras heteroespérmicas en fresco y descongeladas con cualquiera de los crioprotectores.

La morfología espermática de los eyaculados criopreservados con DMSO mostró un valor superior con respecto a las muestras heteroespérmicas de gallo ( $p < 0.05$ ).

### **7.9. Capacidad fertilizante del semen fresco diluido y descongelado.**

En gallinas inseminadas con semen fresco se encontró un porcentaje de fertilidad de 59 %, que fue mayor, comparado con el porcentaje obtenido al utilizar semen descongelado con cualquiera de los crioprotectores (40 % con DMSO y 39 % con PVP). En las faisanas, los promedios de fertilidad obtenidos con semen fresco (47 %) o descongelado (60 % con DMSO y 57 % con PVP), fueron similares. También se encontró que al ser inseminadas con semen fresco o descongelado, las faisanas tuvieron mayor fertilidad comparadas con los resultados en gallinas (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Porcentajes de fertilidad (PF), mediante inseminación artificial con semen fresco diluido y criopreservado con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), en gallinas (n = 5) y faisanas (n = 5).

CONDICIÓN DEL SEMEN	GALLINAS		FAISANAS	
	HF / HT	%	HF / HT	%
FRESCO	57 / 97	59 *	30 / 47	64
DMSO	32 / 80	40	30 / 51	60
PVP	31 / 77	39	20 / 35	57

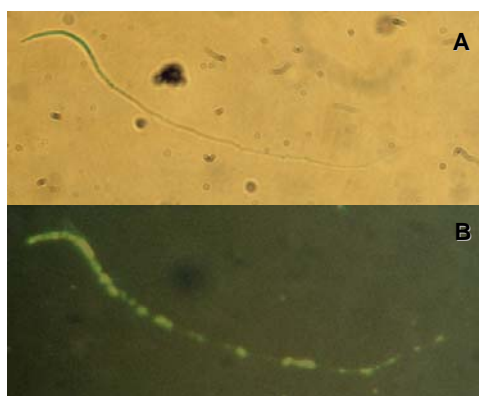
\* Diferencia entre fresco VS descongelado ( $p < 0.05$ )

HT = Total de huevos. HF = Total de huevos fértiles.

n = Número de hembras inseminadas de cada especie.

#### 7.10. Patrón de fluorescencia y porcentaje de espermatozoides de gallo, teñidos con WGA-FITC y Con A-FITC.

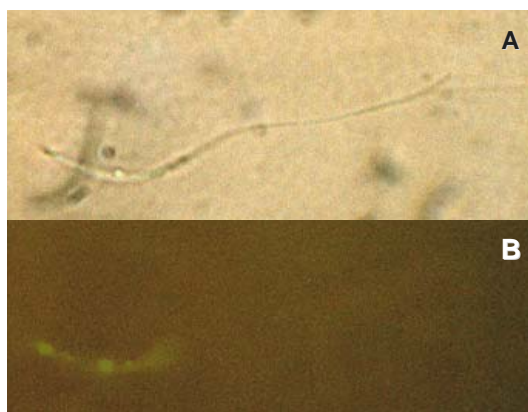
En espermatozoides en fresco y post criopreservación con DMSO o PVP, de muestras heteroespérmicas y eyaculados individuales de gallo, se observó únicamente un patrón de fluorescencia en presencia de WGA-FITC (Figura 6). En este patrón, se encontró una fluorescencia intensa por completo en la región de la cabeza y cuello; en la región de la cola, también se observa una fluorescencia, sin embargo, en ésta presenta segmentos con fluorescencia de menor intensidad.



**Figura 6.** Espermatozoides de gallo a 100 X en campo claro (A), con el patrón de fluorescencia con la lectina WGA-FITC (B).



En espermatozoides en fresco y post criopreservación con DMSO o PVP, de muestras heteroespérmicas y eyaculados individuales de gallo, se observó únicamente un patrón de fluorescencia con el uso de Con-A-FITC (Figura 7). En este patrón, se encontró en la región de la cabeza y cuello una fluorescencia tenue con segmentos de fluorescencia con mayor intensidad; la cola no presentó fluorescencia.



**Figura 7.** Espermatozoides de gallo a 100 X en campo claro (A), con el patrón de fluorescencia con la lectina Con-A-FITC (B).

En las muestras heteroespérmicas de gallo, la proporción de espermatozoides que presentó el patrón de fluorescencia al usar la lectina WGA-FITC, no mostró diferencias entre los valores en fresco y en muestras descongeladas con DMSO o PVP. Sin embargo la proporción de espermatozoides con el patrón de fluorescencia con la lectina Con-A-FITC, en espermatozoides en fresco, mostró valores inferiores a los determinados en las muestras descongeladas (Cuadro 9).

La proporción de espermatozoides de los eyaculados de gallo, que presentó el patrón de fluorescencia al usar la lectina WGA-FITC, mostró diferencias entre los valores en fresco con menor proporción con respecto a las muestras descongeladas con DMSO o PVP. La proporción de espermatozoides con el patrón de fluorescencia al usar la lectina Con-A-FITC en espermatozoides en fresco, no mostró diferencias con respecto a los valores determinados en las muestras descongeladas (Cuadro 10).

**Cuadro 9.** Porcentaje de espermatozoides teñidos con WGA-FITC o Con-A-FITC, en muestras heteroespérmicas en fresco y post

criopreservación con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de gallo (*Gallus domesticus*).

INDICADOR (%)	Fresco $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	DMSO $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	PVP $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
WGA	46.6 ± 5.2	46.5 ± 4.7	39.6 ± 6.7
Con-A	33.3 ± 3.3 <sup>a</sup>	41.0 ± 3.5	48.5 ± 8.1

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )  
n = número de muestras heteroespéricas. Cada muestra con semen de cinco ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos seis meses.

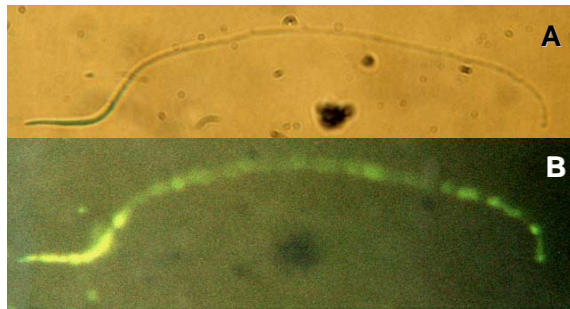
**Cuadro 10.** Porcentaje de espermatozoides teñidos con WGA-FITC o Con-A-FITC, en eyaculados individuales, en fresco y post criopreservación con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de gallo (*Gallus domesticus*).

INDICADOR (%)	Fresco $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	DMSO $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	PVP $\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
WGA	48.5 ± 2.8 <sup>a</sup>	68.1 ± 5.1	68.7 ± 8.1
Con-A	45.6 ± 1.2	50.0 ± 6.3	51.2 ± 5.4

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )  
n = número de eyaculados individuales y/o muestras, obtenidos de cinco ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos seis meses.

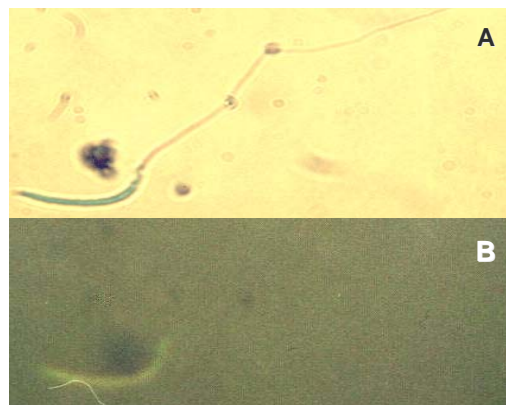
### 7.11. Patrón de fluorescencia y porcentaje de espermatozoides de faisán, teñidos con WGA-FITC y Con A-FITC.

En espermatozoides en fresco y post criopreservación con DMSO o PVP, de muestras heteroespéricas y eyaculados individuales de faisán, se observó únicamente un patrón de fluorescencia con el uso de WGA-FITC (Figura 8). En este patrón se observó una fluorescencia intensa por completo en la región de la cabeza y cuello; en la región de la cola también se observó fluorescencia, sin embargo, en ésta presenta segmentos con fluorescencia de menor intensidad.



**Figura 8.** Espermatozoides de faisán a 100 X en campo claro (A), con patrón de fluorescencia en presencia de la lectina WGA-FITC (B).

En espermatozoides en fresco y post criopreservación con DMSO o PVP, de muestras heteroespérmicas y eyaculados individuales de faisán, se observó únicamente un patrón de fluorescencia con el uso de Con-A-FITC (Figura 9). En este patrón, se observó en la región de la cabeza y cuello una fluorescencia tenue con mayor intensidad en la región apical y del cuello; en la cola no presentó fluorescencia.



**Figura 9.** Espermatozoides de faisán a 100 X en campo claro (A), con el patrón de fluorescencia con la lectina Con-A-FITC (B).

La proporción de espermatozoides de las muestras heteroespérmicas de faisán, con el patrón de fluorescencia con la lectina WGA-FITC, no mostró diferencias entre los valores en fresco y en muestras descongeladas con DMSO o PVP. Los espermatozoides descongelados con PVP, con el patrón de fluorescencia con la lectina Con-A-FITC, mostraron una mayor proporción con

respecto a los espermatozoides en fresco y descongelados con DMSO (Cuadro 11).

La proporción de espermatozoides de los eyaculados de faisán que presentó el patrón de fluorescencia con la lectina WGA-FITC, presentó un comportamiento azaroso entre los espermatozoides en fresco y los descongelados. Con respecto a la proporción de espermatozoides con el patrón de fluorescencia con la lectina Con-A-FITC, los espermatozoides descongelados, mostraron una menor proporción de células fluorescentes con respecto a los espermatozoides en fresco. (Cuadro 12).

**Cuadro 11.** Porcentaje de espermatozoides teñidos con WGA-FITC o Con-A-FITC, en muestras heteroespérmicas en fresco y post criopreservación con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de faisán de collar (*Phasianus colchicus*) (n = 10).

INDICADOR (%)	Fresco	DMSO	PVP
	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
WGA	47.7 ± 5.8	45.0 ± 5.3	54.0 ± 4.2
Con-A	41.0 ± 5.6	42.7 ± 3.7	52.4 ± 4.0 <sup>a</sup>

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística (p<0.05)  
n = número de muestras heteroespérmicas. Cada muestra con semen de cinco ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos seis meses.

**Cuadro 12.** Porcentaje de espermatozoides teñidos con WGA-FITC o Con-A-FITC, en eyaculados individuales en fresco y post criopreservación con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de faisán de collar (*Phasianus colchicus*).

INDICADOR (%)	Fresco	DMSO	PVP
	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
WGA	57.9 ± 3.0 <sup>a</sup>	64.8 ± 3.4 <sup>b</sup>	58.8 ± 4.1 <sup>ab</sup>
Con-A	56.0 ± 2.2 <sup>a</sup>	48.3 ± 3.8	49.6 ± 3.5

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística (p<0.05)  
n = número de eyaculados individuales y/o muestras, obtenidos de cinco ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos seis meses.

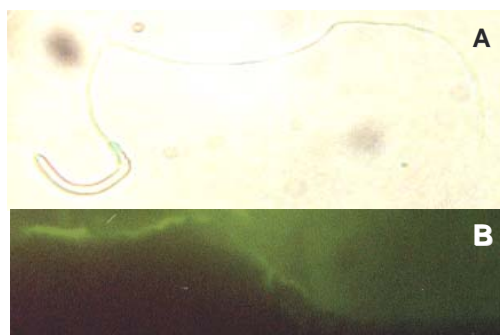
### 7.12. Patrón de fluorescencia y porcentaje de espermatozoides de halcón, teñidos con WGA-FITC y Con A-FITC.

No se encontraron diferencias al comparar la proporción de espermatozoides marcados con el uso de la lectina WGA entre las muestras en fresco y descongeladas. Al comparar el porcentaje de espermatozoides marcados con la lectina Con-A, se encontró una menor proporción de espermatozoides marcados en las muestras en fresco con respecto a las descongeladas; entre las criopreservadas se encontró una mayor proporción en las que se utilizó PVP (Cuadro 13).

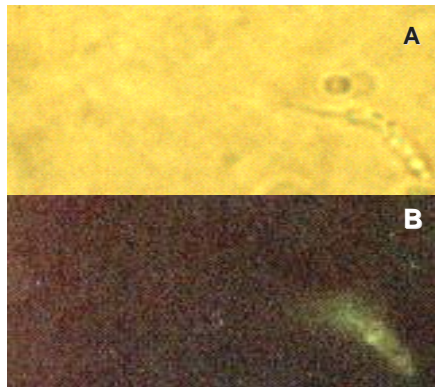
**Cuadro 13.** Porcentaje de espermatozoides teñidos con WGA-FITC o Con-A-FITC, en eyaculados individuales en fresco y post criopreservación con dimetilsulfóxido (DMSO) o polivinilpirrolidona (PVP), de halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*).

INDICADOR (%)	Fresco	DMSO	PVP
	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)	$\bar{X} \pm DE$ (n = 10)
WGA	51.7 $\pm$ 7.8	49.5 $\pm$ 6.0	51.1 $\pm$ 5.4
Con-A	30.4 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	39.8 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	47.1 $\pm$ 5.0 <sup>c</sup>

Promedios con distinto superíndice, entre columnas, presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )  
n = número de eyaculados individuales y/o muestras, obtenidos de cuatro ejemplares.  
El tiempo de congelación fue de por lo menos seis meses.

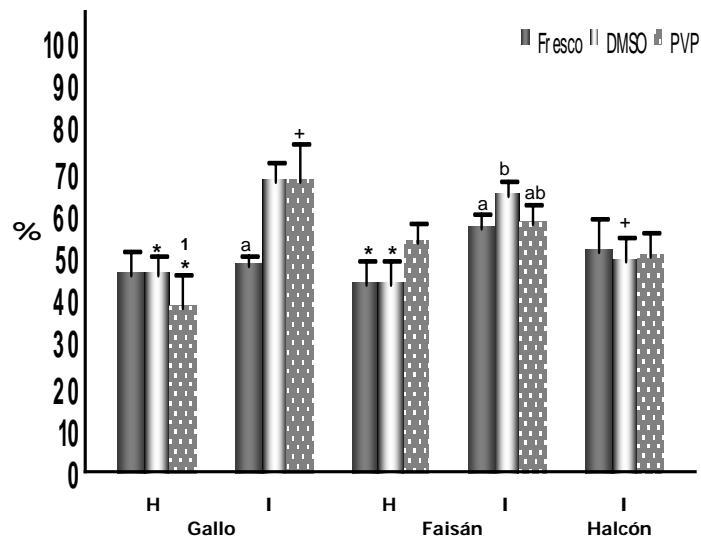


**Figura 10.** Espermatozoides de halcón a 100 X en campo claro (A), con el patrón de fluorescencia con la lectina WGA-FITC (B).



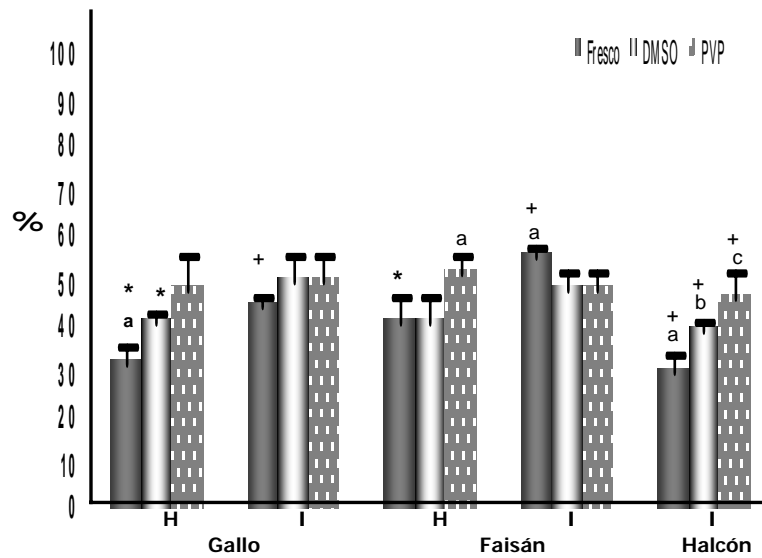
**Figura 11.** Espermatozoides de halcón a 100 X en campo claro (A), con el patrón de fluorescencia con la lectina Con-A-FITC (B).

Al comparar la proporción de espermatozoides teñidos con la lectinas WGA-FITC (Figura 12) y Con-A-FITC (Figura 13), se observó que las proporciones de espermatozoides teñidos se alteran.



**Figura 12.** Indicadores de espermatozoides con el patrón de fluorescencia con la lectina WGA-FITC en eyaculados (I) y muestras heteroespérmicas (H) de las especies estudiadas.

En la misma especie, muestras en fresco vs descongeladas (Literal) y eyaculados individuales vs muestras heteroespérmicas (\*); entre diferentes especies muestras heteroespérmicas de gallo vs faisán (número) y eyaculados individuales de gallo vs faisán vs halcón (+) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13.** Indicadores de espermatozoides con el patrón de fluorescencia con la lectina Con-A-FITC en eyaculados (I) y muestras heteroespérmicas (H) de las especies estudiadas.

En la misma especie, muestras en fresco vs descongeladas (Literal) y eyaculados individuales vs muestras heteroespérmicas (\*); entre diferentes especies muestras heteroespérmicas de gallo vs faisán (número) y eyaculados individuales de gallo vs faisán vs halcón (+) ( $p < 0.05$ ).

## 8.- Discusión.

La colección de semen en las aves es compleja, sin embargo se ha descrito que la técnica de masaje es la más efectiva, comparada con otros métodos como la electro eyaculación en rapaces y el uso de maniqués en grullas (Temple, 1972; Weaver y Cade, 2000; Carpenter, 1986). Usualmente dos sesiones por día durante un periodo continuo de 15 a 20 días se requieren para obtener buenos eyaculados, limpios de uratos y/o heces. A pesar de lograr buenos resultados con esta técnica, es importante señalar que existen factores conductuales propios de cada ejemplar y especie que se reflejan en la calidad de los eyaculados que se obtienen (Ferrante y col 2001), así como la frecuencia con la que se recolecta el semen (Noirault y Brillard, 1999). En este trabajo, se observó que en gallináceas, al obtener los eyaculados de manera consecutiva una vez por día, mostraban indicadores de calidad seminal estables, con valores altos y limpios de heces y uratos y por el contrario, al no obtener los eyaculados de manera continua, estos presentaban variabilidad, principalmente en los indicadores de movilidad y viabilidad espermática. Para el caso de halcones, se observó que a pesar de obtener eyaculados provenientes de ejemplares improntados, no necesariamente en estos se obtuvieron los indicadores mas altos, ya que en varios casos, los eyaculados con mayor concentración y calidad espermática, se obtuvieron de ejemplares que estaban alojados en exhibidores y que nunca habían sido sometidos a este tipo de manejo, demostrándose que al menos el estrés por manejo, no influyo en la calidad de los eyaculados obtenidos.

Se ha observado que los resultados que se logran, sobretodo en especies silvestres son diferentes ya que en muchos casos la estacionalidad biológica de cada especie influye en la actividad reproductiva y por lo tanto en la producción de gametos por ejemplo el cernícalo (*Falco sparverius*) que presenta un periodo reproductivo de aproximadamente 70 días (Bird y Laguë, 1977) y el faisán de collar con un periodo reproductivo aproximado de 150 días (*Phasianus colchicus*) (Kim y Yang, 2001). Esto puede ayudar explicar la diferencia en la concentración espermática entre los eyaculados de gallináceas y rapaces, ya que en las primeras, el comportamiento de los machos es



polígamo dominando una parvada, en la cual las hembras pueden ovopositar decenas de huevos durante un periodo reproductivo de varios meses, mientras que en aves rapaces el periodo reproductivo se reduce únicamente a un par de meses además de la conducta monógama de la especie, aunado a que estas únicamente ovopositan dos a tres huevos por temporada. Siendo esto una probable explicación que para entender que no se requiere de una gran producción espermática de las aves rapaces, comparado con las gallináceas.

Los indicadores de evaluación espermática de los eyaculados de gallo fueron similares al compararlos con los de faisán. Al comparar los indicadores de gallos o faisanes con los de halcones se encontraron diferencias en los promedios de movilidad, viabilidad y morfología. Estas diferencias se pueden explicar desde las características iniciales de los eyaculados, observándose principalmente la diferencia en la concentración espermática en el eyaculado de los halcones, que al tener una mayor área en la cual se puede conservar los espermatozoides, estos pueden tener una actividad metabólica mayor que induce su desgaste energético a mayor velocidad, disminuyendo su movilidad y viabilidad comparado con el semen de gallináceas. También se encontraron diferencias estadísticas al comparar los promedios de movilidad de muestras heteroespéricas en fresco de gallos y faisanes.

El volumen eyaculado y la concentración espermática determinados en este trabajo mostraron diferencias con respecto a los valores reportados por otros autores en *G. domesticus* (Garner, 2002) y *P. colchicus* y otras especies de faisanes (Kim y Yang, 2001; Saint Jalme y col 2003). Esta diferencia se puede explicar por el efecto individual y de estacionalidad reproductiva de las especies en diferentes regiones geográficas (Kim y Yang, 2001), por el efecto del fotoperiodo (Bates, 1987; Dobrescu, 1986; Eitan y Soller, 2001). Sin embargo, en este caso no influyeron los factores ambientales, en la movilidad, viabilidad morfología y capacidad fertilizante de los eyaculados y los espermatozoides en fresco y descongelados (Satterlee y Marin, 2004). En aves rapaces también se encontró una alta variabilidad en la concentración y volumen de los eyaculados, lo cual concuerda con reportes de otras especies de rapaces como *Falco mexicanus* (Boyd y col 1977) y *Buteo jamaicensis* (Herrera y col 2003).

Blanco y col (2000) reportan valores de viabilidad espermática de diferentes especies de aves rapaces (50.8% a 93.2%) con intervalos similares a los observados en este trabajo. Se encontró una alta variabilidad en la concentración de los eyaculados, lo cual coincide con lo reportado en otras aves rapaces como halcón pradera (*Falco mexicanus*) (Boyd y col 1977) y halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*) (Herrera y col 2003). También se ha reportado que aunque los espermatozoides de diferentes especies de rapaces son morfológicamente similares, las características específicas de su membrana plasmática es distinta y se refleja en diferente capacidad para responder al mismo protocolo de criopreservación (Blanco y Höfle, 2003). En el cernícalo (*Falco sparverius*), (Gee y col 1993), se han reportado diferentes indicadores de fertilidad y movilidad de espermatozoides criopresevados con distintas proporciones de DMSO. Es por esto que es necesario evaluar varias alternativas de crioprotectores como el DMSO y PVP, que en este trabajo, mostraron parámetros de evaluación espermática similares post criopreservación, con valores inferiores con respecto a los parámetros en fresco.

En este trabajo se observó que la movilidad espermática se reduce aproximadamente en un 50% en las muestras descongeladas con respecto a los valores determinados en fresco en las tres especies. Donoghue y Donoghue, (1997), analizaron la movilidad espermática del eyaculado de gallos, con los cuales inseminaron de manera artificial dos grupos de gallinas, con semen en fresco diluido y almacenado, para evaluar los huevos después de 6 días de incubación y examinar la MPV, y observar vestigios de hidrólisis espermática, se observó una tasa de fertilidad con respecto a la movilidad de 95.8% vs 90.4% en espermatozoides con alta movilidad y de 88.7% vs 82.4% para espermatozoides con baja movilidad. Concluyeron que diferencias en la movilidad espermática entre machos, influyen en la fertilidad y almacenamiento. Sin embargo, en este trabajo, se observó que con semen descongelado, con una reducción importante de la movilidad espermática, es posible lograr resultados de fertilidad comparables a los obtenidos con semen fresco. Probablemente una causa sea la activación de la movilidad espermática de los espermatozoides al estar en el ambiente del tracto de la hembra, tal como ya se ha demostrado en otros trabajos *in vitro* (Holm y Wishart, 1998).

Siendo esto una línea de investigación ya que en otras especies, se ha observado que la adición de sustancias *in vitro* como la cafeína al semen antes de ser utilizado para IA, incrementa la movilidad espermática, reflejándose en una mayor capacidad fertilizante (Rillo y col 1996).

Lo anterior, es posible, ya que se ha demostrado que espermatozoides descongelados pueden conservar una buena calidad de movimiento para lograr fertilizar (Sontakke y col 2004). La viabilidad y morfología espermática no se alteraron en ninguna de las especies estudiadas ya que los valores de las muestras descongeladas caen dentro de los parámetros normales. A pesar, de que existen estudios en los cuales se menciona que la movilidad espermática es un indicador importante para predecir la capacidad fertilizante en espermatozoides descongelados (Bowlin y col 2003).

Con los resultados obtenidos se muestra de manera evidente que con el uso de DMSO o PVP, se obtienen indicadores de evaluación espermática básica aceptables para su utilización en la IA de rapaces. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios en los cuales evaluaron diferentes variables y técnicas de congelación, por ejemplo, diferentes proporciones del crioprotector y el uso de pajillas para la criopreservación en N<sub>2</sub>L, obteniendo una viabilidad espermática entre 50-90% (Blanco y col 2000 y 2002).

A pesar de que se ha reportado que el grado de conservación de los espermatozoides depende de la técnica de congelación y los crioprotectores utilizados, reflejándose en su capacidad fertilizante (Holt, 2000), en este trabajo, los resultados de evaluación espermática tanto en los eyaculados individuales como en las muestras heteroespérmicas congeladas con el uso de los crioprotectores DMSO o PVP, mostraron valores similares en las tres especies. Sin embargo, es importante conocer la capacidad de poder utilizar otros crioprotectores, como alternativas, ante la factibilidad o no para disponer de ellos, además de considerar el costo que pudieran representar cada uno, ya que a nivel industrial, este es un punto importante a considerar, para determinar los costos de producción. Un punto mas a evaluar es el efecto o reacción individual que pudiera tener cada especie, en particular las hembras, al recibir en su mucosa, sustancias químicas ajenas al propio conducto reproductor, las cuales pudieran tener efectos tóxicos o contraceptivos.

Los indicadores de evaluación espermática y capacidad fertilizante post descongelación logrados en este estudio, contribuyen a concluir que es posible la IA con semen fresco o congelado como una herramienta para la producción, reproducción y/o conservación de especies domésticas (Buss, 1993; Tselutin y col 1995) y silvestres (Hartley y col 1999; Penfold y col 2001; Lukaszewicz, 2002; Saint Jalme y col 2003; Brock, 1991). Encontrando resultados similares con semen fresco y descongelado con el uso de DMSO o PVP. Cabe señalar que es importante evaluar las particularidades de cada especie ya que tienen respuestas diferentes, tal es el caso de un estudio realizado en anátidos (*Anser anser*) en el cual se obtuvieron bajos resultados de fertilidad con concentraciones espermáticas bajas (Lukaszewicz y col 2004). Por otra parte, como se demostró en este trabajo, los porcentajes de fertilidad obtenidos mediante IA con semen criopreservado con DMSO o PVP, mostraron valores similares. Es por ello que se propone la utilización de PVP como una alternativa para ser utilizado en la congelación espermática cuando no se dispone de crioprotectores como el DMSO y el glicerol (Hammerstedt y Graham, 1992).

Además, se demuestra que con la técnica utilizada es posible la congelación individual de eyaculados y muestras heteroespérmicas de gallos, faisanes y halcones. Esto es relevante porque existen especies como los halcones en los cuales no se tienen muchas posibilidades de obtener suficientes eyaculados para criopreservar muestras heteroespérmicas que permitan realizar una serie de evaluaciones previas y post descongelación. Los resultados de este estudio demostraron que una técnica para congelar muestras heteroespérmicas puede funcionar para criopreservar de manera individual un eyaculado con un volumen inferior.

Se observó también que la congelación afecta principalmente la movilidad espermática. Sin embargo, se encontró que en gallináceas, es posible obtener huevos fértiles mediante IA con espermatozoides criopreservados. Las técnicas de fertilización intrauterina (Howarth, 1990), intramagnal (Blanco y col 2002; Howarth, 1983), y FIV (Tanaka y col 1994; Kasai y col 2000), aún no están desarrolladas plenamente en aves, lo cual hace importante tener técnicas de criopreservación que permitan conservar los espermatozoides de manera eficiente.

En otro tipo de estudios, al evaluar en pavos la integridad membranal en espermatozoides almacenados en fresco por 24 horas a 5°C, se usaron varias condiciones de estrés, hipo-osmótico. Se evaluaron por microscopía de luz y citometría de flujo utilizando yoduro de propidio y calcein-AM, sin encontrar diferencias de viabilidad del semen fresco y el almacenado en 100% de PBS. Sin embargo, después de 24 h de almacenamiento, se observaron porcentajes de viabilidad de 48% almacenado en agua y 66.1% en el almacenado en PBS. Sugiriendo que el estrés *in vitro* por condiciones hipo-osmóticas resultan en una susceptibilidad de daño membranal por el frío del almacenamiento (Donoghue y col 1996). Esto hace evidente que a pesar de mostrar indicadores de evaluación espermática dentro de los intervalos normales de uso, existen otro tipo de indicadores que pueden ser alterados por efecto de la criopreservación y/o crioprotectores que pueden interferir con la capacidad fertilizante del espermatozoide, como la integridad membranal y sus componentes.

Se ha demostrado que los carbohidratos manosa, Nacetil glucosamina y ácido siálico, presentes en la superficie membranal de los espermatozoides, juegan un papel importante como receptores (Steele y Wishart, 1996). Los resultados de este estudio mostraron la modificación de la proporción de espermatozoides marcados con la lectina Con-A. Esto sugiere que a pesar del uso de crioprotectores con diferente mecanismo de acción, la presencia de residuos de manosa en la superficie espermática puede alterarse. Estos residuos juegan un papel importante en el proceso de fertilización en las aves (Robertson y col 2000), y el hecho de alterarse puede interferir con dicho proceso (Long y Kramer, 2003). La alteración determinada, en la proporción de espermatozoides con los diferentes patrones de tinción, puede explicarse a la metodología utilizada, ya que mediante microscopía de fluorescencia, no es posible determinar pequeños rastros de fluorescencia en los espermatozoides, como lo realizaría un citómetro, lo cual es la metodología de elección cuando se dispone de el equipo. Por otra parte es importante señalar que de ser este el motivo, esto hace evidente la alteración en la disposición en cuanto a cantidad, de los carbohidratos, para actuar como receptores membranales.

Lo anterior se ha demostrado en espermatozoides de cerdo, en los cuales se ha observado que alteraciones en la distribución de los carbohidratos membranales: manosa, ácido siálico y N-acetilglucosamina, que actúan como receptores, interfieren durante los eventos de capacitación y reacción acrosomal durante el proceso de fertilización, además de que la determinación de estas alteraciones, ha permitido identificar ejemplares subfértiles con indicadores de evaluación seminal dentro de los intervalos normales (Jiménez y col 2002 y 2003). En aves, no existen suficientes trabajos que muestren la importancia de determinar estas características membranales es por esto que se hace relevante realizar estudios como el presentado en este trabajo.

Por otra parte, en espermatozoides de gallos (Blesbois, 1999) y pavos (Douard y cols 2000) se han demostrado cambios cuantitativos y cualitativos en la composición lipídica durante el almacenamiento a 5°C. Se observó que el total de fosfolípidos se reduce significativamente del 75% a 60% (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamoda, esfingomielina, fosfatidil serina y fosfatidil inositol). En contraste, lisofosfatidilcolina se incrementa de 2 a 24% a las 24 h de almacenamiento. Además, el perfil de ácidos grasos es parcialmente reflejado por la composición de la dieta principalmente de ácidos poli insaturados. Se observaron además cambios en la movilidad, morfología y viabilidad, sugiriendo entonces que los cambios en la composición de los fosfolípidos expresan modificación del metabolismo endógeno y peroxidación que se reflejan en la calidad del semen durante su almacenamiento *in vitro*. Lo cual aunado a los resultados de este trabajo, de resalta la importancia de analizar indicadores mas específicos, que puedan predecir de manera precisa, la capacidad fertilizante de espermatozoides en fresco y almacenados en fresco y/o criopreservados, que lleven al éxito, los programas de reproducción asistida.

En este trabajo se observaron tres aspectos principales. El primero es que los patrones de fluorescencia con WGA-FITC y Con-A FITC, no cambian después de descongelar los espermatozoides con cualquiera de los crioprotectores. El segundo es que en las especies estudiadas, la distribución membranal de N-acetilglucosamina y ácido siálico es diferente de la

distribución de residuos de manosa. Por último, la proporción de espermatozoides teñidos se altera de manera diferente con cada variable.

Con los resultados de este trabajo se demuestra que a pesar de mostrar indicadores de evaluación espermática básica dentro de los indicadores normales de uso, existen alteraciones en relación a los carbohidratos de la superficie de la membrana de los espermatozoides post descongelación.

## **9.- Conclusión.**

En este trabajo, se demostró que la inseminación artificial con semen criopreservado, es una alternativa para la reproducción de especies domésticas y silvestres. Sin embargo, es necesario desarrollar técnicas de reproducción asistida eficientes para cada especie, y métodos para predecir la capacidad fertilizante de espermatozoides conservados en fresco y/o criopreservados. La adquisición de aves silvestres por colecciones particulares y públicas es un hecho en la actualidad, y estas poblaciones en cautiverio pueden considerarse como reservorios genéticos invaluable. En los zoológicos y colecciones privadas, los programas reproductivos pueden ser orientados para servir de soporte en la conservación de poblaciones de especies en libertad. Esto ha permitido lograr la reproducción en cautiverio de ejemplares en peligro de extinción contribuyendo a su conservación y por otra parte, para cumplir con los propósitos zootécnicos de las especies domésticas, siendo una alternativa importante, para la industria avícola.



## 10.- Literatura citada.

Amann R (1999). Lessons for the industry gleaned from experiences with other commodity species. *Poult sci* 78:419-427.

Ashizawa K y Katayama S (1992). Maintenance of motility of fowl spermatozoa in vitro is prolonged by a low molecular weight factor derived from cultured chick embryo cell. *J reprod fertil* 95:685-691.

Baks M (1980). Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *J reprod fertil* 60: 121-127.

Bakst M (1990). Preservation of avian cells. En Poultry breeding and genetics., pp:91-108. Edited by Crawford, R. D. New York: Elsevier.

Bakst M y Cecil H (1992). Research note: Effect of agitation and temperature changes on turkey sperm viability after twenty-four hour storage. *Poult sci* 71:395-397.

Bakst M y Cecil H (1992a). Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. *J reprod fertil* 94:287-293.

Barbato G, Cramer P y Hammerstedt R (1998). A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Anim reprod sci* 58:686-699.

Bates D y Hanson L (1987). Lighting and sex ratio for breeding ringnecked pheasants in confined housing. *Poult sci* 66:605-612.

- Bilgili S, Sexton J y Renden J (1987). Fluorometry of poultry semen influence of dilution of storage on chicken spermatozoa viability and fertility. *Poult sci* 66:2032-2035.
- Bird D y Laguë P (1977). Semen production of the american kestrel. *Can j. zool* 55:1351-1358.
- Birkhead T, Pellatt E y Fletcher F (1993). Selection and utilization of spermatozoa in the reproductive tract of the female zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J reprod fertil* 99:593-600.
- Birkhead T, Sheldon B y Fletcher F (1994). A comparative study of sperm-egg interactions in birds. *J reprod fertil* 101:353-361.
- Blake AG, Balander R, Flegal CJ y Ringer RK (1987). Ahemeral light-dark cycles and egg production parameters of ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*). *Poult sci* 66: 258-263.
- Blanco JM, Gee G, Wildt DE y Donoghue AM (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol reprod* 63:1164-1171.
- Blanco JM, Gee G, Wildt DE y Donoghue AM (2002). Producing progeny from endangered birds of prey: Treatment of urine-contaminated semen and a novel intramaginal insemination approach. *J zoo wild* 33:1-7.
- Blanco JM, Höfle U. Reproducción en cautividad del águila imperial ibérica. X Jornadas sobre gestión y conservación de fauna silvestre en peligro de extinción. Marzo de 2003. FMV, Universidad de Murcia. España.
- Blesbois E y Reviers M (1992). Effect of different fractions of seminal plasma on the fertilizing ability of fowl spermatozoa stored *in vitro*. *J reprod fertil* 95:263-268.

- Blesbois E, Grasseau I y Hermier D (1999). Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 degrees C. *Theriogenology* 52:325-334.
- Bootwalla S y Froman D (1988). Effect of extender viscosity on the insemination dose for chickens. *Poult sci* 67:1218-1221.
- Bowling R, Froman P, Davis J y Wilson J (2003). Attributes of broiler breeder males characterized by low and high sperm mobility. *Poult sci* 82:1796-1801.
- Boyd L, Boyd S y Dobler C (1977). Reproduction of prairie falcons by artificial insemination. *J wildl manage* 41:266-271.
- Brillard J (1993). Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult sci* 72:293-298.
- Brock MK (1991). Semen collection and artificial insemination in the hispaniolan parrot (*Amazona ventralis*). *J zoo wildlife med* 22:107-114.
- Burrows WH y Quinn P (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult sci* 23: 15-20.
- Buss EG (1993). Cryopreservation of rooster sperm. *Poult sci* 72:944-954.
- Carpenter J (1986). Cranes (Order gruiformes). En: Zoo and Wild Animal Medicine. pp. 315-326. Ed. W.B. Saunders Company. Denver EUA.
- Cecil y Bakst (1990). Effect of the presence of hens on the semen production of male breeder turkeys. *Poult sci* 69:1003-1005.
- Cerolini S, Kelso K, Noble RC, Speake BK, Pizzi F y Cavalchini LG (1997). Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during ageing of chickens. *Biol reprod* 57:976-980.

Chalah T y Brillard J (1998). Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*. 50:487-493.

Chavarría M y Reyes A (1998). Bioqímica de la capacitación y la reacción acrosomal en los mamíferos. En *Biología de la reproducción*, pp. 151-192. Edited by UAM-I. México D.F.

Christensen V y Bagley L (1989). Efficacy of fertilization in artificially inseminated turkey hens. *Poult sci* 68:724-729.

De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH y Verkleij AJ (1993). Effects of various agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32-44.

Dobrescu O (1986). Photoperior, diet, and methos of feedeng on reproduction. *Poult sci* 65:559-564.

Donald M (1991). *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*, pp:345, Interamericana, México.

Donoghue AM (1999). Prospective approaches to avoid flock fertility problems: Predictive assessment of sperm function traits in poultry. *Poult sci* 78:437-443.

Donoghue AM y Donoghue DJ (1997). Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult sci* 76:1440-1445.

Donoghue AM, Garner DL, Donoghue DJ y Jonson LA (1996). Assesment of the membrane integrity of fresh and stored turkey spermatozoa using a combination of hypo-osmotic stress, fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 46:153-163.

- Donoghue AM y Wishart GJ (2000). Storage of poultry semen. *Anim reprod sci* 62:213-232.
- Douard V, Hermier D y Blesbois E (2000). Changes in turkey semen lipids during liquid *in vitro* storage. *Biol reprod* 63:1450-1456.
- Douard V, Hermier D, Magistrini M, Labbe C y Blesbois E (2004). Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology* 1:1-13.
- Eitan Y y Soller M (2001). Effect of photoperiod and quantitative feed restriction in a broiler strain on onset of lay in females and onset of semen production in males:a genetic hypothesis. *Poult sci* 80:1397-1405.
- Etches JR (1996). Artificial insemination. En *Reproduction in poultry*. pp 234-261. Edited by INTERNATIONAL, C. Cambridge. Ontario Canada, CAB International.
- Etches JR (1996a). The male. En *Reproduction in poultry*, pp. 208-2033. Edited by INTERNATIONAL, C. Cambridge. Ontario Canada, CAB International.
- Ferrante V, Verga M, Mangiagalli M y Carenzi C (2001). Behavioural reactions, semen quality and testosterone levels cocks: Genetic implications. *Anim welf* 10:269-279.
- Fierro R, Foliguet B, Grignon G, Daniel M, Bene MC, Faure GC y Barbarino-Monnier P (1996). Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: Modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch andrology* 36:187-196.

- Fisinin V, Zhuravlev V y Salamatin V (2004). Eggs fertilizability in domestic hens *Gallus (Gallus domesticus)* as a function of the yolk surface area. *Ontogenes* 1:33-36.
- Froman D y Engel H (1991). Analysis of deferent duct morphology in turkeys characterized as low or high semen volume producer. *Poult sci* 70:1981-1985.
- Fujihara N (1991). Comparative phisiology of avian semen and spermatozoa. En: *Advances in Reproductive Biology*. Ed. Yongqing C y Cheng Z. pp 132-155 Beijin.
- Fujihara N (1992). Accessiry reproductive fluids and organs in male domestic birds. *World´s poult sci j* 48:39-56.
- Fujihara N y Bukland R (1987). The effecth of different freezing rates of fertilizing ability of frozen-thawed chicken spermatozoa. *Jpn j anim reprod* 33:11-14.
- Fujihara N y Ohboshi S (1991). Simple and rapid criopreservation of rooster spermatozoa. *Low temp med* 17:128-131.
- Garner DL (2002). Spermatozoa and seminal plasma. En *Reproduction in farm animals*, 7a ed. pp. 163-187. Edited by S, H. E. LEA&FEBIGER. Philadelphia.
- Gee GF, Morrell CA, Franson JC y Pattee OH (1993). Criopreservation of american kestrel semen with dimethylsulfoxide. *J raptor res* 27:21-25.
- Gee FG y Sexton JT (1990). Cryogenic preservation of semen from the aleutian Canada goose (*Branta canadensis leucopareia*). *Zoo biol* 9: 361-371.

- Gilbert A (1996). Aves de corral. En Reproducción e inseminación artificial en animales, pp. 232-187. Edited by S, H. E. Zaragoza España: Interamericana.
- Gill SP, Buss EG y Mallis RJ (1996). Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poult sci* 75:254-256.
- Hammerstedt R (1996). Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. *Anim reprod sci* 42:77-87.
- Hammerstedt R y Graham J (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glicerol. *Cryobiology* 29:26-38.
- Harpal S (1999). Optimizing delivery of genetic merit in subtropical climates through advanced reproductive technologies. *Poult sci* 78: 453-458.
- Hartley SP, Dawson B, Lindsay C, McCormick P y Wishart G (1999). Cryopreservation of houbara semen: A pilot study. *Zoo biol* 18:147-152.
- Herrera J, Fierro R, Zayas H, Conejo J, Jiménez I, García A y Betancourt M (2002). Acrosome reaction in fertile and subfertile boar sperm. *Arch androl* 48:133-139.
- Herrera JA, Ordáz A, Betancourt M., Quintana JA, López MA y Fierro R. Alternativas de reproducción para aves rapaces en cautiverio. *Memorias del XIX Congreso de la Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de la República Mexicana*, A.C. del 7 al 9 de noviembre de 2003. Valsequillo Puebla, México.
- Hofmo P y Almlid T (1991). Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Rep dom anim supp* 1:111-122.
- Holm L y Wishart GJ (1998). The effect of pH on the motility of spermatozoa from chicken, turkey and quail. *Anim reprod sci* 54:45-54.

Holt WV (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim rep sci* 62: 3-22.

Holt WV (2000a). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.

Howarth B (1983). Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis, epididymis, and vas deferens following intramaginal insemination. *Biol reprod* 28:586-592

Howarth B (1990). Fertility following intrauterine insemination near the time of oviposition. *Poult sci* 69:138-141.

Howarth B (1995). Physiology of reproduction: The Male. En Poultry production, pp. 243. Ed Interamericana. Zaragoza españa.

Jiménez I, González H, Ortiz R, Herrera J, Betancourt M y Fierro R (2002). Expresión of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile d subfertile boars by flow cytometry. *Arch androl* 48:159-166.

Jiménez I, González H, Ortiz R, Herrera J, García A, Betancourt M y Fierro R (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59:1171-1180.

Jocking P (1991). Effects of controllong body weight on the semen production of large white turkey males. *Br poult sci* 32:211-218.

Kasai K, Izumo A, Inaba T y Sawada T (2000). Assessment of fresh and stored duck spermatozoa quality via *in vitro* sperm-egg interaction assay. *Theriogenology* 54:283-290.



- Katz D (1984). Characteristics of sperm motility. En *Annals New York Academy of Sciences*, pp. 409-423. Edited by Catt, K. Dufan, M. D. New York: New York Academic of Science.
- Kim IS y Yang HH (2001). Seasonal changes of testicular weight, sperm production, serum testosterone, and in vitro testosterone release in Korean ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpowi*). *J vet med sci* 63: 151-156.
- King LM, Brillard JP, Bakst MR y Donoghue AM (1999). Isolation of sperm storage tubules from the uterovaginal junction mucosa of the turkey. *Poult sci* 78:1044-1047.
- Long A y Kramer M (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility alter artificial insemination with storage turkey semen. *Poult sci* 82:1802-1807.
- Long A y Kulkarni G (2004). An effective method for improving the fertility of glycerol exposed poultry semen. *Poult sci* 83:1594-1601.
- Lukaszewicz E (2001). Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. *Theriogenology* 55:1819-1829.
- Lukaszewicz E (2002). An effective method for freezing White Italian gander semen. *Theriogenology* 58:19-27.
- Lukaszewicz E, Chrzanowska M, Jerysz A y Chelmonska B (2004). Attempts on freezing the greylag (*Anser anser*) gander semen. *Anim reprod sci* 1-2:163-173.
- Mazur P (1984). Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am j phys* 247:125-142.

- Nakanishi A, Utsumi K y Iritan A (1990). Early nuclear events *In vitro* fertilization in the domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Mol reprod develop* 26: 217-221.
- Neubert L y Menger H (1981). Problems relating to low temperature preservation of ram semen. 1. Effects of various cryoprotective agents on sperm. *Arch exp veterinarmed* 35:51-56.
- Noirault J y Brillard JP (1999). Effects of frequency of semen collection on quantitative and qualitative characteristics of semen in turkey breeder males. *Poult sci* 78:1034-1039.
- NOM-059-ECOL-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Secretaría de desarrollo social. Diario oficial de la nación. 16 de Mayo de 1994.
- Niesters H (2000). El noble arte de la cetrería. En: La caza. Pp 147.1701. Ed. AMORETTI s. F. Imprimerie Jean Lamour, Máxéville, Francia.
- O'Brien KJ, Oehler D y Malowski PS (1999). Semen collection, characterization, and cryopreservation in a Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Zoo biol* 18:199-214.
- Ochkur SI, Kopeika EF, Surai PF y Grishchenko VI (1994). The influence of cryopreservation on parameters of energetic metabolism and motility of fowl spermatozoa. *Cryobiology* 31:239-244.
- Onura G (1987). Body weight, semen quality, and age at sperm production of hemicastrated and intact cockerels (*Gallus domesticus*). *J reprod fertil* 81:357-361.

- Parker H y McDaniel D (2003). Semen dilution prior to analysis influences the ability of the sperm quality analyzer to predict fertility whether inseminating a constant number of sperm or a constant volume of semen. *Poult sci* 82:1808-1815.
- Parker H, Karaca A, Yeatman J, Frank L y McDaniel C (2002). Fertility of broiler breeders following categorization by the optibreed sperm quality index when hens inseminated with a constant number of sperm. *Poult sci* 81:239-245.
- Parker H, Yeatman JB, Schultz CD, Zumwalt CD y McDaniel CD (2000). Use of a sperm analyzer for evaluating broiler breeder males. 2. Selection of young broiler breeder roosters for the sperm quality index increases fertile egg production. *Poult sci* 79:771-777.
- Penfold LM, Harnal V, Lynch W, Bird D, Derrickson SR y Wildt DE (2001). Characterization of northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. *Reproduction* 121:267-275.
- Pereira FE, Militao SF, Lourenco GA y Rosa PS (1999). Comparacao de diluentes, diluicoes e tempo de armazenamento do semen sobre fertilidade, eclodibilidade e nascimento de pintos em matrizes pesadas. *Rev bras zootec* 28:1239-1244.
- Pinto O, Amir D, Shindler H y Hurwitz S (1984). Effect of pH on the metabolism and fertility of turkey spermatozoa. *J reprod fertil* 70:437-442.
- Pinto O, Amir D, Shindler H y Hurwitz S (1985). Fertility of fresh and store turkey spermatozoa in the prescense of absccence of glucose or fructose in the suspension medium. *Poult sci* 64:1388-1390.
- Poivey J, Cheng Y, Rouvier R, Tai C, Wang C y Lui H (2001). Genetic parameters of reproductive traits in brown tsaiya ducks artificially inseminated with semen from muscovy drakes. *Poult sci* 80:703-709.

Pollock LD (1999). A geneticist's perspective from within a broiler primary breeder company. *Poult sci* 78: 414-418.

Quintana JA (1991). Reproducción. En AVI-TECNIA, pp. 188-213. Edited by TRILLAS, E. México: Editorial TRILLAS.

Rillo S, Martínez E, García A y De Alba C (1996). Boar semen evaluation in practise. *Rep dom anim* 32:519-526.

Robertson L, Wilson Y, Linsay C y Wishart G (1998). Evaluation of semen from individual male domestic fowl by assessment of sperm: Perivitelline interaction in vitro and in vivo. *Br poult sci* 39:278-281.

Robertson L, Wishart GJ y Horrocks AJ (2000). Identification of perivitelline N-linked glycans as mediators of sperm-egg interaction in chickens. *J reprod fertil* 120:397-403.

Saint Jalme M, Gaucher P y Paillat P (1994). Artificial insemination in houbara bustards (*Chlamydotis undulata*) influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. *J reprod fertil* 100:93-103.

Saint Jalme M, Lecoq R, Seigneurin F, Blesbois E y Plouzeau E (2003). Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology* 59:875-878.

Samour J, Markham J y Moree H (1998). Semen cryopreservation and artificial insemination in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J zool lond* 216: 169-176.

- Satterlee G y Marin H (2004). Photoperiod-induced changes in cloacal gland physiology and testes weight in male japanese quail selected for divergent adrenocortical responsiveness. *Poult sci* 83:1003-1010.
- Sauveur B (1992). Reproducción de las aves. pp.357. Ed. Mundi-Prensa. España.
- Sexton TJ (1977). A new poultry semen extender 1. Effect of a extension on the fertility of chicken semen. *Poult sci* 56:1443-1446.
- Sexton T (1988). Comparison of comercial diluents for holding turkey semen 24 hours at 5 °C. *Poult sci* 67:131-134.
- Singer S y Nicholson G (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- Singh H (1999). Optimizing deliver of genetic merit in subtropical climates through advanced reproductive technologies. *Poult sci* 78:453-458.
- Sontakke S, Umapathy G, Sivaram V, Kholkute S y Shivajai S (2004). Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the blue pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology* 1-2:139-153
- Spreen S, Harris G y Macy L (1990). Contraceptive action of glycerol on chicken spermatozoa in oviductal organ-slice cultures. *Poult sci* 69:1759-1763.
- Steel MG y Wishart GJ (1996). The effect of removing surface-associated proteins from viable chicken spermatozoa on sperm function *in vivo* and *in vitro*. *Anim reprod sci* 45:139-147.
- Surai P, Wishart G, Maldjian A, Noble R y Sparks L (1998). Lipid peroxidation in avian semen: protective effect of seminal plasma. *Br poult sci* 39:557-562.

- Tai JJ, Chen JC, Wu KC, Wang SD y Tai C (2001). Cryopreservation of gander semen. *Br poult sci* 42: 384-388.
- Tajima A, Graham E, Shoffner R, Otis J y Hawkins D (1990). Research note: Cryopreservation of semen from unique lines of chicken germ plasm. *Poult sci* 69:999-1002.
- Tanaka K, Wada T, Koga O, Nishio Y y Hertelendy F (1994). Chick production by *in vitro* fertilization of the fowl ovum. *J reprod fertil* 100:447-449.
- Temple S (1972). Artificial insemination with imprinted birds of prey. *Nature* 237:287-288.
- Thiber A y Guerin B (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim rep sci* 62:233-251.
- Tselutin K, Narubina L, Mavrodina T y Tur B (1995). Cryopreservation of poultry semen. *Br poult sci* 36:805-811.
- Tselutin K, Seigneurin F y Blesbois E (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult sci* 78:586-590.
- Van Voorst A y Leenstra FR (1995). Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. *Poult sci* 74:141-146.
- Van Voorst A y Leenstra FR (1995a). Fertility rate of daily and cryopreserved fowl semen. *Poult sci* 74: 136-140.
- Wambeke F y Huyghebaert G (1989). Current role of semen storage and artificial insemination in the turkey industry. *Br poult sci* 30:461-469.

Watson PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim reprod sci* 60-61:481-492.

Weaver J y Cade T (2000). Artificial insemination. Falco propagation a manual on captive breeding. T. p. Fund. Boise Idaho: 19-21.

Weitze K, Rath D y Leps H (1988). Influence of volumen / surface ratio of plastic packages upon freeze thaw and fertility of boar semen. In II th. International congress animal reproduction and AI, pp. 3-312. II th. International congress animal reproduction and AI.

Wishart GJ (1989). Physiological changes in fowl and turkey spermatozoa during *in vitro* storage. *Br poult sci* 30:443-454.

Wishart GJ y Wilson YI (1999). Temperature-dependent inhibition of motility in spermatozoa from different avian species. *Anim reprod sci* 57:229-235.

Wolfe CA, James PS, Gunning AP, Ladha S y Christova FR (2001). Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after Washing and exposure to macromolecules BSA and PVP. *Mol reprod dev* 59:306-313

Xia L, Michael F, George A y Auckland R (1988). Ultrastructure of fresh and frozen-thawed spermatozoa of high and low fertility lines of chickens. *Poult sci* 67:819-825.

## 11.- Apéndice.

### Composición original del medio *Beltsville Poultry Semen Extender*.

Utilizado para la dilución en fresco, y criopreservación adicionando DMSO o PVP, y descongelación.

<b>Componente</b>	<b>grs / lt.</b>
Difosfato de potasio.3H <sub>2</sub> O	12.7
Glutamato de sodio	8.67
Fructosa (anhidra)	5.00
Acetato de sodio.3H <sub>2</sub> O	4.30
TES*	1.95
Citrato de potasio	0.64
Monofosfato de potasio	0.65
Cloruro de magnesio.6H <sub>2</sub> O	0.34
pH	7.50
mOsm <sup>-1</sup> Kg. H <sub>2</sub> O	333
<b>Crioprotectores</b>	<b>%</b>
Dimetilsulfóxido	6
Polivinilpirrolidona	3

(Sexton, 1977).



## **12.- Difusión de resultados.**

### **Publicaciones en *Journals*.**

Herrera JA, Quintana JA, López MA, Betancourt M, Fierro R (1995). Individual criopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinilpyrrolidone of ejaculates semen of three avian species. Accepted for publication in: *Archives of Andrology* (Dic-2004).

### **Presentaciones en Congresos.**

#### **Criopreservación de espermatozoides de aves.**

XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Del 18 al 22 de noviembre de 2002. La Habana Cuba.

#### **“Criopreservación y evaluación fisiológica de los espermatozoides de aves”**

Reunión conjunta ANECA-WPDC. Puerto Vallarta Jalisco, México. Del 01 al 04 de mayo del 2002.

#### **Obtención y evaluación básica del semen de faisán de collar (*Phasianus colchicus*).**

IV Congreso de Egresados de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAM-I. En México D.F. el 24 y 25 de Octubre de 2002.

#### **Alternativas de reproducción para aves rapaces en cautiverio.**

*Memorias del XIX Congreso de la Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de la República Mexicana, A.C.* del 7 al 9 de noviembre de 2003. Valsequillo Puebla, México.

**Criopreservación de espermatozoides de faisán de collar (*Phasianus colchicus*).**

XIX Congreso de la Asociación de Zoológicos Criaderos y Acuarios de la República Mexicana. En Valsequillo Puebla; México. Del 5 al 9 de Noviembre de 2002.

**Evaluación de espermatozoides de halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*) criopreservados con dimetilsulfóxido o polivinilpirrolidona.** XXIX Reunión anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción y IV Reunión SMBRH. Oaxaca, Oax. México.

**Conferencias Impartidas**

**Conferencia “Inseminación artificial en aves”.**

VIII. Semana de la Licenciatura en Producción Animal.

El 29 de enero de 2003.

Universidad Autónoma Metropolitana.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

**Conferencia “Alternativas de reproducción en las aves”.**

Foro Avícola: Medicina de las Aves de Ornato y Compañía.

3 y 4 de junio de 2004.

UNAM, Fac. de Medicina Veterinaria y Zootécnica. CU. México.

Centro de la Universidad de Texas A&M en la Cd. De México.

**Publicación en Revista de Divulgación.**

**Criopreservación y evaluación fisiológica de los espermatozoides de aves.**

*Tecnología avipecuaria en Latinoamérica.* N° 175 Agosto de 2002.

