



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRIA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

TESIS

(Idónea Comunicación de los Resultados)

**“Indicadores de capacitación y reacción acrosomal en
espermatozoides criopreservados con dimetilsulfóxido o glicerol
de halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*)”**

QUÉ PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL.

Presenta: Biol. Cuauhtémoc Cruz Valencia.

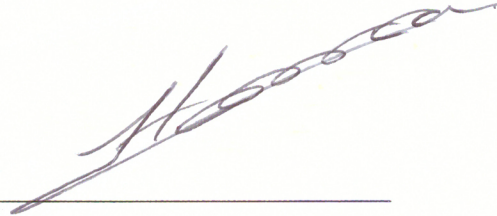
Ciudad de México, México a 21 de Septiembre de 2016.

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dr. José Antonio Herrera Barragán.

Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco
Departamento de Producción Agrícola y Animal- DCBS



Asesores:

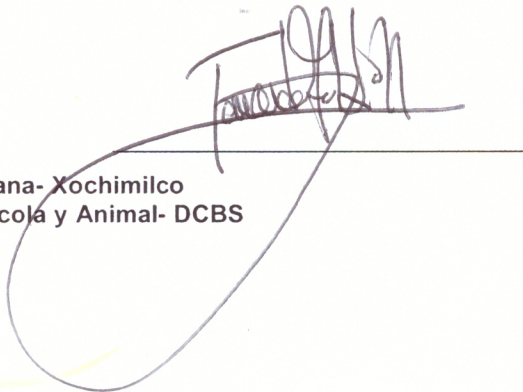
PhD. Juan Gabriel Rivera Martínez.

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.
Departamento de Biología de la Reproducción- DCBS



MSc. Fernando Gual Sill.

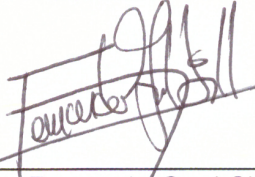
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco
Departamento de Producción Agrícola y Animal- DCBS



La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, pertenece al padrón de posgrados de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó una beca al estudiante del posgrado de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal Cuauhtémoc Cruz Valencia con número (CVU/Becario): 620450/570806

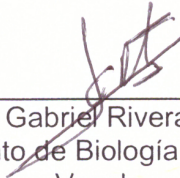
JURADO



MSc. Fernando Gual Sill
UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal
Presidente



Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis
UAM-X. Departamento de Producción Agrícola y Animal
Secretario



PhD Juan Gabriel Rivera Martínez
UAM-I. Departamento de Biología de la Reproducción
Vocal



Dra. Lucía Eliana Rangel Porta
UNAM-FMVZ. Departamento de Reproducción
Vocal

DEDICATORIA

Con todo el respeto que se merece, dedico esta tesis al Dr. José Antonio Herrera Barragán, quien de manera desinteresada permitió adentrarme en el mundo de la reproducción animal, siendo un verdadero maestro en mi formación académica y personal.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa y todo su equipo directivo y personal docente, por brindarme siempre el apoyo para desarrollar este proyecto.

Con respeto, agradezco a mis asesores, el Dr. Juan Gabriel Rivera Martínez y el Dr. Fernando Gual Sill por la confianza que me dieron y las asesorías durante este tiempo.

De la manera mas atenta agradezco al M en C Gustavo Calderón Calderón "Gus" por ayudarme en el inicio de este proyecto y lograr entender todos los procesos que implicaban los experimentos.

Al Biol. Apolinar Misael Hernández Gómez, por su amistad y guiarme en la adaptación a una nueva ciudad.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de el Centro de Educación Ambiental y Cultural "Rodolfo Landeros Gallegos" del Estado de Aguascalientes mediante el departamentos de zoología. En agradecimiento al M en C Gustavo Ernesto Quintero Díaz, al Dr. Marco Antonio Ávila Chávez, a la MVZ. Zulma Soto, y todo el personal del departamento por la atención brindada durante mi estancia y la oportunidad de trabajar en conjunto.

Agradezco mis padres Rebeca Valencia Martínez y Efrén Cruz Pérez, por brindarme siempre ese apoyo incondicional y creer en mi, creer en mis ideas y sobretodo por estar siempre ahí y otorgarme esa integridad para salir y alcanzar mis sueños.

A mi novia Biol. Argelia Calvillo, por estar conmigo y ayudarme en todo momento, por darme esa estabilidad que se necesita para salir adelante.

A mi hermana Citlalli Cruz Valencia, compañera de mi infancia.

A todos mis amigos que comparten el gusto por la naturaleza Santiago Medel, Carlos Contreras, Jonh Chavez, Rodrigo Sarmiento.

A todos ustedes, ¡Gracias!.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar indicadores de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides de halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*) en eyaculados recién obtenidos y criopreservados con dimetilsulfóxido (DMSO) y Glicerol, así como los parámetros de viabilidad, movilidad y morfología en cada tratamiento. Se utilizó membrana perivitelina (MPV) heteróloga como inductor de la reacción acrosomal; se empleó clortetraciclina (CTC) para evaluar la actividad de Ca^{2+} membranal y el marcaje con la lectina *Wheat Germ Agglutinin* conjugada con Isotiocionato de Fluorosceína (WGA-FICT) para determinar la presencia y distribución de N-Acetil-Glucosamina y ácido siálico en relación a la capacidad fertilizante. Se determinaron 3 patrones de fluorescencia y su proporción en cada tratamiento, cada patrón se asoció a la capacitación espermática y reacción acrosomal. La movilidad espermática en fresco fue de 77.2% lo que fue mayor ($P < 0.05$) a la obtenida en eyaculados criopreservados con DMSO (16.8%) y con glicerol (20%).

En eyaculados recién obtenidos se determinó una viabilidad de 95.3% significativamente mayor ($P < 0.05$) a los criopreservados con DMSO 58.1% y 73.6% con Glicerol. Respecto a la morfología espermática, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$), entre los eyaculados en fresco y post criopreservación.

Palabras clave: *Parabuteo unicinctus*, criopreservación, capacitación espermática, reacción acrosomal, fluorescencia, viabilidad.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the capacitation indicators and acrosome reaction in sperm of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*) in freshly ejaculates and cryopreserved with dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol, as well as the parameters of viability, motility and morphology in each treatment. Heterologous perivitelline layer was implemented as an inducer of acrosome reaction; staining was used with chlortetracycline (CTC) to evaluate the activity of Ca^{2+} membrane and labeling with the WGA-FICT lectin to determine the presence and distribution of N-acetylglucosamine and sialic acid relative to the fertilizing capacity. Three fluorescence patterns and their proportion in each treatment were determined, each pattern was associated with sperm capacitation and acrosome reaction. Fresh sperm motility was 77.2%, and was higher ($P < 0.05$) than that obtained in ejaculates cryopreserved with DMSO (16.8%) and glycerol (20%). In newly obtained ejaculates, viability 95.3% significantly higher ($P < 0.05$) cryopreserved with DMSO 58.1% and 73.6% with glycerol was determined. Regarding sperm morphology, no differences ($P > 0.05$) between the ejaculates fresh and post cryopreservation found.

Key words: *Parabuteo unicinctus*, cryopreservation, sperm capacitation, acrosome reaction, fluorescence, viability.

INDICE

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	4
3.- MARCO REFERENCIAL	6
3.1.- Las aves rapaces	6
3.2.- Aves rapaces en México	6
3.3.- Cetrería y aprovechamiento sustentable	7
3.4.- Halcón Harris	7
3.5.- Biología reproductiva	8
3.5.1. Morfofisiología reproductiva	9
4.- MARCO TEÓRICO	14
4.1.- Reproducción en cautiverio	14
4.2.- Obtención seminal	14
4.3.- Conservación seminal <i>in vitro</i>	14
4.4.- Técnicas de evaluación seminal <i>in vitro</i>	20
5.- JUSTIFICACIÓN	25
6.- ANTECEDENTES	26
7.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
8.- HIPÓTESIS	28
9.- OBJETIVOS	29
9.1.-Objetivo General	29
9.2.- Objetivos Específicos	29
10.- MATERIAL Y MÉTODOS	30
10.1.- Marco legal	30
10.2.- Aves donantes	30
10.3.- Técnica de obtención seminal	30
10.4.- Diseño experimental	32
10.5.- Evaluación seminal básica	33
10.6- Evaluación membranal	35
10.7- Protocolo de criopreservación	36
10.8.- Obtención de la membrana perivitelina	36
10.9.- Análisis estadístico	38
11.-RESULTADOS	39
11.1- Evaluación seminal básica	39
11.2.- Patrones de fluorescencia evaluados con clortetraciclina	40
11.3.- Patrones de fluorescencia evaluados con el uso de la lectina <i>Wheat Germ Agglutinin</i> conjugada con isotiocionato de fluorosceína	45
11.4.- Estado fisiológico (Intacto, Capacitado y Reaccionado) de los espermatozoides con CTC y WGA-FICT	48
11.5.- Parámetros en espermatozoides determinados con CTC	49
11.6.- Parámetros en espermatozoides determinados con WGA-FICT	52
12.- DISCUSIÓN	55
13.- CONCLUSIONES	66
14.- REFERENCIAS	67
15.- AVANCES PRESENTADOS EN EVENTOS ESPECIALES	88

2.- INTRODUCCIÓN

Actualmente todas las aves rapaces se encuentran en alguna categoría de riesgo a nivel internacional (CITES, 2015) y 65 especies dentro de alguna categoría de riesgo nacional (NOM-059-SEMARNAT, 2010); entre ellas se encuentra el halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*) que está clasificado en el apéndice II en el CITES y sujeto a protección especial en la NOM-059.

El halcón Harris es originario del continente Americano con amplia distribución en México; además que es la rapaz con mayor presencia en cautiverio en zoológicos, criaderos y particulares; dado que es el ave rapaz con mayor uso en cetrería en México, y es ampliamente utilizada en el control biológico de aves a nivel industrial.

En los zoológicos, criaderos y centros de rehabilitación de fauna silvestre frecuentemente existen ejemplares potencialmente reproductivos que se encuentran con algún impedimento físico o de amputación (Murray y Pizzirani, 2013). Por lo que el uso de las técnicas de reproducción asistida (TRA), en aves rapaces, ha sido fundamental para lograr reproducir individuos de halcón Harris con mayor eficiencia en condición de cautiverio, principalmente aquellos que no pueden ser reintroducidos al medio (Herrera *et al.*, 2013).

Se ha empleado también el concepto de “criozoológicos” o bancos de recursos genéticos, que consisten en centros de conservación “ex situ” que almacenan reservorios genéticos como bancos de espermatozoides, de óvulos ó de líneas celulares, los cuales están disponibles para ser usados en inseminación artificial o transferencia de embriones (Rojas *et al.*, 2006) y corresponde a una interfase

entre programas de reproducción en cautiverio (conservación *ex situ*) y los programas de conservación en el hábitat (conservación *in situ*) (Holt *et al.*, 2004).

Para el manejo *in vitro* de eyaculados de aves, se usan medios de conservación y crioprotectores; uno de los medios mayormente utilizados es la solución Lake y entre los crioprotectores más usados están el Glicerol, Dimetilsulfóxido y Dimetilacetamida (Hammerstedt y Graham, 1992). Estas sustancias han presentado resultados variables en diferentes especies, por lo que es necesario diseñar protocolos de criopreservación seminal específicos que optimicen las TRA en aves rapaces, para así lograr una mayor eficiencia en los protocolos de reproducción en cautiverio y contribuir de manera directa a su conservación y aprovechamiento sustentable (Kowalczyk y Lukaszewicz, 2015).

Una manera de evaluar la eficiencia de los protocolos de criopreservación seminal, además de analizar la viabilidad, movilidad y morfología, es determinando la capacidad de reacción acrosomal de los espermatozoides en semen fresco o post descongelación (Ahammad *et al.*, 2013), esta evaluación *in vitro*, ayuda a predecir su capacidad fertilizante *in vivo*, de una manera cuantificable.

Estudios mencionan que el proceso de capacitación espermática en las aves ocurre en periodos muy cortos y se lleva a cabo en el tracto de la hembra, además, mencionan que este proceso no es requerido para la fertilización del ovocito (Lemoine *et al.*, 2011), sin embargo posteriores estudios mencionan la presencia de factores discapacitantes de los espermatozoides en el oviducto de la hembra (Sasanami *et al.*, 2013). Esta investigación contribuye a la determinación de los parámetros de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides de halcón Harris, con la intención de evidenciar indicadores que permitan evaluar y

desarrollar medios para la conservación en fresco y criopreservación espermática, del halcón Harris.

3.- MARCO REFERENCIAL

3.1- Las aves rapaces

Por su constitución morfológica y capacidad sensorial, las rapaces están especializadas al régimen carnívoro (Salgado *et al.*, 1994, Méndez *et al.*, 2006).

Poseen pico y garras curvas y afiladas, así como visión binocular, que les ayudan a capturar sus presas (Kemp, 1993, Salgado *et al.*, 1994).

Fungen como bio-indicadores en los ecosistemas, ya que al ser depredadores, una buena población de aves rapaces es indicador de que el ecosistema se encuentra sano (Méndez *et al.*, 2006).

3.2- Aves rapaces en México

Históricamente México es un país vinculado desde sus orígenes con las aves rapaces, en formas y usos muy variados (Tavizón, 1999). Desde tiempos prehispánicos se adoraban por su imponente porte, mismo que inspiró para la creación del escudo nacional Mexicano que se plasmó en la bandera, otorgando una identidad a la nación.

En México existen 1096 especies de aves, de las cuales 88 son rapaces (CONANP/SEMARNAT, 2014).

3.3- Cetrería y Legislación

En la actualidad, el interés por el uso y aprovechamiento de las aves rapaces en México es relativamente limitado, aunque especies como el halcón Harris son más comunes en cautiverio, debido a que es la rapaz mayormente usada para practicar la cetrería; esta actividad se considera un deporte que consiste en entrenar aves rapaces para la cacería de diversos tipos de presas. La cetrería constituye hoy en día Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad (Decisión 7.COM 11.33 *List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity*, 16 de noviembre 2012). Esta modalidad de caza ha promocionado la cría de aves rapaces en cautiverio como lo es el caso del halcón Harris, que está clasificado como una especie con protección especial bajo la NOM-059-SEMARNAT- 2010.

Actualmente existe el comercio de aves rapaces a nivel mundial, y México no ha sido la excepción, donde la comercialización legal se hace con ejemplares producidos en diferentes criaderos del país que están regulados por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), quien otorga tasas de aprovechamiento para promover un manejo sustentable. Cabe mencionar que también existe el tráfico ilegal de aves rapaces, que es considerado como una de las actividades ilícitas más lucrativas en México (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, 2014).

3.4- Halcón Harris

Taxonómicamente, el halcón Harris se clasifica en la familia Accipitridae, representando a la única especie a nivel mundial del género *Parabuteo*. Son aves comunes de hábitats semiáridos; sus características distintivas son su color café

parduzco que se hace más oscuro con la edad y una banda blanca en el extremo de las plumas de la cola (Sibley, 2012).

Existen 3 subespecies distribuidas ampliamente sobre el continente americano: *Parabuteo unicinctus superior*, que habita en el norte de México y el sur de Estados Unidos, *Parabuteo unicinctus harrisi*, su distribución es desde Texas, E.U, el este de México y la mayor parte de América Central, y *Parabuteo unicinctus unicinctus* que se distribuye en Sudamérica (Avibirds, 2012).

3.5- Biología reproductiva

Reproducción

El halcón Harris es un ave monógama que vive en parvada, alcanza la edad adulta a los 3 años, en esta etapa el macho comienza a cortejar a las hembras y construye un nido. Generalmente existe un dimorfismo sexual bien marcado, en el cual las hembras son un tercio más grandes que los machos (Ceballos y Justribó, 2011). Una vez formada la pareja, ocurre la cópula y la puesta de huevos; la incubación dura entre 31 y 33 días, y la realiza principalmente la hembra, incubando de 3 a 4 huevos por temporada. Al iniciar la reproducción es común que se formen parvadas de hasta ocho ejemplares, entre polluelos, juveniles y progenitores; los juveniles ayudan a la cría de los nuevos polluelos, lo que es la peculiaridad de esta especie (Conabio/Naturalista, 2015).

Estacionalidad

Para la mayor parte de los animales, la reproducción ocurre durante ciertas épocas del año, usualmente en aquellas en que hay mayor disponibilidad de alimento (Gutiérrez, 1999), las rapaces no son la excepción, su reproducción es estrictamente estacional. Específicamente el halcón Harris en México se reproduce entre los meses de febrero y mayo, cuando existe una gran variedad de presas jóvenes en el medio; en estos meses ocurre una estimulación por el aumento en el la cantidad de horas luz (fotoperiodo) 13 horas luz y 11 oscuridad y un aumento en la temperatura, esto activa procesos fisiológicos que culminan en una gran actividad hormonal. Misma que da comienzo a la producción espermática, regulada por la testosterona. El aumento de fotoperiodo y temperatura son los factores que determinan la actividad reproductiva en esta especie; al no existir estos fenómenos, se produce un proceso refractario en el cual los órganos sexuales involucionan en la estación no reproductiva, mermando la producción de gametos y las conductas reproductivas reguladas por hormonas sexuales (Sauveur, 1992).

3.5.1- Morfofisiología reproductiva

Macho

El aparato reproductor está constituido por tres unidades morfo funcionales: los testículos, conductos deferentes y el órgano copulador.

El proceso de espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos del testículo y promueve el desarrollo de las espermatogonias que se transforman en espermatozoides; de este proceso depende la calidad y la producción espermática constante. La espermiogénesis se desarrolla en estrecha relación con las células

somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli y están bajo control de las hormonas gonadótropas, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (Peralta y Miazzo, 2002).

El espermatozoide del halcón Harris es de forma alargado, la cabeza es filamentosa y mide de 12 a 13 μm , se corona por el acrosoma de 2 μm de largo. La parte media tiene 4 μm de largo. El resto de la cola tiene una longitud aproximada de 70 μm , y a lo largo de ésta se extienden fibras centrales relacionadas con los centriolos (Herrera *et al.*, 2013b). En su parte más ancha, el espermatozoide mide cerca de 0.5 μm . Posee una membrana plasmática en la superficie, donde se encuentran glicoproteínas y glicolípidos como N-acetilglucosamina, Glicofosfatidil-Inositol, β 1,3-galactose, entre otros que actúan como receptores. También están presentes fosfolípidos que se encuentran organizados en forma asimétrica bilaminar (Gilbert, 1996; Long, 2006). Los espermatozoides tienen una membrana acrosomal que se deriva del aparato de Golgi que representa la membrana externa situada en la cabeza. Para obtener su capacidad fertilizante deben llevar a cabo una maduración, capacitación y reacción acrosomal (Lemoine *et al.*, 2008), aunque algunos autores mencionan que en las aves al momento de obtener eyaculados, los espermatozoides ya están capacitados y con capacidad fertilizante (Lemoine *et al.*, 2009; 2011).

En contraste a los mamíferos, el período de capacitación espermática en aves no se tiene bien descrito, se sabe que la reacción del acrosoma en espermatozoides de gallo puede ser inducida muy rápidamente *in vitro* en un medio salino simple que contenga sólo Ca^{2+} y MPV (Lemoine *et al.*, 2011).

El acrosoma es un organelo espermático con forma de capucha, ubicado en la región apical del espermatozoide, sobre el segmento anterior del núcleo, cuyo contenido incluye una mezcla única de enzimas, tales como acrosina y otras enzimas presentes en el lisosoma, peroxisoma e incluso en el citoplasma (Del Río *et al.*, 2007), estas enzimas hidrolíticas se derivan del aparato de Golgi durante la espermatogénesis; por su origen, estructura, y función celular el acrosoma es comparable a un ribosoma. Pero a diferencia de este, presenta exocitosis regulada por el metabolismo de fosfoinosítidos, interacción de nucleótidos endógenos y exógenos, Ca^{2+} , calmodulina, microtubulos y microfilamentos.

Hembra

El aparato reproductor está compuesto por dos partes esenciales: ovario y oviducto izquierdo, encontrándose atrofiado la estructura del lado derecho. En la formación del huevo intervienen dos estructuras anatómicas diferentes: el ovario en la formación del vitelo, y el oviducto para la fracción albugínea y el cascarón. La ovulación permite el paso del óvulo al oviducto, este proceso se completa con la fertilización, la cual se lleva a cabo en el infundíbulo (Galindo, 2006).

Por otro lado, la membrana perivitelina (MPV) del ovocito puede considerarse hasta cierto punto como análoga a la zona pelúcida (ZP) de los mamíferos (Waclawek *et al.*, 1998). Se compone de glicoproteínas que tienen un papel clave en la unión del espermatozoide-ovocito y la inducción acrosómica de exocitosis. Estas glicoproteínas fungen como de factores de reconocimiento gamético, en las aves se han descrito principalmente moléculas como N-acetil-glucosamina, el

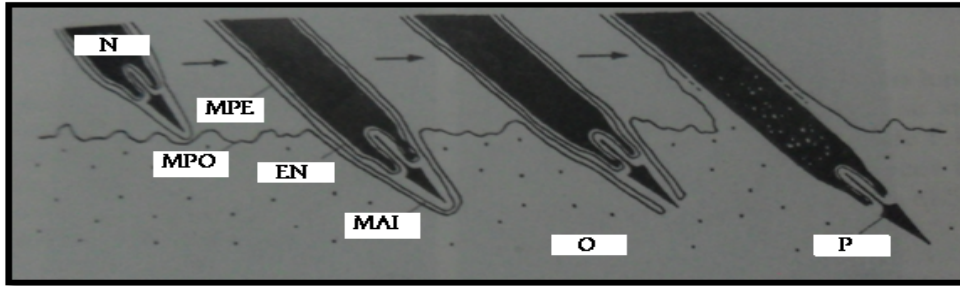
ácido siálico, manosa y glucosa, como parte de las glicoproteínas de reconocimiento gamético (Okumura *et al.*, 2004).

Reconocimiento gamético y fertilización

Después de la cópula, los espermatozoides de las aves pueden permanecer en el oviducto de la hembra hasta 3 semanas antes de llegar al infundíbulo, sitio de la fertilización y someterse a la reacción del acrosoma para penetrar la MPV que rodea al vitelo que contiene el ovocito (Lemione *et al.*, 2009).

En la reacción acrosomal se fusionan las membranas plasmáticas y la membrana acrosomal. Esta fusión da como resultado la liberación de enzimas que ayudan a hidrolizar la membrana perivitelina del óvulo, auxilia al espermatozoide a penetrarlo y realizar la fertilización (Lemoine *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2005). La membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal interna del mismo, se fusionan con la membrana perivitelina se encuentra en la membrana plasmática del óvulo para liberar el núcleo del espermatozoide y la varilla sub acrosomal (perforatum) dentro del óvulo (Figura 1). La envoltura nuclear se desintegra cuando el espermatozoide entra al óvulo, posteriormente ocurre el intercambio genético (Etches, 1998).

Figura 1. Reacción acrosomal y fusión de gametos en aves. (Etches, 1998).



MPE=membrana plasmática del espermatozoide, MAI=membrana acrosomal interna, MPO=membrana plasmática del óvulo, N=núcleo, EN=envoltura nuclear, O=óvulo, P=Perforatum

4.- MARCO TEÓRICO

4.1- Reproducción en cautiverio

Desde hace décadas se ha empleado la criopreservación seminal e inseminación artificial como herramienta para el mantenimiento de líneas específicas de aves domésticas con interés comercial, manteniendo así la variabilidad genética de las líneas germinales (Leibo y Blesbois, 2004). Los mismos protocolos de criopreservación espermática utilizados en las especies domésticas, se han empleado en aves de origen silvestre, para lograr su reproducción con diferentes propósitos. En la actualidad, la reproducción en cautiverio de aves rapaces, incluido el halcón Harris, se lleva a cabo principalmente en zoológicos y en fundaciones en pro de la conservación; con el propósito de exhibir los ejemplares y fomentar su conservación, por medio de la educación ambiental; además en México se desarrolla en Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA's) y Predios o Instalaciones que Manejan Vida Silvestre de Forma Confinada Fuera de su Hábitat Natural (PIMVS), donde se reproducen con fines comerciales, principalmente para uso de cetrería y control biológico.

En estos lugares son utilizadas principalmente dos estrategias de reproducción de rapaces en cautiverio: la cópula natural y la inseminación artificial. La cópula natural tiene las ventajas de necesitar menor mano de obra, produce polluelos no improntados con el ser humano (ideales para su reintroducción) y facilita la formación de parejas con fines reproductivos en los descendientes de este tipo de cría. Por su parte, la reproducción por inseminación artificial permite producir híbridos y optimizar los eyaculados, pudiendo inseminar a más de una hembra por

eyaculado a diferencia que en la cópula natural, pero requiere una capacitación especializada, equipo e instalaciones (Fox, 2003).

4.2- Obtención seminal

Existen varias técnicas de obtención seminal, mismas que se clasifican como invasivas y no invasivas.

Las técnicas invasivas incluyen, la electroeyaculación, lavado de conductos deferentes, procedimientos quirúrgicos y las no invasivas incluyen procedimientos tales como el masaje dorsoventral en ejemplares entrenados y no entrenados y donación voluntaria (Herrera *et al.*, 2013a).

4.3- Conservación seminal *in vitro*

Es el proceso *in vitro* en el cual al semen se le adicionan sustancias que pueden actuar como diluyentes y/o crioprotectores (Herrera *et al.*, 2013a), con la finalidad de maximizar la viabilidad de los espermatozoides para su uso posterior. Existen dos maneras de conservar *in vitro* al semen: La conservación en refrigeración y la criopreservación.

Refrigeración: Consiste en añadir al semen recién eyaculado, diluyentes en diversas proporciones que se obtienen de mezclas de sales de fosfatos, citratos y/o amortiguadores orgánicos como el BES (N,N-bis(2hidroxiethyl)-2aminoetano de ácido sulfónico) y el TES (N-tris (hidroxiethyl) metil-2-aminoetano de ácido sulfónico); los cuales al estar en contacto con el semen, proveen a los espermatozoides condiciones necesarias para mantenerlos viables y con capacidad fertilizante a una temperatura de 5° C aproximadamente hasta por 3 días (Herrera *et al.*, 2013).

Diluyentes: Los diluyentes para semen aviar consisten en reguladores osmóticos, fuentes de energía, buffers y agentes quelantes (Bootwalla y Miles, 1992). No deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso, debe proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación, y finalmente, deben ser resistentes al crecimiento bacteriano (Melrose, 1962; Mann, 1964).

Se ha desarrollado un diluyente especial para aves domésticas el BPSE (Tabla 1) el cual se diseñó de acuerdo a las características metabólicas de los espermatozoides las aves domésticas.

Tabla 1. Composición del diluyente *Beltsville Poultry Semen Extender* (BPSE) (Sexton,1977) (Formula original).

COMPONENTE	g/L
Difosfato de Potasio-3H ₂ O	12.70
Glutamato de Sodio	8.67
Fructosa (Anhidro)	5.0
Acetato de Sodio- 3H ₂ O	4.3
TES *	1.95
Citrato de Potasio	0.64
Monofostato de Potasio	0.65
Cloruro de Magnesio-6H ₂ O	0.34
pH	8.6**
Osmolaridad	380 mOsm

*N-tris (Hidroximetil) metil-2-aminoetano de ácido sulfónico.

** Determinado en condición de laboratorio.

También existe el diluyente Lake (Tabla 2), que es uno de los usados con mayor éxito en aves domésticas, se caracteriza por cumplir las condiciones de osmolaridad; este diluyente incluye uno o más sistemas tampones (citrato, acetato) y posee concentraciones precisas de algunos electrolitos como Na, K, Mg y quelantes (aminoácidos como glutámico y glicina). En general, lleva un solo azúcar, glucosa o fructosa (Álvarez *et al.*, 2009).

Tabla 2. Composición del diluyente Lake (Lake y Ravie, 1984) (Formula original).

COMPONENTE	g/L
Glutamato de Sodio	19.2
Fructosa	8.0
Acetato de Potasio	5.0
Acetato de Magnesio	0.8
pH	7.1*
Osmolaridad	340 mOsm

*Determinado en condición de laboratorio.

Criopreservación: Es la técnica en la cual se congela el semen a una temperatura de -190°C , conservando su viabilidad y capacidad fertilizante de manera prolongada (meses ó años). Para lograrlo se usan sustancias que mantienen las condiciones fisiológicas aptas para los espermatozoides y otras que protegen la membrana plasmática reduciendo el efecto de la excesiva concentración de solutos y para evitar o disminuir la formación de cristales intra y extracelulares durante la descongelación (Holt, 2000). Se ha demostrado que el

proceso de congelación de semen aviar disminuye la fluidez de la membrana (Blesbois *et al.*, 2005), el contenido de los carbohidratos (Long, 2006), daña la mitocondria y la membrana acrosomal, así como el núcleo espermático (Celeghini *et al.*, 2007). En general el semen es enfriado a 5° C después de ser disuelto y equilibrado con un agente crioprotector y se mantiene en esta temperatura por 10 minutos antes de ser criopreservado (Tucker, 2014).

Actualmente los métodos comúnmente usados para la criopreservación de espermatozoides de aves son: La congelación lenta (7° C/min) usando glicerol como crioprotector y la congelación rápida (50°C/min) usando dimetilacetamida (DMA) como crioprotector (Blesbois y Grasseau, 2002).

Crioprotectores: Los crioprotectores se clasifican en dos grupos, los que atraviesan la membrana celular y los que actúan desde el exterior de la célula (Herrera *et al.*, 2005; Blesbois, 2007; Barbas *et al.*, 2009; Purdy *et al.*, 2009). Aquellos que son capaces de atravesar las membranas, ocasionan una reorganización de las proteínas y lípidos, causando una mayor fluidez membranal y deshidratación a bajas temperaturas, que a su vez evita la formación de hielo generando una mayor tasa de supervivencia espermática post descongelación (Blanco *et al.*, 2009). Los crioprotectores más usados en aves son: el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) (Barbas *et al.*, 2009).

El glicerol es un alcohol (Fig. 2) de tres grupos hidroxilos, posee un coeficiente alto de viscosidad y tiene una masa molar de 92, 09382 g/mol; es el crioprotector intracelular más común para el esperma de ganado, específicamente en semen de pavos y gallos, se le atribuyen efectos contraceptivos, ya que se ha visto que disminuye la movilidad espermática e irrita la mucosa vaginal de la hembra

(Hammerstedt y Graham 1992), por lo que la concentración óptima durante el proceso de criopreservación debe determinarse detalladamente, debido a su potencial toxicidad.

En respuesta a la adición del glicerol al medio isotónico en el que están las células espermáticas, tiene lugar un primer ajuste del volumen celular debido a una rápida salida de agua intracelular, seguida por un lento retorno al volumen original a medida que penetra el crioprotector.

Cuando el agua extracelular se congela ocurre un segundo ajuste de volumen, motivado por la salida de agua del interior de la célula, en respuesta a las altas concentraciones de sales extracelulares (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Además de los efectos osmóticos, el glicerol actúa directamente sobre la membrana espermática aumentando su fluidez y el metabolismo celular induciendo una hiperactivación espermática prematura, lo que compromete la capacidad fertilizante espermática; esta acción es más acusada a mayor temperatura (Parks y Graham, 1992), para el desarrollo de cualquier protocolo de criopreservación seminal donde se quiera usar este crioprotector, deben determinarse los rangos de disminución de la temperatura óptimos.

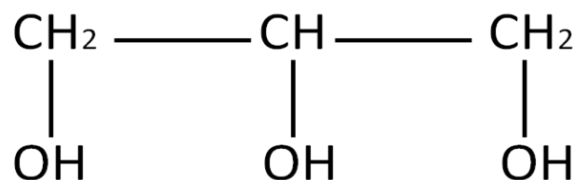


Figura 2.- Estructura molecular del glicerol.

Los efectos tóxicos del glicerol como el aumento de la fluidez del moco oviductal y la irritación de este conducto en la hembra (Long y Kulkarni, 2004) han impulsado el estudio y empleo de otros crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMSO) (Fig.3). Esta sustancia permite la fusión de las membranas a una temperatura aproximada de 0° C, evitando la difusión de los cationes y demás componentes intracelulares a través de las roturas de membrana causadas por la formación intracelular de cristales de hielo (Shier, 1988).

El DMSO es un líquido orgánico que contiene sulfóxido, posee una masa molar de 78.13 g/mol que es menor a la del glicerol; es usado como disolvente orgánico industrial, como criopreservante y como medicamento ya que reduce el dolor y la inflamación. Tiene la capacidad de atravesar membranas orgánicas portando consigo otras sustancias en disolución sin dañar aparentemente la integridad de la membrana, por lo que se le usa en criopreservación de gametos, su toxicidad es muy baja y es una sustancia muy estable a bajas y altas temperaturas (Ramírez y Luza, 1967).

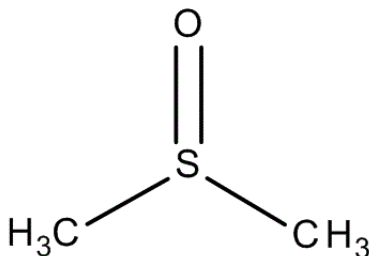


Figura 3.- Estructura molecular del dimetilsulfóxido.

El segundo grupo de crioprotectores está compuesto por sustancias que no atraviesan las membranas y solo actúan extracelularmente, cuentan con un bajo peso molecular, son hidrófilos, no tóxicos y ayudan a estabilizar la concentración de solutos internos bajo ambientes de estrés osmótico, entre estos esta la leche descremada y el agua de coco con una masas moleculares mayores a 10000 g/mol (Blanco et al., 2009), también evitan la formación de cristales de hielo; algunos ejemplos de ellos son: la clara de huevo, dextrosa, lactosa, sacarosa y rafinosa. Estos azúcares interactúan con los fosfolípidos de la membrana plasmática, aumentando la sobrevivencia de los espermatozoides a la criopreservación (Barbas et al., 2009).

Consecuencias celulares de la criopreservación: Este proceso involucra la exposición del espermatozoide a temperaturas no fisiológicas que inducen cambios en diferentes dimensiones como lo son la organización lipídica membranal, la modificación cinética espermática y otras alteraciones que pudieran alterar la capacidad fertilizante del espermatozoide (Xia et al., 1988), el contenido intracelular permanece líquido por debajo del punto de congelación, con lo cual se establece una diferencia en el potencial químico del agua intra y extra celular, creándose una tendencia a que el agua salga de la célula a favor del gradiente osmótico. Si la velocidad de enfriamiento es lo suficientemente lenta, el agua sale de la célula y ésta se deshidrata progresivamente. Cuando la velocidad de enfriamiento es demasiado alta, el agua no puede moverse de la célula lo suficientemente rápido y hay un incremento en el grado de súper enfriamiento hasta que ocurre la congelación intracelular para restaurar el equilibrio (Otero-Muiño, s/f).

Otro de los sucesos durante la criopreservación de espermatozoides que se detecta después de la descongelación es la redistribución de los carbohidratos membranales (Herrera *et al.*, 2005).

4.4- Técnicas de evaluación seminal *in vitro*

La evaluación *in vitro* de semen es una herramienta para valorar de manera cuantitativa la condición espermática de los eyaculados, al conocer características como viabilidad, movilidad, morfología, concentración, capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal y distribución de receptores de reconocimiento gamético en espermatozoides recién eyaculados y post criopreservación; esto permite optimizar los protocolos de criopreservación y crear bancos de semen funcionales.

Evaluación básica: Se determinan los parámetros de: Volumen eyaculado, concentración, movilidad y morfología espermática. Mediante microscopía óptica y con tinciones básicas como la tinción vital de E-N (1% eosina y 5% nigrosina) (Bakst, 1994).

Evaluación fisiológica espermática: Determina algunos parámetros que pueden indicar el estado de los espermatozoides, entre las más comunes están:

- **Actividad mitocondrial:** Este factor se puede determinar usando Rodamina 123, este fluorocromo penetra en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior. Al incidir la luz del láser sobre espermatozoides teñidos con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia verde (Ericsson *et al.*, 1993). La Rodamina 123 suele utilizarse en combinación con PI, que tiñe de rojo el núcleo de los espermatozoides degenerados y por tanto sin actividad

mitocondrial. Aunque la Rodamina 123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células (Graham, 2001).

- Evaluación membranal: La superficie de todas las células eucariotas consta de una zona rica en carbohidratos conocida como el glicocálix. Esta capa de células contiene cadenas de oligosacáridos unidos covalentemente a las proteínas plasmáticas integrales de membrana (glicoproteínas) o lípidos (glucolípidos), así como las cadenas de polisacárido unidos covalentemente a una proteína central (proteoglycanos) que se extiende o se adjunta a la bicapa lipídica (Pelaez y Long, 2007), ésta membrana citoplasmática actúa como separación física del medio exterior, a la vez que intenta equilibrar el medio interno celular con el externo mediante la entrada y salida de iones y agua. De su integridad depende el buen funcionamiento del espermatozoide para llevar a cabo su función fecundante. Lo que hace que las técnicas de evaluación membranal espermática sean primordiales para la evaluación de una muestra seminal.

Para evaluar la funcionalidad membranal comúnmente se aplican las técnicas de tinción con fluorescencia unidas a lectinas.

Lectinas: Son proteínas no inmunes de origen vegetal que poseen afinidad específica a los carbohidratos membranales y una alta especificidad. Con lectinas conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FICT) se pueden detectar carbohidratos que funcionan como receptores de reconocimiento gamético y determinar su presencia y distribución en relación al estado en el que se encuentra

la membrana acrosomal, que es el punto clave para determinar la capacidad fecundante de un eyaculado (Montoya *et al.*, 2008).

Cuando las lectinas son conjugadas con FITC, son expuestas al láser de un microscopio de fluorescencia y emiten un color verde iridiscente.

Entre las lectinas más usadas se encuentran:

-*Triticum vulgare* (WGA): se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico.

-*Arachis hypogaea* (PNA): Se une a β - galactosa en la superficie de la membrana acrosomal, de manera que los acrosomas que exhiben un brillo uniforme se clasifican como acrosomas intactos y aquellos que muestran una apariencia fragmentada o brillo sólo en el segmento ecuatorial se clasifican como acrosomas reaccionados (Pukazhenthil *et al.*, 1999; Pukazhenthil *et al.*, 2001).

- *Pisum sativum* (PSA): Se une a residuos de manosa con resultados similares al anterior (Montoya *et al.*, 2008).

Clortetraciclina (CTC): Es un antibiótico con un componente fluorescente que puede usarse para visualizar el curso de la capacitación espermática y reacción acrosomal. En espermatozoides de mamífero usando CTC es posible diferenciar entre espermatozoides intactos, capacitados, no capacitados y con reacción acrosomal, hecho que no ofrecen otros métodos, que sólo diferencian entre presencia o ausencia de acrosoma. La técnica está basada en la transferencia de CTC a través de las membranas del espermatozoide penetrando en los compartimientos intercelulares, que contienen altos niveles de calcio libre (Ca^{2+}),

donde ioniza un anión y se une al calcio, produciendo como resultado la fluorescencia (Tsien, 1989).

Inducción de la reacción acrosomal: En espermatozoides de aves se usa como inductor de la reacción acrosomal la membrana perivitelina (MPV) de huevos de gallina; se denomina membrana perivitelina heteróloga cuando la membrana se extrae de un huevo de diferente especie a la que se va a analizar; la conservación de algunos de los receptores de reconocimiento gamético en aves, así como el contenido proteico (ZP1), iónico (Ca^{2+}) y hormonal (P4) de esta membrana, se utiliza para inducir la reacción acrosomal en espermatozoides de otras especies (Sasanami *et al.*, 2007), lo cual es un proceso que permite evaluar la integridad de la membrana espermática en diferentes condiciones y relacionarla con su capacidad fertilizante, la cual puede ser determinada con alguno de los métodos anteriormente descritos.

5.- JUSTIFICACIÓN

La reproducción asistida a través de la obtención y congelación de semen y su uso en la inseminación artificial constituye una herramienta para la conservación de diversas especies silvestres.

Se han implementado distintos protocolos de congelación seminal para aves, sin embargo no se han realizado de manera específica por especie, entre las diferentes especies de aves. La evaluación de indicadores *in vitro* durante la capacitación y reacción acrosomal es una manera de ayudar a predecir la capacidad fertilizante *in vivo* de los espermatozoides. Por lo tanto, en este estudio se establecerán indicadores de capacitación y reacción acrosomal determinados con técnicas de evaluación espermática que arrojen resultados cuantificables, para emplearlos como herramienta base en la evaluación de protocolos de criopreservación seminal y lograr valorar la capacidad fertilizante de los eyaculados criopreservados. El desarrollo de este estudio contribuye al conocimiento de la biología reproductiva de la especie, además de aportar conocimientos básicos de utilidad inmediata para el desarrollo de técnicas de reproducción asistida que hacen posible contribuir a la conservación y aprovechamiento sustentable de las especies, ya que con el conocimiento generado se optimizan las técnicas de criopreservación espermática; mismas que pueden emplearse para la reproducción en cautiverio de manera sistemática, teniendo un aporte directamente a la ecología y conservación de las aves rapaces.

6.- ANTECEDENTES

Existen diversos estudios sobre la conservación seminal que han sido desarrollados a lo largo del tiempo; Blanco *et al.*, (2000) evaluaron la variación osmótica del crioprotector y la velocidad de enfriamiento en los espermatozoides de aves de corral (*Gallus domesticus*), águila real (*Aquila chrysaetos*) y halcón peregrino (*Falco peregrinus*), utilizando como crioprotector en diferentes concentraciones dimetilacetamida (DMA), y como diluyente solución Lake; y concluyeron que el enfriamiento rápido, es perjudicial para espermatozoides de todas las especies a excepción del águila real y el gallo. Éstos resultados demuestran que los espermatozoides de las aves difieren notablemente en respuesta a los cambios osmóticos.

Herrera *et al.* (2005) realizaron la criopreservación de eyaculados de tres especies de aves con dimetilsulfóxido (DMSO) y polivinilpirrolidona (PVP), usando como diluyente BPSE. Se analizaron espermatozoides de gallo mostrando una motilidad promedio en fresco de 80.7% y post criopreservación de 52.5% y de morfología normal 98.1% en fresco y 96.3% post criopreservación, en faisán (*Phasianus colchicus*), mientras que para halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*) mostraron resultados para la movilidad en fresco de 67% y 34% post criopreservación. Así, demostraron que el PVP es una alternativa en cuanto a crioprotectores ya que no se encontraron diferencias significativas al compararlo con el DMSO.

Blanco *et al.*, (2009) ha estudiado la criopreservación de espermatozoides en aves silvestres como: La grulla canadiense (*Grus canadensis*) en la que se utilizó como crioprotector el DMSO al 6%, donde se obtuvo el 50% de tasa de fertilidad post descongelación, esto comparado con el 95% usando semen fresco y el mismo

número de espermatozoides por pajilla. Otro caso es el del cernícalo americano (*Falco sparverius*) que demostró una reducción del 26.1% en fertilidad usando el crioprotector DMA en comparación con el semen fresco.

Umapathy *et al.*, (2005) determinaron las características espermáticas en fresco y post descongelación de buitre de espalda blanca (*Gyps bengalensis*) y observaron una disminución considerable en la integridad espermática después de los procesos de congelación.

Villaverde *et al.*, (2015) realizaron la caracterización y criopreservación seminal del águila real (*Aquila chrysaetos*) usando glicerol y dimetiacetamida como crioprotectores. Dogliero *et al.*, (2015) evaluaron semen de tres especies de aves rapaces con analizadores espermáticos computarizados.

Al observar variaciones inter específicas que existen en la viabilidad espermática post criopreservación, con los diversos crioprotectores y diluyentes, se evidencia que existe la necesidad de determinar cuáles de estas sustancias promueven de mayor manera la viabilidad espermática con cada especie; con la finalidad de optimizar los protocolos de criopreservación seminal.

7.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los indicadores espermáticos de evaluación básica, capacitación y reacción acrosomal post criopreservación en halcón Harris, serán diferentes con el uso de los crioprotectores Dimetilsulfóxido o Glicerol?

8.- HIPÓTESIS

El DMSO y glicerol, son molecularmente diferentes y su mecanismo de acción como crioprotectores será diferente, por lo cual se encontrarán diferentes indicadores de evaluación básica, capacitación y reacción acrosomal post descongelación espermática con el uso de cada uno.

9. OBJETIVOS

9.1- Objetivos Generales

Evaluar la capacidad para mantener la viabilidad e integridad espermática post descongelación de los crioprotectores DMSO y Glicerol en el halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*).

9.2- Específicos

- Determinar en semen fresco indicadores seminales básicos y de capacitación y reacción acrosomal.
- Determinar los indicadores espermáticos y de capacitación y reacción acrosomal post descongelación con DMSO y Glicerol.
- Determinar los patrones de distribución de los carbohidratos membranales post criopreservación con cada crioprotector, durante las condiciones de capacitación y reacción acrosomal.

10.- MATERIAL Y MÉTODOS

10.1- Marco legal

Se obtuvo la autorización para la creación de un banco de semen para aves rapaces por parte de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), así como la certificación como técnico en fauna silvestre del personal colector y manejador de especímenes emitida por esta misma instancia.

Asimismo, se cumplió con lo establecido por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-051-ZOO-1995, para el trato humanitario en la movilización de animales y lo establecido en la NORMA MEXICANA NMX-AA-165-SCFI-2014 la cual menciona los requisitos para la certificación con respecto al bienestar animal, conservación, investigación, educación y seguridad en los zoológicos.

10.2- Aves donantes

Las aves utilizadas, machos de halcón Harris, provenían del centro de rehabilitación de aves rapaces que pertenece al predio o instalación que maneja vida silvestre de forma confinada (PIMVS) con número de registro: INE/CITES/DGVS-CR-IN-AV-0035-AGS./00 en el parque Rodolfo Landeros, en la ciudad de Aguascalientes, México. Los ejemplares fueron examinados; realizando análisis coproparasitoscópicos, hemogramas, exploración corporal y análisis de historial clínico, para elegir a los animales clínicamente sanos. Al final, fueron seleccionadas 10 aves que estuvieron entre 3 y 6 años de edad, que mostraron actividad reproductiva, como conducta sexual y una cloaca activa.

De los 10 machos seleccionados se obtuvieron 6 muestras de cada uno, para completar un total de 60 eyaculados que fueron colectados por la técnica de masaje dorso ventral, éstos se diluían en medio Lake. Se incluyeron los

eyaculados que presentaban una viabilidad $\geq 70\%$, una movilidad progresiva $\geq 70\%$ y una morfología normal $\geq 70\%$. De los 6 eyaculados obtenidos por cada macho, 3 se congelaron con glicerol y 3 con DMSO.

10.3- Técnica de obtención seminal

La técnica utilizada para la obtención seminal es denominada “masaje dorsoventral” (Fig. 4), descrita por Burrows y Quinn (1937) y modificada en aves rapaces por Herrera *et al.*, (2013); consiste en sujetar al ave por el pecho de manera que las patas queden libres, para aplicar un masaje suave en el dorso en dirección cabeza-cola, hasta tocar los huesos pélvicos. Cuando el ave muestre signos de relajación, se hace un masaje desde el área ventral hasta la cloaca. Se evierte la cloaca haciendo una ligera presión y en este momento el eyaculado es expulsado, para ser colectado con una micropipeta.

Figura 4.- Masaje dorsoventral en halcón Harris.



10.4- Diseño Experimental

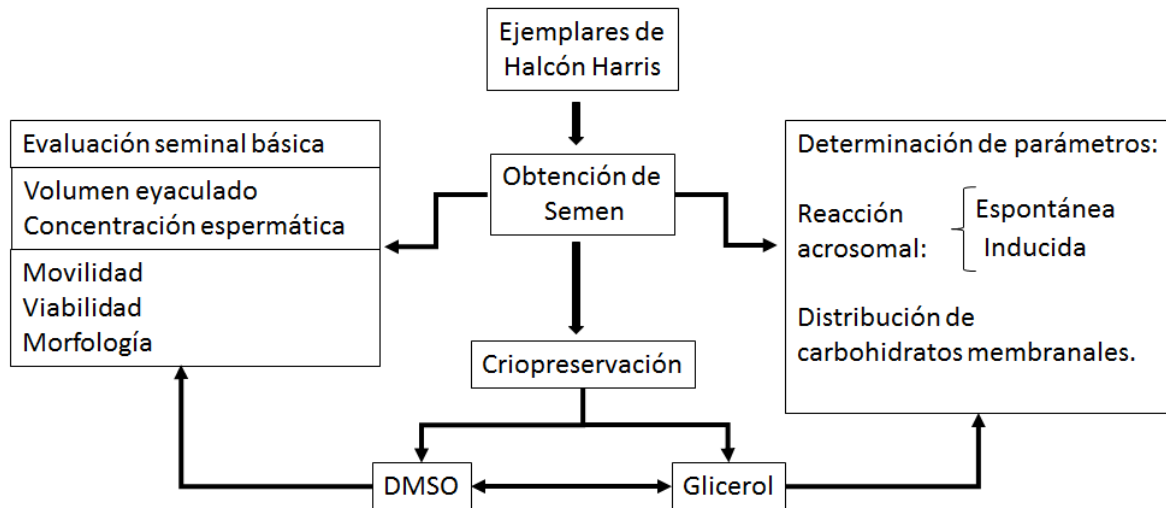
Como se muestra en la figura 5 cada eyaculado obtenido se diluyó en medio Lake (Glutamato de Sodio 0.46M, Acetato de Sodio 1.86M, Fructosa 22.20M, pH 7.1 y Osmolaridad 340), para posteriormente tomar alícuotas y hacer los respectivos análisis con cada una. De un volumen final de 100 μ l se tomaron 5 μ l para realizar la evaluación básica y determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y morfología espermática; otra alícuota de 5 μ l se observó al microscopio para evaluar la movilidad y concentración espermática.

Alícuotas de 20 μ l se usaron para hacer la evaluación en fresco de la capacidad para la reacción acrosomal con CTC en las dos condiciones (10 μ l capacitación y 10 μ l reacción acrosomal) y 20 μ l para el análisis de la distribución de carbohidratos membranales con WGA-FICT en ambas condiciones.

El resto del eyaculado se congeló; de los 60 eyaculados, 30 se criopreservaron y evaluaron utilizando DMSO y 30 con Glicerol como crioprotectores.

Para el proceso de criopreservación y descongelación se empleó la técnica descrita por Herrera *et al.*, (2013) en la cual a los eyaculados se les añadió el 8% de crioprotector y se equilibró por 10 minutos a 5° C, para posteriormente empajillar usando pajillas de 0.25 ml y someterlas a vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos, finalmente se sumergieron las pajillas al nitrógeno líquido en el fondo del termo criogénico. Cada eyaculado fue criopreservado 30 días como mínimo, para repetir los estudios post criopreservación.

Figura 5.- Diseño Experimental



10.5.- Evaluación seminal básica

Determinación del volumen

Se aspiró directamente el eyaculado de la cloaca por medio de una micropipeta graduada en la cual se determinó el volumen de cada eyaculado.

Concentración y movilidad espermática

Se determinó la concentración espermática con el uso de la cámara de Neubauer, solo se procesaron eyaculados en los que la concentración total fuese igual o mayor a 5×10^6 espermatozoides por eyaculado.

Viabilidad y morfología espermática

Alícuotas de 5 μ l se depositaron en una laminilla, donde se le agregaban 2 μ l de eosina-nigrosina (1% y 5% respectivamente), para homogenizar y hacer un frotis, el cual se dejaba secar por al menos 10 minutos, una vez seca, se observó bajo microscopía óptica a un aumento de 40x.

Se realizó el conteo de 100 células espermáticas que se clasificaron y contabilizaron, determinando el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

La capacidad de tinción de la eosina-nigrosina nos permitió evaluar la viabilidad, ya que es una sustancia de bajo peso molecular que es permeable a la membrana celular, por lo que logra entrar en la célula espermática que ha perdido su permeabilidad membranal y tiñe su núcleo de un color azul o violeta, lo que se consideró como espermatozoides muertos (Fig. 7B); en aquellos espermatozoides que están vivos y conservan la permeabilidad membranal, la eosina-nigrosina muestra un fondo de contraste, apreciándose un espermatozoide con núcleo blanco iridiscente que se clasificó como espermatozoide vivo (Fig. 7A).

Para la morfología espermática, en el mismo frotis, se cuantificaron tres anormalidades que son las más comunes en espermatozoides de aves: Anormalidad en cabeza (Fig. 8A): Cuando existía un doblez en el área de la cabeza de tal manera que formaba un ángulo de 90° o menos. Anormalidad en

cuello (Fig. 8B): Cuando el ángulo se formaba en la parte del cuello. Anormalidad en cola (Fig. 8C): Cuando se encontraba colas enrolladas o dobladas.

10.6- Evaluación membranar

Condiciones de capacitación y reacción acrosomal

La condición de capacitación espermática se consideró al incubar los espermatozoides disueltos únicamente en medio Lake, los cuales se ha visto que tienden a capacitarse, mientras la condición de reacción acrosomal se determinó cuando las muestras que fueron co-incubadas con MPV heteróloga para inducir la reacción acrosomal (Ochkur *et al.*, 1994).

Determinación de la presencia de Ca²⁺ membranar

En un tubo Eppendorf con volumen final de 30 µl conformado por 10 µl de medio Lake, 10 µl de eyaculado (con una concentración de 5x10⁶ espermatozoides) y 10 µl de clortetraciclina (CTC) (Ochoa *et al.*, 2014), para las muestras analizadas en condiciones de capacitación.

Para las muestras analizadas en condiciones de reacción acrosomal se estableció un volumen de 30 µl, conformado por 10 µl de membrana perivitelina heteróloga (MPV) (Sasanami *et al.*, 2007), 10 µl de eyaculado con una concentración 5x10⁶ espermatozoides y 10 µl de clortetraciclina (CTC).

Cada tubo se incubó a 38°C durante 40 minutos, los 10 µl de CTC fueron depositados 10 min previos al tiempo establecido de incubación.

Posterior a la incubación se realizó la observación directa al microscopio de fluorescencia, usando 488 nm de excitación y emisión >560 nm para determinar el porcentaje de patrones de espermatozoides (Lemoine, 2009, Ahammad, 2011).

Determinación de los carbohidratos membranales

Este análisis se realizó en ambas condiciones, capacitación y reacción acrosomal. Se llevó a cabo por microscopía de fluorescencia (Herrera *et al.*, 2005), con la lectina WGA (*Triticum vulgare* aglutinina) conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC); esta lectina se une a N-acetil-glucosamina y/o ácido siálico, que son carbohidratos que forman parte de las glicoproteínas de reconocimiento gamético. Conocer su distribución, nos otorga una aproximación del estado

membranal del espermatozoide en relación a la capacidad de reconocer y unirse al ovocito.

Para la condición de capacitación, un volumen final de 40 μ l conformado por 10 μ l eyaculado con una concentración 5×10^6 espermatozoides, 10 μ l de WGA-FICT a una concentración de 15 mg/ml y 20 μ l de medio Lake; se incubó a 25°C por 30 minutos cubriendo de la luz.

En la condición de reacción acrosomal se incubó por 30 minutos a 38°C cubriendo de la luz, un volumen final de 40 μ l, compuesto por 10 μ l de eyaculado, 10 μ l de WGA-FICT a una concentración de 15 mg/ml, 10 μ l de MPV y 10 μ l de diluyente.

Después de la incubación, en ambos casos se centrifugaron los tubos por 5 minutos a 600g; se retiró el sobrenadante y se fijó el paquete celular añadiendo paraformaldehído al 1%.

Cada muestra se observó directamente en un microscopio de fluorescencia a 260 nm de excitación y >560 nm emisión, contabilizando 100 espermatozoides y clasificándolos para determinar los patrones de fluorescencia y su proporción.

10.7- Protocolo de criopreservación y descongelación.

Se empleó la técnica de congelación descrita por Burrows y Quinn (1937) y modificada por Herrera *et al.*, (2005), en la cual a alícuotas de 50 μ l de eyaculado se les añadió el 8% (4 μ l) de crioprotector (DMSO al 99% o Glicerol al 99%), con el cual se homogenizan y se equilibran a 5°C durante 10 minutos. Posteriormente se introduce el eyaculado en una pajilla de 0.25 ml, cuidando que todo el material se encuentre a temperatura de 5° C. Las pajillas se someten a vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos y enseguida se sumergen en nitrógeno líquido a -196°C donde permanecen hasta su descongelación que se realiza en baño María a 35°C por 10 segundos.

10.8- Obtención de membrana perivitelina

Para extraer MPV de huevo de gallina (fig. 6), se abre el huevo, para vaciar el albumen sobre una caja de Petri, aislando el vitelo, el cual se vacía en una caja de Petri y se toma la membrana con unas pinzas y se punciona al lado contrario para que el vitelo vaya saliendo. Una vez que se tiene la membrana asilada, se lavó

con medio Lake para asegurar que no queden restos de vitelo, hasta que se veía con un color blanquecino uniforme.

Se colocó la membrana en un tubo Eppendorf y se le añadieron 500 μ l de medio Lake, se almacenó en un recipiente con hielo y se procedió a macerar la MPV.

Cuando la MPV quedó homogénea, se centrifugó por 1 minuto a 600g, se recogió el sobrenadante con una micropipeta, se depositó en un tubo Eppendorf y se almacenó en un recipiente con hielo hasta su uso (Calderón, 2015).

Figura 6.- Obtención de membrana perivitelina heteróloga.



10.9- Análisis Estadístico

Ordenamiento de datos

Los datos se capturaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010 para ser analizados con el paquete estadístico “R”.

Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar la existencia de diferencias entre las variables ($P < 0.05$).

Se realizó una prueba *Tukey* para determinar las diferencias entre las medias, de los espermatozoides en fresco vs criopreservados con glicerol o DMSO.

Posteriormente, se realizó una prueba T-Student determinar diferencias entre medias de los patrones de fluorescencia en espermatozoides en condiciones de capacitación o reacción acrosomal.

11.-RESULTADOS

11.1- Evaluación seminal básica

Los parámetros de evaluación espermática básica en semen fresco y criopreservado se presentan en la tabla 3.

La movilidad espermática se determinó estimando el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva rectilínea a una temperatura de 38° C observada bajo el microscopio óptico a 40x.

En espermatozoides recién eyaculados la movilidad fue de 77.2 %, mayor ($P < 0.05$) que en espermatozoides descongelados cuando se usó el crioprotector DMSO (16.8 %) ó glicerol (20 %). Sin embargo, la comparación entre los porcentajes en espermatozoides descongelados no mostró diferencia ($P > 0.05$).

En eyaculados recién obtenidos, se determinó un 95.3 % de espermatozoides vivos, valor mayor ($P < 0.05$) que en los eyaculados que fueron criopreservados; con glicerol (73.6 %) como crioprotector, porcentaje que a su vez fue mayor al obtenido con DMSO (58.1 %) ($P < 0.05$).

Con respecto a la morfología espermática, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre los eyaculados en fresco y post descongelación, así tampoco entre muestras criopreservadas con DMSO o glicerol.

Figura 7: Tinción vital de espermatozoides (100X).



A: Espermatozoide vivo, presenta un núcleo de color blanco iridiscente. B: Espermatozoide muerto, presenta un núcleo teñido de morado debido a que el colorante atraviesa la membrana plasmática, lo que evidencia la pérdida de permeabilidad.

Figura 8: Morfología espermática (100X).



A: Anormalidad en cabeza, B: Anormalidad en cuello, C: Anormalidad en cola.

Tabla 3.- Parámetros seminales de evaluación básica en espermatozoides recién eyaculados y post criopreservación.

Condición espermática	Recién	Descongelados	
	eyaculados (X ± EE)	DMSO (X ± EE)	GLICEROL (X ± EE)
Movilidad	77.2±1.6 ^a	16.8±0.7 ^b	20±1.6 ^b
Vivos	95.3±0.6 ^a	58.1±8.7 ^b	73.6±2.6 ^c
Morfología Normal	97.7±2.0 ^a	97±0.5 ^a	97.3±0.7 ^a
Anormalidades			
Cabeza	2.2±0.2 ^a	1.4±0.4 ^a	1.6±0.3 ^a
Cuello	2.4±0.2 ^a	0.9±0.2 ^a	0.6±0.3 ^a
Cola	1.8±0.2 ^a	0.7±0.3 ^{ab}	0.5±0.2 ^b

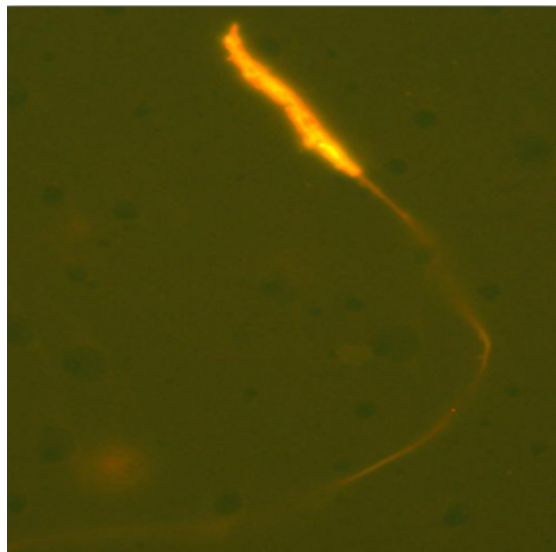
Al comparar la misma variable en distinta condición, diferente literal (a,b,c) indica diferencia estadística (P<0.05).

11.2-Patrones de fluorescencia evaluados con clortetraciclina

En las condiciones de evaluación espermática de este estudio, al igual que en los resultados reportados por Ochoa *et al.*, (2014) se determinaron en los espermatozoides tres patrones de fluorescencia.

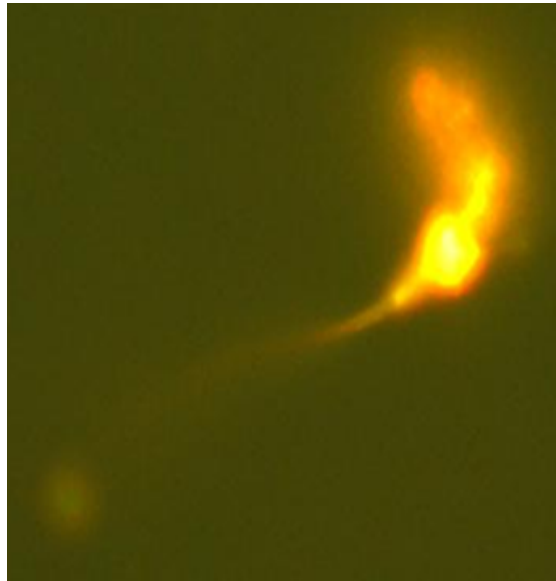
Patrón 1.- Espermatozoides con una fluorescencia uniforme a lo largo de toda su superficie; considerado como intacto o no capacitado (100X) Ver figura 9.

Figura 9.- Espermatozoide intacto, determinado con el uso de clortetraciclina. Lo que sugiere que la actividad de Ca^{2+} esta de manera homogénea en toda la superficie de la célula, relacionada con un estado metabólico pasivo o movilidad progresiva característica de espermatozoides no capacitados.



Patrón 2.- Espermatozoides con una fluorescencia de la pieza media hacia el acrosoma; catalogado como capacitado. Ver figura 10.

Figura 10.- Espermatozoide capacitado, determinado con el uso de clortetraciclina. La actividad de Ca^{2+} (fluorescencia) se acumula en la zona donde se encuentran la región post ecuatorial y apical del cuello, sitio donde se localizan las mitocondrias, lo que sugiere una hiperactivación espermática, relacionada con el proceso de capacitación.



Patrón 3.- Espermatozoides con una zona de fluorescencia pequeña bien marcada en el área de la pieza media, se aprecian pequeñas manchas; clasificado como espermatozoide con reacción acrosomal. Ver figura 11.

Figura 11.- Espermatozoide con reacción acrosomal, determinado con clortetraciclina. La actividad de Ca^{2+} sin denotar en la región acrosomal, sugiere la pérdida de éste, evidenciando una menor actividad y presencia de Ca^{2+}



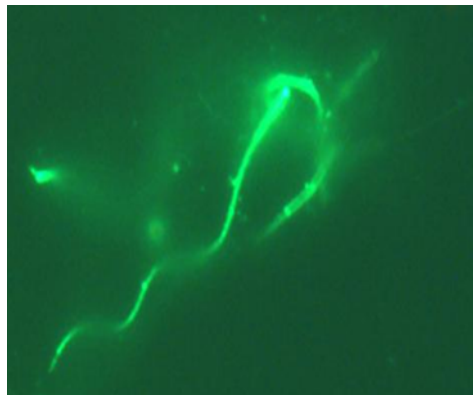
11.3- Patrones de fluorescencia en espermatozoides evaluados con el uso de la lectina *Wheat Germ Agglutinin* conjugada con Isotiocianato de Fluorosceína (WGA-FICT)

Cuando los espermatozoides se evaluaron con WGA-FICT se determinaron tres patrones de fluorescencia característicos, los cuales evidenciaron la presencia en la superficie espermática de N-acetil-glucosamina y ácido siálico (Pukazhenthil *et al.*, 2001), los cuales se ha demostrado que son receptores para el reconocimiento entre gametos (Okumura *et al.*, 2004).

Los patrones determinados se describen como:

Patrón A: Espermatozoides que mostraban una coloración verde intensa a lo largo de toda su superficie, clasificado como espermatozoide intacto o no capacitado. Ver figura 12.

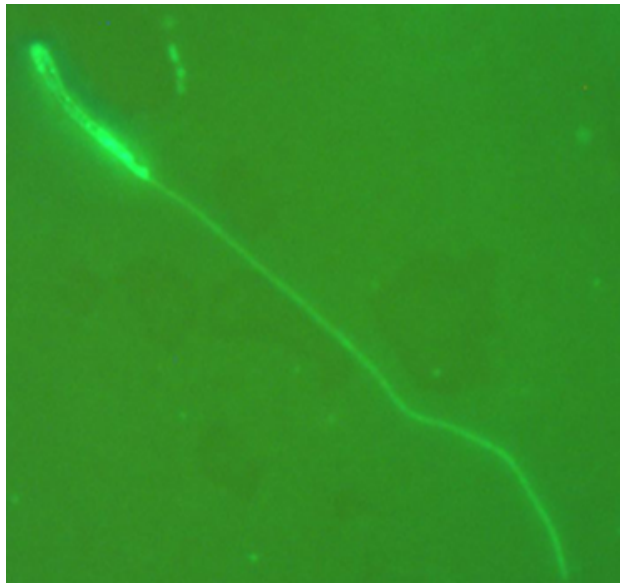
Figura 12.- Espermatozoide intacto, determinado con WGA-FICT. La distribución uniforme de N-acetil-glucosamina y ácido siálico, que evidencia la presencia de estas moléculas de reconocimiento gamético en toda la estructura espermática y que, sugiere un estado no capacitado del espermatozoide.



Patrón B: Este patrón muestra espermatozoides con fluorescencia en el área de la pieza media hasta el acrosoma; clasificado como espermatozoide capacitado.

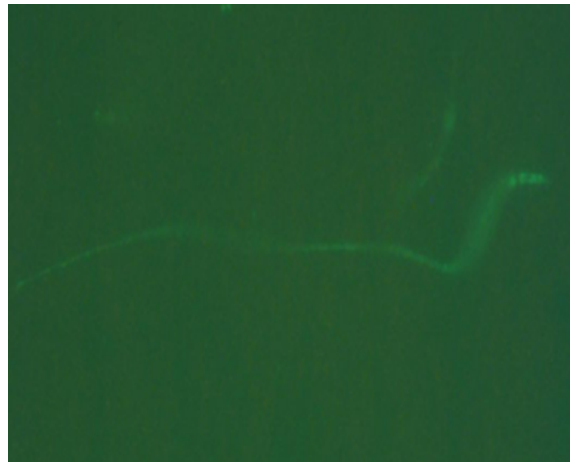
Ver figura 13.

Figura 13.- Espermatozoide capacitado, determinado con WGA-FICT. La distribución de receptores de reconocimiento, es evidente en mayor proporción en el área de la pieza media y acrosoma, lo que sugiere una preparación la presencia de las moléculas de reconocimiento gamético N-acetil-glucosamina y ácido siálico, principalmente en la cabeza del espermatozoide, encontrando la integridad del acrosoma (Previo a la reacción acrosómica).



Patrón C: Espermatozoides que se tenían tenuemente de verde a lo largo de toda su superficie; clasificado como espermatozoide con reacción acrosomal. Ver figura 14.

Figura 14.- Espermatozoide con reacción acrosomal, determinado con WGA-FICT. Evidencia una tenue fluorescencia en la superficie espermática sugiere disminución de residuos de receptores de reconocimiento en espermatozoides que han llevado a cabo la reacción acrosomal.



11.4- Estado fisiológico (Intacto, capacitado y reaccionado) de los espermatozoides evaluados con CTC y WGA-FICT

Al evaluar las características de fluorescencia con las técnicas y metodología empleada, se determinó que cada ensayo de evaluación (Distribución y actividad de Ca^{2+} con CTC y distribución de N-acetil-glucosamina y ácido siálico con WGA-FICT) analiza un aspecto metabólico diferente, cuando la evaluación se realizó en condición de capacitación se encontró una mayor proporción de los patrones 1 y A, los cual se invirtió cuando los espermatozoides se evaluaron en condiciones de reacción acrosomal, en donde se encontró una mayor proporción de espermatozoides con los patrones de fluorescencia 3 y C, los cuales se consideraron como espermatozoides con reacción acrosomal, ya que esta proporción evidentemente se incrementó cuando los espermatozoides se co-incubaron con MPV.

Cuando los espermatozoides fueron incubados en condiciones de capacitación, se encontró que los patrones 2 y B se presentaron en mayor proporción.

Al relacionar la actividad espermática se determinó que los patrones 1 y A corresponden a espermatozoides no capacitados o intactos.

Los patrones 2 y B a espermatozoides considerados como capacitados y los patrones 3 y C corresponden a espermatozoides con reacción acrosomal.

Los patrones de fluorescencia con el uso de CTC ó WGA-FICT no variaron entre los distintos tratamientos evaluados en fresco y criopreservados con el uso de DMSO ó glicerol, solo varió la proporción de estos patrones.

11.5- Parámetros en espermatozoides evaluados con CTC

En espermatozoides en fresco recién eyaculados y criopreservados

En ambas evaluaciones al comparar los resultados en distintas condiciones (Tabla 4), la proporción de patrones fue inversamente proporcional, entre los eyaculados incubados en condiciones de capacitación y los incubados en condiciones de reacción acrosomal.

Los porcentajes de espermatozoides en fresco con los patrones de fluorescencia 1,2,3, fueron diferentes ($P < 0.05$) en comparación con los espermatozoides criopreservados con ambos crioprotectores; los porcentajes de espermatozoides criopreservados con DMSO y glicerol fueron similares ($P > 0.05$) al compararlos entre sí.

En condición de capacitación espermática (Incubación sin MPV)

De manera específica, en semen fresco, el porcentaje de espermatozoides con patrón 1 (Intactos) fue de 61.5 %, mayor ($P < 0.05$) al porcentaje de espermatozoides criopreservados cuando se usó DMSO (44.1 %) y con glicerol (50.2 %), no existiendo diferencia ($P > 0.05$) entre estos últimos.

El porcentaje de espermatozoides con el patrón de tinción 2 (Capacitados) de los eyaculados recién obtenidos, fue de 22.1 %, menor ($P < 0.05$) que los porcentajes criopreservados con DMSO (32.7 %) y glicerol (28.4 %), que fueron similares ($P > 0.05$) entre ellos.

El porcentaje de espermatozoides con patrón 3 (con RA) en el eyaculado en fresco, fue de 16.8 %, menor ($P < 0.05$) que los porcentajes criopreservados con DMSO (23 %) y glicerol (21.4 %), que también fueron iguales ($P > 0.05$) entre ellos.

En condición de reacción acrosomal (co-incubados con MPV)

El porcentaje de espermatozoides con patrón 1 (Intactos) en semen fresco, fue de 22.6 %, mayor ($P < 0.05$), que el porcentaje en espermatozoides criopreservados con el uso de DMSO (10.6%) o glicerol (8.4 %), sin existir diferencia entre los porcentajes post descongelación ($P > 0.05$). El porcentaje de espermatozoides con patrón 2 (Capacitados) en semen fresco fue de 25.3 % en espermatozoides criopreservados con DMSO de 25.9 % y con glicerol de 25.3 %, los cuales fueron similares ($P > 0.05$). También espermatozoides recién eyaculados, el porcentaje de espermatozoides con patrón 3 (con RA) fue de 51.4%, similar ($P > 0.05$) a los porcentajes criopreservados con DMSO (63.4%) o glicerol (66.5%).

Comparación de parámetros de espermatozoides en condiciones de capacitación vs condiciones de reacción acrosomal en semen fresco y descongelado.

Los porcentajes de espermatozoides con patrón 1 (Intactos) recién eyaculados y criopreservados en condiciones de capacitación (sin MPV) fueron mayores ($P < 0.05$) a los determinados cuando lo espermatozoides fueron incubados en condiciones de reacción acrosomal (co-incubados con MPV).

Los porcentajes de espermatozoides con patrón 2, en fresco y congelados con glicerol como crioprotector, los valores fueron similares ($P > 0.05$) entre las muestras incubadas en condición de capacitación y las incubadas en condición de reacción acrosomal. Cuando se utilizó DMSO el porcentaje determinado con patrón 2 fue mayor ($P < 0.05$) en espermatozoides incubados en condiciones de capacitación, comparado con los espermatozoides incubados en condición de reacción acrosomal. De manera evidente, en todas las muestras el porcentaje de

espermatozoides con patrón 3 fue superior ($P<0.05$) cuando éstos fueron incubados en condiciones de reacción acrosomal, en espermatozoides en fresco y descongelados.

Tabla 4.- Parámetros de espermatozoides con patrones de tinción determinados con el uso de CTC en condiciones de capacitación y reacción acrosomal.

Condición	Recién eyaculados		Criopreservados		Criopreservados	
			DMSO		Glicerol	
	Sin MPV	Co-MPV	Sin MPV	Co-MPV	Sin MPV	Co-MPV
espermática	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)
Intactos	61.5±1.6 ^{a+}	22.6±1.4 ¹⁻	44.1±3. ^{b+}	10.6±1.6 ²⁻	50.2±4.8 ^{b+}	8.4±1.4 ²⁻
Capacitados	22.1±1.1 ^{a+}	25.3±1.6 ¹⁺	32.7±1.7 ^{b+}	25.9±2.1 ¹⁻	28.4±2.9 ^{b+}	25.3±4.3 ¹⁺
Con RA	16.8±1.3 ^{a+}	51.4±1.3 ¹⁻	23.0±2.4 ^{b+}	63.4±3.1 ¹⁻	21.4±3.1 ^{b+}	66.5±4.3 ¹⁻

En la comparación de parámetros de semen fresco vs descongelado en la misma condición (Sin MPV o Co-MPV) , diferente superíndice, indica diferencia estadística ($P<0.05$). Al comparar en semen fresco o criopreservado, los parámetros de las diferentes condiciones de evaluación (Sin MPV o Co-MPV) , diferente superíndice, indica diferencia estadística ($P<0.05$).

11.6- Parámetros en espermatozoides evaluados con WGA-FICT

En espermatozoides en fresco y criopreservados

Los porcentajes de espermatozoides en fresco con los patrones de fluorescencia A (Intacto) y B (Capacitado), fueron iguales ($P>0.05$) al compararlos con los espermatozoides descongelados con DMSO y glicerol.

Mientras en los espermatozoides mostraban un patrón C (con RA), los espermatozoides recién eyaculados incubados condiciones de capacitación fueron mayores a los espermatozoides post criopreservados, siendo iguales ($P>0.05$) las muestras descongeladas con ambos crioprotectores. Los espermatozoides recién eyaculados incubados en condiciones de reacción acrosomal fueron similares ($P>0.05$) a los descongelados (Tabla 5).

En condición de capacitación espermática (Incubados sin MPV)

De manera específica, en los espermatozoides que mostraban el patrón A incubados en condición de capacitación, los recién eyaculados (41.6%) fueron similares ($P>0.05$) a los criopreservados con DMSO (50.8%) y glicerol (52.6%); El porcentaje de espermatozoides que mostraban el patrón B, los recién eyaculados (16.4%) fueron iguales ($P>0.05$) a los criopreservados con DMSO (16.7%) y glicerol (17.6%).

En espermatozoides que mostraban el patrón C de distribución de carbohidratos membranales, el porcentaje de espermatozoides recién eyaculados (42%) fue mayor ($P<0.05$) a los criopreservados con DMSO (39%) y glicerol (36.6%), siendo similares ($P>0.05$) entre los criopreservados.

En condición de reacción acrosomal (co-incubados con MPV)

Los porcentajes espermatozoides incubados en condiciones de reacción acrosomal con el patrón A (Intactos), los recién eyaculados (21.1%) fueron mayores ($P < 0.05$) a los criopreservados con DMSO (10.4%) y glicerol (11.2%), sin existir diferencia ($P > 0.05$) entre estos dos últimos.

En los espermatozoides que mostraban el patrón B (Capacitados), los recién eyaculados (39.8%) fueron menores ($P < 0.05$) a los criopreservados con DMSO (50.4%) y glicerol (52.2%), siendo iguales ($P > 0.05$) entre criopreservados. En los espermatozoides que mostraban el patrón C (Reaccionados) de distribución de carbohidratos membranales, no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre recién eyaculados (39%) y los criopreservados con DMSO (39%) y glicerol (36.6%).

Comparación de patrones de espermatozoides en condición de capacitación vs condición de reacción acrosomal en semen fresco y criopreservado

En la condición de capacitación (sin MPV), los espermatozoides recién eyaculados y criopreservados que mostraban el patrón A (Intactos) fueron mayores ($P < 0.05$) a los que se determinaron en condición de reacción acrosomal (co-incubados con MPV). Los espermatozoides que mostraban el patrón B (Capacitados) se presentaron en un porcentaje menor ($P < 0.05$) en condición de capacitación (sin MPV) que los que fueron evaluados en condición de reacción acrosomal (co-incubados con MPV) en fresco y criopreservados.

El porcentaje de espermatozoides con patrón C (con RA) en espermatozoides recién eyaculados en condición de capacitación fue igual ($P > 0.05$) al determinado en espermatozoides evaluados en condición de reacción acrosomal (co-incubados con MPV); asimismo los porcentajes de espermatozoides criopreservados con

DMSO, los evaluados en condición de capacitación (sin MPV) fueron menores ($P < 0.05$) a los evaluados en condición de reacción acrosomal (con MPV), de este mismo patrón, los espermatozoides criopreservados con glicerol, los porcentajes en condición de capacitación fueron menores ($P > 0.05$) a los determinados en condición de reacción acrosomal (co-incubados con MPV).

Tabla 5.- Parámetros de espermatozoides con patrones de tinción determinados con el uso de lectina WGA en condiciones de capacitación y reacción acrosomal.

Condición espermática	Recién eyaculados		Criopreservados DMSO		Criopreservados Glicerol	
	Sin MPV	Co-MPV	Sin MPV	Co-MPV	Sin MPV	Co-MPV
	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)	(X ± EE)
Patrón A	41.6±2.5 ^{a+}	21.1±2.4 ¹⁻	50.8±1.5 ^{a+}	10.4±1.2 ²⁻	52.6±2.5 ^{a+}	11.2±1.1 ²⁻
Patrón B	16.4±1.7 ^{a+}	39.8±3.1 ¹⁻	16.7±1.5 ^{a+}	50.4±2.3 ²⁻	17.6±2.7 ^{a+}	52.2±3.4 ²⁻
Patrón C	42±3.6 ^{a+}	39±2.7 ¹⁺	32.3±2.7 ^{b+}	39.0±2.0 ¹⁻	29.8±1.1 ^{b+}	36.6±3.3 ¹⁻

En la comparación de parámetros de semen fresco vs descongelado en la misma condición (Sin MPV ó Co-MPV) , diferente superíndice, indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

Al comparar en semen fresco o criopreservado, los parámetros de las diferentes condiciones de evaluación (Sin MPV o Co-MPV) , diferente superíndice, indica diferencia estadística ($P < 0.05$)

12.-DISCUSIÓN

Criopreservación seminal en aves silvestres y sus aplicaciones

La biodiversidad y la conservación de la diversidad genética son de amplio interés en el mundo y la mayor parte de la atención se centra en las especies en peligro de extinción. Con la intensa cría y mejora de los animales, la diversidad genética ha disminuido rápidamente; esta crianza intensiva promueve la pérdida de genes valiosos en las especies originales (Váradi *et al.*, 2013). Por esta razón existe una necesidad urgente de crear bancos de germoplasma que resguarden información biológica en riesgo. En este estudio, al estandarizar los protocolos de congelación y evaluarlos, se sientan las bases para la creación de bancos de semen de halcón Harris.

Durante cuatro décadas se han investigado las técnicas de criopreservación seminal en aves y en mamíferos, modificando las condiciones técnicas en los ensayos de congelación y se ha demostrado que el estrés osmótico es una de las principales causas de la ruptura de la membrana espermática (Blanco *et al.*, 2000), dado que expone a los espermatozoides a condiciones físicas diferentes al medio *in vivo*. Por lo tanto, existen en la actualidad técnicas detalladas precisamente para mamíferos y aves domésticas; sin embargo se han desarrollado pocas técnicas específicas para fauna silvestre, a pesar de que se ha demostrado que existen diferencias en la supervivencia espermática de manera especie-específica. Esta situación se corroboró en la presente investigación, tomando en cuenta que los resultados de la supervivencia e integridad espermática post criopreservación varían de acuerdo con lo citado con otros

autores en especies diferentes, aportando valores cuantificables para cada crioprotector (Glicerol y DMSO) y una técnica de congelación/descongelación exitosa de espermatozoides de halcón Harris.

A nivel internacional se comienzan a aplicar las nuevas estrategias para la conservación de especies; por ejemplo en Hungría, para la conservación de aves autóctonas se ha empleado el método de conservación de semen, el cual ha sido el procedimiento más práctico para el almacenamiento a largo plazo de material genético (Váradi, 2013). En México hemos iniciado en las últimas décadas el estudio de la criopreservación seminal de fauna silvestre y se ha aplicado estas técnicas de reproducción asistida como herramienta para apoyar la conservación en especies de aves y mamíferos silvestres en peligro de extinción.

Viabilidad, Morfología y Movilidad post criopreservación

En este estudio se encontró que en eyaculados de halcón Harris los porcentajes de espermatozoides viables y normales evaluados en fresco fueron de 95.3% y post-criopreservación de 58.1% con DMSO y de 73.6% con glicerol. En comparación, estudios similares donde analizaron los porcentajes de espermatozoides viables y normales en eyaculados frescos fueron más altos en pollo (87%), más bajo en gallinas de guinea (64%) e intermedio en los pavos (69%) asimismo se observó la viabilidad fue más alta en halcón Harris, que pudo deberse a que las muestras fueron tomadas en temporada reproductiva, mientras las aves domesticas, como el gallo y el pavo son seleccionadas genéticamente para tener una producción espermática continua lo cual puede influir en la calidad de los eyaculados; y se observó que la criopreservación disminuyó

significativamente la viabilidad y la integridad morfológica en estas especies (Blesbois *et al.*, 2005).

En el presente estudio se criopreservaron eyaculados de halcón Harris y se obtuvieron porcentajes de 58.1% de viabilidad espermática usando DMSO y 73.5% con glicerol y anormalidades menores al 1% en ambos casos. Lo que fue diferente al evaluar semen de gallina de guinea, especie en la que la mejor relación de espermatozoides vivos 41% se obtuvo con el protocolo de congelación lenta, sin embargo se presentaban porcentajes de más del 50% de espermatozoides con anormalidades (Váradi *et al.*, 2013); estas diferencias evidentemente positivas en la criopreservación exitosa de halcón Harris pueden ser atribuidas al uso del diluyente, en este caso solución Lake, la cual se ha comprobado ser eficiente en procesos de criopreservación; además de los tiempos empleados en el proceso de congelación/descongelación, y la fisiología reproductiva propia de cada especie.

En eyaculados de halcón Harris, la disminución de la supervivencia espermática en comparación con los parámetros en fresco fue de un 40% menor con DMSO y 23% menor con glicerol. Mientras que en un estudio hecho por Váradi *et al.*, (2013) en espermatozoides de gallina de Guinea, el crioprotector menos efectivo fue el dimetilformamida (DMF); mientras que el protocolo de congelación lento, con glicerol etileno como crioprotector mostró buenas tasas de supervivencia espermática. Al ser éstos, los principales estudios de criopreservación seminal en aves, nos muestran las mejores opciones como crioprotectores para dichos procedimientos; aunque cabe destacar que se debe considerar el objetivo de la criopreservación, ya que cada sustancia le añade efectos característicos a los

eyaculados. Por ejemplo: El glicerol muestra tener las mejores tasas de viabilidad, pero al ser empleado en eyaculados para inseminación, tiene efectos anticonceptivos en el tracto femenino. El DMSO es una sustancia inerte y miscible, pero tiene tasas menores de supervivencia espermática. La dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA) han otorgado tasas aceptables de supervivencia espermática, pero se ha descubierto que poseen una mayor toxicidad.

En el presente estudio se obtuvo una movilidad progresiva de 16.8% en espermatozoides de halcón Harris criopreservados con DMSO y una movilidad de 20% en los criopreservados con glicerol, fenómeno que se había observado en experimentos previos, donde al emplear la solución Lake como diluyente, se obtenían porcentajes bajos de movilidad pero altos en viabilidad, efecto que era inverso cuando se empleaba BPSE como diluyente en eyaculados de la misma especie. En comparación con lo descrito por Herrera *et al.*, (2005) haciendo uso del DMSO como crioprotector en espermatozoides de gallo se obtuvo una movilidad de 36%, en faisán 42% en halcón cola roja 34% al ser criopreservados con BPSE como diluyente.

Al comparar los rangos de tolerancia a la criopreservación con diferentes crioprotectores en diferentes especies de aves se ha observado que los espermatozoides son metabólicamente diferentes (Baskt y Sexton, 1979), esta sensibilidad específica muestra la importancia de crear tratamientos criogénicos específicos por especie.

Parámetros de capacitación y reacción acrosomal determinados con CTC

La capacidad de sobrevivir a la criopreservación en espermatozoides, varía entre diferentes especies de aves. Uno de los factores biológicos potencialmente

responsables de tales diferencias es la variación de la fluidez de la membrana, la cual tiene un papel importante en la restauración fisiológica después de la criopreservación; el estado de la membrana después de la criopreservación puede ser evaluado mediante la medición de la polarización de la fluorescencia con un colorante fluorescente (Blesbois *et al.*, 2005).

En mamíferos, se sabe que en el proceso de la capacitación espermática hay modificaciones lipoprotéicas membranales que permiten la exteriorización de receptores y activan canales iónicos que intervienen en la activación de mecanismos de transducción como lo son flujo de calcio, síntesis de AMPc y fosforilación-desfosforilación de proteínas (Arenas *et al.*, 2010); éstos mecanismos nos pueden dar una idea del estado metabólico en el que se encuentran los espermatozoides; dado que algunos autores proponen que la capacitación espermática en las aves no es un proceso fundamental para la fertilización y que ocurre en un tiempo corto (Lemoine *et al.*, 2011), asimismo que existen factores descapacitantes en el tracto femenino (Sasanami *et al.*, 2013); debido a esto se considera importante la determinación de los parámetros de capacitación y reacción acrosomal en halcón Harris, que son los datos que aporta el presente estudio.

Al evaluar eyaculados recién obtenidos con clortetraciclina (CTC) que mide la actividad de calcio iónico en el espermatozoide mediante fluorescencia; los porcentajes de espermatozoides intactos en condiciones de capacitación, fueron mayores a los porcentajes con este mismo patrón en condiciones de reacción acrosomal, esta diferencia se debe al efecto de la incubación con MPV, que al inducir la reacción acrosomal, hace que los niveles espermatozoides intactos

disminuyan y los niveles de espermatozoides reaccionados aumenten . Los porcentajes de espermatozoides capacitados en eyaculados frescos fueron similares a los incubados en condición de reacción acrosomal; mientras los espermatozoides reaccionados fueron claramente menores a los porcentajes de espermatozoides reaccionados incubados en esta misma condición, lo que demuestra el efecto inductor de reacción acrosomal otorgado por la MPV, ya que contiene la proteína ZP1 que posee la capacidad de inducir la reacción acrosomal en espermatozoides de aves, y fue probada en codornices japonesas (Sasanami *et al*, 2007).

Los resultados anteriores concuerdan con las proporciones que se muestran en el estudio hecho por Ochoa *et al* (2014) en semen recién eyaculado de guajolote nativo analizado bajo el mismo método, donde se puede observar que se conserva la misma tendencia, en el cual se muestra un porcentaje de espermatozoides no capacitados (intactos) de 72.4%, espermatozoides capacitados 9.3% y espermatozoides reaccionados 2.7%

En todas las especies de aves estudiadas, los lípidos membranales también están implicados en el éxito del almacenamiento espermático *in vitro*, estos lípidos tienen impacto en la función y estructura espermática tanto *in vivo* como *in vitro*. Las alteraciones en lípidos membranales como colesterol y fosfolípidos modifican la fluidez de la membrana, lo cual se relaciona con la capacidad de reconocimiento gamético y la fusión de membranas; además en las aves, éstos lípidos tienen un papel importante *in vivo* en el almacenamiento espermático en las glándulas útero-vaginales del tracto reproductor de las hembras; estos lípidos pueden actuar como

factores discapacitantes, para conservar por más tiempo los espermatozoides (Douard *et al.*, 2000).

Los procesos de criopreservación (ó condiciones de estudio) inducen cambios membranales de los que depende la capacidad fertilizante que pueden ser evaluados *in vitro*, en relación a la capacitación y reacción acrosomal, y de ahí determinar la efectividad de los protocolos de criopreservación empleados.

Parámetros de capacitación y reacción acrosomal determinados con WGA-FICT

La membrana plasmática espermática es dinámica, se han identificado en ésta moléculas como AMPc, glucosaminoglucanos, esteroides y glicoproteínas (Arenas *et al.*, 2010), cuya actividad se modifica durante la capacitación; el estudio de la distribución de algunas de estas glicoproteínas membranales que funcionan como receptores constituye una técnica de evaluación de la capacidad fertilizante de los eyaculados.

En espermatozoides de aves, la glicoproteína N-acetil-glucosamina y el ácido siálico son los principales receptores de reconocimiento gamético, y una manera de evaluar la distribución de estas moléculas en relación a su capacidad fertilizante es mediante el uso de lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), las cuales muestran la distribución específica de los receptores.

En el presente estudio al evaluar la distribución membranal de N-acetil-glucosamina con la lectina WGA-FICT, se determinaron tres patrones de fluorescencia similares que en el tratamiento con CTC; cabe mencionar que en

ambos tratamientos, los patrones espermáticos evalúan eventos metabólicamente diferentes.

Al evaluar en espermatozoides recién eyaculados, se mostró que los porcentajes de espermatozoides intactos en condiciones de capacitación (41.6%) fueron mayores a los espermatozoides intactos en condiciones de reacción acrosomal (21.1%), mientras los porcentajes de espermatozoides capacitados en condición de capacitación (16.4%) fueron menores a los capacitados en condiciones de reacción acrosomal (39.8%), lo que demuestra el efecto de la incubación con MPV en cuanto a la distribución de glicoproteínas membranales en relación a la capacitación y a la redistribución de estos receptores debido a la fluidez membranal. En esta misma variable, los espermatozoides reaccionados en condición de capacitación (42%) fueron diferentes a los espermatozoides reaccionados en condición de reacción acrosomal (39%), lo que posiblemente se deba a que el diseño del protocolo estaba basado en colecciones de eyaculados eventuales, que se hicieron de ejemplares que no contaban con una actividad copulatoria frecuente, por lo tanto, los espermatozoides maduros producidos, al estar en el conducto deferente, no cuentan con las condiciones necesarias para su almacenamiento, lo cual produce que se capaciten, reaccionen y posteriormente se degraden. Este mismo efecto de capacitación y reacción acrosomal se relaciona con lo reportado por Blesbois *et al* (2005), donde mencionan que los procesos de congelación de semen aviar, disminuyen la fluidez de la membrana; lo que puede comprometer la capacidad fertilizante.

Evaluación de crioprotectores en criopreservación de halcón Harris

El dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol, se comportaron de manera similar como crioprotectores al evaluar la actividad de Ca^{++} intracitoplasmático con clortetraciclina (CTC), ya que mantuvieron porcentajes similares de espermatozoides con la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal en condiciones de capacitación, 23% y 21.4% respectivamente, a diferencia de los espermatozoides recién eyaculados 16.8%.

En condiciones de reacción acrosomal, ambos crioprotectores demostraron capacidad para permitir llevar a cabo la reacción acrosomal de manera similar, DMSO (63.4%) y glicerol (66.5%), al igual que en espermatozoides recién eyaculados (51.4%); esta similitud puede ser ocasionada debido a que los procesos de criopreservación inducen la capacitación y reacción acrosomal. Los resultados coinciden por lo citado por Calderón (2015) en criopreservación de semen de halcón Harris con DMSO como crioprotector, dado a la controversia de la capacitación espermática en aves, los resultados concuerdan con los estudios realizados por Terreros *et al* (2015), donde al evaluar tres crioprotectores en la congelación de semen de alpaca, el glicerol y el DMSO, mostraron ser los más eficaces.

Al evaluar la distribución de la glicoproteína N-acetil-glucosamina y residuos de ácido siálico en la membrana de los espermatozoides mediante el uso de la lectina WGA-FICT que es afín a estas moléculas, en condiciones de capacitación, el DMSO y el glicerol se comportaron de manera similar, en el porcentaje de espermatozoides reaccionados, 32.3% y 29.8% respectivamente; a diferencia de los espermatozoides recién eyaculados con un 42% de espermatozoides

reaccionados. Una de las causas a las que se atribuye este fenómeno es que el manejo y el procesamiento de los eyaculados en fresco es un factor que en el caso de las aves induce la capacitación y reacción acrosomal espermática (Calderón 2015).

En condiciones de reacción acrosomal, los crioprotectores se comportaron de manera similar entre ellos con porcentajes de espermatozoides con capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal de: DMSO (39%) y glicerol (36.6%), resultados que coinciden con la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal en espermatozoides recién eyaculados (39%). Lo que se puede observar entonces es que ambos crioprotectores empleados en el estudio conservan en los espermatozoides una capacidad para capacitarse y llevar a cabo la fusión membranal, así como una distribución de receptores de reconocimiento gamético similar a las que se presentan en eyaculados recién obtenidos de halcón Harris. Por esta razón, es recomendable valorar otras cualidades específicas de cada crioprotector y aplicarlos en los protocolos de criopreservación, dependiendo del objetivo de éstos. En ese sentido, el glicerol otorga mayores índices de viabilidad post criopreservación, pero se sabe que tiene efectos anticonceptivos en el tracto reproductor de la hembra al momento de una inseminación (Macías *et al.*, 2012), ya que crea un ambiente de fluidez que complica el traslado de los espermatozoides hasta el infundíbulo. Para evitar este efecto, se hace un lavado para desechar los residuos de crioprotector, pero en el procedimiento una cantidad alta de espermatozoides mueren o sufren anomalías que comprometen su capacidad fertilizante.

El DMSO al ser una sustancia miscible y con un bajo nivel de toxicidad (Ramírez y Luza, 1967), permite que los eyaculados que han sido conservados con este crioprotector, puedan ser inseminados inmediatamente después de descongelarse, sin comprometer la capacidad fertilizante por efectos del crioprotector. El DMSO es uno de los crioprotectores más utilizados para la criopreservación del semen de aves silvestres como grullas (*Chlamydotis undulata*) (Hartley *et al.*, 1999), pingüinos (*Spheniscus magellanicus*) (O'Brien *et al.*, 1999), Gansos (*Anas spp*) (Tai *et al.*, 2001) y rapaces (*Falco peregrinus*, *Aquila adalberti* y *Hiernaetus fasciatus*) (Blanco *et al.*, 2000).

Los parámetros de capacitación y reacción acrosomal fueron similares con el uso de ambos crioprotectores en las diferentes condiciones de evaluación (CTC y WGA), lo que nos otorgó una idea de la actividad de Ca^{2+} intracitoplasmático y de la distribución de glicoproteínas que fungen como receptores de reconocimiento gamético en los tres patrones espermáticos determinados (intacto, capacitado y reaccionado), para así lograr evaluar la capacidad fertilizante de los eyaculados con cada crioprotector y optimizar los protocolos de criopreservación seminal y reproducción asistida de manera específica.

13.- CONCLUSIONES

- Existen parámetros asociados a condiciones de capacitación espermática y reacción acrosomal en espermatozoides de halcón Harris, los cuales son asociados a la actividad metabólica del espermatozoide en condiciones de capacitación y reacción acrosomal.
- Los patrones de capacitación espermática y reacción acrosomal de halcón Harris no varían con el uso de glicerol y dimetilsulfóxido como crioprotectores, solo varía su proporción.
- La evaluación seminal básica, actividad de Ca^{+2} determinada con CTC y distribución de N-acetil-glucosamina determinada con WGA-FICT *in vitro* permitió evaluar el estado metabólico de los espermatozoides, contribuyendo a valorar la capacidad fertilizante, cuantificando la viabilidad, movilidad y morfología espermática, la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal y la capacidad de reconocimiento gamético con la presencia y distribución de N-acetil-glucosamina de cada eyaculado con diferentes crioprotectores.
- La membrana perivitelina heteróloga (de gallina) funciona como inductor de la reacción acrosomal en espermatozoides de halcón Harris.
- Se comprobó que los procesos de evaluación seminal y criopreservación inducen de manera espontánea ciertos índices de capacitación y reacción acrosomal.
- El glicerol y el dimetilsulfóxido son una alternativa viable para llevar a cabo la criopreservación espermática de halcón Harris, aunque se debe considerar los efectos específicos de cada crioprotector para elegir el que más se adecúe a los objetivos de la conservación espermática.

14.- REFERENCIAS

- Ahammad, M.U., Nishino, C., Tatemoto, H., Okura, N., Kawamoto, y., Okamoto, S. y Nakada, T. 2011. Maturational changes in motility, acrosomal proteolytic activity, and penetrability of the inner perivitelline layer of fowl sperm, during their passage through the male genital tract. *Theriogenology* (76) 1100–1109. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.017
- Ahammad, M.U., Nishino, C., Tatemoto, H., Okura, N., Okamoto, S., Kawamoto, Y. y Nakada, T. Acrosome reaction of fowl sperm: Evidence of shedding of the acrosomal cap in intact from to release acrosomal enzyme. 2013. *Poultry Science*. (92) 798-803. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02523>
- Alvarez-Díaz, A., Esteban-Perez, H., De la Cruz Martín-Hernandez, T., Quincosa-Torres, J y Sanchez-Puzo, A. 2009. *Fisiología Animal Aplicada 2*. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 380 pp.
- Arenas, R.E, Cambrón, R.A. y Ambriz, G.E. 2010. “Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide”, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. *ContactoS* (78) 5–11
- Avibirds. 2012. Alemere, Netherlands. [http://www.avibirds.com/html/raptors/Harris_Hawk.html#.VgTV24vnmgQ]. Consultado 25- Septiembre- 2015
- Bakst, M.R., Wishart, G. y Brullard, J.P. 1994. Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poultry Science*. 5: 117–143.
- Barbas, J. y Mascarenhas, R. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*. 10(1): 49-62.

- Baskt, M.R y Sexton, T.J. 1979. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey espermatoza before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*. (55)1-7.
- Bootwalla, S. M y Miles, R.D. 1992. Development of diluents for domestic fowl semen. *World's Poultry Science Journal*. (48) 121-128.
DOI:10.1079/WPS19920012.
- Blanco, J.M, Gee, G., Wildt, G. y Donoghue, A.M. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of Reproduction*. (63)1164–1171
- Blanco, J.M., Wildt, D.E., Voelker, W. y Donoghue, A.M. 2009. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology* 71: 200–213.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.019>
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal* 63(2) 213-222.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0043933907001419>
- Blesbois, E., Grasseau, I. y Seigneurin, F. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* (129) 371–378. DOI: 10.1530/rep.1.00454
- Blesbois, E., y Grasseau, I. 2002. Seminal plasma affects liquid storage and cryopreservation of turkey sperm. Society of Cryobiology., Edinburgh, UK.
- Burrows W, y Quinn J.1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science Journal*. (16) 19-24. doi: 10.3382/ps.0160019

- Calderón, C.G., 2015. Uso de los medios BPSE y Lake para la conservación seminal de halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*). [Tesis] México. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
- Ceballos, J. y Justribó, J.H. 2011. *Manual Básico y Ético de Cetrería*. Caïrel, Madrid. 73 pp.
- Celeghini E.C., Arruda R.P., Albuquerque R., Silva F.H.A., Faria D.E., Andrade AFC., Nascimento J. y Raphael C.F. 2007. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes of rooster spermatozo. *Brazilian Journal of Poultry Science* (3)143-149.
- CITES - 2015. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. [<http://www.cites.org/eng/app/e-appendices.Pdf>.] Consultado el 21/Febrero/2016
- Comisión Nacional para la Biodiversidad (CONABIO). Naturalista. Aguillilla Rojinegra (*Parabuteo unicinctus*). [<http://conabio.inaturalist.org/taxa/5355-Parabuteo-unicinctus>.] Consultado el 26 de septiembre de 2015.
- Comunicado de prensa Conanp/ Semarnat. México D.F. 03 de Junio de 2014 [http://www.conanp.gob.mx/difusion/comunicado.php?id_subcontenido=694.] Consultado el 16 de septiembre de 2015.
- Del Río, M.J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M.E., Moreno, R.D y Vigil, P. 2007. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances reciente. *Revista Internacional de Andrología*. (5)4 DOI: 10.1016/S1698-031X(07)74086-4

- Douard, V., Hermier, D. y Blesbois, E. 2000. Changes in Turkey Semen Lipids During Liquid In Vitro Storage. *Biology of reproduction* 63, 1450–1456. doi: 10.1095/biolreprod63.5.1450
- Dogliero, A., Rota, A., Lofiego, R., von Degerfeld, M. M. y Quaranta, G. 2015. Semen evaluation in four autochthonous wild raptor species using computer-aided sperm analyzer. *Theriogenology*. 85 (6), 1113–1117. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.023>
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Thomas, C.A., Downing, T.W. y Marshall, C.E., 1993. Interrelationships among fluorometric analyser of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 39, 1009-1024. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90002-M](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(93)90002-M)
- Etches RJ, 1998. “Reproducción aviar”, Departament of Animal and Poultry Science. Editorial Acribia. 348 pp.
- Fox, N. 2003. Comprender al Ave de Presa. Cairel Ediciones. 452 pp.
- Galindo-Ricaurte, L.S. 2006. Importancia de un buen manejo de la reproducción en la avicultura. *Revista Electrónica de Veterinaria*. Vol. VII. No. 04.
- Gilbert, A. 1996. Aves de Corral. En reproducción e inseminación artificial en animales,. Editado por S, H.E. Zaragoza España. Interamericana. 232-187 p.
- Graham, J.K., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. 68, 239-247. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00160-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00160-9)

- Gutierrez, G. 1999. Hormonas y Reproducción en Aves: La influencia de factores ambientales y sociales. *Revista Latinoamericana de Psicología*. Vol. 31. Num 1. 151-154.
- Hartley, S.P., Dawson, B., Lindsay, C., McCormick, P. y Wishart, G.1999. Cryopreservation of houbara semen: A pilot study. *Zoo biology* 18:147- 152.
- Hammerstedt, R. H. y Graham, J.K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* (29) 26-28.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. y Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? *J. Andrology*.11(1) 73-88.
DOI: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
- Herrera, J.A., Ávalos, A., Rodríguez, I., Gonzales, J.A. y Rosales, A.M. 2013. Técnicas de Reproducción Asistida en Aves Domésticas Y Silvestres. Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Unidad Xochimilco. México, D.F. 71 pp.
- Herrera, J.A., García, C., Gonzalez, C.J., López, Y.B., López, O., Ávalos, A., González, J.A. y Rosales, A.M. 2013. Indicadores Hematológicos del Halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*) en Diferentes Etapas Fisiológicas. Congreso de Nacional de Zoología.
- Herrera, J.A., Quintana, J.A., Lopez, M.A., Betancourt, M. y Fierro, R. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of Andrology* 51(5): 353-360. DOI:10.1080/014850190944401

- Holt, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species. Editado por Hunton, P. Amsterdam: Elsevier. Individual differences. *Theriogenology*. 53:47-58.
- Holt, W., Pickard, A y Prather, R. 2004. Wildlife conservation and reproductive cloning. *Reproduction*. 127: 317-324.
- Kemp, A. 1993. ¿Qué es una rapaz.? En Newton I. Aves de Presa. Encuentro Editorial, S.A. Barcelona. Barcelona, España. 90-107 p.
- Kowalczyk, A. y Łukaszewicz, E. 2015. Simple and Effective Methods of Freezing Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) Semen. *PLoS ONE* 10(1): e0116797. doi:10.1371/journal.pone.0116797
- Lake, P. y Ravie, O. 1984. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science Journal* 25: 145-150.
- Leibo, A.S. y Blesbois, E. 2004. Cryobiology and the breeding of domestic animals. En: Life in the frozen state. Benson, E. y Lane, N. Taylor and Francis Group. London, GBR. Cap. 12. Pag 371-392
- Lemoine, M., Dupont, J., Guillory, V., Tesseraud, S., y Blesbois, E. 2009. Potential Involvement of Several Signaling Pathways in Initiation of the Chicken Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction* (81): 657–665. doi:10.1095/biolreprod.108.072660
- Lemoine, M., Mignon, S., Grasseau, I., Magistrini, M. y Blesbois, E. 2011. Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*. 75:122-130

- Lemoine, M., Grasseau, I., Brillard, J.P. y Blesbois, E. 2008. A reappraisal of the factors involved *in vitro* initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction* 136(4): 391. doi: 10.1530/REP-08-0094.
- Long, J.A., Wildt, D.E., Wolfe, B.A., Critser, J.K., DeRossi, R.V. y Howard J. 1996. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biology of Reproduction*. 54: 638-646
- Long, J. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges. *Poultry Science* 85(2): 232-236. doi: 10.1093/ps/85.2.232
- Long, J.A. y Kulkarni, G. 2004. An Effective Method for Improving the Fertility of Glycerol-Exposed Poultry Semen. *Poultry Science* 83:1594–1601. doi: 10.1093/ps/83.9.1594
- Macias, G. B., Ortega, F.C., Aparicio, M.I., Miro, M.A., Morillo, R.A., Gallardo, B.M., Gonzalez, L.F., Balao da Silva, C.M., Rodriguez, M.H., Tapia, J.A y Pena, F.J. 2012. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*, (77)7 1280-1289. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.033>
- Mann, T., 1964. The biochemistry of semen and of the reproductive male tract. 2ed. Methuen, London.
- Melrose, D.R., 1962. Artificial insemination in cattle. En: The semen of animals and artificial insemination. (ed. J.P. Maule). Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks. England. 1-181 p.

- Méndez, P., Curti, M., Herrera, K. y Benedetti, A. 2006. Las Aves Rapaces Guía Didáctica de Educación Ambiental, The Peregrine Fund/Fondo Peregrino-Panamá. 112 pp.
- Montoya, A., Ten, J., Mendiola, J., Guerrero, J. y Bernabeu, R. 2008. Utilidad de las lectinas en el estudio de espermatozoides. *Andrología. Vol. 25- no 4. 257-266.*
- Murray, M y Pizzirani, S. A. 2013. Technique for Evisceration as an Alternative to ENUCLEATION in Birds of Prey: 19 Cases. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 27(2) 120–127. DOI: <http://dx.doi.org/10.1647/2012-007>
- NOM-051-ZOO-1995. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana Para el Trato humanitario en la movilización de animales. SEMARNAT, Gobierno Federal.
- NOM-059-ECOL-2001. Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana para la protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. SEMARNAT, Gobierno Federal.
- NOM-AA-165-SCFI-2014. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana que establece los requisitos para la certificación con respecto al bienestar animal, conservación, investigación, educación y seguridad en los zoológicos. SEMARNAT, Gobierno Federal.
- O'Brien, K.J., Oehler, D. y Malowski, P.S. 1999. Semen collection, characterization, and cryopreservation in a Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Zoo biology* 18:199-214.

- Ochoa, F., Val, D., Juárez, A., Toscano, I., Olivo, I. y Conejo, J. 2014. Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo durante el proceso de criopreservación. *Acta Iberoamericana de Conservación Animal. AICA 4*: 123-125.
- Okumura, H., Kohno, Y., Iwata, Y., Mori, H., Aoki, N., Sato, C., Kitajima, K., Nadano, D, y Matsuda, T. 2004. A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm–egg interaction. *Biochemical Journal* (384):191–199. DOI: 10.1042/BJ20040299
- Ochkur, I.S., Kopeika, F.E., Suraj, F.P. y Grischenko, I.V. 1994. The Influence of Cryopreservation on Parameters of Energetic Metabolism and Motility of Fowl Spermatozoa. *Cryobiology*. 31(3). Pags 239-244. doi: 10.1006/cryo.1994.1029
- Otero-Muiño, R. sin fecha. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. [Tesis]. Chile, Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria.. 157 pp.
- Parks, J.E. y Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38, 209-222. DOI:10.1016/0093-691X(92)90231-F
- Peláez, J. y Long, J. 2007. Characterizing the Glycocalyx of Poultry Spermatozoa: I. Identification and Distribution of Carbohydrate Residues Using Flow Cytometry and Epifluorescence Microscopy. *Journal of Andrology*, Vol. 28, No. 2. DOI: 10.2164/jandrol.106.001073

- Peralta, M.F y Miazzo, R. 2002. Manejo Reproductivo en Aves. Cursos de Introducción a la Producción Animal y Producción Animal I. FAV UNRC.
- Pukazhenthil, B., Pelican, K., Wildt, D.E. y Howard, J. 1999. Sensitivity of domestic cat sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biology of Reproduction*. 61: 135-141. DOI: 10.1095/biolreprod61.1.135
- Pukazhenthil, B., Wildt, D.E. y Howard, J.G. 2001. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*. 57:423-33.
- Purdy, P., Song, Y., Silversides, F. y Blackburn, H. 2009. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science Journal*, 88(10): 2184. doi: 10.3382/ps.2008-00402
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). 2014. [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/436/1/mx/trafico_ilegal_de_especies_.html]
- Ramírez, E. y Luza, S. 1967. Dimethyl sulfoxide in the treatment of mental patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141: 655–667. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb34937.x
- Rojas, M., Castro, R., Venegas, F., Álvarez, R., y Guillomot, M. 2016. Impacto de la biotecnología reproductiva en la conservación de los animales en riesgo de extinción. *TecnoVet*. 12 (3) 9-15. Consultado en: www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/39049/40696

- Salgado, H., S.,D. Villansis y C. Juárez. 1994. Aves de Presa. Instituto Nacional de Ecología, INE. Primera Edición. 23 pp.
- Sasanami, T., Murata, T., Ohsuki, M., Matsushima, K., Hiyama, G., Kansaku, N. y Mori, M. 2007. Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Society for Reproduction and Fertility. ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899 (online). DOI: 10.1530/REP-06-0104.
- Sasanami, T., Matzuzaki, M. Mizushima, S. y Hiyama, G. Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *Journal of Reproduction and Development*. (59) 4
- Sauveur, B. 1992. Reproducción de las Aves. Instituto de Investigaciones Avícolas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 350 pp.
- Sexton, T.J. 1997. New Poultry Semen Extender. Effect of Extension on Fertility of Chicken Semen. *Poultry Science Journal*. 56:1443-1446. doi: 10.3382/ps.0561443
- Shier, W.T. 1988. Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: conditions that prevent cell killing using nucleated freezing. *Cryobiology* 25: 110-120. DOI:10.1016/0011-2240(88)90004-1
- Sibley-Allen, D. 2012. The Sibley Field Guide to Birds of Western North America. National Audubon Society. ISBN 0-679-45121-8. New York. USA. 252 pp.
- Tai, J.J., Chen, J.C., Wu, K.C., Wang, S.D. y Tai, C. 2001. Cryopreservation of gander semen. *Br poult sci* 42: 384-388.
- Tavizón G., P. 1999. Proyecto de Protección, Conservación y Recuperación del Águila Real en México (rescate de un símbolo viviente). INE, Instituto

Nacional de Ecología. México. Disponible en:

[http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=135&id_tema=3&dir=Consultas.] Consultado (06/07/2015).

Terreros, M., Huanca, W., Arriaga, I. y Ampuero, A. 2015. Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*. 26(3): 420-426. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11182>

Tsien RY.1989. In: Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part B. Quantitative fluorescence microscopy – Imaging and spectroscopy. Taylor DL, Wang YL. New York: Academic Press. 30: 127-156.

Tucker, L.D. 2014. The effect of sialic acid on the success of poultry spermatozoa cryopreservation. [Tesis]. USA, University of Maryland.

Umapathy, G., Sontakke, S., Reddy, A., Ahmed, S. y Shivaji, S. 2005. Semen characteristics of the captive Indian white-backed vulture (*Gyps bengalensis*). *Biology Reproduction* 1039–1045. DOI 10.1095/*Biology reproduction*,105.0434

Váradí, E., Végi, B., Liptói, K. y Barna, J. 2013. Methods for Cryopreservation of Guinea Fowl Sperm. *PLoS ONE* 8(4): e62759. doi:10.1371/journal.pone.0062759.

Villaverde-Morcillo, S., García-sánchez, R., Castaño, C., Rodríguez, E., González, F., Esteso, M y Santiago-Moreno, J. 2015. Caracterización of natural ejaculates and sperm cryopreservation in a Golden Eagle (*Aquila chrysaetus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 46 (2) pgs 335-338. doi: 10.1638/2013-0293R1.1

Waclawek, M., Foisner, R., Nimpf, J. y Schneider, WJ. 1998. The chicken
homologue of zona pelucida protein-3 is synthesized by granulosa cells.

Biology of Reproduction. 59(5):1230-9. doi: 10.1095/biolreprod59.5.1230

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. *Poultry*

Science. 67:819-825. doi: 10.3382/ps.0670819

15.- AVANCES PRESENTADOS EN EVENTOS ESPECIALES

CONGRESO NACIONAL DE ZOOLOGÍA 2015.

CAMBIOS MEMBRANALES INDUCIDOS CON MEMBRANA PERIVITELINA HETEROLOGA EN ESPERMTOZOIDES DE HALCÓN HARRIS (*Parabuteo unicinctus*).

Cruz Valencia C¹, JG Rivera Martínez², SE Mora Vergara³, A Soriano Antonio A³, JA Herrera Barragán⁴, G Calderón Calderón⁴, AK Vargas Ibarra⁴, GE Quintero Diaz⁵, ZA Soto Guerrero⁵.

INSTRUCTOR CURSO: “INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN AVES PARA LA CONSERVACIÓN”.

Sociedad Mexicana de Zoología, A.C.

2do ENCUENTRO DE UMAS, Región Centro Occidente.

USO DE DOS CRIOPROTECTORES PARA LA CONGELACIÓN SEMINAL DEHALCON HARRIS (*Parabuteo unicinctus*).

Cauhtémoc Cruz V, Juan G Rivera M, Sara E Mora V, Aidee Soriano A., Gustavo Calderón C, José A Herrera B.

SOUTHWESTERN ASSOCIATION OF NATURALISTS (SWAN), INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. CONGRESO ANUAL.

LA CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL DE AVES RAPACES COMO HERRAMIENTA PARA SU CONSERVACIÓN / SEMINAL CRYOPRESERVATION OF RAPTORS AS TOOL FOR CONSERVATION.

Cauhtémoc Cruz-Valencia, José Antonio Herrera-Barragán y Fernando Gual-Sill.

PREPARACIÓN DE ARTÍCULOS PARA REVISTAS INDEXADAS.

FUNCIONALIDAD MEMBRANAL POST CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE HALCÓN HARRIS (*Parabuteo unicinctus*).

Cauhtémoc Cruz-Valencia, José Antonio Herrera-Barragán, Juan Gabriel Rivera-Martínez y Fernando Gual-Sill.

EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD MEMBRANAL EN ESPERMATOZOIDES DE *Parabuteo unicinctus* CRIOPRESERVADOS CON DIMETILSULFÓXIDO (DMSO).

Cauhtémoc Cruz-Valencia, José Antonio Herrera-Barragán, Juan Gabriel Rivera-Martínez y Fernando Gual-Sill.