

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa.**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

**Capacidad de conservación espermática *in vitro* con
suplementos de lavado de la unión útero vaginal de
*Gallus gallus***

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL
P R E S E N T A**

MVZ. RICARDO CAMARILLO FLORES

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN

Dra. IRMA JIMENEZ MORALES

ASESOR:

Dr. ADRIÁN GUZMAN SANCHEZ

COMITÉ DE SINODALES



Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz Y Celis
(PRESIDENTE)



Dr. Alejandro Avalos Rodríguez
(SECRETARIO)



Dr. Adrián Guzmán Sánchez
(VOCAL)



M.C. Fernando Gual Sill
(VOCAL)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México, por el apoyo económico brindado con la beca 003797 al alumno Ricardo Camarillo Flores (CVU: 781399).

Agradecemos a la Empresa AVICOLA JOCEF S.A. de C.V. por permitirnos el acceso para uso del material biológico proporcionado para la realización del experimento de esta de tesis.

Así también al Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del DPAA, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, por el acceso a su equipo e infraestructura.

El producto logrado con estos apoyos, es la culminación de esta tesis de posgrado, titulada “Capacidad de conservación espermática *in vitro* con suplementos de lavado de la unión útero vaginal de *Gallus gallus*” correspondiente a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, en especial a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, por permitirme cursar mis estudios de posgrado, al igual de desarrollarme en el ámbito de la investigación.

Deseo expresar mi más profundo reconocimiento al Dr. José Antonio Herrera Barragán por la acertada dirección de este trabajo de tesis, por el apoyo y la confianza que en todo momento me brindo, además de su valiosa ayuda a nivel académico como personal.

Gracias al Dr. Adrián Guzmán Sánchez y a la Dra. Irma Jiménez Morales por la colaboración para dirigir este trabajo, los valiosos consejos y aceptar ser miembros de mi comité.

Agradezco a la Dra. Ana María Rosales Torres responsable del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco y a todos los que laboran en él, por el apoyo brindado para la realización de la tesis.

Gracias al Dr. Humberto González Márquez y al Hidrobiólogo José Francisco Ibarra Canales por la ayuda brindada en la parte experimental de este trabajo.

Agradezco al Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz Y Celis por la estrecha colaboración en la realización de esta tesis, su apoyo y valiosos consejos.

DEDICATORIAS

Con cariño y gratitud a mis padres Rene Camarillo Pinzón y María Minerva Flores Pérez que siempre han sido ejemplo de amor y entrega sin límite.

A mi hermana Laura Irene

A Ilse por acompañarme en esta etapa de mi vida.

A todos mis amigos del Laboratorio a quienes admiro profundamente, hacen mi vida placentera y me dan su ayuda continua:

Karen, Samantha, José Manuel (Jr.), Juan (Axolotl), Sofia, Cuau, y Fercha

A todos los compañeros de la MBRA con lo que recorrí este trayecto: Juan, Gina, Darla, Cin, Alain, Quique y Gus

Y en especial con todo el afecto y amistad al Dr. Herrera mi maestro de tantos años.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Importancia del modelo.....	10
1.2. Biología reproductiva de las aves.....	10
1.3. Estacionalidad.....	10
1.4. Fotoperiodo	11
1.5. Anatomía reproductiva.....	11
1.5.1. Macho.....	11
1.5.2. Hembra	12
1.6. Fisiología reproductiva.....	12
1.6.1. El espermatozoide.....	12
1.6.2. Espermatogénesis.....	13
1.6.3. Señalización hormonal en el macho	14
1.6.4. Maduración espermática	14
1.6.5. Capacitación y reacción acrosomal.....	15
1.6.6. Ovogénesis.....	15
1.6.7. Señalización hormonal en la hembra.....	16
1.6.8. Fertilización de aves.....	16
1.6.9. Almacenaje de espermatozoides en el oviducto	17
1.6.10. Secreciones del oviducto.....	17
1.7. Reproducción asistida en aves.....	18
1.7.1. Obtención seminal.....	18
1.7.2. Masaje dorso ventral.....	19
1.7.3. Medios de conservación espermática.....	19
1.7.4. Inseminación artificial.....	20
1.7.5. Conservación espermática en fresco.....	20
1.7.6. Criopreservación.....	20
1.7.7. Crioprotectores.....	21
2. ANTECEDENTES	22
2.1. Secreciones de la unión útero vaginal.....	22

2.2.	Criopreservación.....	23
3.	JUSTIFICACIÓN.....	24
4.	HIPÓTESIS	25
5.	OBJETIVOS	25
5.1.	General	25
5.2.	Específicos	25
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1.	Animales	26
6.2.	Obtención de lavado de la unión útero vaginal	26
6.3.	Separación de proteínas oviductales.....	26
6.4.	Análisis bioquímico de las proteínas de la unión útero vaginal.....	27
6.4.1.	Cuantificación proteica.....	27
6.4.2.	Electroforesis unidimensional (PAGE-SDS)	27
6.5.	Preparación de medios para los tratamientos suplementados para la conservación espermática.....	28
6.6.	Obtención de eyaculados.....	28
6.7.	Conservación en refrigeración	28
6.8.	Criopreservación.....	28
6.9.	Evaluación espermática básica	29
6.10.	Determinación de patrones de estado fisiológico espermático e inducción de reacción acrosomal con MPV.....	29
6.11.	Evaluaciones de los tratamientos.....	31
6.12.	Fertilidad	32
6.13.	Análisis estadístico	33
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1.	Análisis Bioquímico de líquido UUV	34
7.2.	Cuantificación proteínica	34
7.3.	Determinación de peso molecular	35
7.4.	Evaluación básica espermática	36
7.4.1.	Viabilidad espermática	36
7.4.2.	Movilidad espermática	37
7.5.	Efecto de las proteínas del oviducto en el patrón de estado fisiológico espermático	38
7.5.1.	Espermatozoides con patrón a (intactos).....	38

7.5.2.	Espermatozoides con patrón b (capacitados).....	40
7.5.3.	Espermatozoides con patrón c (con reacción acrosomal)	41
7.6.	Parámetros en espermatozoides co incubados con MVP.	42
7.6.1.	Espermatozoides con patrón a (intactos) con MVP	42
7.6.2.	Espermatozoides con patrón b (capacitados) con MVP	43
7.6.3.	Espermatozoides con patrón c (reaccionados) con incubados con MVP.....	44
7.7.	Evaluación básica espermática post descongelación	45
7.7.1.	Viabilidad espermática post descongelación	45
7.7.2.	Movilidad espermática post descongelación	46
7.7.3.	Espermatozoides con patrón a (intactos) post descongelación.....	47
7.7.4.	Espermatozoides con patrón b (capacitados) post descongelación.....	48
7.7.5.	Espermatozoides con patrón c (con reacción acrosomal) post descongelación ..	49
7.8.	Parámetros en espermatozoides co incubados con MVP post descongelación	50
7.8.1.	Espermatozoides descongelados con patrón a (intactos) con incubados con MVP 50	
7.8.2.	Espermatozoides descongelados con patrón b (capacitados) co incubados con MVP 51	
7.8.3.	Espermatozoides descongelados con patrón c (reaccionados) co incubados con MVP 52	
7.9.	Fertilidad	54
8.	CONCLUSIONES.....	56
9.	PERSPECTIVAS	56
10.	BIBLIOGRAFIA	57
	ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA MAESTRIA	67

RESUMEN

Se conoce poco sobre los mecanismos específicos implicados en la capacidad de almacenamiento espermático, la cual se propone puede estar relacionada con actividad metabólica espermática y liberación controlada de los espermatozoides al lumen oviductal. Se sugiere que las microvellosidades de los túbulos almacenadores de espermatozoides presentes en la unión útero vaginal, contribuyen al almacenamiento de espermatozoides ayudan suprimir funciones como la capacitación espermática y su capacidad fertilizante. El objetivo de este trabajo fue demostrar que las proteínas oviductales pueden mejorar la capacidad de conservación *in vitro*, así como la capacidad fertilizante *in vivo*. Se utilizaron aves *Lohmann Brown*. De las hembras, se obtuvo la fracción proteica de las secreciones útero-vaginal (EUUV). De los machos el semen fue almacenado en fresco y en criopreservación, con medio Lake suplementado con diferentes concentraciones de EUUV (control, 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL). En los espermatozoides se determinó la evaluación espermática básica, estado fisiológico del espermatozoide y capacidad fertilizante. Los resultados de este estudio, demostraron que el suplemento *in vitro* de proteínas oviductales 200 µg/mL, favorece la conservación en fresco y aumenta los parámetros de viabilidad espermática post criopreservación. También se encontró que la inducción de la reacción acrosomal utilizando membrana perivitelina, en semen conservado en fresco o post descongelación, demuestra que el efecto determinado como descapacitación espermática, es un estado fisiológico reversible, que confirma la viabilidad espermática asociada a su capacidad fertilizante *in vivo*. Con lo anterior, es posible demostrar, que puede inducirse una descapacitación espermática *in vitro*, de los espermatozoides de gallo logrando una mayor viabilidad para su conservación *in vitro*.

Palabras clave: Reproducción aviar, Criopreservación, Reacción acrosomal, Fertilidad.

ABSTRACT

Little is known about the specific mechanisms related to sperm storage capacity, which can be helped with sperm metabolic activity and the release of sperm to the oviductal lumen. It is suggested that the microvilli of the sperm storage tubules present in the vaginal uterus junction, produce in sperm storage help to reduce the functions such as sperm capacitation and fertilizing capacity. The objective of this work was to demonstrate that oviductal proteins can improve the in vitro conservation capacity, as well as the fertilizing capacity in vivo. Lohmann Brown birds were used. Of the females, the protein fraction of the uterine-vaginal secretions (EUUV) was obtained. Of the males, the semen was stored fresh and in storage, in the middle of the lake supplemented with the different levels of EUUV (control, 100 µg / mL, 200 µg / mL and 300 µg / mL). In the spermatozoids, the basic sperm evaluation, the physiological state of the spermatozoon and the fertilizing capacity were determined. The results of this study, will demonstrate that the in vitro supplement of oviductal proteins 200 µg / ml, favors the conservation in the fresh and increases the parameters of sperm viability post cryopreservation. It was also noted that the induction of the acrosome reaction using the perivitelline membrane, semen preserved in fresh or post thawing, demonstrates that the effect as sperm deprivation is a reversible physiological state, which confirms the sperm viability and its fertilizing capacity in vivo. With the above, it is possible to demonstrate that it can induce an in vitro sperm deprivation of rooster sperm, achieving greater viability for in vitro conservation.

Key words: Avian reproduction, Cryopreservation, Acrosomal reaction, Fertility.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del modelo

El gallo (*Gallus gallus*) es un organismo modelo, que sirve de puente evolutivo entre mamíferos y otros vertebrados, es el principal modelo de laboratorio de las aproximadamente 9.600 especies de aves. También es la primera especie pecuaria de la que se ha secuenciado su genoma completo (ICGSC, 2004). El análisis genético del gallo se remonta al inicio del siglo XX a lo que ha llevado al desarrollo de líneas endogámicas. El embrión de gallo ha sido un sistema útil, debido a las ventajas en experimentos de embriogénesis in ovo, además el gallo se ha utilizado en diferentes estudios tales como seminales, en virología, inmunología oncogénesis (ICGSC, 2004).

1.2. Biología reproductiva de las aves

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

1.3. Estacionalidad

En la mayoría de las aves de zonas templadas, aseguran que la postura ocurra en primavera o en verano, lo cual favorece a la supervivencia de la cría. Las aves en las que su incubación ocurre en la primavera son llamadas criadoras de día largo. La regulación de la reproducción estacional y la luz es recibida por los fotorreceptores cerebrales profundos que se encuentran fuera de la retina y la glándula pineal (Yoshimura et al., 2003).

1.4. Fotoperiodo

La reproducción en aves está influenciada por los cambios en el fotoperiodo. Los mecanismos por los que las respuestas fotoperiódicas influyen en la fisiología reproductiva estacional de las aves son complejos. (Sharp y Blache, 2003) Sin embargo, para que se lleve a cabo la capacidad de generar una respuesta fotoperiódica, se requiere: (a) fotorreceptores de detección de la luz, (b) temporizador para medir la duración del fotoperiodo y (b) un sistema para activar las respuestas fisiológicas reproductivas y afines, además de que los componentes necesarios para generar una respuesta fotoperiódica en las aves se encuentran dentro del hipotálamo medio basal (HMB) (Dawson y Sharp, 2007).

En el HMB aumenta la expresión del gen que codifica la yodotironina desyodasa tipo 2 (DIO2) y disminuye la expresión del gen yodotironina deiodinasa tipo 3 (DIO3) en respuesta a la exposición de luz. La función de DIO2 es convertir la hormona tiroxina (T4) a la triyodotironina (T3) en forma activa en condiciones de día largo, mientras que DIO3 metaboliza T4 y T3 a una forma inactiva, además que los días largos estimula la secreción de TSH, esto ocasiona que ocurran cambios de restructuración morfológica, para que pueda sintetizar y liberar la hormona liberadora de gonadotropinas conocida como GnRH (Yoshimura, 2010).

1.5. Anatomía reproductiva

1.5.1. Macho

En las aves los testículos están localizados en el centro de la cavidad corporal, ventrales a los riñones, se sostienen por ligamentos de la superficie dorsal, adyacentes a las glándulas adrenales (Herrera et al., 2005). Son órganos pares, de forma arriñonada, aunque está próximo a los sacos aéreos, su temperatura es la misma que la temperatura corporal del animal (41 a 43 °C). Cada testículo contiene túbulos seminíferos que desembocan, a través de conductos deferentes en el urodeo, cada conducto concluye en una papila eréctil eyaculadora (Ricaurte, 2006).

1.5.2. Hembra

El aparato reproductor de la hembra está compuesto de:

Ovario: Únicamente se encuentra funcional del lado izquierdo, está situado en la parte superior de la cavidad abdominal, debajo de la arteria aorta y de la vena cava posterior. La gónada adulta muestra el aspecto de un racimo de uvas, debido a la presencia de 7 a 10 folículos portadores de vitelo que se encuentran en fase de crecimiento acelerado. Junto a ellos se encuentran folículos más pequeños y folículos vacíos, que degeneran rápidamente. Las estructuras que relacionan las células de la granulosa y el vitelo contenido en el folículo, varían con el tiempo. Cada folículo está unido al ovario por un pedicelo, por donde penetran arterias, el sistema venoso y fibras nerviosas (Ricaurte, 2006).

Oviducto: Es un tubo de color rosa pálido, que se extiende desde la región del ovario a la cloaca. Este órgano puede ser dividido en 5 partes, diferentes una de otra, desde proximal a distal (infundíbulo, magnum, istmo, útero y vagina) (Ricaurte, 2006).

1.6. Fisiología reproductiva

1.6.1. El espermatozoide

Las características de los espermatozoides de las aves se han estudiado a profundidad por diferentes autores. Son de forma alargada y se subdividen en cabeza, cuerpo y cola (Herrera et al., 2005). Con longitud de 80 a 90 μm (Long, 2006). El espermatozoide es haploide, se encuentra desprovisto de citoplasma, constituido por un núcleo alargado, con cromosomas altamente condensados que impiden la actividad transcripcional para remplazar proteínas, un acrosoma que permite al espermatozoide interactuar y a su vez penetrar al ovocito y fertilizarlo. También cuenta con mitocondrias de 20 a 60 situadas en la parte anterior del flagelo (Long, 2006; Barbas et al., 2009).

El espermatozoide es filiforme, en la cabeza se observa el acrosoma con sus membranas acrosomales externa e interna, exteriormente se ve la membrana plasmática. El núcleo muestra la cromatina muy compactada. Cerca del núcleo hay

microtúbulos que alargan la cabeza del espermatozoide y ayudan a compactar la cromatina, también se describe la presencia de un perforatorio (perforatum) o filamento acrosómico (Peralta et al., 2002).

La región del cuello incluye los centriolos proximal y distal, el centriolo distal ubicado a continuación, ensambla el axonema actuando como centro organizador de microtúbulos, este axonema, es el componente motor de la cola, se origina en el centriolo distal y a su alrededor hay unas 30 mitocondrias que forman el segmento medio; el anillo citoplasmático denso marca la frontera distal del segmento medio y la proximal del segmento principal; sin embargo, carece de la vaina fibrosa y las fibras densas externas observadas en los mamíferos; pero el axonema está envuelto en una vaina amorfa (Peralta et al., 2002).

La membrana plasmática, se encuentran proteínas como (glicoproteínas) o lípidos (glicolípidos) (Long, 2006). Los fosfolípidos de la membrana está en forma asimétrica bilaminar. Así también, los espermatozoides cuentan con una membrana conocida como membrana acrosomal, misma que se derivada del aparato de Golgi y en la forma madura del espermatozoide es la membrana externa situada en la cabeza (Lemoine et al., 2008).

1.6.2. Espermatogénesis

En los testículos de las aves sexualmente maduras y activas, el túbulo seminífero contiene un epitelio estratificado que comprende células germinales en diversas etapas de división meiótica y morfogénesis. La segunda y última división meiótica ocurre en el espermatocito secundario dando lugar a células germinales haploides, las espermátidas redondas. La espermátide posteriormente sufre cambios morfológicos complejos; se pueden observar en diferentes etapas de diferenciación, dependiendo de la fase en que se encuentra la espermiogénesis, dentro del epitelio. Las espermátides tempranas son generalmente de forma redonda y adluminales, los cambios de espermátides dentro del epitelio seminífero son provocados por las células de Sertoli. Histológicamente, los túbulos seminíferos están rodeados por tejido intertubular que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y las células de Leydig. En un corte transversal del epitelio seminífero presenta una

disposición celular estratificada, y varios pasos de espermátides se encuentran en diferentes niveles dentro del epitelio. Además, hay espermátides en varias etapas de la espermiogénesis, que se encuentran juntas o incluso mezcladas, en la misma sección transversal del túbulo seminífero. Por lo tanto, las asociaciones celulares heterogéneas se muestran en las aves, como en ciertos primates (Aire, 2007).

1.6.3. Señalización hormonal en el macho

La actividad testicular está bajo el control de las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), que se sintetizan en la adenohipofisis. LH y FSH se liberan en la circulación y activan sus receptores expresados en las células de Leydig y células de Sertoli, respectivamente, para estimular la secreción de testosterona y la espermatogénesis en los testículos. La espermatogénesis se produce en los túbulos seminíferos que poseen una población permanente de células de Sertoli, que apoyan la espermatogénesis y la espermiogénesis y actúan como un depósito de células germinales para sucesivas épocas de actividad espermatogénica. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es el principal factor que regula la secreción de gonadotropina. La GnRH se produce en el área pre óptica (POA) y se libera en la eminencia mediana para estimular la secreción de gonadotropina de la adenohipófisis. Los esteroides testiculares y la inhibina pueden modular la secreción de gonadotropina mediante retroalimentación negativa. Aunque la dopamina ha sido reportada como un inhibidor de la secreción de gonadotropinas. La GnIH puede inhibir la secreción de gonadotropina al disminuir la actividad de las neuronas GnRH así como inhibir directamente los gonadotropos hipofisarios (Aire, 2007).

1.6.4. Maduración espermática

En las aves el proceso de maduración espermática ocurre en los conductos deferentes, donde el espermatozoide obtiene una mayor movilidad durante su tránsito por estos conductos (Ahammad et al., 2013). También adquieren los espermatozoides su forma definitiva ya que sufren varios cambios morfológicos. Además, las aves están desprovistas de glándulas accesorias, por lo que los

conductos deferentes elaboran el plasma seminal y se encargan del almacenamiento (Ricaurte, 2006).

1.6.5. Capacitación y reacción acrosomal

La capacitación espermática en aves ocurre en periodos muy cortos y se produce *in vivo* en el tracto reproductor de la hembra, sin embargo algunos autores señalan que este proceso no es requerido para lograr la fertilización del ovocito (Lemoine, 2011). Este proceso implica diferentes mecanismos celulares que dan lugar a la desestabilización de la membrana del espermatozoide, el espermatozoide sufre un proceso de hiper-activación. En condiciones *in vitro*, la capacitación se puede lograr por incubación de los espermatozoides en un medio salino que contiene sólo iones de calcio (Ca^{2+}) y membrana perivitelina (Lemoine, 2009).

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

Cuando el espermatozoide entra en contacto con la membrana perivitelina, existe una liberación espermática de enzimas, principalmente hialuronidasa y acrosina, lo cual sugiere que la membrana perivitelina tiene receptores especializados para la inducción de la reacción acrosomal. Para inducirla se requiere Ca^{++} extracelular, elevación intracelular de AMPc y una disminución del pH intracelular con esto se genera una hiperactivación en el espermatozoide y poder inducir la reacción acrosomal (Arenas et al., 2010).

1.6.6. Ovogénesis

Se estima que aproximadamente hay 12,000 ovocitos en el ovario de la gallina, pero solo unos pocos cientos serán seleccionados para madurar y ser ovulados. Generalmente el ovario de gallina madura sexualmente, contiene cientos de folículos corticales blancos con un diámetro entre 1-5 mm, 5 a 6 pequeños folículos

pre-jerárquicos amarillos con 6-8 mm de diámetro y 5 a 6 folículos pre ovulatorios amarillos grande con 9-40 mm de diámetro. En el ovario de gallina, se selecciona un solo folículo pre ovulatorio una vez al día. Estos se someten a una serie de procesos complejos que incluyen la modulación de la acción de las gonadotropinas, síntesis de hormonas esteroides, la selección de folículos, la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Kang et al., 2013) .

1.6.7. Señalización hormonal en la hembra

El desarrollo del ovario y la ovogénesis ocurre, gracias a la acción de las hormonas esteroides, las cuales dependen, a su vez, de las hormonas hipofisarias LH y FSH, que están integrando el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Peralta & Miazzo, 2002).

La LH es responsable del desarrollo del ovario, de la secreción ovárica de esteroides sexuales y, sobre todo, de la ovulación. Por su parte, la FSH regula el desarrollo de los folículos del ovario y la actividad secretora de éste. El ovario de las aves, al igual que el de los mamíferos, secreta 3 tipos principales de esteroides: estrógenos, andrógenos y progesterona. Esta secreción es cíclica, de acuerdo con el desarrollo de la ovulación, aunque siempre se mantienen niveles basales. Por otro lado, los esteroides juegan un papel importante al ejercer un efecto retroactivo negativo sobre la liberación de la LH en la hipófisis. Los estrógenos son sintetizados por las células intersticiales de las tecas foliculares, desapareciendo la capacidad de síntesis de estas hormonas la víspera de la ovulación de ese folículo. Las funciones de los estrógenos son importantes, puesto que participan prácticamente en el control de la formación del huevo (Peralta & Miazzo, 2002; Peralta, 2016).

1.6.8. Fertilización de aves

Es el proceso por el cual los gametos se fusionan para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos progenitores. Los dos fines principales de la fecundación es la recombinación genética y la generación de un nuevo individuo, para ello los espermatozoides deben someterse a la reacción del acrosoma para así penetrar la membrana perivitelina y fertilizar el óvulo. Las enzimas liberadas permiten que el espermatozoides hidrolize la membrana perivitelina interior que rodea el ovocito, y esto da como resultado orificios que permiten el paso de uno o

varios espermatozoides a través de la membrana perivitelina (Lemoine et al., 2008). La membrana perivitelina puede ser considerarse hasta cierto punto como análoga a la zona pelúcida (ZP) en el ovocito de los mamíferos (Waclawek et al., 1998). Se compone de glicoproteínas, las cuales tienen un papel clave en la unión del esperma y la inducción acrosómica (Okumura et al., 2004).

Los espermatozoides de las aves pueden almacenarse hasta 30 días en el caso de las gallinas, en la unión útero vaginal del tracto antes de llegar al sitio de la fertilización y someterse a la reacción del acrosoma para penetrar la membrana perivitelina que contiene el vitelo y rodea al ovocito (Lemione et al., 2009).

1.6.9. Almacenaje de espermatozoides en el oviducto

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

Debido a la presencia de estos TAE, el espermatozoide una vez que ha entrado en el aparato reproductor de la hembra, puede sobrevivir entre 2-15 semanas en aves domésticas, como gallinas y pavas (Sasanami, 2013); en contraste con la relativamente corta duración de la vida espermática de no más de una semana en mamíferos. Aunque existen investigaciones sobre la función de los TAE (Bakst, 2007; Froman, 2003), se sabe poco sobre los mecanismos específicos implicados en la capacidad de almacenamiento espermático, la cual se propone puede estar relacionada con actividad metabólica espermática y liberación controlada de los espermatozoides al lumen oviductal.

1.6.10. Secreciones del oviducto

Existen diferentes proteínas presentes en el oviducto incluyendo; anhidrasa carbónica, avidina, acuaporinas y fosfatasa alcalina; La anhidrasa Carbónica presenta una actividad de liasa, es decir, enzimas que catalizan reacciones de eliminación no hidrolítica, no oxidante o la lisis de un sustrato (Monroy & Vargas,

2010); La Adivina es una glicoproteína tetramérica que une la biotina, producida en el oviducto de aves y es depositada en el albumen del huevo, se sabe que es dependiente de la actividad de la progesterona, además secretada en presencia de espermatozoides en los TAE e interviene en el proceso de su liberación de estos y su migración en el oviducto para que llegue al infundíbulo para fertilizar (Fernández, 1985; Hemmings et al., 2015; Foye-Jackson et al., 2011).

Las acuaporinas son proteínas mediadoras del transporte de agua; La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuida que hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico liberando fosfato inorgánico (Ruiz et al., 2015; Bakst, 2011; Long & Conn, 2012; Sasanami et al., 2013).

Los estrógenos son importantes en el mecanismo de almacenamiento de espermatozoides ya que son los encargados de proliferar vellosidades en los TAE, además se sabe que en estos se encuentran receptores a estradiol por lo que se cree que están relacionados con la supervivencia espermática sobre todo en el proceso de liberación del espermatozoide (Das et al., 2006) además, hay proteínas específicas sintetizadas en los TAE, como la HSP70 la cual se sabe que no influye en el proceso de almacenamiento del espermatozoide y se cree que su efecto es sobre el proceso de migración de los espermatozoides que se encuentran en los TAE hacia la zona de fertilización en el oviducto (Hiyama et al., 2014).

1.7. Reproducción asistida en aves

Las tecnologías utilizadas para la reproducción asistida en aves tales como: la Inseminación artificial (IA), la criopreservación de eyaculado y la incubación de huevos, tienen un impacto importante en la preservación y las líneas genéticas para las futuras generaciones (Sontakke et al., 2004).

1.7.1. Obtención seminal

La obtención de semen en aves, se realiza mediante varias técnicas, que abarcan desde la electro-eyaculación, eyaculación voluntaria y eyaculación por masaje dorso ventral (Burrows y Quinn 1937; Wishart, 1995; Blanco et al., 2002).

1.7.2. Masaje dorso ventral

Burrows y Quinn (1937), desarrollaron el método de masaje dorso ventral en gallos para la extracción y recolección de semen. La fácil recolección de semen y el procesamiento, ha permitido su utilización de forma extensiva en la inseminación artificial. Esta técnica ha demostrado ser de gran ayuda para la inseminación artificial en pavos y gallos, su única desventaja radica en que el masaje también estimula el coprodeo y urodeo, ocasionando que ciertos porcentajes de los eyaculados se contaminen con heces, ácidos úricos o ambos (Duchi, Almela, Peinado, & Poto, 2009).

1.7.3. Medios de conservación espermática

Un objetivo importante de la dilución del semen es extender su volumen para así facilitar su manejo y de ser posible, inseminar un mayor número de hembras. El diluyente sirve además para poder preservar la capacidad fertilizante del semen durante períodos más largos. El semen de gallo sin diluir no puede mantener toda su capacidad fertilizante fuera de la vagina más allá de unos 45 minutos. La dilución a campo mantiene la capacidad fertilizante de los espermatozoides durante unas 6 horas, lo que permite, en el caso de los pavos, poder transportarlo de la granja de sementales a la de las hembras. (Herrera et al., 2005)

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

1.7.4. Inseminación artificial

La IA en aves fue desarrollada originalmente en gallinas, la primera ocasión que tuvo éxito en aves fue hace cien años (Herrera et al., 2003). Para obtener un buen porcentaje de fertilidad es necesario considerar varios factores relacionados con el procedimiento de descongelación, método de inseminación y sobre todo la calidad espermática (Purdy et al., 2009).

La IA presenta algunas diferencias entre aves y mamíferos; por ejemplo, en ganado bovino se intenta coincidir con la ovulación, mientras que en aves comerciales se requiere de una inseminación por semana para mantener los niveles de fertilidad en rangos rentables, por lo que se requiere de altas cantidades de espermatozoides y que estos permanezcan viables en el tracto de la hembra (Long, 2006). Es necesario un intervalo entre inseminaciones para que la fertilidad se mantenga al máximo nivel, esto depende de la capacidad de la hembra para almacenar espermatozoides viables en los TAE y de la concentración de espermatozoides. Este periodo se denomina periodo fértil. Sin embargo, tras una dosis única de inseminación, la fertilidad desciende.

1.7.5. Conservación espermática en fresco

Los espermatozoides de aves pueden ser conservados con capacidad fertilizante hasta por 24 horas. Para esto, es necesario que el diluyente contenga una provisión de oxígeno, fructosa o glucosa, mantener el pH en intervalos de 6.0 a 8.8 mediante amortiguadores, una mezcla de sales de fosfatos, citratos y/o amortiguadores orgánicos (Donoghue & Wishart, 2000). La osmolaridad del diluyente está asociada a cambios morfológicos de la estructura espermática, ésta puede variar durante el enfriamiento del eyaculado (Etches, 1996). Se ha demostrado que el eyaculado almacenado en líquido puede conservarse hasta por 6 horas (pavos) y 24 horas (gallos) y presentan niveles de fertilidad comparables al realizar IA con eyaculado fresco (Donoghue y Wishart, 2000).

1.7.6. Criopreservación

Es un proceso que no existe de manera natural por lo que requiere una alta adaptabilidad de las células para soportar los cambios osmóticos y el estrés térmico

(Blesbois, 2007). Las variables que influyen sobre la capacidad de los espermatozoides para soportar la criopreservación, evitar daños en la membrana y mantener su capacidad fertilizante son: la permeabilidad de la membrana a medios acuosos y a los crioprotectores permeables, tiempos de exposición requeridos a los crioprotectores y la resistencia a cambios osmóticos (Blanco et al., 2009).

1.7.7. Crioprotectores

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

El primer grupo está compuesto por los crioprotectores intracelulares aquellos que son capaces de atravesar las membranas, ocasionan una reorganización de las proteínas y lípidos, causando una mayor fluidez membranal y deshidratación a bajas temperaturas, que a su vez evita la formación de hielo generando una mayor tasa de supervivencia espermática tras el descongelamiento (Blanco et al., 2010); dos ejemplos son: el glicerol y el DMSO (Barbas et al., 2009).

El segundo grupo está compuesto por los crioprotectores extracelulares que no atraviesan las membranas y solo actúan extracelularmente, son hidrófilos, no tóxicos y ayudan a estabilizar la concentración de solutos internos bajo ambientes de estrés osmótico (Blanco et al., 2010), también evitan la formación de hielo; algunos ejemplos de ellos son: la clara de huevo, 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).

2. ANTECEDENTES

2.1. Secreciones de la unión útero vaginal

Se ha sugerido que los espermatozoides almacenados en los TAE son inmóviles y por lo tanto se cree que su metabolismo es basal como resultado de un consumo bajo de ATP, sin embargo, se sugiere que los espermatozoides mantienen su posición en contra de una corriente de flujo hacia el exterior en los TAE, esto es generado por la oxidación de los ácidos grasos exógenos liberados a partir de células epiteliales de los TAE, dando como resultado la reducción de la velocidad de los espermatozoides debido a la escasa suplementación de energía de la mitocondria al espermatozoide (Sasanami et al., 2013 y Bakst & Bauchan, 2015).

Bakst & Bauchan (2015), examinaron el origen de microvellosidades (MVBs) en la punta apical de las células epiteliales de los TAE, y su papel en la conservación de los espermatozoides. Concluye que las MVBs contribuyen al almacenamiento de espermatozoides en los TAE, por el suministro de lípidos y proteínas utilizados por los espermatozoides que ahí se encuentran y que sirven para bloquear funciones ligadas a la recapacitación espermática y su capacidad fertilizante, además de estabilizar a los espermatozoides (Freedman et al., 2001; Marzesco et al., 2009). Los fosfolípidos están relacionados con la maduración del espermatozoide, las propiedades de la movilidad y la capacidad antioxidante es por eso que por el alto contenido de colesterol, se ha propuesto que inhibe la capacitación y la reacción acrosomal. (Bakst & Bauchan, 2015; Long & Conn, 2012).

Sasanami et al. (2013), investigaron el efecto de almacenamiento del espermatozoide en la codorniz japonesa, en donde prepararon extractos de la unión útero- vaginal (UUV), observando el movimiento flagelar de los espermatozoides mediante una cámara de alta velocidad. Cuando los espermatozoides se incubaron sin extractos de UUV, se observó un movimiento flagelar rápido, en cambio utilizando los extractos UUV, se encontró que los movimientos flagelares eran relativamente lentos, y que la amplitud del movimiento flagelar, así como la velocidad lineal de los espermatozoides decreció, además, los extractos UUV incremento el tiempo de vida útil de los espermatozoides *in vitro*. En presencia de

extractos de UUV, los espermatozoides continuaban vivos, después de 48 h de incubación, mientras que en ausencia de los extractos, en promedio murieron dentro de las 5 h de incubación. Estos resultados indican la posibilidad de que existan moléculas desconocidas a las que llamaron factores descapacitantes responsables del mantenimiento de los espermatozoides en la UUV.

2.2. Criopreservación

En el trabajo de Rakha et al. (2016), evaluaron el desempeño de los medios que son comunmente usados en la criopreservación de aves, en la especie *Gallus gallus murghi*; midiendo la movilidad, viabilidad, integridad del acrosoma, integridad de la membrana plasmática, al igual que valores de fertilidad. Los medios que evaluaron haciendo una disolución 1:5 fueron: *Beltsville poultry semen extender* (BPSE) (Giesen & Sexton, 1983), Red fowl extender (RFE), que es una modificación del medio propuesto por Lake, 1978; Lake (Lake, 1960), EK (Lukaszewicz, 2002), Tselutin poultry extender (TPE) (Tselutin et al., 1995) y Chicken eyaculado extender (CSE) (Lake, 1966). Tomando que la movilidad en fresco al momento de la eyaculación era del 75% hasta el 80%, en todos los casos después de pasar el proceso de congelación y siendo evaluados nuevamente tenían valores desde el 26.1% hasta 63% siendo el más bajo el BPSE y el más alto RFE observando que el medio tiene gran repercusión en la calidad espermática. El parámetro de la viabilidad fue más homogéneo teniendo un rango entre el 71.3% al 87% siendo el más efectivo RFE. Para evaluar la fertilidad utilizaron eyaculado diluido con RFE sin congelar y congelado observaron que las gallinas que fueron inseminadas con el eyaculado sin congelar en promedio tenían un mayor número de huevos fértiles (86.7%) con respecto en las que se usó eyaculado congelado (57.5%).

En un estudio realizado por Blesbois et al. (2008), reportaron la misma tendencia reportada por Rakha et al. (2016), utilizando BPSE observo que comparándolo con eyaculado fresco la porcentaje de fertilidad decrece de un 74.36% al 56%, al igual que el porcentaje de movilidad disminuye de un 84.77% hasta 42.36%.

El uso de crioprotectores para ayudar a adaptarse al espermatozoide en el proceso de criopreservación inicia desde las investigaciones de Lake & Stewart (1978),

utilizando el glicerol, posterior a eso se empezó a utilizar dimetilsulfoxido (DMSO) por Sexton, el dimetilformamida (DMF) propuesto por Schramm (1991) y el Dimetilacetamida (DMA) utilizado por Tselutin et al. (1995).

Al utilizar el DMA o el glicerol como crioprotector el porcentaje de fertilidad puede incrementarse, arriba de un 90% (Challah et al., 1999), aunque hay que hacer hincapié que la técnica utilizando DMA es sencilla a comparación que el glicerol, ya que se debe de centrifugar la muestra para retirar el glicerol (Blesbois, 2007).

En un estudio realizado por Long et al. (2014), utilizaron glicerol y DMA en una concentración de 11% y 6% respectivamente observando que los espermatozoides tratados con glicerol presentaron mayor integridad de la membrana, pero no mostraron diferencias significativas en movilidad e integridad acrosomal.

3. JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones de la anatomía aviar datan de mucho tiempo atrás, pero los mecanismos de acciones hormonales, que regulan la madurez y el funcionamiento de los órganos reproductivos y de la postura en el caso de las hembras, aún son motivo de investigaciones. Se sabe poco sobre los mecanismos específicos implicados en la capacidad de almacenamiento espermático, la cual se propone puede estar relacionada con actividad metabólica espermática y liberación controlada de los espermatozoides al lumen oviductal. Se sugiere que los MVBs contribuyen al almacenamiento de espermatozoides por los TAE por el suministro de lípidos y proteínas utilizados por los espermatozoides residentes, que sirven para suprimir funciones posiblemente asociadas a la re capacitación espermática y su capacidad fertilizante, además de estabilizar el plasmalema del espermatozoide, y que actúa como vesículas de transporte, donde se transportan activamente el líquido de las células epiteliales de los TAE al lumen. Por lo tanto, este conocimiento es crítico para poder establecer prácticas de manejo que permitan una mayor eficiencia reproductiva, así contribuyendo al conocimiento de la conservación espermática para su aplicación en protocolos de reproducción asistida.

4. HIPÓTESIS

La suplementación del medio de conservación con la fracción proteica de lavados de la unión útero vaginal incrementarán los parámetros de viabilidad espermática *in vitro* y capacidad fertilizante *in vivo*.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Determinar el efecto de la fracción proteica del lavado de la unión útero vaginal en parámetros fisiológicos espermáticos en la conservación en fresco y criopreservado.

5.2. Específicos

- Estimar la concentración adecuada de la fracción proteica que se utilice para la suplementación en el medio Lake para la conservación del eyaculado en fresco y criopreservado.
- Determinar el rango del peso molecular o masas relativas de las proteínas obtenidas en los lavados de la unión útero vaginal.
- Evaluar la capacidad fertilizante de los espermatozoides conservados en fresco y criopreservados con suplemento de lavados de la unión útero vaginal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizaron revisar los tiempos en dos laboratorios de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la unidad Iztapalapa, en el laboratorio de andrología del Departamento de Ciencias de la Salud y en la unidad Xochimilco, en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, del Departamento de Producción Agrícola y Animal.

6.1. Animales

Se utilizaron 5 machos y 30 hembras, de la granja AVICOLA JOCEF S.A. de C.V. Ubicada en el municipio de Jilotepec, Edo. De México, de la raza "Lohmann Brown" animales clínicamente sanos. Las hembras fueron de una edad del segundo tercio del primer ciclo de postura y los machos de 5 meses, encontrándose maduros física y sexualmente. Los ejemplares contaban con acceso *ad libitum* al agua y alimento.

6.2. Obtención de lavado de la unión útero vaginal

Se realizó un lavado a las gallinas, evertiendo la cloaca, se insertó una sonda aproximadamente 3 cm en el oviducto, se introdujo 5 mL de medio Lake (Fructosa al 0.6% p/v, Glutamato de sodio al 1.92% p/v, Acetato de magnesio al 0.08% p/v, Acetato de sodio al 0.51% p/v, Citrato de potasio al 0.128% p/v, pH de 7.2 y osmolaridad de 330 mOms) (Lake, 1978); se recolecto aproximadamente 2.4 mL del líquido de la UUV y se hizo un pool de todas la hembras manteniéndolo a 4°C para su evaluación (Herrera et al., 2013; Ito et al., 2011). Se filtró mediante un colador de células de 70 µm y el filtrado se centrifugo durante 30 minutos a 1500 g. El sobrenadante se conservó a -20 ° C hasta su uso (Thongboonkerd et al., 2002).

6.3. Separación de proteínas oviductales

Las proteínas de la UUV se precipitaron con 4 volúmenes de acetona helada, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaran a 14000g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el paquete proteínico se seco con vapores de nitrógeno (Thongboonkerd et al., 2002).

6.4. Análisis bioquímico de las proteínas de la unión útero vaginal

6.4.1. Cuantificación proteica

Para cuantificar la concentración de las proteínas de UUV (sugiero referir asil lavado de la unión útero vaginal) se realizó la técnica de Bradford. Se elaboró una curva patrón con BSA (0.0, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.15 mg/mL). Las muestras se prepararon añadiendo en un tubo Eppendorf 2 μ L del sobrenadante obtenido del punto 7.1, con 798 μ L de agua destilada o solución de NaCl como control Cero y 200 μ L de colorante de Bradford, se agitaron con vortex y se analizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

6.4.2. Electroforesis unidimensional (PAGE-SDS)

Se determinó el perfil proteínico de UUV, mediante PAGE-SDS en medio reductor, se utilizaron las proteínas obtenidas en la separación. Se colocaron 20 μ g de proteína en buffer de muestra (Tris 0.5 M a pH 6.8, SDS 10%, Glicerol, Azul de Bromofenol 0.5% y β -mercaptoetanol 5%). Las muestras se calentaron a 100°C por 3 minutos. Para la electroforesis se preparó un gel de separación de 10% y un gel de compactación al 4% con Acrilamida/Bis 30% Solución, 37.5:1 (2.6%C). La separación se realizó en una cámara Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) y usando el marcador Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards #1610373 de Bio-Rad, a 200 Volts durante 45 minutos. Posteriormente los geles fueron teñidos El gel de poliacrilamida se fijó con una solución de metanol-ácido acético-agua (50:10:40) durante una hora en agitación suave. Posteriormente, el gel se introdujo en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.1% preparada en metanol-ácido acético (40:10) y se mantuvo durante una hora en agitación suave. El gel se decoloró en una solución metanol-ácido acético-agua (30:7.5:62.5)(Laemmli, 1970). El gel se digitalizó con un scanner y el análisis se realizó por medio de densitometría con el software Gel-Pro® Analyzer. La Mr (masa relativa) de las bandas se determinó comparándolas con la Mr de un estándar de bajo peso molecular.

6.5. Preparación de medios para los tratamientos suplementados para la conservación espermática

Una vez obtenida la fracción proteica del lavado de la unión útero vaginal, se determinó su actividad probando 3 diferentes concentraciones. Se suplemento el medio Lake (Fructosa al 0.6% p/v, Glutamato de sodio al 1.92% p/v, Acetato de magnesio al 0.08% p/v, Acetato de sodio al 0.51% p/v, Citrato de potasio al 0.128% p/v, pH de 7.2 y osmolaridad de 330 mOms), además de la cantidad necesaria de proteína para las 3 concentraciones de proteínas (100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL) (Sasanami et al., 2013).

6.6. Obtención de eyaculados

Los eyaculados se obtuvieron mediante masaje dorso-ventral (Burrows & Quinn, 1937; Herrera et al., 2005), el eyaculado se recolectó con una micropipeta graduada y se depositaron en un tubo Eppendorf con 1000 µl de solución Lake para formar un pool, se homogenizo con la finalidad de evitar aglutinaciones (Herrera et al. 2005), la muestra se mantuvo a una temperatura de 5 °C hasta su uso (Santiago et al., 2011).

6.7. Conservación en refrigeración

Se depositó en un tubo Eppendorf 50 µl del pool realizado y se le añadió 150 µl de cada uno de los tratamientos (concentraciones de proteínas y un control), calentado previamente a 39 °C (Ahammad et al., 2013; Matsuzaki et al. 2015).

6.8. Criopreservación

Con ayuda de una cámara de Neubauer se prepararon pajillas de 100 millones de espermatozoides por cada una; se incubo por 15 minutos a 31 °C, posteriormente se enfrió a 4 °C por 10 minutos, y se sumergió en nitrógeno líquido (Rakha et al., 2016; Matsuzaki et al., 2015).

6.9. Evaluación espermática básica

Movilidad: El porcentaje de movilidad espermática se determinó mediante microscopía óptica en cada tratamiento, evaluando subjetivamente el movimiento (progresivo, rápido y rectilíneo) (Duchi et al., 2009).

Viabilidad: El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó utilizando la tinción eosina-nigrosina colocando 4 μl de la muestra sobre un portaobjetos atemperado a 37 °C y se agregaron 2 μl de la tinción, realizando un frotis y dejando secar por 5 min revisar que se escriba igual en todo el texto sobre una platina térmica. La tinción se observó en un microscopio óptico a un aumento de 40X contando 100 células espermáticas; los espermatozoides teñidos en color rosa se toman como muertos y los no teñidos o en color blanco como vivos (Váradi et al., 2013; Moya, 2003).

6.10. Determinación de patrones de estado fisiológico espermático e inducción de reacción acrosomal con MPV.

Se colocaron en un tubo Eppendorf una alícuota de 20 μl de semen con una concentración de 100×10^6 espermatozoides en que volumen y 10 μl de solución de clortetraciclina (CTC) 0.009M, se homogenizo y se colocó sobre una platina térmica a 37 °C cubriéndolos de la luz. se evaluó a los 5 min, tomando 10 μl de esta mezcla sobre un portaobjetos, dejando secar para después cubrirlo con un cubreobjetos y se llevó observó en un microscopio de epifluorescencia, se contaron 100 espermatozoides determinando tres patrones diferentes: espermatozoides intactos, espermatozoides capacitados y espermatozoides con reacción acrosomal (Figura 1) (Herrera et al., 2017).

Para la inducción de la reacción acrosomal se utilizó membrana perivitelina (MPV) 0.1 g/500 μl y se determinó por medio de la tinción de CTC; se colocó en un tubo Eppendorf 20 μl de muestra con 5×10^6 espermatozoides de las diferentes fracciones, 50 μl de CTC y 50 μl de MPV, se homogenizo y se colocó sobre una platina térmica cubriéndolos de la luz, se procedió a incubar durante 10 min a 37 °C, pasado el tiempo de incubación se evaluó la muestra tomando 10 μl de esta

mezcla se depositó sobre un portaobjetos, dejando secar para después cubrirlo con un cubreobjetos y evaluando posteriormente en el microscopio de Fluorescencia, se contaron 100 espermatozoides determinando tres patrones diferentes: espermatozoides intactos, espermatozoides capacitados y espermatozoides con reacción acrosomal (Herrera et al., 2017).



Figura 1. Patrones determinados con clortetraciclina en espermatozoides de gallo, **1A:** espermatozoide con estado fisiológico intacto, presenta fluorescencia en cabeza¹, pieza media² y flagelo³. **1B:** espermatozoide con estado fisiológico capacitado, presenta fluorescencia en la parte acrosomal¹, en la zona post-ecuatorial² y pieza media³. **1C:** espermatozoide con estado fisiológico con reacción acrosomal, presenta poca fluorescencia en pieza media¹ y flagelo².(Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, UAM-X)

6.11. Evaluaciones de los tratamientos

En las siguientes cuadros se muestran los tratamientos y las evaluaciones realizadas a diferentes tiempos, así como las evaluaciones realizadas posteriormente a la criopreservación, en donde solo se utilizó una concentración proteica.

Cuadro 1. Condiciones de evaluación para eyaculados conservados en refrigeración.

CONDICIÓN DE EVALUACIÓN	TIEMPO DE EVALUACIÓN			
	T0	40 min	6 h	24 h
Eyaculado + Lake. (Control)	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA
Eyaculado + Lake+FPLUUV 100 µg/mL	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA
Eyaculado + Lake+FPLUUV 200 µg/mL	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA
Eyaculado + Lake+FPLUUV 300 µg/mL	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA	- Ev. spz básica. - Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA

FPLUUV= Fracción proteica del lavado de la unión útero vaginal, Ev. spz básica = Evaluación espermática básica, Det. Edo. Fisiologico e Induccion RA= Determinación de estado fisiológico espermático e inducción de reacción acrosomal

Cuadro 2. Condiciones de evaluación para la criopreservación de los eyaculados.

CONDICIÓN DE EVALUACIÓN	POST DESCONGELACION
Eyaculado + Lake + DMA (Control)	- Ev. Espermatoca básica. - Capacidad de RA
Eyaculado + Lake + DMA + FPLUUV 200 µg/mL	- Ev. Espermatoca básica. - Capacidad de RA

FPLUUV = Fracción proteica del lavado de la unión útero vaginal., DMA= Dimetilacetamida- como crioprotector. Falta indicar el número de repeticiones que se realizaron*

6.12. Fertilidad

Se descongelaron las pajillas a 37 °C por 30 s., se hizo la inseminación intra vaginal utilizando 5 gallinas por tratamiento (cuadro 3) , 5 min después de haber sido descongelado (Rakha et al., 2016). Los huevos fueron recogidos el día después de la inseminación por 8 días, se utilizó una incubadora automática a una temperatura de 37.2 ° - 37.8 °C con una humedad relativa de 86 – 90% y el volteo cada hora. Los huevos fueron revisados por ovoscopia a los 14 días de incubación para determinar la fertilidad del huevo (Rakha et al., 2016).

Cuadro 3. Condiciones de los eyaculados para la evaluación de su capacidad fertilizante.

Inseminación Artificial	
CONDICIÓN DE EVALUACIÓN	DIA 14 POSTERIOR A LA OVODEPOSICION
Eyaculado refrigerado: - Eyaculado fresco + Lake - Eyaculado fresco + Lake + FPLUUV 200 µg/mL	% Huevos fértiles.
Eyaculado descongelado: - Eyaculado + Lake + DMA (Control) - Eyaculado + Lake + FPLUUV 200 µg/mL	% Huevos fértiles.

FPLUUV= Fracción proteica del lavado de la unión útero vaginal., DMA= Dimetilacetamida como crioprotector., Lake = Medio de conservación seminal.

6.13. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias en la conservación seminal con diferente concentración de proteína en diferentes tiempos, y para comparar el porcentaje de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal en cada uno de los tratamientos; se realizó mediante una prueba Tukey la determinación de significancia con un valor de $P < 0.05$, para determinar las diferencias en la fertilidad de los huevos obtenida posterior a la inseminación con los diferentes tratamientos, se realizó una prueba de Chi-cuadrada.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Análisis Bioquímico de líquido UUV

7.2. Cuantificación proteínica

Mediante Bradford se cuantificó la cantidad de proteína obtenida del oviducto a diferentes horas tomando en cuenta la postura (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración proteica en lavados de la unión útero vaginal a diferentes horas.

Hora / postura	concentración proteica mg/mL
3 pre	0.05 ± 0.04
2 POST	0.10 ± 0.05
5 POST	0.16 ± 0.03
8 POST	0.12 ± 0.04
11 POST	0.13 ± 0.09

Se determinó usar el líquido oviductal obtenido a las 5 horas posteriores a la postura ya que cuenta con una mayor concentración de proteínas (0.16±0.03 mg/mL), además que esto corresponde a la hora más habitual en donde se lleva a cabo la copula de forma natural (North y Bell, 1993)

7.3. Determinación de peso molecular

Se determinaron un total de 14 bandas en tres carriles usando la proteína obtenida a las 6 horas posteriores a la postura, que van desde los 227.68 hasta 68.60 KDa. se lograron identificar por medio del PM 3 bandas correspondientes a las secreciones que se encuentran normalmente en el oviducto las cuales fueron:

Banda 4 = “IgY 150 KDa” homologa a la IgG en mamíferos, presente en el oviducto, con función inmunológica (Hemmings et al., 2015).

Banda 6 = “ovomucina 88.5 KDa” es un inhibidor de la tripsina, altamente glicosilado, se encuentra en un porcentaje del orden del 3.5 % en el albumen. (Foye-Jackson et al., 2011).

Banda 10 = “Avidina 66-69KDa” presente en el albumen y el oviducto ejerce una función protectora al impedir el crecimiento de bacterias en el huevo (Foye-Jackson et al., 2011).

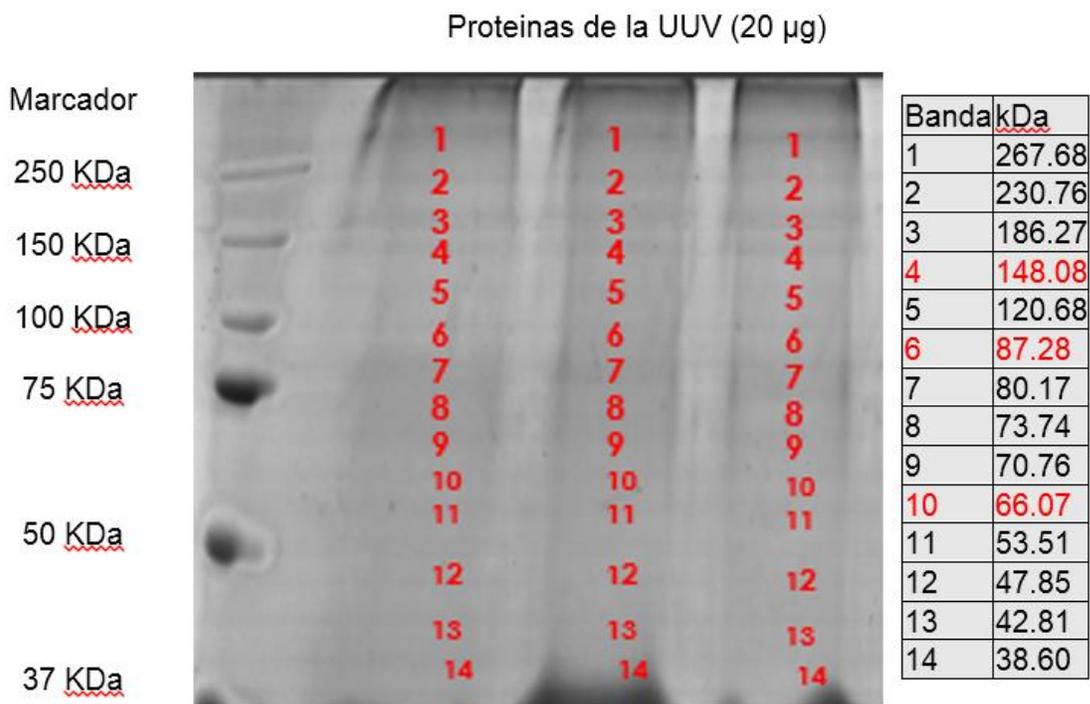


Figura 2. Determinación de peso molecular de las proteínas oviductales.

7.4. Evaluación básica espermática

7.4.1. Viabilidad espermática

En la Figura 3 se muestra el porcentaje de viabilidad espermática, no se observan diferencias estadísticas significativas en los diferentes tratamientos (control, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ y 300 $\mu\text{g/mL}$) en el tiempo 0, se presentó un rango del 95.4% al 97.6 % y a los 40 minutos entre 89% al 94.2%. Se mostró una viabilidad significativa en el tratamiento de 200 $\mu\text{g/mL}$ (89.6% y 82.8%) en los tiempos de 6 y 24 horas; Sin embargo a las 24 horas a la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas oviductales se observó una disminución en la viabilidad significativamente con respecto a los demás tratamientos.

Nuestros resultados indican que al suplementar el medio de conservación con proteínas oviductales a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, los espermatozoides puede sobrevivir por un mayor tiempo, esto se puede deberse a que en el oviducto existen macromoléculas que tienen efectos descapacitantes como lo reporta Sasanami et al. (2013).

Los resultados obtenidos en los demás tratamientos coinciden con los del estudio de Madeddu et al. (2010), el cual también comenta que sin ningún componente que proteja al espermatozoide tanto metabólicamente, así como en la membrana celular, su viabilidad se verá reducida con el paso del tiempo; por lo cual podemos hacer referencia que las proteínas que adicionamos tienen esta función en el espermatozoide.

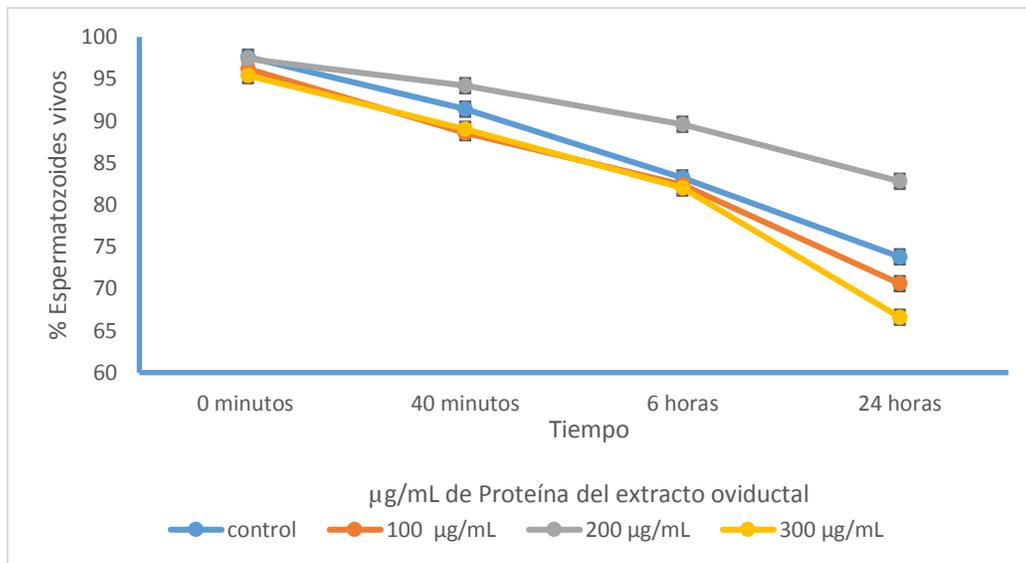


Figura 3. Viabilidad espermática con diferentes tratamientos evaluados a diferentes tiempos observando que el tratamiento de 200 µg/mL aumenta la viabilidad significativamente con respecto a los demás tratamientos.

7.4.2. Movilidad espermática

Los resultados de la movilidad espermática se muestran en Figura 4. En el tiempo 0 se muestra una disminución drástica en la movilidad, se observó diferencia significativa en el control con respecto a los tratamientos. En las tres concentraciones de proteína se muestra una disminución en el porcentaje de movilidad del 60% con respecto al control del 86%; a los 40 minutos continua la disminución en la movilidad, presentó diferencias significativas del control con los tratamientos, teniendo un rango del 34% al 71% de movilidad; a las 6 horas los tratamientos de 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL presentaron un descenso significativo de la movilidad espermática (14%, 9.6% y 9.4% respectivamente) con respecto al tratamiento control que obtuvo 34%; a las 24 horas todos los tratamientos descendieron 7.2% a 8.4% manteniendo su movilidad el control en 19%.

Estos resultados nos indican que al suministrar los tratamientos con proteínas la movilidad se ve disminuida por efecto de las proteínas, esto coincide con Sasanami et al., 2013 reportando el mismo efecto al incubo espermatozoides con extractos de la UUV. el trabajo de Yan et al. (2017) en el cual reportan que a través del tiempo

se ve disminuida la movilidad en forma progresiva hasta un 8% a las 24 horas posteriores de la obtención del eyaculado en presencia de las proteínas.

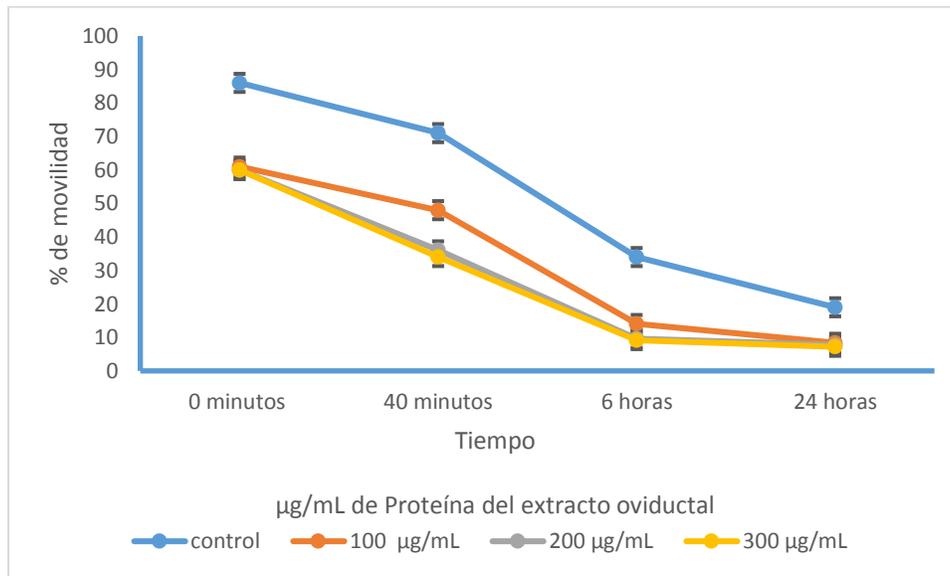


Figura 4. Porcentaje de movilidad espermática con diferentes tratamientos observando el efecto de las proteínas disminuyendo la movilidad significativamente ($P < 0.05$)

7.5. Efecto de las proteínas del oviducto en el patrón de estado fisiológico espermático

7.5.1. Espermatozoides con patrón a (intactos)

En el tiempo 0, el porcentaje de espermatozoides intactos (Figura 5) no presentó ninguna diferencia significativa en los diferentes tratamientos (control, 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL) se observa en la mayor concentración de proteína el 86% de espermatozoides intactos comparado con el control que fue del 92 %; a los 40 minutos, el porcentaje de espermatozoides intactos no presentó ninguna diferencia significativa en los diferentes tratamientos con respecto al control, mayor concentración (espero que corresponda) 83.3% vs 88.7%; a las 6 horas el concentración de 200 µg/mL presentó un porcentaje significativamente mayor (71.3%) con respecto a los demás tratamientos los cuales presentaron un porcentaje del 63.3% al 65.3% a que tratamiento corresponden los valores; a las 24 horas nuevamente el tratamiento de 200 µg/mL presento un porcentaje

significativamente mayor (38%) con respecto a los demás tratamientos, los cuales presentaron un porcentaje del 2.7% al 10%.

Nuestros resultados demuestran que al suplementar con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína oviductal mantiene el número de células intactas durante un mayor tiempo, 6 y 24 horas, esto significa que al proveer de proteínas oviductales a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los espermatozoides, pueden mantener su estado intacto, disminuyendo así los efectos de la refrigeración la cual puede llevar a cabo la capacitación y reacción acrosomal, así como el desgaste metabólico de los espermatozoides, estos resultados coinciden con lo reportado por Sasanami et al., 2013, al mencionar los factores descapacitantes de estas moléculas.

Los demás tratamientos se comportaron igual que el control esto debido a que la concentración de proteínas oviductales no fue la adecuada para que hubiera un aumento en los espermatozoides intactos, esta tendencia de la disminución de espermatozoides intactos a través del tiempo es muy similar por la reportada por Mocél et al. (2010).

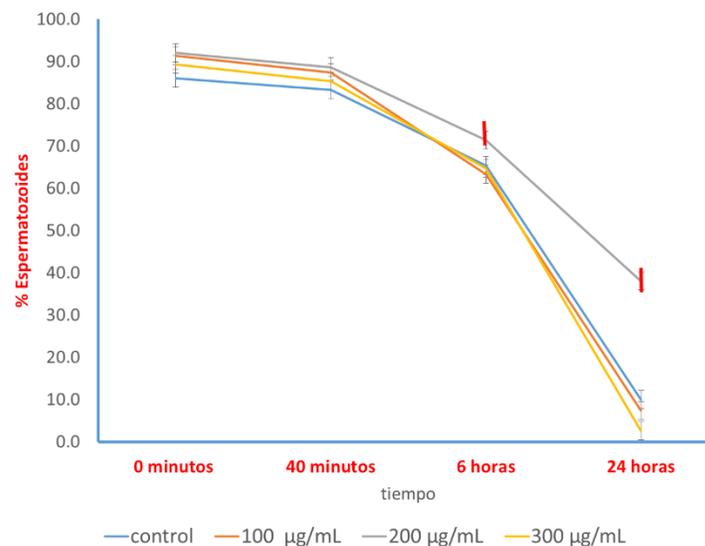


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides intactos con diferentes tratamientos evaluados a diferentes tiempos ($P < 0.05$).

7.5.2. Espermatozoides con patrón b (capacitados)

En el tiempo 0 (Figura 6) el tratamiento de 200 µg/mL presentó un porcentaje de espermatozoides capacitados significativamente menor (4%) con respecto a los demás tratamientos, los cuales presentaron un porcentaje del 7.33% al 7.34%, a los 40 minutos, la presencia de las proteínas oviductales no afecta el porcentaje de espermatozoides capacitados, se mantienen sin cambio no presentó ninguna diferencia significativa en los diferentes tratamientos obteniendo un rango de concentración que corresponde a estos valores del 8% al 867 %, a las 6 horas, se observa un ligero incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados no mostrando ninguna diferencia significativa entre los diferentes tratamientos y el control, en un rango del 16% al 17.33%, sin embargo a las 24 horas, se observó una ligera disminución en la concentración de 200 µg/mL presentó un porcentaje de un 13.33% con respecto a los demás tratamientos, los cuales presentaron un porcentaje del 18% al 19.33%.

Estos resultados significan que al suministrar proteínas oviductales a una concentración de 200 µg/mL a los espermatozoides, a las 0 y 24 horas disminuyen el porcentaje de espermatozoides capacitados, disminuyendo así los efectos de la refrigeración la cual puede llevar a cabo la capacitación y reacción acrosomal, así como el desgaste metabólico de dicho espermatozoide por no encontrarse en un medio oviductal, que también reporta Sasanami et al., 2013, al mencionar los factores descapacitantes de estas moléculas.

Los demás tratamientos se comportaron igual que el control esto debido a que la concentración de proteínas oviductales no fue la adecuada para que hubiera una disminución en los espermatozoides capacitados, esta tendencia de la disminución de espermatozoides intactos a través del tiempo es similar por la reportada por Mocél et al. (2010).

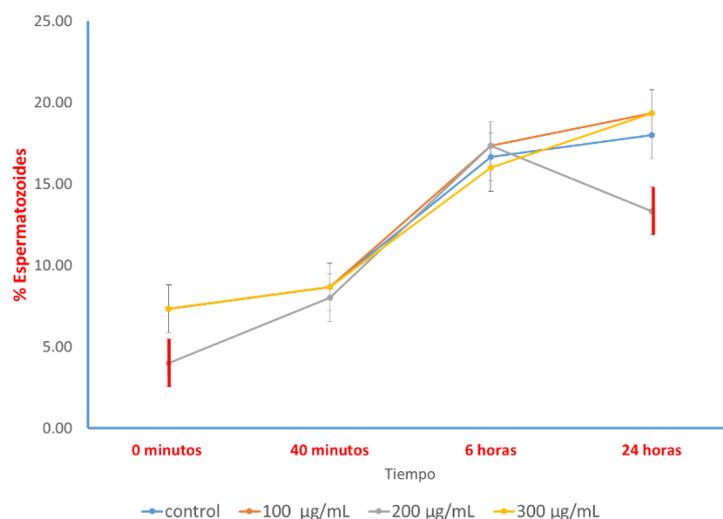


Figura 6. Porcentaje de espermatozoides capacitados con diferentes tratamientos evaluados a diferentes tiempos observando diferencias significativas en el tratamiento de 200 µg/mL ($P < 0.05$).

7.5.3. Espermatozoides con patrón c (con reacción acrosomal)

La Figura 7 muestra, el porcentaje de espermatozoides reaccionados, en el tiempo 0 no se observó diferencia significativa en los diferentes tratamientos (control, 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL) presentaron valores entre el 1.33% al 4%; a los 40 minutos, el porcentaje de espermatozoides reaccionados se mantiene sin cambio, no presentan diferencia significativa entre los diferentes tratamientos y el control, obteniendo un rango del 3.33% al 8%, sin embargo se observa una ligera disminución en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en la concentración de 200 µg/mL; a partir de las 6 horas se muestra un ligero incremento en el número de espermatozoides con el acrosoma reaccionado, el tratamiento de 200 µg/mL presentó un porcentaje significativamente menor (11.33%) con respecto a los demás tratamientos, los cuales presentaron un porcentaje del 18% al 19.34%; a las 24 horas el tratamiento de 200 µg/mL presentó un porcentaje significativamente menor (48.67%) con respecto a los demás tratamientos, los cuales presentaron un porcentaje del 72% al 78%.

Estos resultados sugieren que el suplemento de proteínas oviductales a una concentración de 200 µg/mL disminuyen el porcentaje de espermatozoides

reaccionados, disminuyendo los efectos de la refrigeración, la cual puede llevar a cabo la capacitación y reacción acrosomal, así como el desgaste metabólico de dicho espermatozoide (Sasanami et al., 2013),

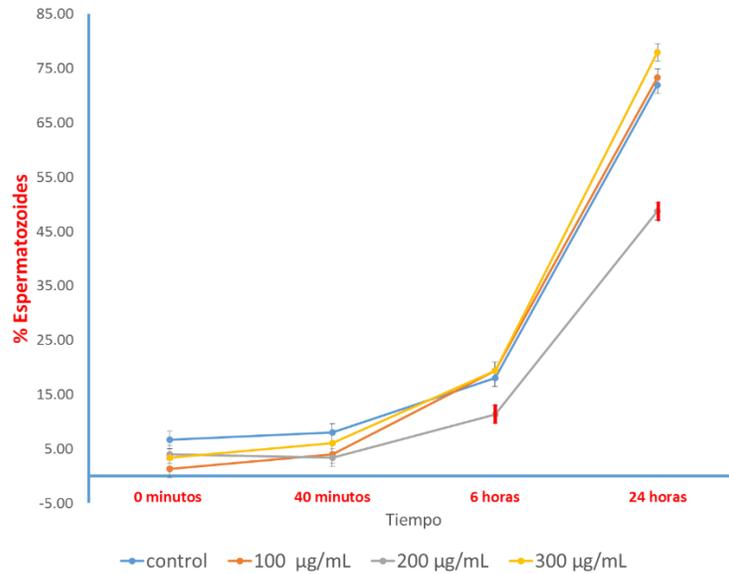


Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal con diferentes tratamientos evaluados a diferentes tiempos observando diferencias significativas en el tratamiento de 200 µg/mL ($P < 0.05$).

7.6. Parámetros en espermatozoides co incubados con MVP.

7.6.1. Espermatozoides con patrón a (intactos) con MVP

En el tiempo 0 (Figura 8), el porcentaje de espermatozoides intactos con MPV no presentó cambios significativos tanto en el control como en los diferentes tratamientos (100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL) obteniendo un porcentaje entre el 80.66% al 84%. A los 40 minutos, el porcentaje de espermatozoides intactos con MVP no presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 70.67% al 76.67%. A las 6 horas, disminuye el porcentaje de espermatozoides intactos con MVP no presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 50% al 53.34% y después de 24 horas de conservación, el porcentaje de espermatozoides intactos con MVP no presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 6.67% al 9.33%.

Lo anterior, indica que los tratamientos no arrestan los espermatozoides en un solo estado fisiológico, por lo cual es capaz de llevar a cabo todos los procesos para poder realizar la fertilización y por ende el espermatozoide mantiene su viabilidad. Los resultados obtenidos corresponde de igual manera a los obtenidos por Horrocks et al. (2000).

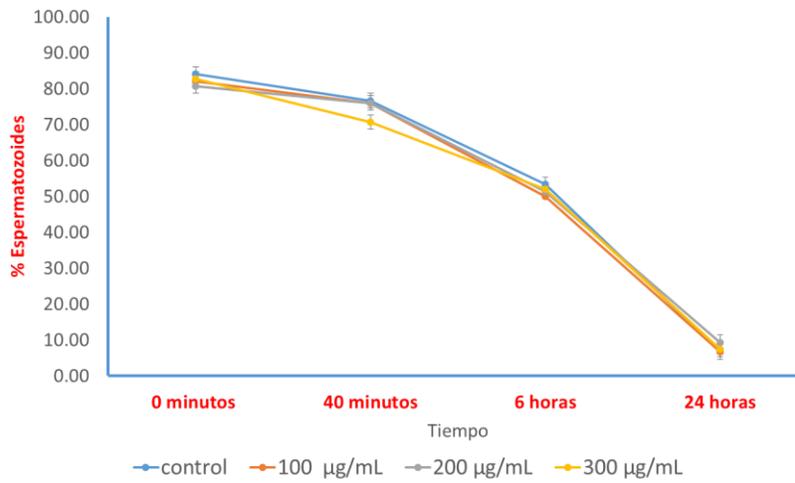


Figura 8. Porcentaje de espermatozoides intactos co incubados con MVP con diferentes tratamientos evaluados a diferentes tiempos (P<0.05).

7.6.2. Espermatozoides con patrón b (capacitados) con MVP
 Hay que cambiar la redacción del inicio de párrafo es el mismo, En el tiempo 0 (Figura 9), el porcentaje de espermatozoides capacitados co incubados con MPV no presentó ninguna diferencia significativa en los diferentes tratamientos (control, 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL) obteniendo un rango del 8% al 10%. A 40 minutos de conservación, el porcentaje de espermatozoides capacitados co incubados con MVP no presentó ninguna diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 12% al 14.67%, después de 6 horas, el porcentaje de espermatozoides capacitados co incubados con MVP no presentó ninguna diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 23.33% al 25.33% y a las 24 horas de conservación, el porcentaje de espermatozoides capacitados co incubados con MVP no presentó ninguna

diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 15.33% al 17.33%.

Nuevamente indica que los tratamientos no arrestan los espermatozoides en un solo estado fisiológico, por lo cual es capaz de llevar a cabo todos los procesos para poder realizar la fertilización y por ende el espermatozoide sea viable. Los resultados obtenidos corresponde de igual manera a los obtenidos por Horrocks et al. (2000), en el cual el número de espermatozoides capacitados aumentan a medida que avanza el tiempo, siendo este un fenómeno normal, por el desgaste que tiene el espermatozoide.

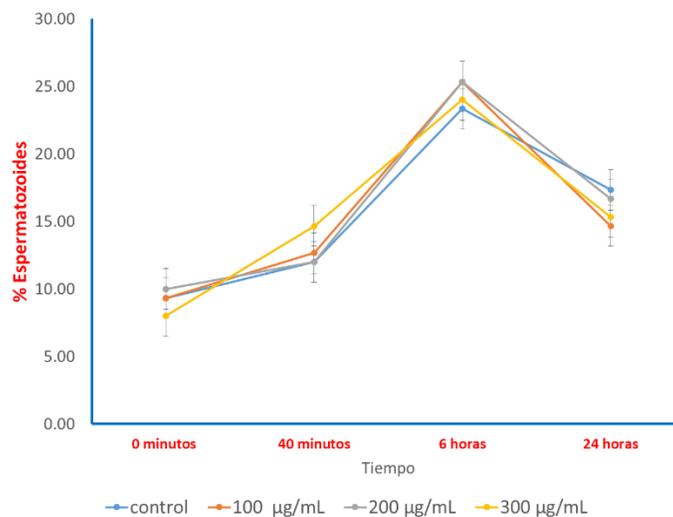


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides capacitados co incubados con MVP con diferentes tratamientos evaluados a diferentes tiempos (P<0.05).

7.6.3. Espermatozoides con patrón c (reaccionados) con incubados con MVP.

En el tiempo 0 el porcentaje de espermatozoides que presentaron reacción acrosomal inducida por la co incubación con MPV (Figura 10). No presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos (control, 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL) obteniendo un rango del 6.67% al 9.33%; a los 40 minutos, el porcentaje de espermatozoides reaccionados con MVP no presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 11.33% al 14.67%; a las 6 horas, el porcentaje de espermatozoides reaccionados con MVP no

presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 23.33% al 24.67% y a las 24 horas, el porcentaje de espermatozoides reaccionados con MVP no presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos, obteniendo un rango del 74% al 78.67%.

Lo anterior indica que los tratamientos no arrestan los espermatozoides en un solo estado fisiológico, por lo cual es capaz de llevar a cabo todos los procesos para poder realizar la fertilización y por ende el espermatozoide sea viable. Los resultados obtenidos corresponde de igual manera a los obtenidos por Horrocks et al., 2000 en el cual el número de espermatozoides reaccionados aumentan a medida que avanza el tiempo, siendo este un fenómeno normal, por el desgaste que tiene el espermatozoide.

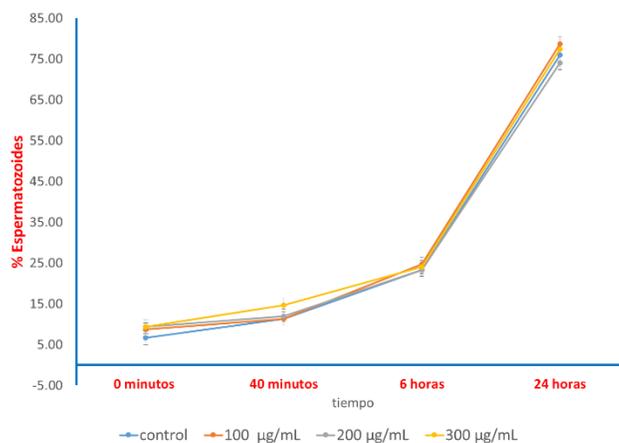


Figura 10. Porcentaje de espermatozoides reaccionados con MVP con diferentes tratamientos evaluados a diferentes tiempos (P<0.05).

7.7. Evaluación básica espermática post descongelación

7.7.1. Viabilidad espermática post descongelación

El tratamiento control y el de 200 µg/mL (Figura 11) no mostraron diferencias significativas entre ellos (83.8% y 83.6% respectivamente), pero se observó una diferencia significativa mayor con respecto a los tratamientos de 100 µg/mL (69.8%) y 300 µg/mL (67.2%).

Esto significa que al utilizar concentraciones de 100 µg/mL y 300 µg/mL aumenta la mortalidad posterior a la criopreservación, por ende la concentración más adecuada es la de 200 µg/mL.

Los resultados obtenidos son diferentes a los publicados por Rakha et al. (2016), esto debido a que uso una especie más silvestre y con menor calidad inicial.

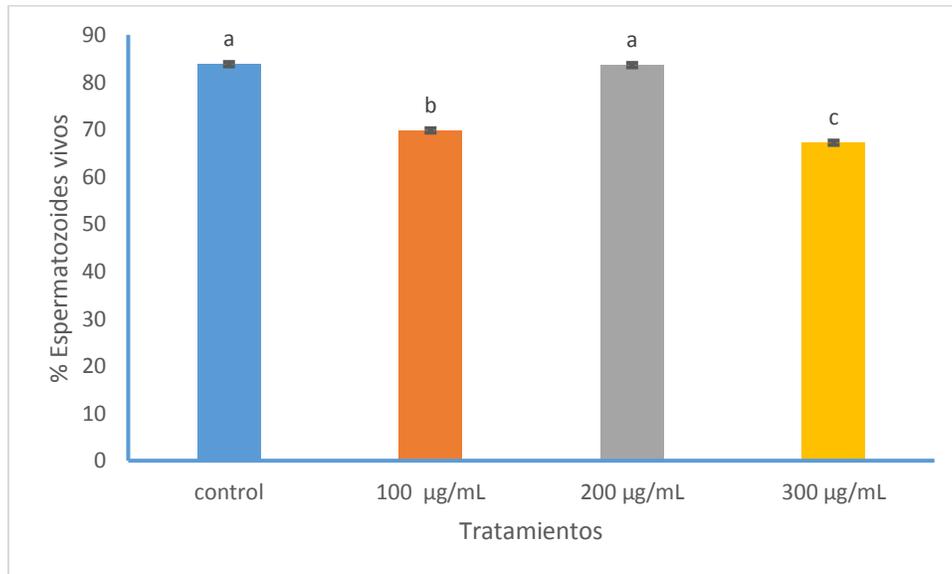


Figura 11. Porcentaje de viabilidad espermática post descongelación, con diferentes tratamientos (letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$)

7.7.2. Movilidad espermática post descongelación

El tratamiento control (61%) no presenta diferencias significativas con el tratamiento de 100 µg/mL (58%), pero el porcentaje de movilidad espermática del tratamiento control es significativamente mayor que el de los tratamientos de 200 µg/mL (56%) y 300 µg/mL (46%); hubo diferencias estadísticas significativas. El tratamiento de 100 µg/mL no presenta diferencias significativas con el tratamiento de 200 µg/mL, pero si tiene un mayor porcentaje significativo respecto al tratamiento de 300 µg/mL y por último el tratamiento de 200 µg/mL no tiene diferencias significativas con el tratamiento de 300 µg/mL (Figura 12).

Lo anterior demuestra que al usar los tratamientos con proteínas oviductales la movilidad disminuye, esto causado por el efecto de las proteínas (Sasanami et al., 2013).

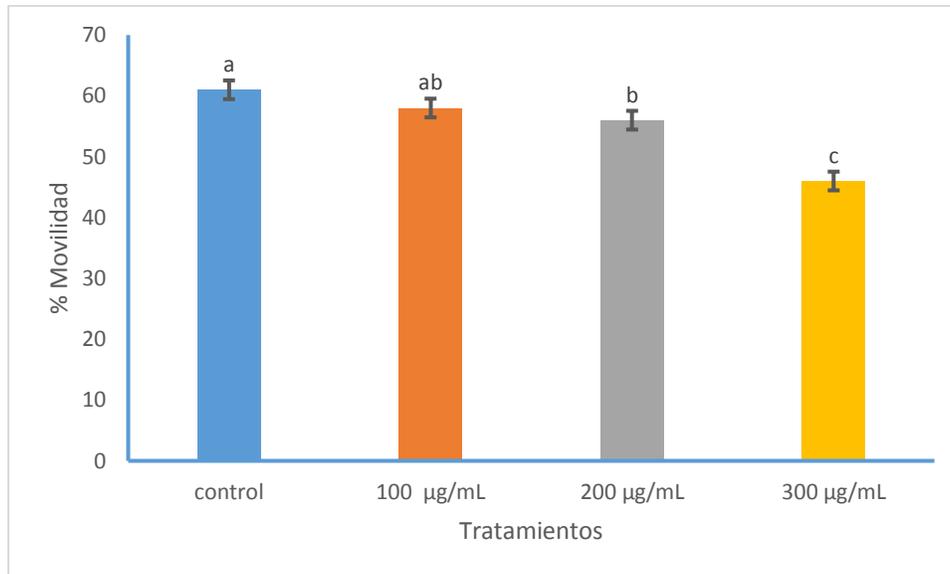


Figura 12. Porcentaje de movilidad espermática post descongelación con diferentes tratamientos ((letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$))

Determinación de patrón estado fisiológico espermático post descongelación

7.7.3. Espermatozoides con patrón a (intactos) post descongelación.

Con el tratamiento de 200 µg/mL hay un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides intactos (84%) a comparación de los demás tratamientos; el tratamiento de 300 µg/mL no presenta diferencias significativas con el de 100 µg/mL (46% y 50% respectivamente), y el tratamiento control obtuvo un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides intactos (58%) a comparación de los tratamientos de 100 µg/mL y 300 µg/mL (figura 13).

Resultando que al añadir el tratamiento con 200 µg/mL aumenta el número de espermatozoides intactos demostrando que estas proteínas funcionan como un tipo crioprotector por sus propiedades descapacitantes (Sasanami et al., 2013). Los demás tratamientos se comportaron de manera similar a lo reportado por Amani et al. (2015).

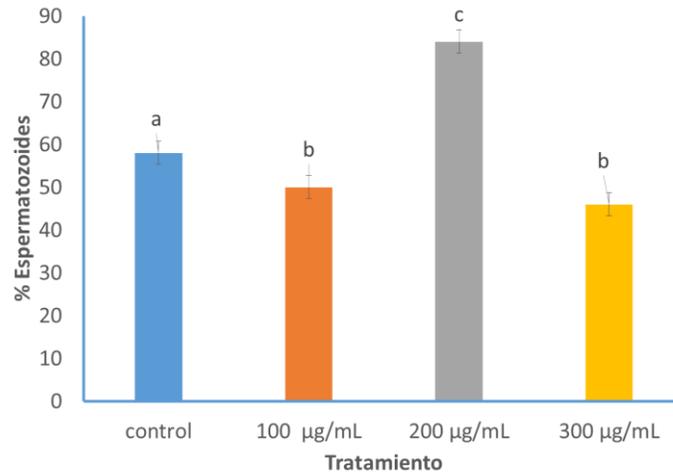


Figura 13. Porcentaje de espermatozoides intactos post descongelación con diferentes tratamientos (letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$)

7.7.4. Espermatozoides con patrón b (capacitados) post descongelación

El tratamiento con 200 µg/mL obtuvo un porcentaje significativamente menor de espermatozoides capacitados (10.67%) con respecto a los tratamientos control (14.67%), 100 µg/mL (18%) y 300 µg/mL (17.33%) (Figura 14).

Resultando que al añadir el tratamiento con 200 µg/mL disminuye el número de espermatozoides capacitados, demostrando que estas proteínas funcionan como un tipo crioprotector por sus propiedades descapacitantes (Sasanami et al., 2013). Los demás tratamientos se comportaron de manera similar a lo reportado por Amani et al. (2015).

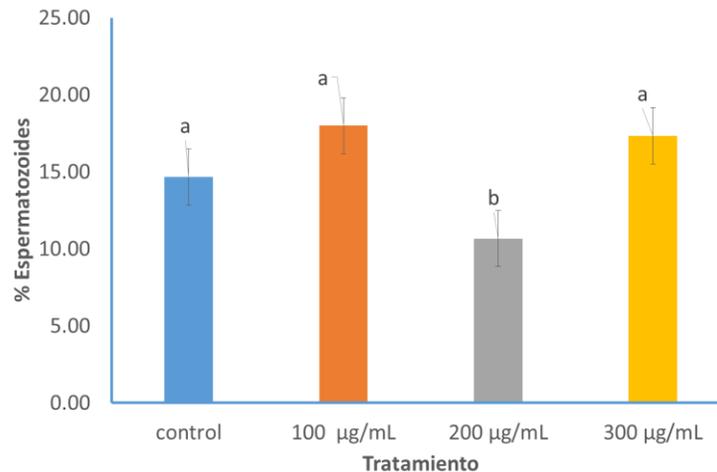


Figura 14. Porcentaje de espermatozoides capacitados post descongelación con diferentes tratamientos (letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$)

7.7.5. Espermatozoides con patrón c (con reacción acrosomal) post descongelación

El tratamiento de 200 µg/mL obtuvo un porcentaje significativamente menor de espermatozoides reaccionados (5.33%) con respecto a los tratamientos control (27.33%), 100 µg/mL (32%) y 300 µg/mL (36.67%); el tratamiento control no mostro diferencias significativas con el tratamiento de 100 µg/mL, al contrario del tratamiento de 300 µg/mL en la cual si hubo diferencia significativa; el tratamiento de 100 µg/mL no mostro diferencias significativas con respecto al de 300 µg/mL (Figura 15).

Resultando que al añadir el tratamiento con 200 µg/mL disminuye el número de espermatozoides reaccionados, demostrando que estas proteínas funcionan como un tipo crioprotector por sus propiedades descapacitantes (Sasanami et al., 2013). Los demás tratamientos se comportaron de manera similar a lo reportado por Amani et al. (2015).

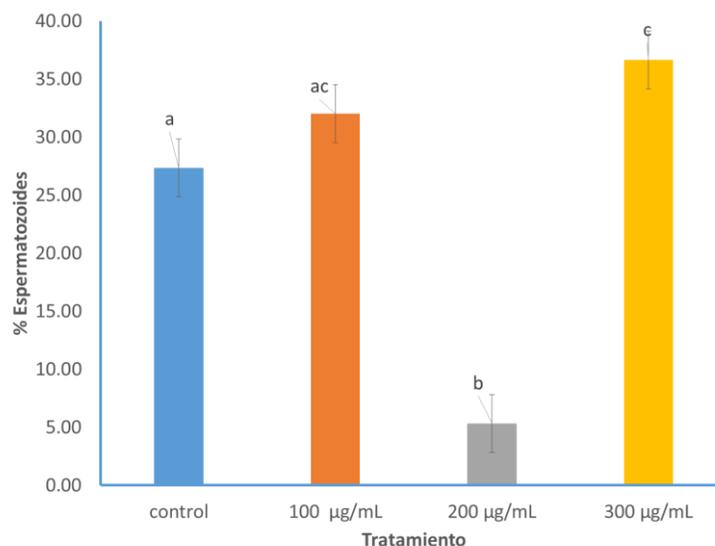


Figura 15. Porcentaje de espermatozoides reaccionados post descongelación con diferentes tratamientos (letras diferentes hay diferencia significativa $P<0.05$)

7.8. Parámetros en espermatozoides co incubados con MVP post descongelación

7.8.1. Espermatozoides descongelados con patrón a (intactos) con incubados con MVP

Ninguno de los diferentes tratamientos: control (22%), 100 µg/mL (21.33%), 200 µg/mL 20% y 300 µg/mL (21.33%) tienen diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides intactos (Figura 16).

Lo que indica que los tratamientos no arrestan los espermatozoides en un solo estado fisiológico. Los resultados obtenidos fueron mayores a los de Horrocks et al. (2000), debido al proceso de la criopreservación que se sabe produce un efecto de criocapacitación.

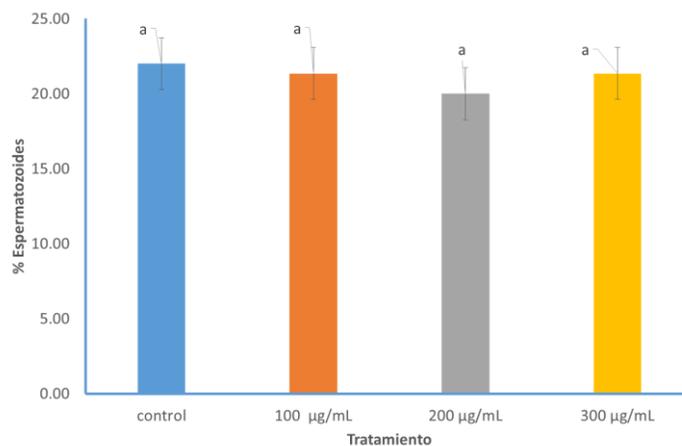


Figura 16. Porcentaje de espermatozoides intactos post descongelación con diferentes tratamientos (letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$)

7.8.2. Espermatozoides descongelados con patrón b (capacitados) co incubados con MVP

Ninguno de los diferentes tratamientos: control (12.67%), 100 µg/mL (10.67%), 200 µg/mL (10.67%) y 300 µg/mL (10%) tienen diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides capacitados (Figura 17).

Lo que indica que los tratamientos no arrestan los espermatozoides en un solo estado fisiológico, por lo cual es capaz de llevar a cabo todos los procesos para poder realizar la fertilización y por ende el espermatozoide sea viable. Los resultados obtenidos fueron mayores a los de Horrocks et al. (2000), debido al proceso de la criopreservación que se sabe produce un efecto de criocapacitación.

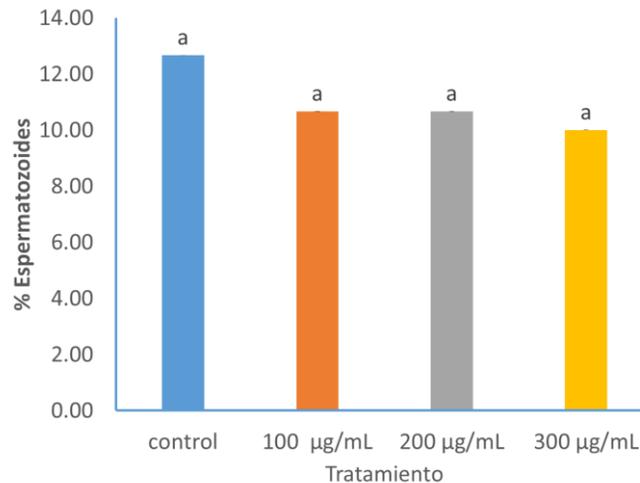


Figura 17. Porcentaje de espermatozoides capacitados post descongelación con diferentes tratamientos (letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$)

7.8.3. Espermatozoides descongelados con patrón c (reaccionados) co incubados con MVP

Ninguno de los diferentes tratamientos: control (65.33%), 100 µg/mL (68%), 200 µg/mL (69.33%) y 300 µg/mL (68.66%) tienen diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides reaccionados (Figura 18). Lo anterior indica que los tratamientos no arrestan los espermatozoides en un solo estado fisiológico, por lo cual es capaz de llevar a cabo todos los procesos para poder realizar la fertilización y por ende el espermatozoide sea viable. Los resultados obtenidos fueron mayores a los de Horrocks et al. (2000), debido al proceso de la criopreservación que se sabe produce un efecto de criocapacitación.

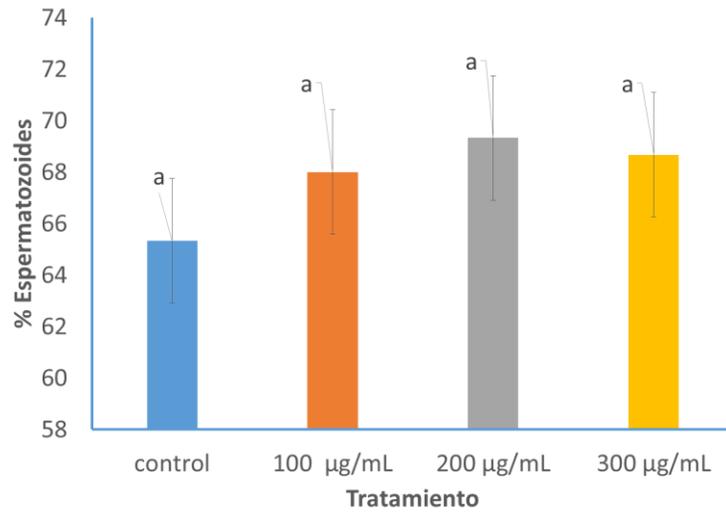


Figura 18. Porcentaje de espermatozoides reaccionados post descongelación con diferentes tratamientos (Letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$)

7.9. Fertilidad

Cuadro 3. Fertilidad obtenida con semen conservado en diferente tratamiento
(letras diferentes hay diferencia significativa $P < 0.05$)

Tratamiento	N° de huevos		% de fertilidad
	Fértil	Infértil	
Eyaculado fresco + Lake ^a	38	5	88.37
Eyaculado fresco + Lake + FPLUUV 200 µg/mL/ml ^a	32	5	86.49
Eyaculado descongelado + Lake + DMA ^b	28	15	65.12
Eyaculado descongelado + Lake + FPLUUV 200 µg/mL/ml ^a	32	7	82.05

FPLUUV= Fracción proteica del lavado de la unión útero vaginal., DMA= Dimetilacetamida como crioprotector., Lake = Medio de conservación seminal (tratamientos con letra diferente existe diferencia significativa)

Se observa que el porcentaje de fertilidad fue similar utilizando eyaculados frescos sin y conservado con suplemento de proteínas (88.37% y 86.49% respectivamente), al igual que usando eyaculados descongelados con proteínas (82.05%), únicamente hay un decremento significativo usando simplemente eyaculado descongelado (65.12%) (Cuadro 3).

Los resultados demostraron que al utilizar las proteínas oviductales se puede inducir una descapacitación espermática, la cual permite mantener la viabilidad espermática, además de disminuir los efectos negativos de la criopreservación llegando a ser igual de fértil que usar semen fresco, esto recalca el efecto

descapacitante, además del efecto crioprotector de estas proteínas; dando como resultado la creación de un nuevo medio de criopreservación.

Investigadores como Partyka et al. (2015 y 2018), Fattah et al. (2017), Noorani et al. (2015), han utilizado la suplementación de medio para la criopreservación teniendo como resultado cierta aproximación en la fertilidad a el resultado obtenido (70% al 78%) esto podría ser distinto por los protocolos de congelación, los medios utilizados, así como los crioprotectores.

8. CONCLUSIONES

- Los resultados de este estudio, demuestran que el suplemento *in vitro* de proteínas oviductales, favorece la conservación en fresco y aumenta los parámetros de viabilidad espermática post descongelación.
- La inducción de la reacción acrosomal utilizando MVP en semen conservado en fresco o post descongelación, demuestra que el efecto determinado como descapacitación espermática, es un estado fisiológico reversible, que confirma la viabilidad espermática demostrada con los resultados de fertilidad obtenidos.
- Con lo anterior, es posible demostrar, que puede inducirse una descapacitación espermática *in vitro*, de los espermatozoides de gallo.

9. PERSPECTIVAS

Aún se desconoce el mecanismo por el cual estas proteínas pueden modificar los estados fisiológicos del espermatozoide, por lo que se requiere hacer un estudio celular y molecular más exhaustivo, al igual de identificar las proteínas obtenidas del oviducto.

Una vez identificadas y aisladas se deberán probar en los medios de criopreservación para verificar si su efecto es el mismo que se observó en este estudio.

Si los resultados son satisfactorios; se propone implementar este medio de criopreservación en las técnicas de reproducción asistida, y posteriormente estudiar si se puede aplicar este procedimiento en diferentes especies de aves, para así generar medios especie-específicos.

10. BIBLIOGRAFIA

Ahammad M., Miyazato T., Nishino C., Tatemoto H., Okura N., Okamoto S., Kawamoto Y., Nakada T. (2013). Effects of fluid secreted from the uterus on duration of fertile egg production in hens, and survivability and penetrability of fowl sperm in vitro. *The Journal of Poultry Science*, 50: 74-82.

Aire T. (2007). Anatomy of the Male Reproductive Tract and organs. In: Jamieson BGM. (ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds*, Vol. 1, Phylogeny, morphology, hormones and fertilization, New Hampshire: Science Publishers, Inc., 03479, USA; Plymouth, UK. 37-114.

Amini M., Kohram H., Zare-Shahaneh A., Zhandi M., Sharideh H., Nabi M. (2015). The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*, 70(3), 226-232. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.03.001

Bakst M. (2011). Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *The Journal of Animal Science*, 89: 1323–1329.

Bakst M., Akuffo V. (2007). Alkaline Phosphatase reactivity in the vagina and uterovaginal junction sperm-storage tubules of turkeys in egg production: implications for sperm storage. *British Poultry Science*, 69: 248-253.

Bakst M., Bauchan G. (2015). Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology*, 2015:83: 1438-1444.

Bakst M., Wishart G., Brullard J. (1994). Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. *The Journal of Poultry Science*, 5: 117–143.

Barbas J., Mascarenhas R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1): 49-62.

Blanco J., Gee G., Wildt D., Donoghue A. (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., Wildt D., Höfle U., Voelker W., Donoghue A. (2009). Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, 71(1): 200-213.

Blesbois E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63(2): 213-222.

Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F., Mignon-Grasteau S., Saint M., Mialon M. (2008). Predictors of success of semencryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69, 252–261.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Brandstätter R. (2003). Encoding time of day and time of year by the avian circadian system. *Journal of Neuroendocrinology* 15(4): 398-404

Burrows W., Quinn J. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 16(1): 19-24.

Challah T., Seigneurin F., Blesbois E., Brillard J. (1999). *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology* 39: 185-191.

Cunningham J. (1999). *Fisiologia Veterinaria* 2da edicion. Ed. MCLraw-hill interamericana. México, D.F. p: 531-532.

Das S., Nagasaka N., Yoshimura Y. (2006). Changes in the expression of estrogen receptor mRNA in the utero-vaginal junction containing sperm storage tubules in laying hens after repeated artificial insemination. *Theriogenology*, 65:893–900 doi:10.1016/j.theriogenology.2005.07.004

Dawson A., Sharp P. (2007). Photorefractoriness in birds—photoperiodic and nonphotoperiodic control. *General and Comparative Endocrinology*, 153, 378–384.

Del Río M. Godoy A., Toro A., Orellana R., Cortés M., Moreno R., Vigil P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*, 5(4):368-73

Donoghue A., Wishart G. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62:213–232

Duchi D., Almela V., Peinado R., Poto R. (2009). Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana. Recuperado el Enero de 2017, de agroecologia.net: http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPREDSERVACION.pdf

Ducolomb Y. (2004). Tesis (Doctorado): “Estudio de las fracciones proteínicas del fluidofolicular porcino en la maduración, fertilización in vitro y polispermia de ovocitos de cerdo”. México, D. F. Universidad Autónoma Metropolitana – I. pp 123.

Etches J. (1996). Artificial insemination. *Reproduction in poultry*. Edited by international, C. Cambridge. Ontario Canada, CAB International. pp 234-261.

Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., & Najafi, A. (2017). I-carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74, 148-153. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.10.009

Fernández D. (1985). El complejo adivina-biotina y su uso en la biología molecular. *Interferón y Biotecnología*, 2:137-141.

Foye-Jackson O., Long J., Bakst M., Blomberg L., Akuffo V., Silva M., Guthrie H., McMurtry J. (2011). Oviductal expression of avidin, avidin-related protein-2, and progesterone receptor in turkey hens in relation to sperm storage: Effects of oviduct tissue type, sperm presence, and turkey line. *Poultry Science*, 90:1539–1547 doi: 10.3382/ps.2010-01159.

Freedman S., Akuffo V., Bakst M. (2001). Evidence for the innervation of sperm storage tubules in the oviduct for the turkey (*Meleagris Gallopavo*). *Reproduction*, 121: 809-814.

Froman D. (2003). Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod* 69: 248-253.

Giesen A., Sexton T. (1983). Beltsville poultry semen extender 7. Comparison of commercial diluents for holding turkey semen six hours at 15°C. *Poultry Science*, 62, 379–381.

Hemmings N., Birkhead T., Brillard J., Froment P., Briere S. (2015). Timing associated with oviductal sperm storage and release after artificial insemination in domestic hens. *Theriogenology* 83:1174–1178.

Herrera J., Avalos A., Rodríguez I., González J., Rosales A. (2003). Técnicas de reproducción asistida en aves domésticas y silvestres., manual 41, CBS, UAM X.

Herrera J., Guzmán A., Vargas A., Ávalos A., Rosales A. (2017). Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved eyaculado of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*). *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 49, 39-43.

Herrera J., Quintana J., López M., Betancourt M., 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.

Hiyama G., Matsuzaki M., Mizushima S., Dohra H., Keisuke Ikegami K., Yoshimura T., Shiba K., Inaba K., Sasanami T. (2014). Sperm activation by heat shock protein 70 supports the migration of sperm released from sperm storage

tubules in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, 147:167–178 DOI: 10.1530/REP-13-0439.

Holt W. (2011). Mechanism of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. *Reproduction In Domestic Animals Journal*, 46: 68–74.

Horrocks, A. J., Stewart, S., Jackson, L., & Wishart, G. J. (2000). Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(1), 84-89. doi:10.1006/bbrc.2000.3766

International Chicken Genome Sequencing Consortium (ICGSC) (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate. *Nature*, 432.

Ito T., Yoshizaki N., Tokumoto T., Ono H., Yoshimura T., Tsukada A., Kansaku N., Sasanami T. (2011). Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. *Endocrinology*, 152, 3952–3962

Kang L., Cui X., Zhang Y., Yang C., Jiang Y. (2013). Identification of miRNAs associated with sexual maturity in chicken ovary by Illumina small RNA Deep sequencing. *BMC Genomics*, 14:352.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

Lake P. (1960). Studies on the dilution and storage of fowl semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1, 30–35.

Lake P. (1966). Physiology and biochemistry of poultry semen. *Advances in Reproductive Physiology*, 1, 93–123

Lake P. (1978). The principles and practice of semen collection and preservation in birds. *Symposia of the Zoological Society of London*, 43, 31–49.

Lake P., Stewart J. (1978). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen an improved method. *British Poultry Science*, 19: 187- 194.

Lemoine M., Dupont J., Guillory V., Tesseraud S., Blesbois E. (2009). Potential Involvement of Several Signaling Pathways in Initiation of the Chicken Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction*, 81: 657–665.

Lemoine M., Grasseau M., Brillard I., Blesbois E. (2008). A reappraisal of the factors involved in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction*, 136(4): 391.

Lemoine M., Mignon-Grasteau I., Grasseau M., Magistrini E., Blesbois E. (2011). Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*, 75:122-130.

Liu H., Long B. (2002). Melatonin blocks inhibitory effects of prolactin on photoperiodic induction of gain in body mass, testicular growth and feather regeneration in the migratory male redheaded bunting (*Emberiza bruniceps*). *Biology of Reproduction*, 66:1068-1075.

Long J, Conn T. (2012). Use of phosphospatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24hours. *Poultry Science*, 91: 1990-1996.

Long J. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges. *Poultry Science*, 85(2): 232-236.

Long J., Purdy P., Zuidberg K., Hiemstra S., Velleman S., Woelders H. (2014). Cryopreservation of turkey semen: Effect of breeding line and freezing method on post-thaw sperm quality, fertilization, and hatching. *Cryobiology*, 68:371–378

Lukaszewicz E. (2002). An effective method for freezing white Italian gander semen. *Theriogenology*, 58, 19–27.

Łukaszewicz E., Chrzanowska M., Jerysz A., Chelmońska B. (2004). Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser*) gander semen. *Animal Reproduction Science*, 80, 163–173.

Madeddu M., Berlinguer F., Pasciu V., Succu S., Satta V., Leoni G., Naitana S. (2010). Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (*Gallus gallus domesticus*) and the barbary partridge (*alectoris*

barbara). *Theriogenology*, 74(6), 1010-1018.

doi:10.1016/j.theriogenology.2010.05.001

Marzesco A., Wilsch-Brauninger M., Dubreuil V., Janich P., Langenfeld K., Thiele C., Huttner W., Corbeil D. (2009). Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol. *FEBS Letters*, 583: 897-902.

Matsuzaki M., Mizushima S., Hiyama G., Hirohashi N., Shiba K., Inaba K., Suzuki T., Dohra H., Ohnishi T., Sato Y., Kohsaka T., Ichikawa Y., Atsumi Y., Yoshimura T., Sasanami T. (2015). Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules. *Scientific Reports*, 5, 17643; doi: 10.1038/srep17643.

Mocé E., Grasseau I., Blesbois E. (2010). Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science*, 122(3), 359-366. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.10.010

Monroy E., Vargas S. (2010). Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 69:4: 200-209.

Moya A. (2003). Introducción de la Inseminación Artificial en el Desarrollo de la Cría de Pavos. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 27(2): 129- 133

Noorani, M., Rahimi, S., Shahverdi, A. H., Sharafi, M., Esmaeili, V., Rahimi, M., & Bazgir, S. (2015). Cryopreservation of rooster semen using hand-made cryopreservation media supplemented with different cryoprotectants. *International Journal of Fertility & Sterility*, 9, 66.

North O., Bell D. (1993). Manual de producción avícola. Ed. Manual moderno, México, D.F. p. 44-45.

Okumura H., Kohno Y., Iwata Y., Mori H., Aoki N., Sato C., Kitajima K., Nadano D., 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.

Partyka A., Łukaszewicz E., Niżański W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77(8), 1497-1504. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.006

Partyka A., Strojcecki M., Niżański W. (2018). Cyclodextrins or cholesterol-loaded-cyclodextrins? A better choice for improved cryosurvival of chicken spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 193, 235-244. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.04.076

Peralta M., Miazzi R., Koncurat M., Vivas, A. (2002). Estudio anatómo-histopatológico y ultraestructural de testículos de pavos (*Meleagris gallopavo*) que recibieron furazolidona en sus dietas. *Reproducción*, 23, 44.

Purdy P., Song Y., Silversides F., Blackburn H. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science*, 88(10): 2184.

Rakha B., Ansarib M., Akhterc S., Hussaina I., Blesbois E. (2016) Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Animal Reproduction Science*, 174, 45-55 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.004>

Ricaurte G. (2006) Importancia de un buen manejo de la reproducción en avicultura. *Revista Electrónica de Veterinaria* [online] 2006, VII (Abril-Sin mes).

Ruiz B., Concepción G., Padilla P., Martínez G., Díez D. (2015). Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa,1407: 1-13.

Santiago J., Castaño C., Toledano A., Coloma M., López A., Prieto M., Campo J. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science*, 90 :2047–2053 doi: 10.3382/ps.2011-01355

- Sasanami T., Matsuzaki M., Mizushima S., Hiyama G. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *The Journal of reproduction and development*, 59(4), 334-338.
- Sauveur B., Reviere M. (1992). Reproduccion de las aves 2da ed. Ed. Mundiprensa. Madrid, España. P. 281-282.
- Schramm G. (1991). Eignung verschiedener gefrierschutzstoffe zur kryoprotektion von hahnensperma. *Monatsh. Veterinärmedizin*, 46: 438-440.
- Sharp J., Blache D. (2003). A neuroendocrine model for prolactin as the key mediator of seasonal breeding in birds under long- and short-day photoperiods. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 81, 350–358
- Sontakke S., Umapathy G., Sivaram V., Kholkute S., Shivaji S. (2004). Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology* 62(1-2): 139-153.
- Thongboonkerd V, Mcleish K, Arthur J & Klein J (2002) Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation, *Kidney International* 62, 1461-1469.
- Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B. (1995) Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, 36, 805–811.
- Váradí É., Végi B., Liptói K., Barna J. (2013). Methods for cryopreservation of guinea fowl sperm. *PLoS ONE* 8:e62759.
- Waclawek M., Foisner R., Nimpf J., Schneider W. (1998). The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 59 1230–1239.
- Yan W., Kanno C., Oshima E., Kuzuma Y., Kim S., Bai H., Kawahara M. (2017). Enhancement of sperm motility and viability by turmeric by-product dietary supplementation in roosters. *Animal Reproduction Science*, 185, 195-204. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.08.021

Yoshimura T. (2010). Neuroendocrine mechanism of seasonal reproduction in birds and mammals. *Animal Science Journal*, 81, 403–410

Yoshimura T., Yasuo S., Watanabe M., Iigo M., Yamamura T., Hirunagi K., Ebihara S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature*, 426, 178–181.

ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA MAESTRÍA

- Redacción de un artículo científico para una revista indexada.

MANUSCRITO ENVIADO A LA REVISTA CRYOLETTERS (JCR)

OVIDUCTAL PROTEINS EFFECT IN ROOSTER'S SPERMATIC CRYOPRESERVATION

Ricardo Camarillo^{1, 2}, Irma Jimenez², Adrián Guzmán³, Ana M Rosales³, Juan J. Pérez-Rivero³, Fernanda Rodríguez³, José A Herrera^{3*}.

*Author for correspondence: herreraaves@gmail.com / jherrerab@correo.xoc.uam.mx

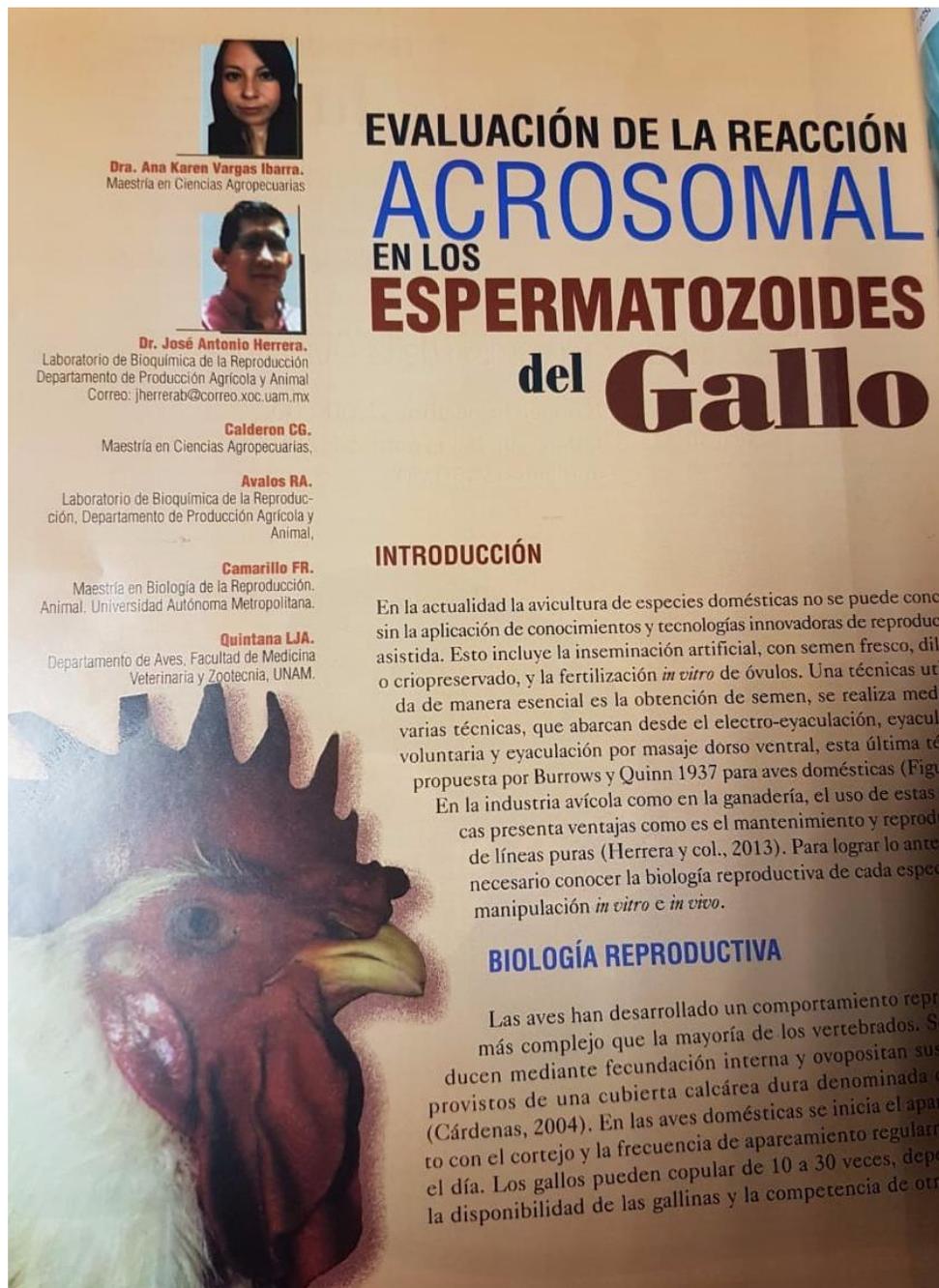
University Autonomous Metropolitan: ¹Mastery in Biology of the Animal Reproduction.
²Department of Health Sciences. UAM-I. San Rafael Atlixco 186, C.P., 09340, CDMX.
³Department of Agricultural and Animal Production. UAM-X. Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, CDMX. C.P. 04960.

Abstract

BACKGROUND: Cryopreservation induces spermatic cryo capacitation, which can decrease thawed spermatozoa's fertilizing capability. **OBJECTIVE:** Evaluate the effect of uterus-vaginal union protein factors to inhibit spermatozoa's cryo capacitation and maintain viability and fertilizing capability of rooster's spermatozoa. **MATERIALS AND METHODS:** Rooster's spermatozoa was cryopreserved using Lake extender supplemented with different hen's uterus-vaginal union protein concentrations, to determine spermatic viability, spermatozoa's physiologic condition and fertilizing capability *in vivo*. **RESULTS:** It was possible to induce spermatic decapacitation *in vitro*, inhibiting cryo capacitation and allowing fertility results comparable to those obtained with fresh semen. **CONCLUSION:** Uterus-vaginal protein extracts induce spermatic decapacitation *in vitro*.

Keywords: Acrosomal reaction, preservation, semen.

- Redacción de un artículo de divulgación para una revista.



EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL EN LOS ESPERMATOZOIDES del Gallo

Dra. Ana Karen Vargas Ibarra.
Maestría en Ciencias Agropecuarias

Dr. José Antonio Herrera.
Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Correo: jherrera@correo.xoc.uam.mx

Calderon CG.
Maestría en Ciencias Agropecuarias,

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

Camarillo FR.
Maestría en Biología de la Reproducción.
Animal, Universidad Autónoma Metropolitana.

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

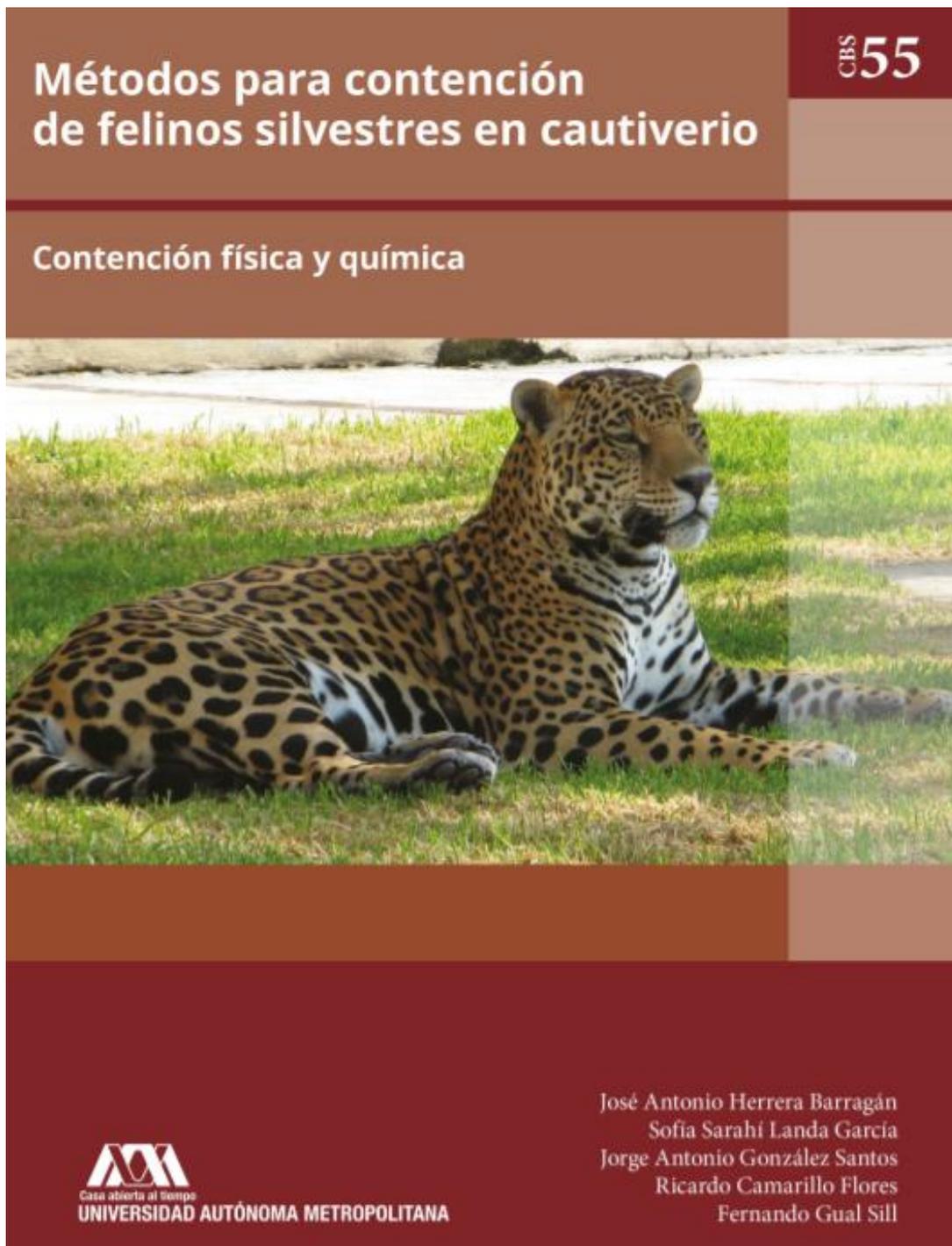
INTRODUCCIÓN

En la actualidad la avicultura de especies domésticas no se puede concebir sin la aplicación de conocimientos y tecnologías innovadoras de reproducción asistida. Esto incluye la inseminación artificial, con semen fresco, diluido o criopreservado, y la fertilización *in vitro* de óvulos. Una técnica utilizada de manera esencial es la obtención de semen, se realiza mediante varias técnicas, que abarcan desde el electro-eyaculación, eyaculación voluntaria y eyaculación por masaje dorso ventral, esta última técnica propuesta por Burrows y Quinn 1937 para aves domésticas (Figura 1). En la industria avícola como en la ganadería, el uso de estas técnicas presenta ventajas como es el mantenimiento y reproducción de líneas puras (Herrera y col., 2013). Para lograr lo anterior es necesario conocer la biología reproductiva de cada especie y la manipulación *in vitro* e *in vivo*.

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

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

- Redacción de un manual publicado por la Universidad Autónoma Metropolitana (CBS 55).



- Trabajos presentados en eventos especiales.

6° Congreso y 2ª feria técnico científico del Departamento de Producción Agrícola y Animal y Animal 2017. V Reunión nacional de Productores y Experimentadores en Producción Orgánica Alternativa.

- EXTRACTOS DE LA UNIÓN ÚTERO VAGINAL UTILIZADOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA DE *GALLUS GALLUS*. Ana Karen Vargas I, Estefany Brenda Sánchez Nochebuena, Itzel Andrea Marín, Ana María Rosales Torres, Fernanda Rodríguez Hernández, **Ricardo Camarillo Flores**, José Antonio Herrera barragán.

- DENSIDAD DEL LIQUIDO OVIDUCTAL A DIFERENTES HORAS DE OVOPOSICION EN GALLINAS DE POSTURA. **Ricardo Camarillo Flores**, Irma Jiménez Morales, Adrián Guzmán Sánchez, José Antonio Herrera Barragán, Ana María Rosales Torres, Prisma Itzel Navarro Guido, Fernanda Rodríguez Fernández, Ana Karen Vargas Ibarra, Samantha A Carcoba Perez.

- SECRECIONES DE LA UNION UTERO VAGINAL VS CONSERVACION ESPERMÁTICA IN VITRO DE *GALLUS GALLUS*. Ana Karen Vargas Ibarra, José Antonio Herrera Barragán, Alejandro Ávalos Rodríguez, Ana María Rosales Torres, **Ricardo Camarillo Flores**, Samantha A Carcoba Pérez, Fernanda Rodríguez Fernández, José Antonio Quintana López.

- EL APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE LOS PSITACIDOS EN MEXICO. Samantha A Carcoba Perez, Ana Karen Vargas Ibarra, **Ricardo Camarillo Flores**, Fernanda Rodríguez Hernández; Alejandro Avalos Rodríguez, Juan Jose Perez Rivero CyC, José Antonio Herrera Barragán

7° Congreso y 3ª feria técnico científico del Departamento de Producción Agrícola y Animal y Animal 2018.

- USO DE PROTEINAS OVIDUCTALES PARA LA CRIOPRESERVACION ESPERMÁTICA DE *Gallus gallus*. **Ricardo Camarillo Flores**, José A Herrera Barragán, Ana K Vargas Ibarra, Fernanda Rodríguez Hernández, Juan J. Pérez Rivero CyC, Samantha A Cárcoba Pérez, Irma Jiménez Morales, Adrian Guzmán Sánchez.
- HEMATOLOGÍA EN AVES RAPACES: UNA APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. José A. Herrera Barragán, Ana K. Vargas Ibarra, **Ricardo Camarillo Flores**, Fernanda Rodríguez Hernández, Juan J. Perez Rivero C. y C., Samantha A. Cárcoba Pérez
- PARÁMETROS DE ESPERMATOZOIDES CONSERVADOS IN VITRO CON SECRECIONES DE LA UNIÓN ÚTERO VAGINAL DE *Gallus gallus*. Ana K Vargas-Ibarra, Alejandro Avalos Rodríguez, Ana M Rosales-Torres, Jose A Quintana-López, **Ricardo Camarillo Flores**, Fernanda Rodríguez Hernández, 2Juan J Pérez Rivero CyC, Jose A Herrera-Barragán



Capacidad de conservación espermática in vitro con suplementos de lavado de la unión útero vaginal de Gallus gallus.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 13 del mes de noviembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JUAN JOSE PEREZ RIVERO CRUZ Y CELIS
M. EN C. FERNANDO GUAL SILL
DR. ADRIAN GUZMAN SANCHEZ
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ




RICARDO CAMARILLO FLORES
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: RICARDO CAMARILLO FLORES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



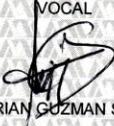
DR. JUAN JOSE PEREZ RIVERO CRUZ Y CELIS

VOCAL



M. EN C. FERNANDO GUAL SILL

VOCAL



DR. ADRIAN GUZMAN SANCHEZ

SECRETARIO



DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ