



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**EVALUACION DE AGENTES CRIOPROTECTORES
PARA LA CRIOPRESERVACION DEL SEMEN
DE GUAJOLOTE CRIOLLO (*Meleagris gallopavo*)**

T E S I S

QUE PRESENTA:

FERNANDO OCHOA AMBRIZ

**COMO REQUISITO PARA
OBTENER EL TITULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESUS CONEJO NAVA
DR. AURELIANO JUAREZ CARATACHEA**

Morelia, Michoacán, diciembre del 2009



**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**EVALUACION DE AGENTES CRIOPROTECTORES
PARA LA CRIOPRESERVACION DEL SEMEN
DE GUAJOLOTE CRIOLLO (*Meleagris gallopavo*)**

T E S I S

QUE PRESENTA:

FERNANDO OCHOA AMBRIZ

**COMO REQUISITO PARA
OBTENER EL TITULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Morelia, Michoacán, diciembre del 2009



**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

U.M.S.N.H.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
PROGRAMA ACREDITADO



www.vetzoo.umich.mx

Aprobación de Impresión del Trabajo

Morelia, Michoacán, a 1 de Diciembre de 2009

C. MC. ORLANDO ARTURO VALLEJO FIGUEROA

Director de la FMVZ-UMSNH

P R E S E N T E .

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis titulada: **"EVALUACIÓN DE AGENTES CRIOPROTECTORES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DEL GUAJOLOTE CRIOLLO (*Meleagris gallopavo*)"**, que forma parte del Proyecto de investigación *"Efecto de dos agentes crioprotectores para la congelación de semen de guajolote criollo (meleagris gallipavo)"*, financiado por el Consejo de la Investigación Científica de la UMSNH, en el año 2009 con número de proyecto 14.2, del PMVZ. **FERNANDO OCHOA AMBRIZ**, dirigida por el asesor **DR. J. JESÚS CONEJO NAVA**, fue *revisada y aprobada* por esta mesa sinodal, conforme a las normas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ATENTAMENTE.

DR. MANUEL JAIME TENA MARTÍNEZ
Presidente

DR. DANIEL VAL ARREOLA
Vocal

DR. J. JESÚS CONEJO NAVA
Vocal (Asesor)

UNIDAD ACUEDUCTO

Av. Acueducto y Tzintzuntzan
Col. Matamoros C.P. 58130
Morelia, Michoacán
Teléfono y FAX: (01443) 314 1463
C.E. direccion@urantia.vetzoo.umich.mx
subdireccion@urantia.vetzoo.umich.mx

UNIDAD POSTA

Carretera Morelia-Zinapécuaro Km. 9.5
Teléfono: (01443) 312 5236 FAX: 312 4176
Municipio de Tarímbaro, Michoacán
C.E. secretario.academico@urantia.vetzoo.umich.mx
secretario.administrativo@urantia.vetzoo.umich.mx
secretario.tecnico@urantia.vetzoo.umich.mx

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y sobre todo a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura.

Gracias a la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal por haberme dado la oportunidad y confianza de participar en el presente proyecto.

A la Coordinación de la Investigación Científica por el apoyo brindado para poder realizar este proyecto.

Al Sector Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia a cargo del Dr. Aureliano Juárez Caratachea, quien facilitó parte de la infraestructura y su experiencia para llevar a cabo este proyecto.

Muy en especial al Dr. Jesús Conejo Nava por haberme dirigido en este trabajo, gracias por su paciencia, por sus consejos y por los conocimientos que compartió conmigo.

Gracias a las co-asesoras Ingrid Brenda Olivo Zepeda e Irma Araceli Toscano Torres, quienes en todo momento me brindaron su apoyo incondicional en el laboratorio, por sus consejos y por hacer más ameno el trabajo.

A los Doctores de la mesa sinodal, Dr. Daniel Val Arreola y el Dr. Manuel Jaime Tena Martínez, por la revisión de este trabajo y por sus aportaciones para mejorarlo.

INDICE

INDICE DE CUADROS.....	i
RESUMEN.....	ii
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 El guajolote criollo, un recurso alimenticio Y económico de las comunidades rurales de México.....	2
2.2 El guajolote criollo, un recurso genético local.....	3
2.3 Conservación del semen de pavo comercial.....	5
2.4 Bases biológicas de la conservación.....	6
2.4.1 Diluyentes.....	7
2.4.2 Agentes crioprotectores.....	7
2.4.2.1 Glicerol.....	8
2.4.2.2 Dimetilsulfoxido.....	8
2.4.2.3 Etilenglicol.....	9
2.4.2.4 Triladyl.....	10
2.4.2.5 Suero Fetal Equino.....	10
3. PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	11
4. OBJETIVO.....	11
5. HIPOTESIS.....	12
6. METODOLOGIA.....	12
6.1 Entrenamiento de los guajolotes Criollos para la colección de semen.....	12
6.2 Colección y evaluación del semen fresco.....	13

6.2.1	Movilidad en masa.....	14
6.2.2	Movilidad progresiva.....	14
6.2.3	Concentración espermática.....	15
6.2.4	Morfología y viabilidad.....	15
6.3	Fase experimental.....	16
6.3.1	Tratamiento 1.....	16
6.3.2	Tratamiento 2.....	18
6.3.3	Tratamiento 3.....	19
6.3.4	Tratamiento 4.....	20
6.4	Dilución y congelación de semen.....	21
6.5	Descongelamiento del semen.....	21
7.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	22
8.	CONCLUSIONES.....	25
9.	BIBLIOGRAFIA.....	26

INDICE DE CUADROS

			Pagina
Cuadro	1.	Características fenotípicas del guajolote criollo y de doble pechuga (Camacho, 2009)	4
Cuadro	2.	Clasificación de eyaculados y sementales.	13
Cuadro	3.	Evaluación espermática y clasificación de los pavos reproductores.	13
Cuadro	4.	Valoración de las ondas de movimiento (Evans y Maxwell, 1990).	14
Cuadro	5.	Composición del diluyente HS-1, para la preparación de 50 ml.	16
Cuadro	6.	Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con el diluyente HS-1 y DMSO en 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).	17
Cuadro	7.	Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con diferentes porcentajes de DMSO y 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).	18
Cuadro	8.	Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con diferentes porcentajes de Etilenglicol y 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).	19
Cuadro	9.	Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con 3 diferentes crioprotectores al 10 % y 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).	20

Cuadro 10.	Porcentajes de diluyente y crioprotector en los diferentes tratamientos utilizados para la congelación.	21
Cuadro 11.	Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen fresco diluido en Triladyl.	22
Cuadro 12.	Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen fresco diluido en Suero Fetal Equino con tres diferentes crioprotectores (DMSO, Etilenglicol y Glicerol).	23
Cuadro 13.	Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen diluido y posdescongelado en Triladyl.	24
Cuadro 14.	Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen posdescongelado diluido en Suero Fetal Equino con tres diferentes crioprotectores (DMSO, Etilenglicol y Glicerol).	24
Cuadro 15.	Promedios de movilidad progresiva y viabilidad en semen diluido y posdescongelado de los diferente tratamientos	25

EVALUACION DE AGENTES CRIOPROTECTORES PARA LA CRIOPRESERVACION DEL SEMEN DE GUAJOLOTE CRIOLLO

(*Meleagris gallopavo*)

RESUMEN

No obstante la importancia económica y social del guajolote criollo (*Meleagris gallopavo*) en México, es una especie poco estudiada, por lo que cualquier información que se obtenga es valiosa para dirigir los esfuerzos de conservación, manejo y explotación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar tres crioprotectores utilizados en la congelación del semen de guajolotes criollos para la implementación de un banco de germoplasma. Para ello, se utilizaron 10 guajolotes criollos machos en etapa reproductiva. Los animales fueron sometidos a un entrenamiento para la obtención del semen, mediante la técnica de masaje abdominal no invasiva, obteniéndose de 70µl a 200µl por animal. El eyaculado se evaluó macro y microscópicamente; solo los eyaculados con 70% de movilidad y viabilidad y menos del 20% de anomalías fueron utilizados para la congelación. El semen se colectó en un diluyente (Triladyl; Suero Fetal Equino al 90%) empleando como crioprotectores el Dimetilsulfoxido, Etilenglicol y Glicerol al 10%, con los cuales se obtuvo una movilidad del 85% y viabilidad del 90% postdilución. Posteriormente se envasaron en pajillas de 0.25 ml a una concentración de 100×10^6 espermatozoides. El semen se congeló por la reducción gradual de la temperatura: (5°C) durante 2 horas, y posteriormente a (-196°C) en nitrógeno líquido. Para la evaluación del semen congelado, Las pajillas (n=40) se descongelaron en agua a 24 °C por 2 min. Para su posterior evaluación, donde se obtuvo una movilidad progresiva y una viabilidad del $40 \pm 13\%$ y $50 \pm 14.1\%$, respectivamente, para el Triladyl; del $10 \pm 5\%$ y $18.3 \pm 7.6\%$, respectivamente, para el DMSO; del $6.6 \pm 2.8\%$ y $13.3 \pm 5.7\%$, respectivamente, para el Etilenglicol; del $11.6 \pm 2.8\%$ y $20 \pm 5\%$, respectivamente, para el Glicerol. Se concluye que el Triladyl, es capaz de criopreservar el semen de guajolote criollo.

Palabras clave: Guajolote criollo, semen, agentes crioprotectores, criopreservación, Dimetilsulfoxido, Etilenglicol, Glicerol y Triladyl.

1. INTRODUCCION

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas (-196 °C). Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas y térmicas las cuales pueden alterar las membranas celulares. La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, en el comportamiento durante la congelación y descongelación se definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservacion son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Woods *et al.*, 2004).

La criopreservación involucra la suspensión del semen en diluyentes con crioprotectores, ésta técnica permite su almacenamiento de manera “indefinida” en nitrógeno líquido permitiendo la creación de un banco de genes, con un fácil manejo posterior (Bakst, 1990).

La conservación del semen en las aves requiere también la utilización de una técnica eficaz de criocongelación espermática. En el ganado aviar no pueden utilizarse las técnicas convencionales aplicadas a los espermatozoides procedentes de mamíferos. La situación tan diferente de la fisiología de los guajolotes y la escasa repercusión que ha tenido la inseminación artificial en general en la explotación de las aves, ha provocado la existencia de muy pocos equipos de investigación dedicados a la crioconservación de los gametos masculinos de las aves. Escasas han sido los avances al respecto y es necesario la realización de ensayos que mejoren los actuales métodos de criocongelación de semen en aves.

2. ANTECEDENTES

2.1. El guajolote criollo, un recurso alimenticio y económico de las comunidades rurales de México

El género Meleagrididae comprende las dos especies de guajolote que se encuentran en México, una es el guajolote norteño (*M. gallopavo*), del cual se deriva el guajolote doméstico y la otra es el guajolote de monte (*M. ocellata*). De acuerdo a las características morfológicas se han reconocido 6 subespecies: *M. gallopavo intermedia*, *M. gallopavo merriami*, *M. gallopavo osceola*, *M. gallopavo silvestris*, *M. gallopavo mexicana* y *M. gallopavo gallopavo* (López, 2007).

México ha sido tradicionalmente productor de guajolotes, ya que desde su domesticación hasta la fecha estas aves han representado un aporte, tanto alimenticio, debido a su alto valor proteico, como económico para las familias mexicanas; persistiendo en sistemas de producción de traspatio y como parte importante de la cultura de las familias rurales, así como un recurso genético pecuario propio de México (Aquino *et al.*, 2003).

La crianza del guajolote en México se desarrolla mediante tres sistemas de explotación: a) Sistema industrial o tecnificado con requerimientos estrictos de reproducción. b) Sistema semitecnificado se incorporan algunas técnicas para mejorar la producción. c) Sistema tradicional o rústico siendo este el más practicado en todo el territorio nacional, por lo general no hay selección ni manejo o instalaciones tecnificadas. Bajo este último sistema se produce el 42% de la producción Nacional de la carne de guajolote en México (SAGARPA, 2007).

2.2. El guajolote criollo, un recurso genético local

En el caso de los animales domésticos, la diversidad de razas es producto de la interacción de varios factores: mutaciones, selección artificial de las variaciones producto de la recombinación genética, la deriva génica y la emigración. De esta manera se logró la creación de más de 8000 razas de animales domésticos desde hace unos 15 mil millones de años (Conejo *et al.*, en prensa).

En particular el guajolote criollo deriva del guajolote silvestre (*Meleagris gallopavo gallopavo*), habitante común de los bosques de pino y encino del centro de México; fue domesticado por los primeros grupos humanos que habitaron Mesoamérica, hace unos 3000 a 4000 años. El animal domesticado (*Meleagris gallopavo*) fue utilizado para la producción de plumas, con propósitos ceremoniales y para la producción de carne para consumo humano (Valadez, 1996; Valadez *et al.*, 2001; Valadez, 2003). Después de la Conquista de México, los españoles lo difundieron por Europa y regresó a Norteamérica junto con los colonizadores ingleses, en el siglo XVII. En este último país, el guajolote criollo se cruzó con la variedad silvestre (*Meleagris gallopavo silvestris*) para formar una nueva raza de mayor rendimiento; misma que en 1927 es sometida a una intensa selección para formar una variedad a la que se denomina como de “doble pechuga” y se convierte en la base de la producción intensiva de pavo en los Estados Unidos de América y en todo el mundo (Crawford, 1992).

Los guajolotes criollos y las líneas comerciales tienen fenotipos similares, pero biológica y etológicamente son distintos. Sus diferencias se originan en función al ambiente en que cada uno se ha desarrollado. Los guajolotes de doble pechuga tienen un metabolismo más acelerado, mayor tamaño, peso corporal, así como nidadas con más huevos que el guajolote criollo. Sin embargo el guajolote criollo presenta algunas características propias que deben conservarse como: capacidad de vuelo, resistencia a cambios bruscos de dietas, conservación del

instinto de alimentación omnívora bajo condiciones en pastoreo y en general, adaptación a ambientes extremos (cuadro 1).

Cuadro 1. Características fenotípicas del guajolote criollo y de doble pechuga (Camacho, 2009)

Características	Guajolote criollo	Doble pechuga
Peso corporal (Kg.)	Macho 5-8 Hembras 3-4	Macho 25 Hembras 10
Madurez sexual (meses)	Macho 12 Hembra 8-10	Macho 10 Hembra 7-8
N° de huevos en el primer año de postura	36 huevos	90 huevos
Fecundidad (%)	90	90
Tasa de eclosión de huevos fecundos (%)	85	84
Rusticidad	Alta	Baja
Resistencia a climas extremos	Alta	Baja
Adaptabilidad	Alta	Baja
Requerimientos de infraestructura	Pocos	Muchos
Incubación	28 días	28 días

A diferencia de los Estados Unidos, en donde la variedad criolla está en riesgo de extinción (Sponenberg *et al.*, 2005), México conserva aun este importante recurso genético, bajo sistemas de producción de traspatio. Sin embargo, el conocimiento existente sobre la variedad mexicana es ínfimo. Por eso, la FAO (1999) ha recomendado la necesidad de estudiar este importante recurso genético “antes que sea demasiado tarde”.

En varias partes del mundo, una de las estrategias que se vienen implementando para la conservación de las razas locales es la creación de bancos de recursos zoogenéticos o bancos de germoplasma (Martínez *et al.*, 2005; Fulton, 2006; Wolders *et al.*, 2006; Tamargo *et al.*, 2009). Para ello es necesario el

desarrollo de los protocolos para la crioconservación de espermatozoides y ovulos por periodos prolongados.

2.3. Conservación de semen de pavo comercial

Los métodos de conservación del semen en los animales domésticos buscan reducir o detener el metabolismo del espermatozoide mediante la congelación y así prolongar su vida fértil utilizando diluyentes y crioprotectores (Hafez, 1993 y Watson, 1995).

En los guajolotes criollos no existe información sobre estudios realizados donde mencionen un protocolo de congelación. Sin embargo debido, debido a esta razón, la presente revisión se basa en el conocimiento existente en el pavo de doble pechuga.

Existen dos métodos de conservación del semen de animales domesticos: El almacenamiento del semen en estado líquido o refrigerado y la crioconservación. El primero, presentan niveles de fertilidad comparables a la inseminación con semen fresco. La principal desventaja de esta técnica es el corto tiempo de vida del espermatozoide (Akacay *et al.*, 2007; Etches, 1996). Esta técnica es comúnmente utilizada en la inseminación artificial del pavo comercial de “doble pechuga” por su incompatibilidad de peso entre hembra y macho; ya que debido al peso de los sementales la copula es impedida por su torpeza.

El segundo procedimiento, la criopreservación de semen, involucra el uso de crioprotectores en los diluyentes del semen; ésta técnica permite su almacenamiento de manera “indefinida”, mediante el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad espermáticas a bajas temperaturas (-196 °C). La estructura y composición de las membranas plasmáticas del espermatozoide determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia del espermatozoide (Sexton, 1988).

La elección de cualquiera de estas dos maneras de conservación *in vitro* del semen dependerá del propósito de la conservación y de los tiempos que se requieran, existen diferentes variables a considerar incluso al elegir el protocolo de dilución y congelación según los reactivos con los que se cuenten y la tecnología disponible.

2.4. Bases biológicas de la Criopreservación del espermatozoide aviar

La tecnología para la criopreservación espermática se ha desarrollado desde hace siete décadas. Las diferencias fisiológicas de las células espermáticas entre las especies animales e incluso entre individuos, aún representa un problema sin resolver. A pesar de los esfuerzos realizados en el campo de la criopreservación espermática, pocas técnicas permiten supervivencias elevadas como lo es el caso de los cerdos, ovinos, caprinos y sobre todo en aves; A diferencia de los bovinos y equinos donde existen técnicas de criopreservación con resultados favorables (Hofmo y Almlid, 1991).

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

La criopreservación expone al espermatozoide a bajas temperaturas (-196 °C) no fisiológicas y los crioprotectores son sustancias que tienen un cierto efecto citotóxico. Ambos factores inducen cambios, como la reorganización lipídica de la

membrana plasmática, modificación de la cinética enzimática y alteración de proteínas membranales y carbohidratos en la superficie espermática.

2.4.1. Diluyentes

Los diluyentes son amortiguadores usados para mantener la viabilidad del espermatozoide *in vitro* y maximizar el número de hembras inseminadas (Donoghue y Wishart, 2000). Los componentes básicos de los diluyentes son; a) agua, que se comporta como solvente de los componentes similares y del diluyente; b) sustancias disueltas iónicas, para mantener la osmolaridad y amortiguar el pH del medio; c) sustancias orgánicas con capacidad para impedir el choque del frío (por lo general yema de huevo o leche); d) agentes crioprotectores como glicerina o DMSO; e) azúcares simples como fuente de energía o di- y trisacáridos como crioprotectores adicionados; f) aditivos tales como enzimas que pueden mejorar la fertilidad; y g) antibióticos para controlar el crecimiento microbiano (Salisbury, *et al.*, 1978).

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

2.4.2. Agentes crioprotectores

La estandarización de un protocolo para la criopreservación espermática, es un requisito para la reproducción y mantener el germoplasma por tiempo indefinido en bancos de semen. La preparación de los espermatozoides para la criopreservación requiere la implementación de la metodología para realizar dicho procedimiento, y la adición de criopreservadores a los diluyentes para la conservación en fresco.

Los crioprotectores se dividen en dos grupos, los que atraviesan la membrana celular tales como: la dimetilformamida, etilenglicol, el dimetilsulfóxido (DMSO), la dimetilacetamida (DMA) y el glicerol, el cual tiene que ser retirado posdescongelación. El otro grupo, se refiere a los crioprotectores que actúan desde el exterior de la célula, como la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y polivinilpirrolidona (PVP). La función de los crioprotectores, es reducir el efecto de la excesiva concentración extracelular de solutos y evitar o disminuir la formación de cristales intra y extracelulares durante la descongelación, los cuales pueden producir daños en la estructura espermática (Holt, 2000 y Sexton, 1989).

2.4.2.1. Glicerol

La crioprotección proporcionada por la adición de glicerina a los diluyentes seminales se atribuyó en principio a las alteraciones en el tamaño y forma de los cristales de hielo formados, alteraciones que posiblemente disminuían su destrucción mecánica. La glicerina actúa mediante un mecanismo de taponamiento salino, puesto que la glicerina se une con el agua y disminuye acentuadamente el punto de cualquier temperatura dada. En consecuencia la concentración de solutos en el líquido residual se reduce correspondientemente. La influencia perjudicial de los solutos concentrados parece depender de la temperatura, de aquí que la glicerina, al reducir la temperatura a la que se obtienen tales concentraciones de soluto, disminuye posiblemente sus efectos perjudiciales. La glicerina posiblemente deshidrata el espermatozoide y forma complejos con iones metálicos (Salisbury, *et al.*, 1978).

2.4.2.2. Dimetilsulfóxido

El dimetilsulfóxido es un solvente bipolar, hidrosoluble, de bajo peso molecular. Lovelock (1959) descubrió las propiedades crioprotectoras del DMSO, atribuidas principalmente a su habilidad de prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación

de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana; su bajo peso molecular facilita un rápido ingreso a través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos de la membrana, así como también afecta los procesos de solvatación de agua (Garcia, 1989). Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana. (Porcu, *et al.*, 2001).

2.4.2.3. Etilenglicol

El etilenglicol (EG) es un polialcohol ($C_2H_6O_2$) crioprotector cuyo peso molecular es inferior al del glicerol (Massip, 2001). El etilenglicol, también llamado etanodiol y glicol de etileno, es un líquido transparente, incoloro, ligeramente espeso como el almíbar. A temperatura ambiente es poco volátil, pero puede existir en el aire en forma de vapor, el etilenglicol es inodoro pero tiene un sabor dulce. Se fabrica a partir de la hidratación del óxido de etileno. Es una sustancia de bajo peso molecular que penetra fácilmente la célula, remplazando el agua intracelular por medio de la introducción de radicales hidroxilo. Estos reemplazan osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento y disminuyen el punto de congelación del agua (Medeiros, 2002). Lo que cambiando con una lenta tasa de enfriamiento disminuye la formación de cristales de hielo. Su peso molecular varía entre 32 y 212 Daltons. Es utilizado universalmente en la congelación de tejido ovárico (Medeiros, 2002) y de embriones de distintas especies (Massip, 2001).

La utilización de EG como crioprotector, en la congelación del semen de toro ha ejercido un menor efecto inhibitorio en la motilidad que el glicerol o el DMSO (Guthrie *et al.*, 2002), reduciendo la extensión de las conocidas “lesiones osmóticas” y presentando por tanto, potencial como crioprotector alternativo al glicerol. En el semen ovino, el EG utilizado a concentraciones entre el 1,5 y el 6% ha proporcionado buenos porcentajes de motilidad posdescongelación. El EG, también se ha utilizado en la congelación del espermatozoide equino, con buenos resultados (Fahy, 1986). No se tiene reporte de su empleo como crioprotector del

espermatozoide de guajolote, sin embargo es un crioprotector utilizado para la congelación de semen de caballo.

2.4.2.4 Triladyl®

El Triladyl® es un diluyente buffer que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, glicerina, agua deionizada y antibióticos. El Triladyl® fue introducido al mercado en el año 1974, y se ha convertido en un diluyente clásico para la crioconservación de semen bovino. También se han podido congelar una serie de eyaculados de otros mamíferos, como ovinos, caprinos, camélidos y caninos, como igualmente de diversas especies exóticas. El crioprotector de este diluyente es el glicerol, el cual entra en el grupo de crioprotectores que penetran la membrana de la célula deshidratándola y evitando la formación de cristales durante su congelamiento y descongelación, de esta manera evita la ruptura de las estructuras del espermatozoide.

2.4.2.5. Suero Fetal Equino

El Suero Fetal Equino esta usualmente presente en los sistemas de cultivo como fuente de nutrientes, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y antioxidantes, todos ellos son de beneficio para el desarrollo embrionario. Aunque no hay estudios realizados sobre la utilización del Suero Fetal Equino como diluyente para la congelación de semen en aves, reúne las características necesarias de un diluyente, el Suero Fetal Equino ha sido usado en la congelación de células somáticas con éxito, de lo anterior surge la posibilidad de utilizarlo como diluyente adicionado con crioprotectores para la preservación de semen de guajolote criollo.

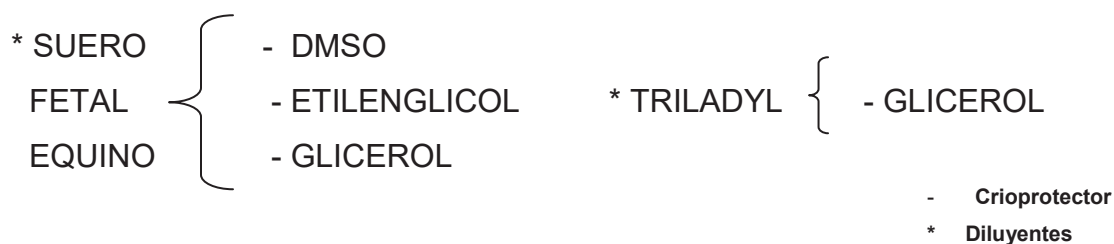
3. PROBLEMA DE INVESTIGACION

La FAO (1999) ha recomendado la necesidad de estudiar al guajolote criollo, como un recurso genético local “antes que sea demasiado tarde”. Este recurso genético, es explotado en las comunidades rurales bajo sistemas de producción familiar y bajo estas condiciones ha desarrollado varias características, tales como: capacidad de vuelo, resistencia a cambios bruscos de dietas, resistencia a enfermedades y parásitos, conservación del instinto de alimentación omnívora bajo condiciones en pastoreo y en general, adaptación a ambientes extremos.

Aunque la criopreservación es una alternativa para contribuir con la reproducción eficiente de las especies domésticas y silvestres, y además de conservación de germoplasma, aún no existen técnicas eficientes de criopreservación en aves y no hay estudios realizados sobre esta técnica en esta especie. Se sabe que la criopreservación es letal para los espermatozoides, además de producir alteraciones morfológicas y fisiológicas que interfieren con su capacidad de fertilizar y se requiere de la adaptación de esta técnica en particular para cada especie, además de lograr protocolos más eficientes para conservar su integridad (Yang *et al.*, 2003).

4. OBJETIVO

Con estos antecedentes, el propósito del presente trabajo fue evaluar la utilización de tres crioprotectores para la conservación de la viabilidad y la capacidad fertilizantes de los espermatozoides del guajolote criollo como base para la creación de un banco de germoplasma.



5. HIPOTESIS

Los tres crioprotectores propuestos (DMSO, etilenglicol y glicerol) han demostrado su efectividad en la congelación y criopreservación de semen en otras especies, por lo que es posible probar y demostrar cuál de ellos se adapta más al especie de estudio obteniendo resultados favorables y los espermatozoides mantendrán una buena movilidad y viabilidad posdescongelados.

6. METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo en el Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal y en el Sector Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en el Km. 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro.

6.1. Entrenamiento de los guajolotes criollos para la colección de semen

Se utilizaron 10 guajolotes criollos en etapa reproductiva, los cuales fueron sometidos a un entrenamiento para obtener el semen por el método de masaje abdominal no invasivo descrito por Burrows y Quinn (1937). Este entrenamiento se llevó a cabo dos veces por semana durante 3 meses, se colectó y se les realizó un espermiograma individualmente utilizando solo aquellos machos que resultaran aptos para la reproducción.

Para la evaluación y clasificación espermática de los reproductores se utilizó el procedimiento descrito por Moya *et al.*, (1986) evaluándose los indicadores de volumen, motilidad, concentración y anomalías espermáticas de 12 machos entre las 10 y 24 meses de edad. Con los datos anteriores se calculó la

concentración espermática viable la cual permitió agrupar los eyaculados y sementales en las categorías de aptos, dudosos y no aptos de acuerdo con los siguientes indicadores:

Cuadro 2. Clasificación de eyaculados y sementales.

CATEGORIA	(10 ⁶ /espermatozoides/eyaculado)
Apto (A)	> 280 X 10 ⁶
Dudoso (D)	Entre 280 y 150 X 10 ⁶
No apto (NA)	< 150 X 10 ⁶

6.2. Colección y evaluación del semen fresco

Se realizaron dos colecciones por semana por animal durante la fase experimental, obteniéndose un promedio de 72.5 µl. El eyaculado inmediatamente después de la colecta fue evaluado macroscópicamente (volumen, color, pH y consistencia) y microscópicamente (movilidad en masa, movilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad y anomalías morfológicas) según Etches (1996) y Conejo (1991).

Cuadro 3. Evaluación espermática y clasificación de los pavos reproductores.

N°	INDICADORES ESPERMATICOS						CATEGORIA		
Semental	Vol. (µl)	M.M. (0-5)	M.P. (%)	C.E. X10 ⁶	Anorm. (%)	Viabilidad (%)	A	D	NA
561	50	4	70	367	7	86	X		
565	100	4	85	444	11	89	X		
564	70	4	85	369	9	88	X		
566	80	4	70	406	7	90	X		
563	60	4	70	283	6	92	X		
538	80	4	75	392	16	88	X		

544	75	4	80	375	12	86	X		
540	45	3	70	270	8	89		X	
543	80	3	75	435	25	82			X
541	90	4	85	403	13	88	X		
539	60	4	70	353	8	92	X		
542	80	4	80	399	11	89	X		

6.2.1. Movilidad en masa se determinó inmediatamente después de la colección del semen y para ello se utilizó un microscopio compuesto con objetivos de 10x y 40x, manteniendo el semen y el material a una temperatura de 24 °C. Se colocó una gota de semen sin diluir sobre un portaobjetos y se calificó de 0 a 5; donde 0 indicó la ausencia de movimiento y 5, ondas de movimiento vigorosas.

Cuadro 4. Valoración de las ondas de movimiento (Evans y Maxwell, 1990).

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas muy rápidas
4	Buena	Ondas rápidas
3	Regular	Ondas lentas
2	Pobre	Sin ondas (movimiento aislado)
1	Muy pobre	Sin movimiento
0	Mala	Muertos

Se desestiman los eyaculados con menos de 4 de movilidad masal.

6.2.2. Movilidad progresiva se evaluó de forma individual, mediante la determinación de la proporción o porcentaje de los espermatozoides con movimiento progresivo o de avance, se colocó una gota del semen diluido en un portaobjetos

con cubreobjetos. Se desestimaron los eyaculados con valores inferiores a 70% de movilidad progresiva.

6.2.3. Concentración espermática se determinó con una cámara de Neubauer; se realizó una dilución del semen 1:200 en una pipeta de Thoma, utilizando citrato de formalina y se colocó una gota sobre la cuadrícula de la cámara. El conteo espermático se realizó con el objetivo 40x. Para obtener la concentración total de espermatozoides se utilizó la siguiente fórmula (Mejía, 2004):

$$\text{Conc. espermática} = \frac{\text{número de espermatozoides contados}}{\text{altura cámara} \times \text{dilución} \times \text{superficie evaluada}}$$

$$\frac{1}{10} \quad \frac{1}{200} \quad \frac{5}{25} = \frac{1}{5} \quad =$$

$$\text{Esp./mm}^3 = (\text{No. Promedio}) (10,000)$$

$$\text{Esp./ml} = (\text{esp./mm}^3) (1000)$$

$$\text{Conc. total de espermatozoides} = (\text{esp./ml}) (\text{volumen eyaculado})$$

$$\text{Conc. total de espermatozoides vivos} = (\text{esp./ml}) (\text{volumen eyaculado}) (\text{mov. progresiva})$$

6.2.4. Morfología y viabilidad espermática se evaluó mediante un frotis. Para ello, se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos, se mezcló con una gota de la tinción Eosina-Nigrosina y se realizó la extensión, dejándola secar durante 5 minutos. La muestra se observó con el objetivo 40X en un microscopio de luz adaptado a un equipo de video y se contaron en 200 espermatozoides el porcentaje de los espermatozoides vivos, muertos y con anomalías.

Las muestras con una proporción de espermatozoides muertos mayor al 30% y con más del 20% de anomalías serán indicadoras de machos con fertilidad reducida.

Los eyaculados con un porcentaje mayor a 70 % de movilidad progresiva, 80% de viabilidad y menos del 20% de anormalidades, fueron aptos para el proceso de criopreservación.

6.3 Fase experimental

Durante esta fase se probaron diferentes protocolos de congelación y descongelación; usando diferentes diluyentes, crioprotectores, congelación y descongelación a diferentes temperaturas y tiempos de equilibrio, también se utilizaron diferentes porcentajes de crioprotectores etc.

6.3.1 Tratamiento 1.

Se utilizó el diluyente HS-1, propuesto por Hanzawa (2004) el cual reporta tasas de fertilidad de 41.3 % con semen criopreservado en gallos, utilizando el diluyente HS-1 y DMSO al 7.6 %. Sin embargo no reporta las tasas de movilidad y viabilidad espermática. Se probó este diluyente con el protocolo recomendado por este autor y el protocolo de congelación utilizado normalmente para el Triladyl.

Cuadro 5. Composición del diluyente HS-1, para la preparación de 50 ml.

REACTIVOS	50 ml.
Glutamato de sodio	0.6 gr.
Acetato de potasio	0.15 gr.
Trehalosa	1.9 gr.
Glucosa	0.1 gr.
BES	0.25 gr.
Bis-tris	0.25 gr.
Gentamicina	0.0005 gr.
pH	6.8
DMSO	7.6 %

Cuadro 6. Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con el diluyente HS-1 y DMSO en 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).

						SEMEN DESCONGELADO			
						P.C. 1		P.C.2	
N	DILUYENTE	μl	CRIOPROTECTOR	μl		M.P	VIAB	M.P	VIAB.
3	HS-1 92.4 %	462	DMSO 7.6 %	38		5 %	33 %	3 %	27 %

Protocolo de congelación 1. El semen diluido se refrigero a 5 °C por 2 horas, se expuso a vapor de nitrógeno por 10 minutos y se sumergió en nitrógeno liquido a -196 °C para su posterior descongelación a baño maría a 36 °C por un minuto para su evaluación.

Protocolo de congelación 2. El semen diluido se refrigero a 5 °C por 30 minutos, se expuso a vapor de nitrógeno por 30 minutos y se sumergió en nitrógeno liquido a -196 °C para su posterior descongelación a 5 °C por 5 minutos para su evaluación.

A pesar de los resultados obtenidos con este diluyente mediante la fertilización, los resultados obtenidos bajo los parámetros de movilidad progresiva y viabilidad fueron muy bajos, por lo cual se desestimo este protocolo de congelación sugerido por Hanzawa (200).

6.3.2 Tratamiento 2.

Se probó el diluyente comercial Triladyl, adicionado con diferentes porcentajes del crioprotector DMSO y usando 2 diferentes protocolos de congelación como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 7. Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con diferentes porcentajes de DMSO y 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).

					SEMEN DESCONGELADO			
					P.C. 1		P.C.2	
N	DILUYENTE	μl	CRIOPROTECTOR	μl	M.P	VIAB	M.P	VIAB.
3	Triladyl 95 %	475	DMSO 5 %	25	5 %	8 %	3 %	8 %
3	Triladyl 90%	450	DMSO 10 %	50	5 %	12 %	4 %	11 %
3	Triladyl 85 %	425	DMSO 15 %	75	0 %	0 %	0%	0 %
3	Triladyl 80 %	400	DMSO 20 %	100	0 %	0 %	0 %	0 %

Protocolo de congelación 1. El semen diluido se refrigeró a 5 °C por 2 horas, se expuso a vapor de nitrógeno por 10 minutos y se sumergió en nitrógeno líquido a -196 °C para su posterior descongelación a baño maría a 36 °C por un minuto para su evaluación.

Protocolo de congelación 2. El semen diluido se refrigeró a 5 °C por 30 minutos, se expuso a vapor de nitrógeno por 30 minutos y se sumergió en nitrógeno líquido a -196 °C para su posterior descongelación a 5 °C por 5 minutos para su evaluación.

No se obtuvieron resultados satisfactorios de ninguno de los 4 diferentes tratamientos en los 2 diferentes protocolos de congelación, ni existió diferencia significativa usando diferentes tiempos de equilibrio ni temperaturas de descongelación y descongelación.

6.3.4 Tratamiento 3.

Se probó el diluyente comercial Triladyl, adicionado con diferentes porcentajes del crioprotector Etilenglicol y usando 2 diferentes protocolos de congelación como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 8. Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con diferentes porcentajes de Etilenglicol y 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).

					SEMEN DESCONGELADO			
					P.C. 1		P.C.2	
N	DILUYENTE	μl	CRIOPROTECTOR	μl	M.P	VIAB	M.P	VIAB.
3	Triladyl 95 %	475	Etilenglicol 5 %	25	4 %	10%	3 %	8 %
3	Triladyl 90%	450	Etilenglicol 10 %	50	5 %	11 %	2 %	9 %
3	Triladyl 85 %	425	Etilenglicol 15 %	75	0 %	0 %	0%	0 %
3	Triladyl 80 %	400	Etilenglicol 20 %	100	0 %	0 %	0 %	0 %

Protocolo de congelación 1. El semen diluido se refrigeró a 5 °C por 2 horas, se expuso a vapor de nitrógeno por 10 minutos y se sumergió en nitrógeno líquido a -196 °C para su posterior descongelación a baño maría a 36 °C por un minuto para su evaluación.

Protocolo de congelación 2. El semen diluido se refrigeró a 5 °C por 30 minutos, se expuso a vapor de nitrógeno por 30 minutos y se sumergió en nitrógeno líquido a -196 °C para su posterior descongelación a 5 °C por 5 minutos para su evaluación.

No se obtuvieron resultados satisfactorios de ninguno de los 4 diferentes tratamientos en los 2 diferentes protocolos de congelación, ni existió diferencia significativa usando diferentes tiempos de equilibrio ni temperaturas de descongelación y descongelación.

6.3.5 Tratamiento 4.

Se utilizo el Suero Fetal Bovino como un diluyente adicionado al 10 % con tres diferentes crioprotectores como lo son el DMSO, Etilenglicol y Glicerol, y congelado con 2 diferentes Protocolos de Congelacion, como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad en semen descongelado con 3 diferentes crioprotectores al 10 % y 2 diferentes protocolos de congelación (P.C.).

					SEMEN DESCONGELADO			
					P.C. 1		P.C.2	
N	DILUYENTE	μl	CRIOPROTECTOR	μl	M.P	VIAB	M.P	VIAB.
3	Triladyl 90 %	450	DMSO 10 %	50	0 %	0 %	0 %	0 %
3	Triladyl 90%	450	Etilenglicol 10 %	50	5 %	9 %	4 %	7 %
3	Triladyl 80 %	450	Glicerol 10 %	50	0 %	0 %	0%	0 %

Protocolo de congelación 1. El semen diluido se refrigero a 5 °C por 2 horas, se expuso a vapor de nitrógeno por 10 minutos y se sumergió en nitrógeno liquido a -196 °C para su posterior descongelación a baño maría a 36 °C por un minuto para su evaluación.

Protocolo de congelación 2. El semen diluido se refrigero a 5 °C por 30 minutos, se expuso a vapor de nitrógeno por 30 minutos y se sumergió en nitrógeno liquido a -196 °C para su posterior descongelación a 5 °C por 5 minutos para su evaluación.

No se obtuvieron resultados satisfactorios de ninguno de los 3 diferentes tratamientos en los 2 diferentes protocolos de congelación, ni existió diferencia significativa usando diferentes tiempos de equilibrio ni temperaturas de descongelación y descongelación.

6.4. Dilución y congelación del semen

Se obtuvo un pool de los eyaculados en un tubo eppendorf de 2 ml y se dividieron en 4 fracciones las cuales fueron distribuidos de la siguiente manera: Triladyl®, 90% Suero Fetal Equino (SFE) más 10% DMSO, 90% SFE más 10% Etilenglicol y 90% SFE más 10% glicerol a 24°C. Inmediatamente después de la dilución del eyaculado, se evaluaron los porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad. Los eyaculados con más del 70% de movilidad y viabilidad fueron procesados.

Cuadro 10. Porcentajes de diluyente y crioprotector en los diferentes tratamientos utilizados para la congelación.

DILUYENTE			CRIOPROTECTOR		
SFE	90 %	450 µl	Dimetilsulfóxido	10 %	50 µl
SFE	90 %	450 µl	Etilenglicol	10 %	50 µl
SFE	90 %	450 µl	Glicerol	10 %	50 µl
Triladyl®	100 %	500 µl			

El semen diluido se envasó en pajillas de 0,5 ml a una concentración de 100×10^6 espermatozoides, las cuales fueron selladas en uno de sus extremos con alcohol polivinilico y colocadas dentro de gobelets para ser sometidas a refrigeración a 5°C durante dos horas.

Transcurrido este periodo de equilibrio, las pajillas fueron expuestas a vapor de nitrógeno durante 10 minutos y posteriormente sumergidas en nitrógeno líquido a -196°C para después ser almacenadas en un termo criogénico hasta su descongelación y evaluación (Etches, 1996).

6.5. Descongelamiento del semen

Las pajillas se descongelarán en baño de agua a 24°C por 2 min. (Etches, 1996) para su posterior evaluación microscópica, cuyos parámetros fueron: movilidad progresiva y viabilidad espermática.

7. Resultados y discusión

Se realizaron 12 ensayos para el tratamiento con triladyl®, con el cual se obtuvo una movilidad progresiva del $88\pm4,5\%$ para el semen fresco diluido y una viabilidad del $89\pm3,3\%$ estos resultados son similares a lo reportado por Herrera (2005), quién obtuvo un $84\pm0,7\%$ de movilidad progresiva y $92,9\pm2,1\%$ de viabilidad en el Faisan de collar (*Phasianus colchicus*). Ackay *et al.* (2001), determinó los porcentajes de movilidad progresiva del semen de Guajolote Bronce utilizando un diluyente a base de glucosa obteniendo un $92,5\pm1,9\%$ posdilución en fresco.

Cuadro 11. Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen fresco diluido en Triladyl.

N	% MP	% V
1	90 %	90 %
2	85 %	90 %
3	85 %	88 %
4	90 %	90 %
5	90 %	90 %
6	90 %	92 %
7	90 %	95 %
8	90 %	90 %
9	90 %	87 %
10	75 %	82 %
11	90 %	92 %
12	90 %	93 %
Promedio	88 ± 4.5	89 ± 3.3

Respecto a los tres tratamientos con SFE se observó una disminución en los porcentajes de movilidad progresiva (SFE+DMSO, $65 \pm 13,2$, SFE+ Etilenglicol $63,3 \pm 5,7\%$ y SFE+Glicerol $60 \pm 17,3\%$) y viabilidad (SFE+DMSO, $74 \pm 16,5\%$; SFE+ Etilenglicol $74,3 \pm 9,2\%$ y SFE+Glicerol $73,3 \pm 18,9\%$) en comparación con el semen tratado con triladyl, esto pudiera deberse al alto índice de aglutinación que presentó el semen posdilución.

Cuadro 12. Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen fresco diluido en Suero Fetal Equino con tres diferentes crioprotectores (DMSO, Etilenglicol y Glicerol).

N	SFE+DMSO		SFE+ETILENGLICOL		SFE+GLICEROL	
	MP %	V %	MP %	V %	MP %	V %
1	50	55	60	68	50	60
2	70	85	60	70	50	65
3	75	82	70	85	80	95
Promedio	65 ± 13.2	74 ± 16.5	63.3 ± 5.7	74.3 ± 9.2	60 ± 17.3	73.3 ± 18.9

Los resultados postcongelamiento del semen tratado con triladyl® fueron del $40 \pm 13\%$ y $50 \pm 14.1\%$ de movilidad progresiva y viabilidad respectivamente, estos resultados son superiores a los 3 tratamientos con SFE+DMSO; SFE+ Etilenglicol y SFE+Glicerol. Los porcentajes de movilidad progresiva con triladyl son ligeramente superiores a lo reportado por Herrera (2005) quién obtuvo un $34 \pm 3.9\%$, sin embargo, el porcentaje de viabilidad es superior al obtenido en el presente trabajo hasta en un 20%; esto pudiera deberse al tipo de diluyente y concentración del crioprotector utilizado (DMSO 6%) o a la especie animal.

Cuadro 13. Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen diluido y posdescongelado en Triladyl.

N	% MP	% V
1	35 %	50 %
2	55 %	65 %
3	45 %	50 %
4	30 %	45 %
5	50 %	65 %
6	35 %	40 %
7	45 %	50 %
8	30 %	40 %
9	40 %	55 %
10	45 %	55 %
11	45 %	50 %
12	45 %	60 %
Promedio	40±13	50±14.1

Cuadro 14. Porcentajes de Movilidad Progresiva y Viabilidad espermática de semen posdescongelado diluido en Suero Fetal Equino con tres diferentes crioprotectores (DMSO, Etilenglicol y Glicerol).

N	SFE+DMSO		SFE+ETILENGLICOL		SFE+GLICEROL	
	MP %	V %	MP %	V %	MP %	V %
1	15	25	5	10	10	15
2	10	20	5	10	15	25
3	5	10	10	20	10	20
Promedio	10±5	18.3±7.6	6.6±2.8	13.3±5.7	11.6±2.8	20±5.7

Cuadro 15. Promedios de movilidad progresiva y viabilidad en semen diluido y posdescongelado de los diferente tratamientos

N	Tratamiento	Semen diluido		Semen descongelado	
		%MP	%V	%MP	%V
12	Triladyl®	88±4.5	89±3.3	40±13	50±14.1
3	SFE +DMSO	65±13.2	74±16.5	10±5	18.3±7.6
3	SFE +Etilenglicol	63.3±5.7	74.3±9,2	6.6±2.8	13.3±5.7
3	SFE +Glicerol	60±17.3	73.3±18.9	11.6±2.8	20±5

8. Conclusiones

El diluyente a base de suero fetal equino, con cualquiera de los tres crioprotectores no logró mantener tasas aceptables de movilidad y viabilidad espermática. En cambio, el triladyl® fue capaz de criopreservar el semen de guajolote criollo, mostrando buenos porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad espermática posdescongelamiento.

Por lo anterior, es recomendable evaluar la capacidad fertilizante del espermatozoide de guajolote criollo conservado en triladyl® bajo condiciones *in vivo*, antes de recomendar su uso.

9. BIBLIOGRAFIA

- Akcay, E.; Varisli, O.; Tekin, N. (2001) Fertilizing ability of turkey semen diluted with simple sugar-based extenders after cooled storage. Department of Animal Reproduction and AI, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ankara 06110 Ankara, Turkey
- Aquino, R.E.; Arroyo, L.A.; Torres, H.G.; Riestra, D. D.; Gallardo, L. F.; López, Y.B. A. (2003). El guajolote criollo (*Meleagris gallopavo L.*) y la ganadería familiar en la zona centro del Estado de Veracruz. Técnica Pecuaria en México. 41(2):165-173.
- Bakst M (1990). Preservation of avian cells. En Poultry breeding and genetics., pp:91-108. Edited by Crawford, R. D. New York: Elsevier.
- Burrows WH y Quinn P (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult sci* 23: 15-20.
- Burrows, W. y Quinns J. (1936). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science. 40: 8-10.
- Buss EG (1993). Cryopreservation of rooster sperm. *Poult sci* 72: 944-954.
- Camacho, E.M.A (2009). Diferencias y similitudes entre guajolote silvestre y de traspatio. Temas de Ciencia y Tecnológica. 13: 53 – 62.
- Conejo, N.J.J. (1991). Manual de inseminación artificial del Ganado porcino con semen diluido. Editorial de la Universidad Michoacana. Morelia, Mich. México.

Conejo-Nava J., Tena Martínez J.M. y Val- Arreola D. La evolución de las especies domésticas. Una perspectiva histórica. (2010). **C + Tec**. No Especial. En prensa.

Crawford R. D. (1992). Introduction to Europe and diffusion of domesticated turkeys from the America. *Zootecnia*, 41 (154 extra):307-314
cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Therio* 60: 999-cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42: 849-858
cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 67: 1811-1816.

Donoghue AM y Wishart GJ (2000). Storage of poultry semen. *Anim reprod sci* 62:213-232.

Etches, R. (1996). The male. In: Reproduction in Poultry, p 208-233. New York, USA: CAB International.

Evans, G, y Maxwell, W.M.C. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 32-33.

Fahy, G. M. (1986). The relevance of cryoprotectant "toxicity to cryobiology. 323: 1-13

FAO. (1999). *Lista Mundial de Vigilancia para la Diversidad de los Animales Domésticos*. 2ª. Ed. Roma, Italia.

Fulton J. E. (2006). Avian Genetic Stock Preservation: An Industry Perspective. *Poultry Science* 85:227–231.

García JV. (1989). Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol*. 6(219).

- Guthrie, H.D.; Liu, J.; Critser, J.K. (2002) - Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **67**: 1811-1816.
- Hafez, E.S.E. (1993). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Sexta edición, McGRAW Hill-Interamericana. México, DF.
- Herrera, J.A. (2005). Criopreservación y evaluación fisiológica y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. p 44.
- Hofmo P y Almlid T (1991). Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Rep dom anim supp* 1:111-122.
- Holt W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53: 47-58.
- López, Z. R. (2007). Caracterización del sistema de producción, morfometría y genética del guajolote doméstico de traspatio (*Meleagris gallopavo*) que se cría en el Estado de Michoacán. Tesis de Doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México.
- Lovelock JE. (1959) The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 10:414-26.
- Martínez R., Ávila O., Pérez J., Gallego J. y Onofre H. (2005). Estructura y función del banco de germoplasma in vitro en Colombia. *Arch. Zootec*. 54: 545-550.
- Massip A. (2001) - Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* 36: 49-55.

Medeiros, A.; Gomez, G.; Carmo, M.; Papa, F. and Alvarenga, M. (2002): "Cryopreservation of stallion sperm using different amides" *Theriogenoly*. 58. 273-276.

Medeiros, A.; Gomez, G.; Carmo, M.; Papa, F. and Alvarenga, M. (2002): "Cryopreservation of stallion sperm using different amides" *Theriogenoly*. 58. 327-244.

Mejia, V. O. (2004). Congelación de semen e inseminación artificial en ovinos. Memorias del curso: Congelación de semen e inseminación artificial en ovinos, FMVZ-UMSNH.

Moya, A.; Edith, A. (1986). Evaluación espermática del semen de pavo en sistema de explotación intensiva. *Rev. Cubana de Ciencia Avícola* 13(1) 79-85.

Porcu E. Oocyte Criopreservation. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (2001). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. London, UK: Martin Dunitz Ltd. quality assessment wiht standard analyses and wiht the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutrition*.

SAGARPA (2007), Situación actual y perspectiva de la producción de carne de Guajolote (pavo) en México 2006. Claridades Agropecuarias. México, D. F.

Salisbury, G.W., VanDemark, N.L., Lodge, J.R. (1978). Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2ª edición, Ed. Acribia, 518-519.

Sexton T (1988). Comparison of comercial diluents for holding turkey semen 24 hours at 5 °C. *Poult sci* 67:131-134.

- Sexton, T (1989). Comparison of comercial diluents for holding turkey semen 24 hours at 4°C. *Poultry Science*. 67:131-134.
- Sponenberg, D.P., M. Bender, P. Johnson, E. Smith, R. Gogal, F.W. Pierson y M.A. Gómez Jaramillo. (2005). Turkey Conservation In The United States. *Arch. Zootec*. 54: 177-183.
- Tamargo, C., de la Fuente J., Rodríguez A., Pérez-Garnelo S.S., Fernández A., Benito J.M. y Hidalgo C.O. (2009). Creación en Asturias de un banco de germoplasma de razas autóctonas. *Arch. Zootec*. 58 (Supl. 1): 529-532.
- Tselutin K, Narubina L, Mavrodina T y Tur B (1995). Cryopreservation of poultry semen. *Br poult sci* 36:805-811.
- Valadez A. R. (1996). *La Domesticación Animal*. Plaza y Valdés- México, D.F. pp 110.
- Valadez A. R. (2003). Domesticación y zootecnia en el México antiguo. *Imagen Veterinaria*. 3 (4): 32.45
- Valadez A. R., García R. CH., Rodríguez G. B., gamboa C. L. (2001). Los guajolotes y la alimentación prehispánica. *Ciencia y Desarrollo*. 27 (157):55-63.
- Watson P.F. (1995) Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and the Assessment of their Post-thawing function. *Reproduction Fertility Development*. 7:871-91.
- Woelders H., Zuidberg C. A., and S. Hiemstra J. (2006). Animal Genetic Resources Conservation in The Netherlands and Europe: Poultry Perspective. *Poultry Science* 85:216–222.

Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*; 48:146-56.

Yang JP, Acker JP, Cabuhat M, McGann LE. (2003). Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assessment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. *Bone Marrow Transplant*: 1021-6.