



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**



**EFFECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN LA MOVILIDAD, VIABILIDAD Y
MORFOLOGÍA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO A -79°C DE
GUAJOLOTE NATIVO (*Meleagris gallopavo gallopavo*)**

T E S I S

QUE PRESENTA:

PMVZ. TANYA IMAZ CHRISTY

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

DIRECTOR DE TESIS

DR. Jesús Conejo Nava

ASESORES

DR. Daniel Val Arreola
MVZ. Irma Arcelia Toscano Torres
MVZ. Ingrid Brenda Olivo Zepeda

Morelia, Michoacán Octubre del 2011



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN LA MOVILIDAD, VIABILIDAD Y
MORFOLOGÍA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO A -79°C DE
GUAJOLOTE NATIVO (*Meleagris gallopavo gallopavo*)**

T E S I S

QUE PRESENTA:

PMVZ. TANYA IMAZ CHRISTY

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Morelia, Michoacán Octubre del 2011

Este trabajo se desprende del proyecto de investigación “14.2 Integridad de la membrana plasmática y capacidad fertilizante *in vivo* del espermatozoide de guajolote criollo (*Meleagris gallopavo*) criopreservado en triladyl “. Financiado por la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 El guajolote nativo (<i>Meleagris gallopavo gallopavo</i>) en México.....	1
1.2 La criopreservación de semen aviar.....	2
1.2.1. Agentes crioprotectores.....	3
1.2.2. Métodos de criopreservación.....	5
2. JUSTIFICACIÓN.....	7
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	8
4. OBJETIVO.....	8
5. HIPÓTESIS.....	8
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
6.1 Obtención y evaluación del semen.....	9
6.2 Congelación del eyaculado.....	10
6.3 Descongelación y evaluación del semen.....	10

6.4	Análisis estadístico.....	11
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
	7.1. Movilidad progresiva.....	11
	7.2. Viabilidad espermática.....	12
	7.3. Anormalidades espermáticas.....	13
8.	CONCLUSIONES.....	14
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	15

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1	
Composición del medio Beltsville Turkey Semen Extender II	10
Cuadro 2	
Efecto del crioprotector en la movilidad progresiva del semen de guajolote nativo descongelado.....	11
Cuadro 3	
Efecto del crioprotector en la viabilidad espermática del semen de guajolote nativo descongelado.....	12
Cuadro 4	
Efecto del crioprotector en las anomalías espermáticas del semen de guajolote nativo descongelado.....	13

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 gran 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 facilito parte de la infraestructura para llevar a cabo este proyecto.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Jesús Conejo Nava por haberme dado la oportunidad y confianza de realizar este proyecto, gracias por su paciencia, consejos y por los conocimientos que compartió conmigo.

Gracias a mis asesoras Ingrid Brenda Olivo Zepeda e Irma Arcelia Toscano Torres, quienes desde un principio y en todo momento me brindaron su apoyo dentro y fuera del laboratorio, así como compartir diariamente su experiencia y amistad.

A mi asesor el Dr. Daniel Val Arreola y a mis sinodales de mesa el Dr. Manuel Jaime Tena Martínez y el MVZ. José Farías Mendoza, por la revisión de este trabajo y por sus aportaciones y consejos para mejorarlo.

Quiero agradecer muy especialmente al MVZ. Fernando Ochoa Ambriz, quien en todo momento me brindo su amistad y cariño, conocimientos y paciencia, y gracias a su apoyo incondicional fue posible realizar este proyecto.

Finalmente quiero agradecer a mis padres, quienes siempre me apoyaron y confiaron en mí y a quienes dedico este trabajo.

EFFECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN LA MOVILIDAD, VIABILIDAD Y MORFOLOGÍA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO A -79°C DE GUAJOLOTE NATIVO (*Meleagris gallopavo gallopavo*)

Resumen:

El guajolote nativo constituye un importante recurso genético autóctono y un apoyo económico y alimenticio para las poblaciones rurales y suburbanas de nuestro país. Esta especie ha sido poco estudiada, principalmente porque productivamente son poco competitivos frente al pavo doble pechuga. El guajolote nativo tiende a desaparecer por su sustitución con nuevas líneas comerciales y su cruzamiento con éstas. Por lo anterior es importante realizar acciones para preservar este recurso y uno de los métodos utilizados para ello es la criopreservación del semen. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del Dimetilsulfóxido (DMSO), Polivinilpirrolidona (PVP) y el glicerol como agentes crioprotectores sobre la movilidad, viabilidad y morfología espermáticas del semen criopreservado en pellets (-79°C) de pavo nativo. Se utilizaron 12 machos nativos en etapa reproductiva (8-24 meses de edad), conformándose dos grupos de 6 cada uno, para la colección del semen una vez por semana, de manera intermitente. Del pool de semen obtenido se tomó 0.1 ml de semen y se diluyó 1:4, en el extensor Betsville Turkey Semen Extender II (BTSE II®) para su evaluación macro y microscópica. Los eyaculados que mostraron más del 80 % de movilidad progresiva, una viabilidad mayor de 80% y anormalidades morfológicas no mayores al 30% se seleccionaron para su congelación. A los eyaculados diluidos en BTSE II® se les dio un tiempo de equilibrio de 15 minutos a 5°C y se volvió a diluir con BTSE II® a razón de 1:1, manteniéndolo a la misma temperatura por 3 minutos más. Posteriormente el semen se dividió en tres alícuotas y a cada una se le añadió el crioprotector correspondiente (DMSO al 3%, PVP al 6 % y glicerol al 8 %). El semen se congeló en hielo seco a -79°C, depositando 150 µl del semen diluido en un hoyuelo del hielo y se dejó reposar por dos minutos para la formación del pellet. Los pellets se descongelaron en baño maría a 27°C durante 10 minutos y se evaluaron obteniendo los siguientes resultados: en movilidad progresiva el semen descongelado obtuvo con DMSO (14.65 ± 0.86 %), glicerol (12.926 ± 0.86 %) y PVP (8.615 ± 0.86 %); en la viabilidad espermática se observó con DMSO (85.34 ± 1.42 %), glicerol (82.96 ± 1.42 %) y PVP (82.69 ± 1.42 %), y para las anormalidades espermáticas los valores fueron para el DMSO (12.19 ± 1.071 %), glicerol (12.35 ± 1.071 %) y PVP (15.61 ± 1.071 %). El uso de DMSO, glicerol y PVP, como crioprotectores del semen de guajolote nativo, mantienen un alto porcentaje de viabilidad y bajas tasas de movilidad y de anormalidades espermáticas utilizando el método de congelación en hielo seco (-79°C) y de envasado en pellets. Es recomendable evaluar *in vivo* la capacidad fertilizante del semen de guajolote nativo congelado-descongelado para probar la hipótesis de que la baja movilidad progresiva observada en el presente trabajo, no afecta su capacidad fertilizante.

Palabras clave: Criopreservación del semen, Crioprotectores, Guajolote nativo.

1. ANTECEDENTES:

1.1. El guajolote nativo (*Meleagris gallopavo gallopavo*) en México

La domesticación del guajolote nativo (*Meleagris gallopavo gallopavo*) probablemente ocurrió cerca de Oaxaca, durante el neolítico. A la llegada de los Españoles a México, los Aztecas y otros pueblos autóctonos ya habían domesticado el guajolote. En el México precolombino el guajolote fue una importante fuente de alimentación y de decoración (con sus plumas se hacían ostentosos y ricos mantos, penachos y adornos para las orejas), sus espolones se empleaban como dardos; los huesos como collares de cuentas, así mismo, las piezas artesanales eran adornadas con llamativos dibujos de esta ave (Museo de Historia Natural y Cultura Ambiental, 2007)

El guajolote nativo hoy en día constituye un importante recurso genético autóctono y un apoyo económico y alimenticio para las poblaciones rurales y suburbanas de nuestro país (Medrano, 2000; SAGARPA, 2002). Esta especie ha sido poco estudiado, principalmente porque productivamente son poco competitivos frente al pavo doméstico de líneas genéticas comerciales y porque son los indígenas y campesinos quienes han conservado hasta nuestros días la técnica ancestral de la crianza del guajolote en traspatio (Camacho-Escobar *et al.*, 2008).

En México la crianza de traspatio y semitecnificada del guajolote se produce en Chihuahua, Yucatán, Estado de México, Michoacán, Puebla, Tabasco, Guerrero, Veracruz e Hidalgo, entre otros. Estos estados producen en conjunto alrededor de dos millones de guajolotes anualmente (INA, 2010); así mismo el estado de Michoacán ocupa el 14° lugar en el país en cuanto al tamaño de la producción en pie, con una explotación del 89% bajo condiciones rústicas o de traspatio (INEGI 2004).

Sin embargo, ésta especie tiende a desaparecer (Mallia, 1999) por su sustitución por nuevas líneas comerciales y su cruzamiento con éstas. Es importante mencionar que las líneas modificadas genéticamente no poseen características del guajolote nativo tales como la adaptación a condiciones de manejo rural y a las diversas condiciones ecológicas (climas extremos, condiciones sanitarias inadecuadas y alimentación con bajo valor nutrimental) (Mallia 1998; Losada *et al.* 2006). Por tal motivo es importante realizar acciones para preservar este recurso genético natural tan importante en nuestro país.

La criopreservación es un método no fisiológico que implica un alto nivel de adaptación de células biológicas a los choques osmóticos y térmicos que se producen durante el enfriamiento y durante el proceso de descongelación (Blesbois, 2006). Este método se utiliza para difundir y evaluar los progresos genéticos, mantener la conservación de los recursos genéticos nativos, mantener la biodiversidad y mejorar la gestión de la inseminación artificial (Blesbois, 2006).

1.2. LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN AVIAR

La criopreservación de semen aviar ha sido estudiada desde hace 60 años y una variedad de protocolos para su congelación se han venido desarrollando; cada uno de estos protocolos tiene sus variables particulares como son: el diluyente utilizado, las tasas de dilución, los tiempos de equilibrio, la velocidad de enfriamiento, los crioprotectores utilizados, la elección del envasado, la tasa y método de congelación. Para la criopreservación exitosa del semen aviar se requiere considerar principalmente dos aspectos: La elección de los crioprotectores adecuados y del método de congelación empleado.

1.2.1. Agentes Crioprotectores

Una variedad de crioprotectores se han utilizado para la congelación de semen aviar, entre los más utilizados se encuentran el DMSO, el PVP y el glicerol, obteniendo resultados muy variables según el protocolo de congelación y la especie aviar utilizada.

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad cuya función consiste en proteger la membrana plasmática de los espermatozoides para reducir el efecto de la excesiva concentración extracelular de solutos y disminuir la formación de cristales intra y extracelulares durante la congelación, los cuales pueden producir daños en la estructura espermática (Holt, 2000).

De acuerdo a la permeabilidad celular, los crioprotectores se clasifican en dos grupos (Herrera, 2005): 1) Los que atraviesan la membrana celular (crioprotectores penetrantes), como el glicerol, eritritol, adonitol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) y etilenglicol (EG) y 2) Los que actúan desde el exterior de la célula (crioprotectores no penetrantes), como la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y polivinilpirrolidona (PVP).

El **DMSO** es uno de los crioprotectores más utilizados en aves desde 1959; es un solvente bipolar, hidrosoluble, de bajo peso molecular. Su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y las fases de la bicapa de los fosfolípidos. De esta manera, actúa principalmente previniendo la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y reduce la formación intracelular de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana plasmática (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Williamson *et al.* (1981) reportaron una motilidad espermática del 15 % y 55 %, cuando utilizaron DMSO como crioprotector el espermatozoide aviar. Chalah y Brillard (1999) evaluaron la viabilidad del semen de gallo criopreservado con DMSO, encontrando a las 0 y 24 horas post descongelación una disminución de la

viabilidad, del 55 al 40 %.

El **glicerol** es líquido a 25 ° C, es incoloro, viscoso y de sabor dulce; reemplaza el agua intracelular antes y durante la congelación y en combinación con tasas de congelación lenta y controlada minimizan la formación de cristales de hielo.

Polge *et al.* (1949), publicaron la primera congelación de semen de aves, mediante la adición de glicerol como crioprotector, lo que supuso una revolución en el campo de la inseminación artificial. Sin embargo, el glicerol como crioprotector del espermatozoide aviar, daña la mucosa del tracto reproductor de la hembra (Hammerstedt y Graham, 1992), disminuye la tasa de movilidad espermática e incrementa el porcentaje de espermatozoides muertos y con anomalías, mostrando entonces un efecto anticonceptivo (Gill *et al.*, 1996; Long y Kulkarni, 2004). Por tal motivo este crioprotector debe ser removido del semen en la descongelación, mediante centrifugaciones sucesivas, la dilución o diálisis, gradiente de Percoll o centrifugación Accudenz (Lake y Ravie, 1978; Buss, 1993; Long y Kulkarni, 2004).

La **PVP** (Polivinilpirrolidona) es de los crioprotectores menos utilizado en la congelación de semen aviar; este es un polímero soluble en agua, formado por cadenas de múltiples vinilpirrolidonas. El monómero es carcinógeno y es extremadamente tóxico para la vida acuática, pero su polímero (PVP) en estado puro es completamente sano. Este compuesto extrae el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica, sin penetrar a la célula; es efectivo para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; y deshidrata las células (Sommerfeld y Niemann, 1999).

1.2.2. Métodos de criopreservación.

Con respecto a los métodos de criopreservación, se pueden destacar dos; el primero es en vapores de nitrógeno líquido (- 196 °C) y el segundo es en hielo seco (-79 °C). Al igual que los crioprotectores, los resultados obtenidos son muy variables y van desde 15 hasta 92 % de fertilidad dependiendo del protocolo de congelación y la especie utilizada.

Polge *et al.* (1949) congelaron semen de gallo a -79 °C en hielo seco (pellets), utilizando glicerol al 20 % como crioprotector y se realizó una descongelación rápida mostrando alta motilidad espermática contra su grupo control (semen fresco).

Tselutin *et al.*, (1999) congelaron el semen de gallo comparando el efecto de dos crioprotectores (DMA y glicerol) y dos métodos de embase (pellets y pajillas). El DMA se utilizó al 6 %, refrigerando el semen a -6 °C por 20 minutos y una tasa de congelación ultrarrápida, sumergiendo el semen en nitrógeno líquido para la formación de pellets obteniendo una fertilidad del 92.7 %. Cuando se utilizó el glicerol, se empleó un tiempo de equilibrio de 30 minutos a 5 °C, una tasa de congelación lenta (de 5 a -35 °C a una velocidad de 7°C/min y de -35 °C a -140 °C fue de 20 °C/min), para posteriormente ser embasado en pajillas y almacenado en un termo criogénico (-196 °C), obteniendo una fertilidad de 63.9 %. Los resultados obtenidos por estos autores son los más altos reportados hasta la fecha en el gallo, utilizando pellets como procedimiento de embasado y una congelación ultrarrápida.

Hernández *et al.* (2005) Congelaron semen de gallo de la raza Plymouth Rock Barrada a -196°C utilizando glutamato de sodio como diluyente, glicerol al 10% como crioprotector y una velocidad de enfriamiento lenta (1°C/min de 5°C hasta -20°C, después 4°C/min hasta -80°C) reportando porcentajes de motilidad progresiva de semen post descongelado de 44.23%, y un 35.61% de viabilidad.

Herrera (2005), congeló el semen de gallo usando DMSO y PVP con el método de pellets a -79°C , obtuvo una viabilidad del 84.7% y 89.2% respectivamente y una fertilidad de 40 % con DMSO y 39 % con PVP. Congelando semen de faisán, utilizando DMSO reportó un 40.5% en movilidad progresiva y un 83.5% de viabilidad, obteniendo una fertilidad del 60 % con DMSO y 57 % con PVP y empleando la misma técnica congelando semen de halcón con PVP como crioprotector reporta 39% de movilidad progresiva y 83.3% en viabilidad, obteniendo resultados similares entre los dos crioprotectores.

Los trabajos realizados en la congelación de semen de pavo son menores a los del gallo. Macpherson *et. al.* (1969) congelaron semen de pavo bronceado, utilizando como crioprotectores una combinación de etilenglicol con glicerol y DMA con glicerol, respectivamente; un tiempo de equilibrio de $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 5°C , una tasa de congelación lenta ($8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -80°C , para almacenarse en pajillas en nitrógeno líquido (-196°C), obteniendo una fertilidad de 15% y 24 %, respectivamente.

Los primeros métodos de criopreservación de semen de pavo exitosos fueron publicados por Sexton (1981), quien utilizó como diluyente el extensor Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) y DMSO al 4 % como crioprotector; bajas tasas de enfriamiento y pajillas para envasar, obteniendo una tasa de fertilidad del 61 %, la cual hasta la fecha ha sido el protocolo con mejor fertilidad en esta especie.

Blesbois y Grasseau (2007) congelaron semen de pavo utilizando como diluyente BPSE a una dilución de 1:4; DMA al 8 % como crioprotector, un tiempo de equilibrio de 60 minutos a 4°C y una tasa de congelación ultrarrápida sumergiendo el semen directamente en nitrógeno líquido (-196°C) para la formación de pellets, obteniendo un 25 % de viabilidad y un 30.4% de fertilidad inseminando con semen post-descongelado.

Nicolaia *et al.*, (2009) congelaron semen de pavo utilizando DMA al 8 % como crioprotector, con un tiempo de equilibrio de 60 minutos a 4 °C y una tasa de congelación ultrarrápida, sumergiendo el semen directamente en nitrógeno líquido (-196°C) para la formación de pellets, obteniendo un 24.05 % de viabilidad espermática post descongelación.

Ochoa (2010), congeló el semen de guajolote nativo en Triladyl a - 196°C, envasado en pajillas y criopreservado en nitrógeno líquido, obteniendo una movilidad progresiva del 40.4±6.5 % y una viabilidad espermática de 50.8±7.3 %.

Los protocolos de congelación de semen de guajolote ya sea en pellet o en pajillas, con tasas de congelación lentas o ultrarrápidas, hasta la fecha, han dado resultados de fertilidad inferiores a los obtenidos en semen fresco, pero los resultados de Sexton son alentadores.

Asimismo, cuando se comparan los resultados del semen congelado de gallo con los de semen de pavo, se encontró una fertilidad inferior en esta última especie, lo que indica que los espermatozoides de guajolote son mucho más afectados por el daño a la refrigeración y procedimiento de congelación (Blanco *et al.*, 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

Los resultados de esta revisión muestran que el uso del pellet es mejor que la pajilla como método de embasado del semen de gallo y de aves silvestres, pero no hay estudios similares en pavos. Dado los resultados obtenidos por Tselutin (1999) y Herrera (2005) es interesante estudiar este procedimiento en la congelación de semen del guajolote nativo.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuál de los agentes crioprotectores, glicerol, DMSO y PVP, es más eficaz para conservar la movilidad, viabilidad y morfología espermáticas del semen criopreservado a -79°C del guajolote nativo?

4. OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto crioprotector del DMSO, PVP y glicerol, en la movilidad, viabilidad y morfología espermáticas del semen criopreservado en pellets de hielo seco a -79°C de guajolote nativo.

5. HIPÓTESIS.

El DMSO, la PVP y el glicerol, se han empleado con relativo éxito en la criopreservación del semen de mamíferos y aves domésticas a -196°C ; por lo tanto, es probable que el método de pellets a -79°C , podrá congelar el semen de guajolote nativo conservando a niveles satisfactorios la movilidad, la viabilidad y la morfología espermática, aprovechando las características de estos crioprotectores.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal (USIRA), y en el Área experimental de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que se ubica en el Km. 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro.

6.1. Obtención y evaluación del semen

Se utilizaron 12 machos nativos (*Meleagris gallopavo gallopavo*) en etapa reproductiva (8-24 meses de edad), conformándose dos grupos de 6 cada uno, para la colección del semen una vez por semana, de manera intermitente. Para ello, se utilizó el método de masaje abdominal no invasivo descrito por Burrows and Quinn (1937).

Con los eyaculados colectados de cada grupo de pavos se efectuó un pool de semen, del cual se tomó 0.1 ml de para su dilución en el extensor Betsville Turkey Semen Extender II (BTSE II®), en una relación 1:4. En el cuadro 1 se presenta la composición química de este diluyente.

Se tomo una muestra de semen para su evaluación y el resto se utilizó para la congelación. Las características macroscópicas que se determinaron fueron: color, volumen; mientras que las características microscópicas fueron: movilidad progresiva, viabilidad y anormalidades espermáticas, utilizando un microscopio de campo claro, según lo describe Etches (1996). Los eyaculados que mostraron más de 80 % de movilidad progresiva, una viabilidad mayor de 80% y anormalidades morfológicas no mayores al 30%, fueron congelados.

El semen diluido en BTSE II® a temperatura ambiente (30°C) se le dio un tiempo de refrigeración de 15 minutos a 5°C. Concluido este período el semen se volvió a diluir en BTSE II® a razón de 1:1 y se mantuvo a la misma temperatura por 3 minutos más. Posteriormente el semen se dividió en tres alícuotas, utilizando criotubos de 1.2 ml, y a cada uno se le añadió el crioprotector correspondiente (10µl de DMSO al 3%, .02g de PVP al 6 % y 26.5µl de glicerol al 8 %), según Herrera (2005).

Cuadro 1. Composición del medio Beltsville Turkey Semen Extender II

(Sexton, 1977).

COMPONENTE	grs/lts.
Difosfato de potasio 3H ₂ O	12.7
Glutamato de sodio	8.67
Fructosa (anhídrida)	5.0
Acetato de sodio 3H ₂ O	4.30
TES*	1.95
Citrato de potasio	0.64
Monofosfato de potasio	0.65
Cloruro de magnesio	0.34
Ph	6.5
mOsm -1 kg/H ₂ O	353

6.2. Congelación del eyaculado

El semen se criopreservó utilizando el protocolo descrito por Herrera (2006). Brevemente, el método consiste en depositar 150 µl del semen diluido con una micropipeta (Brand) en un hoyuelo de hielo seco a -79°C y se dejó reposar por dos minutos para la formación del pellet, el cual se extrajo mediante pinzas de acero inoxidable. Los pellets se depositaron en criotubos (Brand) de 1.2 ml, los cuales se almacenaron en un termo criogénico con nitrógeno líquido a -196°C para su posterior descongelación y evaluación.

6.3. Descongelación y evaluación del semen

El semen se descongeló en un recipiente con agua a 30°C durante 10 minutos y se evaluó la movilidad progresiva, la viabilidad y la morfología espermática, según el procedimiento descrito por Etches (1996).

6.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de una vía, utilizando la movilidad progresiva, la viabilidad y la morfología espermáticas como variables dependientes y el semen fresco como variable independiente. Se hizo la comparación de tratamientos a través de la comparación de diferencias mínimas significativas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Movilidad progresiva

Se realizaron 15 ensayos de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados: El efecto del crioprotector en la movilidad progresiva del semen descongelado fue el siguiente (promedios \pm EE): El semen Fresco mostró una movilidad del 87.8 ± 0.83 %, valor superior significativamente ($p \leq 0.001$) con respecto al obtenido con DMSO (14.65 ± 0.86 %), glicerol (12.926 ± 0.86 %) y PVP (8.615 ± 0.86 %). El DMSO y el glicerol, produjeron una movilidad progresiva más baja que el semen fresco, pero mayor que la de la PVP ($p \leq 0.001$) (Cuadro 2.)

Cuadro 2. Efecto del crioprotector en la movilidad progresiva del semen descongelado de guajolote nativo (n=15)

TRATAMIENTO	% PROMEDIO	EE
DMSO	14.65 ^a	0.86
GLICEROL	12.93 ^a	0.86
PVP	8.62 ^b	0.86
SEMEN FRESCO	87.80 ^c	0.83

^{a b c} Literales distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0.001$)

Las tasas de movilidad progresiva obtenidas en el presente estudio con DMSO (14.654 ± 0.86 %), son inferiores a lo publicado por Ochoa, (2010) utilizando Triladyl como diluyente para la congelación de semen de guajolote nativo

obteniendo un $40.4 \pm 6.5\%$. Igualmente, los resultados para la PVP ($8.62 \pm 0.86\%$) son más bajos que los reportados por Herrera (2005), del 31.5 ± 2.4 con semen congelado de gallo.

Duchi *et al.* (2008) reportaron una motilidad espermática de 3.57% agregando glicerol en la congelación de semen envasando en pajillas y conservándolo en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), lo cual es un resultado más bajo que el obtenido en el presente trabajo con glicerol ($12.9 \pm 0.86\%$).

Las bajas tasas de movilidad reportadas en este estudio pueden deberse a que el espermatozoide de guajolote nativo es más sensible a la congelación que el de gallos. Sin embargo, Hanzawa *et al.* (2005) reportan que las bajas tasas de movilidad en espermatozoides de aves, no indica una baja fertilidad, ya que después de su depósito en el tracto reproductivo de las hembras recuperan su movilidad.

7.2. Viabilidad espermática.

La viabilidad espermática del semen descongelado fue similar en los cuatro tratamientos ($p > 0.05$) obteniéndose valores promedios \pm EE, para el DMSO ($85.34 \pm 1.42\%$), glicerol ($82.96 \pm 1.42\%$), PVP ($82.69 \pm 1.42\%$) y semen fresco ($89.53 \pm 1.37\%$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del crioprotector en la viabilidad espermática del semen descongelado de guajolote nativo (n=15)

TRATAMIENTO	% PROMEDIO	EE
DMSO	85.34 ^a	1.42
GLICEROL	82.96 ^a	1.42
PVP	82.69 ^a	1.42
SEMEN FRESCO	89.53 ^a	1.37

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$)

En el presente trabajo, los resultados de viabilidad espermática post-descongelación usando los crioprotectores DMSO ($85.34 \pm 1.42 \%$) y PVP ($82.69 \pm 1.42 \%$) son similares a los reportados por Herrera, (2005) en semen congelado de gallo, obteniendo una viabilidad del 84.7% y 89.2% para el DMSO y PVP, respectivamente. Estos resultados coinciden debido a que se utilizó el mismo protocolo de congelación, diluyente y concentraciones de crioprotectores.

Sin embargo las tasas de viabilidad post-descongelado del presente estudio para el glicerol ($82.96 \pm 1.42 \%$), fueron superiores a lo reportado por Ochoa, (2010) obteniendo un $50.0 \pm 7.3 \%$ con el diluyente Triladyl. Estas diferencias pueden estar asociadas al diluyente utilizado.

7.3. Anormalidades espermáticas

El empleo de los crioprotectores en la congelación de semen de pavo nativo no evitó un incremento de las anormalidades espermáticas, con respecto al semen fresco ($p \leq 0.001$). Los valores (promedios \pm EE) fueron: DMSO ($12.19 \pm 1.071\%$), glicerol ($12.35 \pm 1.071\%$), PVP ($15.61 \pm 1.071\%$), y semen fresco ($7.93 \pm 1.038\%$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del crioprotector en las anormalidades morfológicas del semen descongelado de guajolote nativo (n=15)

TRATAMIENTO	% PROMEDIO	EE
DMSO	12.19 ^a	1.071
GLICEROL	12.35 ^a	1.071
PVP	15.61 ^a	1.071
SEMEN FRESCO	7.93 ^b	1.038

^a ^b Literales distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0.001$)

Los resultados descritos en el presente estudio para el DMSO (12.19 ± 1.071) y glicerol (12.35 ± 1.071), presentaron tasas más bajas de anomalías espermáticas que los obtenidos por Tselutin *et al.* (1999) cuando congelaron semen de gallo en pajillas a -196°C utilizando glicerol y DMSO, reportando un 24% y 78% de anomalías espermáticas respectivamente. Posiblemente la diferencia entre resultados se debe a los métodos utilizados para la congelación de semen, la especie utilizada, y el diluyente.

Para el caso del PVP (15.61 ± 1.071), los resultados del presente estudio mostraron tasas de anomalías espermáticas superiores a las reportadas por Herrera, (2005) cuando congeló semen de gallo a -79°C con el método de pellets obteniendo un 6% de anomalías; lo cual puede deberse a que el estudio se realizó en una especie distinta.

8. CONCLUSIONES.

El uso de DMSO, PVP y glicerol, como crioprotectores del semen de guajolote nativo, mantienen un alto porcentaje de viabilidad y bajas tasas de anomalías espermáticas utilizando el método de congelación de pellets a -79°C .

En lo referente al efecto de los tres crioprotectores sobre la movilidad espermática se obtuvieron tasas muy bajas; por lo tanto es recomendable evaluar *in vivo* la capacidad fertilizante del semen de guajolote nativo congelado-descongelado para probar la hipótesis de que la baja movilidad progresiva no afecta esta variable.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ávila-Portillo, L. M., Madero J. I., López C., León M. F., Acosta L., Gómez C. Delgado L.G., Gómez C., Lozano J.M., Reguero M. T. (2006). Basic points in cryopreservation. *International Journal of Obstetrics and Gynecology*. 57: 4 (291-300)

Blanco, J. M. Gee G, Wildt D. E y Donoghue A. M. (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biology Reproduction* 63:1164-1171.

Blesbois, E., (2006). Semen cryopreservation for *ex situ* management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian criobank. *Poultry Science*. 86: 555

Burrows, W and Quinn, P. (1937). The collection of spermatozoa from the domesticfowl and turkey. *Poultry Science*. 23: 15-20

Buss, E.G. (1993). Cryopreservation of rooster sperm. *Poultry Science* 72: 944-954.

Camacho-Escobar, M.A, Hernandez-Sanchez V, Ramirez-Cancino I, Sánchez-Bernal EI and Arroyo-Ledezma, J. (2008). Characterization of backyard guajolotes (*Meleagris gallopavo gallopavo*) in tropical zones of mexico. *Livestock Research for Rural Development*. 20: 50

Camacho-Escobar, M. A, Ramírez-Cancino L, Lira-Torres I. I, Hernández-Sánchez V. (2008). Phenotypic characterization of the guajolote (*meleagris gallopavo gallopavo*) in Mexico. *Animal Genetic Resources Information* 43:59-66.

Chalah,T., Seignerin,F., Blesbois,E. and Brillard,J.P. (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.

Donoghue, A.M. and Wishart G.J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* 62: 313-232.

Duchi, N. Almela, L. Peinado, B. Poto, A. (2008). Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza murciana. pp 38-42

Etches, J.R. (1996). Artificial insemination. *Reproduction in Poultry*. pp 234-261.

Etches, J.R. (1996 a). The male. *Reproduction in Poultry*, pp. 208-2033

Gill, S.P.S., Buss, E.G. and Mallis, R.J. (1996). Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poultry Science*, 75:254-256.

Hammerstedt, R. y Graham, J. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glicerol. *Cryobiology* 29:26-38.

Hanzawa, S. Niinomi, T. Takahashi, R. Yamaguchi, K. Miyata, T.. Tajima, A. (2005). New method of freezing chicken semen using N-methyl-acetamide as cryoprotecting agent. *Japan Poultry Science Association* 18: 323-453

Herrera, J. A. B. (2005). Criopreservación y evaluación fisiológica y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves. *Tesis de Doctorado*. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, DF.

Hernández, P.J.E., Fernández R.F. Rodríguez S.J.L. (2005). Obtención y congelación de semen de gallo doméstico usando un diluyente con glutamato de sodio. *Journal of Animal Health* 27: 2

Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science* 62: 3-22.

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

Iaffaldano, N., Manchis A., Gambacarta M., Di Iorio M., Pina Rosato M. (2009). Effect of different sperm concentrations on the post thaw viability and motility turkey spermatozoa cryopreserved by the pellet method. *Italian Journal Animal Science* 8: 760-767.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (2004). Monografía del Estado de Michoacán. INEGI, México.

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

Long, J. A., G. Kulkarni. (2004). Effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Science*. 83: 1594–1601.

Losada, H. Rivera, J. Cortes, J. Castillo, A. González, R. O y Herrera, J. (2006). Un analisis de sistemas de produccion de guajolotes (*Meleagris gallipavo*) en el espacio suburbano de la delegacion Xochimilco al sur de la Ciudad de Mexico., *Livestock Research for Rural Development*. 18 : 52

Macpherson, J.W., Chatterjee S., Friars G.W. (1969). Frozen turkey semen. *Canadian J. Compend Medic.* 33: 37-38

Mallia, J. G. (1998). Indigenous domestic turkeys of Oaxaca and Quintana Roo, México. *Animal Genetic Resources Information* 23:69-78

Mallia, J.G. (1999). Observation on family poultry units in parts of Central America and sustainable development opportunities. *Livestock Research for Rural Development.* (11)

Medrano, J.A. (2000). Recursos animales locales del centro de México. *Archivos de Zootecnia.* 187 : 385-390

Museo de Historia Natural y Cultura Ambiental (2007). <http://www.sma.df.gob.mx/mhn/index>

Ochoa, F. (2009). Evaluación de agentes crioprotectores para la criopreservación del semen de guajolote criollo (*Meleagris gallopavo*). *Tesis de Licenciatura.* Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Morelia, Michoacán. 29-32

Polge C., Parkers C.G. (1941). Revival of espermatozoa after vitrification and dehydration at low temperaturas. *Nature.* 164-666

Sagarpa (2002). Anuario Estadístico de la Producción Pecuaria de los Estados Unidos Mexicanos. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera.

Sexton T.J., (1977). A new poultry semen extender: Effect of a extension on the fertility of chicken semen. *Poultry Science.* 56:1443-1446.

Sexton, T.J. (1981). Development of a commercial method for freezing turkey semen. 1. Effect of pre-freeze techniques on the fertility of processed unfrozen and frozen-thawed semen. *Poultry Science* 60: 1567-1573.

Shaffner, C. S., Henderson E. W., Card C. G. (1941). Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poultry Science*. 20: 259-265

Sommerfeld, V. Niemann, H. (1999). Cryopreservation of bovine in vitro Produced Embryos Using Ethylenglicol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology*. 38: 95-105.

Tselutin, K., Seigneurin F., Bleisbois E., (1999). Comparision of Cryoprotectans and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. *Poultry Science* 78: 586-590

Williamson, R. G., Etches R. J., Reinhart B. S., Macpherson J. W. (1981). The effect of cooling rate before freezing and the temperature of the semen up on addition of DMSO on the fertilizing capacity of chicken semen stored at -196 °C., *Reproduction Development*, 21: 1033-1042