



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

---

**Área temática: Producción y salud animal**

**INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y CAPACIDAD  
FERTILIZANTE DEL ESPERMATOZOIDE DE GUAJOLOTE  
NATIVO (*Meleagris gallopavo gallopavo*) CRIOPRESERVADO EN  
TRILADYL**

**TESIS**

**QUE PRESENTA:**

**MVZ. Fernando Ochoa Ambriz**

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

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Morelia, Mich. Marzo del 2012



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
BIOLOGICAS**

---

**Área temática: Producción y salud animal**

**INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y CAPACIDAD  
FERTILIZANTE DEL ESPERMATOZOIDE DE GUAJOLOTE  
NATIVO (*Meleagris gallopavo gallopavo*) CRIOPRESERVADO EN  
TRILADYL**

**TESIS**

**QUE PRESENTA:**

**MVZ. Fernando Ochoa Ambriz**

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

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**ASESORES:**

**Dr. Aureliano Juárez Caratachea**

**Dr. Jesús Conejo Nava**

**Dr. Daniel Val Arreola**

**Dr. Marco Cajero Juárez**

**Dr. Jaime Tena Martínez**

Morelia, Mich. Marzo del 2012

**Proyecto de investigación 14.2 titulado “Integridad de la membrana plasmática y capacidad fertilizante del espermatozoide de guajolote nativo (*Meleagris gallopavo gallopavo*) criopreservado en Triladyl”.**

**Financiado por la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y forestales, por haberme dado la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias.

Gracias a la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal por haberme dado la oportunidad de realizar los experimentos del presente trabajo.

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

Al CONACYT por la beca otorgada para poder realizar el estudio de posgrado.

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 material biológico para cumplir con los objetivos planteados.

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

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

# ÍNDICE

	Págs.
<b>RESUMEN</b>	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. PERDIDA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS.....	3
2.2. EL GUAJOLOTE NATIVO ( <i>Meleagris gallopavo gallopavo</i> ), UN RECURSO GENÉTICO DE MÉXICO.....	4
2.2.1. Origen, domesticación y distribución del pavo.....	4
2.2.2. Clasificación taxonómica.....	6
2.2.3. Características productivas.....	7
2.2.4. Los sistemas de producción del guajolote nativo en México.....	9
2.3. ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS NATIVOS.....	10
2.4. LOS BANCOS DE RECURSOS ZOOGENETICOS PARA LA CONSERVACIÓN <i>EX SITU</i> .....	11
2.5. PRINCIPIOS GENERALES DE LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.....	13
2.6. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN LAS AVES DE CORRAL.....	17
2.6.1. Diluyentes para la criopreservación de semen aviar .....	17
2.6.2. Agentes crioprotectores para la congelación de semen aviar.....	20
2.6.3. Tasas de congelación y descongelación .....	23
2.6.4. Congelación del espermatozoide de pavo.....	24
2.7. CAMBIOS DEL ESPERMATOZOIDE EN EL PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.....	25

2.8.	PERIODO FÉRTIL DEL ESPERMATOZOIDE AVIAR.....	27
3.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	29
4.	OBJETIVOS.....	30
4.1.	Objetivo general.....	30
4.2.	Objetivos específicos.....	30
5.	HIPÓTESIS.....	31
6.	METODOLOGÍA.....	31
6.1.	Entrenamiento de los guajolotes nativos para la colección de semen.....	31
6.2.	Colección de semen.....	32
6.3.	Evaluación macroscópica.....	32
6.4.	Dilución y evaluación microscópica.....	32
6.5.	Congelación de semen.....	33
6.6.	Descongelación de semen.....	33
6.7.	Inseminación artificial.....	34
6.8.	Diseño experimental.....	34
6.8.1.	Experimento 1. Establecimiento del periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl®.....	34
6.8.2.	Experimento 2. Determinación de la tasa de fertilidad en pavas nativas inseminadas artificialmente con semen criopreservado en Triladyl®.....	35
6.8.3.	Experimento 3. Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide criopreservado en Triladyl® mediante clortetraciclina (CTC).....	36
6.9.	Análisis estadístico.....	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
7.1.	Experimento 1. Establecimiento del periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl®.....	39

7.2.	Experimento 2. Determinación de la tasa de fertilidad en pavas nativas inseminadas artificialmente con semen criopreservado en Triladyl®.....	42
7.3.	Experimento 3. Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide criopreservado en Triladyl® mediante clortetraciclina (CTC ).....	46
8.	CONCLUSIONES.....	51
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	52
10.	ANEXO.....	60

### ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Págs.</b>
Cuadro 1. Proceso de evolución, domesticación y difusión del guajolote nativo.....	5
Cuadro 2. Clasificación taxonómica y fenotípica del pavo.....	6
Cuadro 3. Características biológicas, etológicas y reproductivas del guajolote silvestre, doméstico y pavos de línea comercial.....	8
Cuadro 4. Programas nacionales de bancos de germoplasma aviar hasta el 2006.....	12
Cuadro 5. Situación de estrés para las membranas del espermatozoide en los procesos de congelación y descongelación.....	16
Cuadro 6. Composición de los diluyentes de semen, de gallo y pavo, utilizados para la criopreservación.....	18
Cuadro 7. Tasas (%) de supervivencia de los espermatozoides de gallo congelados-descongelados dependiendo de la velocidad de congelación y tipo de pajilla.....	24
Cuadro 8. Clasificación reproductiva de machos reproductores.....	32
Cuadro 9. Periodo de fertilidad del semen congelado vs semen fresco en pavas nativas inseminadas artificialmente .....	39

Cuadro 10.	Fertilidad del semen criopreservado y del semen fresco en pavas inseminadas cada siete días durante siete semanas.....	43
Cuadro 11.	Porcentajes de fertilidad por día post-inseminación durante siete semanas.....	45
Cuadro 12.	Porcentajes de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en semen fresco, refrigerado y congelado de guajolote nativo (n=13).....	47
Cuadro 13.	Porcentajes de viabilidad, motilidad y anormalidades espermáticas en el semen fresco, refrigerado y criopreservado de guajolote nativo (n=13).....	49

### ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Págs.</b>	
Figura 1.	Estados funcionales de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo teñidos con CTC.....	38
Figura 2.	Colección de semen por medio del masaje abdominal no invasivo descrito por Burrows y Quinn (1937).....	60
Figura 3.	Técnica de colección de semen.....	60
Figura 4.	Dilución del semen.....	61
Figura 5.	Evaluación espermática y proceso de congelación del espermatozoide de guajolote nativo.....	61
Figura 6.	Evaluación de los indicadores del espermiograma (motilidad, viabilidad, concentración y anormalidades espermáticas.....	62
Figura 7.	Proceso de inseminación artificial tanto de semen fresco como de semen congelado.....	63
Figura 8.	Proceso de incubación de huevos de pavas nativas inseminadas con semen fresco y congelado.....	64
Figura 9.	Evaluación de huevos fértiles por medio del embriodiagnostico (29 días de incubación).....	64
Figura 10.	Pavipollos nacidos por medio de inseminación artificial con semen fresco y criopreservado.....	65

## RESUMEN

La criopreservación de semen y los bancos de germoplasma de animales domésticos es una biotecnología de la reproducción que se utiliza para aumentar la difusión y evaluación de los progresos genéticos, mantener la conservación de especies, la biodiversidad y mejorar la gestión de la inseminación artificial. México cuenta aún con poblaciones locales de animales domésticos como lo es el guajolote nativo, sin embargo, en la actualidad no se cuenta con un protocolo de congelación en pavos que obtenga tasas de fertilidad exitosas. Por lo tanto, el objetivo planteado fue probar la eficacia del Triladyl® para la conservación de semen de guajolote nativo, para determinar la duración del periodo fértil y la tasa de fertilidad por medio de la IA, además de estudiar la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de congelación. Se realizaron tres experimentos para cumplir los objetivos planteados. Experimento 1. Se formaron aleatoriamente dos grupos de 5 hembras adultas cada uno (grupo testigo y grupo tratado). Las pavas del grupo tratado, se inseminaron con semen criopreservado en Triladyl® y el grupo testigo con semen diluido en BTSE II®. En ambos casos, la inseminación se realizó por única vez los días 1 y 2, al inicio del experimento, una vez ya iniciada la postura. Las dosis utilizadas contenían una concentración espermática de  $300 \times 10^6$  y  $150 \times 10^6$  respectivamente. Los huevos se recolectaron 24 horas después de la segunda inseminación diariamente, se almacenaron por 7 días a temperatura ambiente y posteriormente fueron introducidos a una incubadora automática a 37.8 °C, las cargas a la incubadora se realizaron cada semana y así sucesivamente durante 4 semanas para su desarrollo embrionario. Este experimento tuvo como propósito estimar la duración de la fertilidad. Experimento 2. A diferencia del Experimento 1, el grupo tratado y testigo se formó por 10 pavas jóvenes cada uno y se inseminaron cada 7 días, durante 7 semanas, una vez comenzada la producción de huevo, con el fin de determinar la tasa de fertilidad. Experimento 3. Se utilizaron 6 machos (12 meses de edad), estos se colectaron simultáneamente para la formación de un “pool” de semen el cual se diluyó en Triladyl® (1:4) y se sometió al proceso de congelación. Durante este proceso, se evaluó el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide mediante clortetraciclina (CTC) fluorescente, en las 3 etapas principales del proceso de congelación; fresco, diluido y descongelado. Se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar; para el caso de los datos obtenidos de la inseminación artificial (Experimentos 1 y 2) se realizaron tabulaciones cruzadas y pruebas de Chi-Cuadrada. Para el caso de los datos de la evaluación de la integridad de la membrana plasmática (Experimento 3), se analizaron a través de un análisis de varianza de una vía y los promedios se compararon empleando la prueba estadística prueba de Tukey. Empleándose para tal efecto el programa SPSS® versión 16. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Experimento 1. Por medio del embriodiagnóstico, se determinó un periodo fértil de dos semanas para el semen congelado y de tres semanas para el semen fresco, y una disminución de la fertilidad conforme pasa el tiempo post-inseminación en ambos tratamientos. Experimento 2. La tasa de fertilidad del semen fresco (77.27%) fue significativamente superior ( $p < 0.10$ ) a la obtenida por el semen criopreservado (35.70 %). Experimento 3. El semen fresco obtuvo mayor número de espermatozoides con

capacidad fecundante de 87.82; mientras que el semen refrigerado 78.15 y el semen descongelado 36.46. En general, estos resultados, permite concluir que es posible la IA en pavas nativas con semen criopreservado en Triladyl® como una herramienta para la producción, reproducción y conservación del guajolote nativo; ya que para la criopreservación de semen aviar con fines de conservar la diversidad genética, no se requieren altos porcentajes de fertilidad mientras que la tasa de eclosión sea alta.

**Palabras clave: Triladyl®, guajolote nativo, criopreservación, diversidad genética y bancos de germoplasma o recursos zoogenéticos.**



---

# INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y CAPACIDAD FERTILIZANTE DEL ESPERMATOZOIDE DE GUAJOLOTE NATIVO (*Meleagris gallopavo gallopavo*) CRIOPRESERVADO EN TRILADYL

## 1. INTRODUCCIÓN

La pérdida de biodiversidad, conocida como erosión genética, pone en peligro la calidad de vida del ser humano y la subsistencia de las generaciones futuras. La extinción de especies llegó a niveles críticos durante el siglo XX, por eso la FAO ha planteado la necesidad de conservar los recursos biológicos y poder enfrentar cambios en el futuro, ya que la diversidad biológica es la clave para el mantenimiento de la vida tal y como ahora la conocemos, siendo un aspecto fundamental la conservación de poblaciones de animales autóctonos (Tamargo *et al.*, 2009). México cuenta aún con poblaciones locales de animales domésticos como lo es el guajolote nativo que es importante conservar.

La Criopreservación de semen de animales domésticos se utiliza para aumentar la difusión y evaluación de los progresos genéticos, mantener la conservación de los recursos, la biodiversidad y mejorar la gestión de la inseminación artificial (IA) (Blesbois, 2006). Esta estrategia se concretiza a través del establecimiento de los bancos de germoplasma.

En varios estudios se inseminaron pavas de líneas comerciales con semen congelado utilizando diferentes diluyentes, crioprotectores y protocolos de congelación, obteniendo tasas de fertilidad variables, de 15% y 24% por Macpherson *et al.* (1969); 30.4% por Blesbois y Grasseau (2006); y hasta de 61% publicados por Sexton (1981). Esta última cifra, es la tasa de fertilidad más alta alcanzada y es menor a la obtenida en inseminaciones con semen fresco (90%).

En la actualidad, no existen protocolos de congelación de semen de pavo reproducibles y por eso se sigue utilizando el semen fresco diluido en la reproducción artificial de pavos a nivel comercial.

Por lo anterior, es importante desarrollar un protocolo satisfactorio para conservar a largo plazo el semen de las poblaciones de animales autóctonos, como el guajolote nativo. Ochoa (2010) recientemente obtuvo resultados satisfactorios *in vitro* con semen de guajolote nativo criopreservado en <sup>1</sup>Triladyl®, de 40±13% de movilidad progresiva y 50±14.1%, de viabilidad espermática y sugiere la confirmación de estos resultados, mediante la IA en pavas nativas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad fertilizante y el periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl® mediante inseminación artificial y estudiar la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación.

<sup>1</sup>**Triladyl®**, Marca Registrada por Minitube. Alemania.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. PERDIDA DE LA DIVERSIDAD GENETICA DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

A escala mundial, la diversidad genética de animales domésticos está declinando rápidamente por la práctica de cruzar, absorber o sustituir razas autóctonas con un grupo reducido de razas exóticas. Al menos 300 de las 6,000 razas identificadas por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2003), se extinguieron en los últimos 15 años y una proporción importante de las 1,300 razas que aun existen, declinaron su tamaño de población y en la actualidad están en peligro de extinción; perdiéndose un promedio de dos razas por semana.

A este proceso de extinción de razas se le conoce también como erosión genética, el cual debe controlarse, ya que las razas locales o autóctonas permanecen como una opción para producir en condiciones ambientales difíciles (Alderson, 1990).

La conservación de razas locales también es importante porque ante la posibilidad de futuros cambios climáticos del planeta o la aparición de nuevas enfermedades, más de una de esas razas nativas o locales podrían sobrevivir y producirse de mejor manera en comparación con las razas especializadas o líneas comerciales (Alderson, 1990).

Además, los recursos genéticos se cuentan entre los bienes más valiosos e importantes que posee una nación; por ello, varios países realizan esfuerzos importantes para su conservación, evaluación y aprovechamiento (Izquierdo *et al.*, 2005). Desafortunadamente, países como México, poseen más reservorios de razas autóctonas o de poblaciones locales, pero tienen las mayores tasas de extinción por carecer de políticas de conservación y de gestión específicas (FAO-UNEP, 2000).

En México el guajolote nativo es una especie que ha sido poco estudiada, porque productivamente es poco competitivo frente al pavo comercial de doble pechuga (Cuadro 3). Sin embargo, los grupos indígenas y campesinos lo han conservado hasta nuestros días

bajo condiciones de traspatio (Camacho *et al.*, 2008); gracias a ellos existen aún grandes poblaciones autóctonas en todo el país.

## **2.2. EL GUAJOLOTE NATIVO (*Meleagris gallopavo gallopavo*), UN RECURSO GENÉTICO DE MEXICO**

### **2.2.1. Origen, domesticación y distribución del pavo**

Se cree que los antepasados de los guajolotes (*Rhegninormis calbates*) emigraron de Asia a América por el estrecho de Bering en el Mioceno Temprano y para el Pleistoceno ya había evolucionado el antecesor del guajolote actual que ahora conocemos (Camacho *et al.*, 2011). Aparentemente el guajolote actual (*Meleagris gallopavo gallopavo*) fue domesticado hace 400 A.C. en la parte sur del altiplano mexicano.

Diversos autores sitúan la domesticación de la especie en diferentes lugares del territorio mexicano (Valadez *et al.*, 2001; FAO, 2005; Corona- Martínez, 2006) una de ellas hace referencia al actual estado de Michoacán, la cultura purépecha posiblemente fue la responsable de la domesticación; dicha hipótesis se basa en el extenso uso de la especie para el aprovechamiento de sus huesos y plumas en la elaboración de adornos para la participación en ceremonias (Leopold, 1990).

En el México prehispánico, el guajolote 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). 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 nativo se cruzó con la variedad silvestre (*Meleagris gallopavo silvestris*) para formar una nueva raza de mayor rendimiento; misma que en 1927 fue sometida a una intensa selección para formar una variedad a la que se denomina “doble pechuga” y se convierte en la base de la producción intensiva del pavo en todo el mundo (Crawford, 1992). Este proceso de domesticación y difusión del guajolote se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Proceso de evolución, domesticación y difusión del guajolote

Años A.C.	Proceso	Fase del proceso
10,000 A.C.	Antecesor del guajolote ( <i>Rhegninormis calbates</i> ) emigra de Asia a América por el estrecho de Bering  Evolución al guajolote actual	Evolución y Migración
7,000 A.C.	Cacería de guajolotes por grupos humanos ↓ Captura de pavipollos por humanos ↓ Control de crías hasta edad adulta	Cacería para la alimentación  Cautiverio y pre-domesticación
400 A.C.	Ejemplares que hacen su vida completa dentro de los campamentos humanos ↓ <b>Guajolote doméstico</b>	Domesticación
Siglo XIV	Es llevado y difundido en Europa por los españoles colonizadores de América  ↓	Difusión
Siglo XVII	Regresó a Norteamérica junto con los colonizadores ingleses y lo cruzaron con la subespecie nativa del Este Norteamericano <i>M. g. silvestris</i>	
1927	Formación de nueva raza, misma que fue sometida a una intensa selección llamada “doble pechuga”	Creación de líneas comerciales

Fuente: Elaboración propia con datos de Crawford (1992) y Valadez (2003)

De esta manera México ha sido el centro de origen de la domesticación y distribución del guajolote nativo y desde entonces ha representado un aporte, tanto alimenticio, como económico para las familias de los mexicanos, persistiendo en sistemas de producción de traspatio (Aquino *et al.*, 2003).

### 2.2.2. Clasificación taxonómica

En un intento por ubicar taxonómicamente la posición del guajolote nativo doméstico, se ha construido el Cuadro 2. De manera general se distinguen dos géneros (*Agriocharis* y *Meleagris*), cada uno con su respectiva especie. *A. Ocellata* es una especie silvestre localizada actualmente en la península de Yucatán, conocida como pavo de monte o guajolote ocelado y utilizado como especie de ornato. *M. gallopavo* tiene seis subespecies de las cuales, *M. g. mexicana* y *M. g. intermedia* se distribuyen actualmente en México en estado silvestre; mientras que *M. g. gallopavo* es la actual especie doméstica y distribuida en toda la Republica Mexicana. Además, se han reconocido hasta 11 fenotipos, de acuerdo a diferentes características morfológicas, como la coloración de las patas y plumaje.

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica y fenotípica del pavo**

Familia	Género	Especie	Subespecie	Fenotipo
<i>Meleagridae</i>	<i>Agriocharis</i>	<i>A. ocellata</i>		Bronceado Negro Royal Palm Castaño Rojo Borbón Narragancet Manchado Café Pizarra Blanco Albinismo
	<i>Meleagris</i>	<i>M. gallopavo</i>	<i>M. g. gallopavo</i> <i>M. g. mexicana</i> <i>M. g. intermedia</i> <i>M. g. merriani</i> <i>M. g. silvestris</i> <i>M. g. osceola</i>	
			Actual guajolote doméstico	

Fuente: Elaboración propia con datos de Stangel *et al.* (1992) y Camacho *et al.* (2008a).

### 2.2.3. Características productivas

Los guajolotes silvestres, domésticos 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 (Camacho, 2009). Estas diferencias biológicas, etológicas y reproductivas se muestran en el Cuadro 3.

En el cuadro se presenta una síntesis de las características productivas, etológicas y reproductivas entre el guajolote silvestre, el nativo doméstico y el pavo comercial. Se puede observar que los guajolotes silvestres tienen un mayor peso corporal, mayor número de huevos por nidada y más pavipollos al nacimiento que los guajolotes nativos domésticos, sin embargo, estos últimos tienen mayor número de nidadas por año, menor mortalidad de pavipollos, independencia de los pavipollo de la madre a edad más corta, la parvada no presenta dimorfismo sexual, las hembras son más precoces. Los pavos domésticos conservan algunas características propias del guajolote silvestre como son: la capacidad de vuelo, resistencia a cambios bruscos de dietas y el instinto de alimentación omnívora cuando tienen oportunidad del pastoreo.

Mientras tanto, el pavo de línea comercial ha desarrollado otras características que han sido aprovechadas para la selección de líneas genéticas comerciales, como lo son: mayor peso corporal, mejor conversión alimenticia, mayor producción de huevos, menor mortalidad de pavipollos y más precocidad que los guajolotes nativos domésticos y silvestres. Sin embargo, ha perdido instintos importantes como el temperamento de alerta y huida a los depredadores, ha perdido totalmente la capacidad de vuelo y la diferencias de peso entre macho y hembra, ha hecho el uso obligatorio de la inseminación artificial.

Es importante mencionar que las líneas de pavo comercial han perdido la capacidad de adaptación a prácticamente todas las condiciones ecológicas (climas extremos, condiciones sanitarias inadecuadas y alimentación con bajo valor nutrimental) a diferencia de los guajolotes nativos domésticos que han desarrollado su capacidad de adaptación a prácticamente todos los climas del territorio mexicano. (Mallia 1998; Losada *et al.*, 2006).

**Cuadro 3. Características biológicas, etológicas y reproductivas del guajolote silvestre, doméstico y pavos de línea comercial**

CARACTERÍSTICAS	GUAJOLOTE SILVESTRE	GUAJOLOTE DOMÉSTICO	LINEA COMERCIAL
Hábitat	Bosques templados y fríos	Adaptables a climas extremos	Explotaciones con ambiente controlado
Peso corporal macho adulto	9 kg en promedio. El peso y la talla dependen de la subespecie y el clima	5 - 9.4 kg el peso y la talla dependen de la edad máxima de crianza, alimentación y fenotipo	De 18 a 25 kg (reproductores)
Peso a la venta macho y hembra	9 kg macho 6 kg hembra	8-9 kg machos al año de edad 4-6 kg hembras al año de edad	8 kg a 15 semanas de edad 5 kg a 17 semanas de edad
Peso corporal hembra adulta(kg)	3.5 – 9. Dependiendo del clima	3 - 7.2. Varía con la edad y tipo de alimento	11 kg a las 30 semanas de edad (reproductoras)
Características reproductivas del macho	Comienzan la reproducción a los 2 – 3 años de edad. A los cinco años ya son considerados viejos	Los productores prefieren los machos jóvenes y consideran que los mayores a tres años ya son viejos	En las explotaciones comerciales se utilizan machos de 1-2 años edad para la IA de hembras
Características reproductivas de la hembra	Comienzan su actividad reproductiva al primer año de vida	Alcanzar la madurez sexual en promedio a los 9 meses	Comienzan la producción de huevo a las 30 semanas de edad
Periodo reproductivo	Estacional. Con una sola parvada por año	Estacional. Con 2 a 3 parvadas al año	La duración del ciclo de postura es de 24 semanas
Núm. de huevos por nidada	8 – 22 huevos por nido	13 huevos en promedio	60 a 100 huevos en un ciclo
Tasa de Fertilidad %	72	76.9	90
Duración incubación (días)	25 – 29	29.7	28
Tasa de eclosión %	70	85	84
Núm. de crías por hembra	3.9 pavipollos a las 2 semanas de edad	5 pavipollos a las 2 semanas de edad	Criadora artificial
Independencia de pavipollos	7 meses de edad	2.7 meses de edad	Al nacer. Crianza en criadora artificial
Temperamento	Cautelosos, desconfiados, siempre alerta para escapar y poco tolerantes a los humanos	Toleran bien a las personas y sus animales domésticos	Dóciles y curiosos
Alimentación	Omnívora	Omnívora bajo condiciones de pastoreo	Alimento comercial
Capacidad de vuelo	A los 6-10 días de nacidos	A las 3 semanas de nacidos	Perdida, debido al peso
Proporción macho-hembras	1:5	1:3	IA
Conversión alimenticia (kg)	No hay estudios	8.4	2.7

Fuente: Elaboración propia con datos de Mukesh (2005); SAGARPA (2007); SEMARNAT (2007) y Camacho (2009).

El guajolote silvestre y doméstico tienen características propias que son valoradas para su conservación y aprovechamiento; el guajolote silvestre es una de las principales especies de caza desde el Norte de México hasta el sur de Canadá; mientras que el guajolote doméstico ha sido conservado por los campesinos y grupos indígenas mexicanos para su consumo principalmente en fiestas (Camacho, 2009).

#### **2.2.4. Los sistemas de producción del guajolote nativo en México**

En México la producción de guajolotes es una actividad que se continúa desarrollando prácticamente en todo el territorio nacional mediante tres sistemas productivos; tecnificado, semitecnificado y de traspatio.

El sistema productivo tecnificado se desarrolla principalmente en los estados de Chihuahua, Sonora, Puebla y Yucatán, destinando su producción al abasto del mercado de fin de año, sus canales de comercialización están bien definidos y sus principales compradores son centros comerciales que compran al mayoreo. Este sistema aporta el 50% de la producción nacional y cuenta con tecnología de punta para cumplir sus objetivos; sin embargo, son importadores de huevo fértil o pavipollos de líneas comerciales mejoradas provenientes de Chile y Estados Unidos. En la actualidad solo existen 4 empresas que explotan el pavo de manera intensiva en México, las cuales durante los últimos 5 años, han venido manteniendo una producción de carne en canal de 12,000 a 14,000 toneladas anuales (SAGARPA, 2007).

El sistema de producción semitecnificado, solo se practica de manera aislada en algunos estados como lo son el estado de México, Puebla, Yucatán, Michoacán, Hidalgo, Tlaxcala y Tabasco. Por lo general, el tamaño de estas explotaciones van de 500 a 5000 aves por ciclo de engorda. El nivel de tecnificación es bastante limitado por lo que se obtienen menores niveles de eficiencia productiva. Por tal razón este sistema de producción aporta solo el 8 % de la producción nacional (SAGARPA, 2007a).

La producción de traspatio es el sistema con mayor tradición en las comunidades rurales y se practica en todo el territorio nacional; este sistema carece de tecnificación,

siendo el pastoreo la única práctica de manejo, la cual es realizada en su mayoría por las amas de casa. El sistema aporta el 42 % de la producción nacional, tiene un alto valor cultural ya que la mayor proporción de la producción se destina a la preparación de platillos mexicanos que se consumen en festividades familiares como bodas, bautizos y cumpleaños, además de ser un aporte económico y nutricional para las familias rurales al venderlos o para el autoconsumo (Aquino *et al.*, 2003).

El estado de Michoacán ocupa el 14° lugar en el país en cuanto al tamaño de la producción en pie, produciendo dos millones de guajolotes, con una explotación de 89% bajo condiciones rústicas o de traspatio (INEGI, 2004).

### **2.3. ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS NATIVOS**

Existen dos estrategias de conservación de los recursos genéticos nativos las cuales son: la conservación *in situ* y la conservación *ex situ*.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB, 1992) define la conservación *in situ* como “la conservación de los ecosistemas, los hábitats naturales y el mantenimiento y recuperación de poblaciones de especies viables en sus entornos naturales y, en el caso de las especies domesticadas y cultivadas, en los entornos en que hayan desarrollado sus propiedades específicas”. También se define a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos como “la conservación de componentes de la diversidad biológica fuera de sus hábitats naturales” o la conservación de material germinal que en un futuro permita regenerar un individuo o una población.

En los países europeos y en Norteamérica, diferentes organizaciones gubernamentales y privadas, tratan de preservar la diversidad genética *in situ* estimulando el uso de razas autóctonas por los productores en las reservas naturales y en granjas comerciales. Al mismo tiempo están estableciendo bancos de genes para la conservación *ex situ* de las especies, ya que este es un instrumento complementario a la conservación *in situ*, particularmente cuando existe riesgo de enfermedades epidémicas (Bleisbois *et al.*, 2006).

En la conservación *ex situ*, se plantea como estrategia el establecimiento de los bancos de germoplasma o bancos de recursos zoogenéticos, en los cuales se almacena material germinal en forma de semen, ovocitos, embriones y células. La conservación *ex situ* tiene como objetivo el mantenimiento de material genético de especies amenazadas, a fin de apoyar a los programas de conservación *in situ*, asegurando a largo plazo la propagación de especies con alto valor genético y en peligro de extinción (Hammon y Leitch, 1996).

Sin embargo, con los métodos actuales y la tecnología disponible, la criopreservación de embriones y ovocitos con el fin de preservar el cromosoma W de las aves no es posible, debido al gran tamaño y características del huevo. La criopreservación de células del blastodermo o células germinales primordiales podrían ofrecer un medio para preservar el genoma completo. No obstante, la baja tasa de eficiencia de la reconstitución y los altos costos asociados con la tecnología, hacen que estos últimos enfoques no sean una opción (Petite, 2006).

La Criopreservación de semen aviar, es el método más fácil y efectivo de la conservación *ex situ* de los recursos genéticos de las aves. Sin embargo, mediante este método solamente se puede conservar el genoma del macho, puesto que en las aves el sexo de la hembra es heterogamético.

#### **2.4. LOS BANCOS DE RECURSOS ZOOGENETICOS PARA LA CONSERVACIÓN *EX SITU***

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 (Martínez *et al.*, 2005; Fulton, 2006; Wolders *et al.*, 2006). Los cuales tienen diversos usos (Blesbois *et al.*, 2006):

- a) La reconstitución de las poblaciones de especies locales.

- b) Reintroducción de la variabilidad genética en las razas cuya base genética se debe volver a introducir los genes que se pudieron haber perdido o han sufrido una reducción en frecuencia, debido al cruzamiento con razas o líneas especializadas.
- c) El desarrollo de nuevas razas o poblaciones compuestas, ya sea para investigación o uso de la industria.
- d) Una fuente de material para estudios genéticos.

Los avances recientes en la criopreservación de semen aviar, ha permitido la gestión *ex situ* de los recursos genéticos aviares a través de los bancos de recursos zoogenéticos, tanto en Europa como en América del Norte.

Existen tres principales programas nacionales de bancos de recursos zoogenéticos aviares operando en Norte América, Holanda y Francia hasta el 2006 (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Programas nacionales de bancos de germoplasma aviar hasta el 2006**

Ubicación	Bancos de recursos zoogenéticos	Inventario
<b>Norte América</b> (Blackburn, 2006)	The National Animal Germplasm Program	Semen y sangre de 59 líneas de pollos y pavos Un total de 451 machos 2132 pajillas de semen
<b>Holanda</b> (Wolders <i>et al.</i> , 2006)	The Netherlands Centre of Genetic Resources	Contiene 11 raza autóctonas Un total de 261 machos 7,762 dosis de inseminación
<b>Francia</b> (Bleisbois y Grasseau, 2006)	The French National Cryobank of Domestic Animals	Incluye semen de 18 razas Un total 391 machos 11,000 pajillas

En América del norte se ubica el Programa Nacional de Germoplasma Animal en el cual se conserva semen y sangre de 59 líneas de pollos y pavos con alto valor genético para las explotaciones comerciales. En Holanda se conserva el semen de 11 razas autóctonas con un total de 261 machos con fines de preservar la diversidad genética en el Centro de

Recursos Genéticos de Holanda. En Francia mediante el Criobanco Nacional de Animales Domésticos se conserva semen de 18 razas de aves de un total de 391 machos.

En México, en Octubre del 2011, se inauguró el Centro Nacional de Recursos Genéticos, en Tepatitlan, Jalisco; el cual busca fomentar la conservación y aprovechamiento de la riqueza genética existente en el país: acuática, agrícola, forestal, microbiana y pecuaria, de importancia biológica o económica. Sin embargo, aun no posee germoplasma animal de ningún tipo en sus instalaciones.

## **2.5. PRINCIPIOS GENERALES DE LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE**

El descubrimiento del glicerol como agente crioprotector del espermatozoide de ave (Polge *et al.*, 1949) permitió el desarrollo de diversos protocolos de congelación en varias especies domésticas. Empero, con excepción de los bovinos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas, en parte porque los protocolos no proporcionan resultados aceptables de fertilidad (Parks y Graham, 1992).

Las diferencias entre especies se deben principalmente a diferencias en la fisiología y la bioquímica del espermatozoide y, también, a las variaciones en la anatomía y fisiología del tracto reproductor de la hembra, que dan lugar a importantes diferencias en las características del transporte espermático (Holt, 2000).

El proceso de criopreservación incluye cinco etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación. Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y el metabolismo celular; pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Watson, 1995).

Dichas etapas del protocolo de congelación (dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación) se influyen mutuamente, así los ritmos de

cambio de temperatura elegidos en una determinada etapa del proceso afectan directamente a los que se utilizarán en la etapa siguiente (Hammerstedt *et al.*, 1990).

La dilución excesiva del semen aviar provoca una disminución de la motilidad y de la capacidad fecundante de los espermatozoides, por tanto, la tasa de dilución debe ser la adecuada para asegurar la eficacia del diluyente pero no excesiva. Como norma general, se considera un rango óptimo de dilución (semen:diluyente) de 1:2 hasta 1:5 (Sauveur, 1991).

La refrigeración del semen forma parte del proceso de criopreservación; para lo cual se necesitan diluyentes adecuados que contienen componentes específicos, tales como: solución tampón, azúcares y sustancias crioprotectoras de la membrana plasmática, como la yema de huevo o la leche ultra pasteurizada (Hammerstedt *et al.*, 1990). En el siguiente apartado se analizarán a fondo las características y componentes de los diluyentes de semen aviar.

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la refrigeración), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias. La pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precozmente se producen en el proceso (De Leeuw *et al.*, 1991).

La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, pues los crioprotectores, proporcionan protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extracelulares del espermatozoide (Fahy *et al.*, 1990).

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, 2000a).

Durante el enfriamiento de la suspensión celular por debajo de los 0°C, se producen una serie de procesos nocivos para la célula, que comienzan con la formación de hielo en el compartimento extracelular. La membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la

expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intracelular. Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que habrá una considerable concentración de sales en la porción remanente del agua no congelada. El aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intracelular hacia el ambiente extracelular, causando deshidratación de la célula. Por tanto, la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones estructurales de la membrana plasmática del espermatozoide (Parks y Graham, 1992).

El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los  $-15$  y  $-60^{\circ}\text{C}$ , que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A  $-196^{\circ}\text{C}$  no se producen reacciones térmicas, puesto que a  $-130^{\circ}\text{C}$  no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

La presencia de hielo extracelular, aunque puede deformar las células, no causa ruptura de la membrana plasmática ni tampoco daños irreversibles. Por el contrario, la formación intracelular de cristales de hielo provoca lesión y muerte de la célula. Dado que la formación de hielo intracelular es dependiente del ritmo de congelación y descongelación. Por eso, el estricto control de la velocidad del descenso o del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intracelular (Watson, 1979).

El éxito final de un procedimiento de congelación está condicionado por el proceso de descongelación. Si el ritmo de enfriamiento es rápido, el de calentamiento también lo debe ser; alternativamente, si el ritmo de enfriamiento es lento también debe serlo el de calentamiento. Las células que contienen microcristales de hielo intracelulares deben ser recalentadas muy rápidamente a fin de evitar la recrystalización de estos pequeños cristales, en grandes cristales que pueden dañar las células (Amann y Pickett, 1987).

Por tales razones, es difícil, si no imposible, separar los efectos perjudiciales causados por la congelación de los causados por la descongelación, ya que las células criopreservadas son expuestas al descenso y ascenso de la temperatura.

Las principales situaciones de *estrés* para la membrana plasmática del espermatozoide en los procesos de congelación y descongelación son de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico (cuadro 5).

**Cuadro 5. Situaciones de *estrés* para las membranas del espermatozoide en los procesos de congelación y descongelación (Parks y Graham, 1992)**

<b>Stress detectado</b>	<b>Consecuencia celular</b>
<b>Reducción de la temperatura</b>	Cambios en los lípidos de la membrana fase despolimerización del citoesqueleto
<b>Aumento de la concentración de solutos</b>	Retracción osmótica
<b>Aumento de la concentración iónica</b>	Los efectos directos sobre las membranas, incluyendo la solubilización de proteínas de la membrana
<b>Deshidratación</b>	La desestabilización de la bicapa lipídica
<b>La formación de burbujas de gas</b>	El daño mecánico a las membranas y el citoesqueleto
<b>Cambios en el pH</b>	Desnaturalización de proteínas

En consecuencia, los daños en la membrana del espermatozoide incluyen alteraciones en su organización, fluidez, permeabilidad y en su composición lipídica. Además de estos cambios se produce la pérdida de algunas proteínas de la membrana durante estos procesos de congelación y descongelación (Ollero *et al.*, 1998).

---

## 2.6. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN LAS AVES DE CORRAL

La criopreservación de semen en las aves domésticas se comenzó a estudiar desde hace 60 años. Sin embargo, los métodos eficientes de congelación de semen de gallo de diferentes razas han surgido sólo en la última década del siglo XX, a partir de la formación del Acuerdo Internacional Sobre la Diversidad Biológica en Río de Janeiro, Brasil (1992), el cual provocó un nuevo interés en el desarrollo de métodos de congelación de semen para las aves domésticas (Fulton, 2006). También han sido estudiados métodos de congelación en los pavos, pintadas, patos, gansos y otras especies, en las cuales no se han obtenido resultados satisfactorios (Bleisbois *et al.*, 2006).

Cabe señalar que las altas tasas de fertilidad necesaria para la producción comercial (> 90%) no son obligatorias para el éxito de la criopreservación de espermatozoides de aves de corral con propósitos de conservación genética; la línea germinal de recuperación es factible con tasas de fertilidad modestas, del 60% o menos, siempre y cuando el porcentaje de nacimientos de huevos fértiles siga siendo alto (Long, 2006).

La criopreservación de semen busca reducir o detener el metabolismo del espermatozoide y prolongar su vida fértil. Dicho proceso requiere: 1) Selección de un diluyente apropiado, 2) Selección de un crioprotector, 3) Determinación de las tasas de congelación y descongelación (Buss, 1993).

### 2.6.1. Diluyentes para la criopreservación de semen aviar

Tras la obtención del semen, el primer paso a seguir es la dilución del semen en un medio adecuado para la supervivencia de los espermatozoides *in vitro*. El tipo de diluyente elegido y los ritmos específicos de refrigeración, congelación y descongelación son factores importantes en la calidad del semen, pues influyen sobre la morfología y la motilidad de los espermatozoides y éstas, a su vez, en los índices de fertilidad tras la inseminación artificial.

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 diluyentes de semen aviar se basan en la composición bioquímica del

semen de pollo y pavo (Lake, 1995). Existen una gama de diluyentes para conservar y congelar el semen, tanto en gallos como en pavos; la composición química de los principales diluyentes se presenta en el Cuadros 6. Estos diluyentes fueron diseñados exclusivamente para la congelación de semen aviar y son adicionados con diferentes crioprotectores, he incluso de combinaciones de ellos, aunque también se han utilizado como extensores de semen para la inseminación con semen fresco.

**Cuadro 6. Composición química de los diluyentes de semen de gallo y pavo, utilizados para la criopreservacion**

COMPONENTE	BPSE I	PBSE II	HS-1
	(Sexton, 1977)	(Sexton y Giesen, 1982)	(Hanzawa <i>et al.</i> , 2006)
	Semen de gallo g/lt	Semen de pavo g/lt	Semen de gallo g/lt
Difosfato de potasio (3H <sub>2</sub> O)	12.7	12.7	3.0
Glutamato de sodio	8.67	8.67	12.0
Fructosa (anhídrida)	5.0	5.0	
Glucosa	-	-	2.0
Trihalosa	-	-	3.8
Acetato de sodio (3H <sub>2</sub> O)	4.30	4.30	-
TES*	1.95	1.95	-
BES*	-	-	5.0
BIS-TRIS*	-	-	5.0
Citrato de potasio	0.64	0.64	-
Monofosfato de potasio	0.65	0.65	-
Cloruro de magnesio	0.34	0.34	-
Sulfato de gentamicina	-	-	0.01
pH	7.5	6.5	6.8
mOsm -1 kg/H <sub>2</sub> O	333	350	360

Los diluyentes BPSE I y BPSE II®, son elaborados comercialmente y patentados en USA.

Estos dos diluyentes tienen composición química similar, a pesar de ser diseñados para especies diferentes, en la cual TES, fosfatos (Na o K) y TRIS actúan como soluciones buffer; la fructosa y glucosa aportan energía al espermatozoide; el glutamato de sodio protege a los espermatozoides del choque térmico; el cloruro de magnesio, el acetato de sodio, el citrato de potasio y el cloruro de sodio son sustancias que regulan la presión osmótica. Las únicas diferencias entre el BPSE I y el BPSE II es que el pH del diluyente de gallos es más alto, mientras que la osmolaridad es menor con respecto al diluyente de pavos.

A estos diluyentes se les adiciona sustancias orgánicas con capacidad para impedir el choque del frío (por lo general yema de huevo o leche) y agentes crioprotectores como glicerina o DMSO.

No existe una norma específica para la elaboración de los diluyentes para el semen aviar y los estudios son muy variables en el diseño experimental (tasa de dilución, envasado del semen, tiempo de refrigeración, uso de crioprotectores, tasas de congelación-descongelación) lo que muestra que es difícil analizar los beneficios de diferentes diluyentes. Sin embargo, hay una base común de características que deben reunir los diluyentes como lo son; los factores para mantener el pH, osmolaridad y proporcionar una fuente de energía para los espermatozoides, además de la adición de crioprotectores.

Aunque el intervalo de tolerancia en pH para los espermatozoides de aves es amplio, el pH ácido reduce la movilidad, la producción de ácido láctico y el consumo de oxígeno; mientras que un pH alcalino, aumenta el metabolismo y en ambos casos se reduce sensiblemente la fertilidad de los espermatozoides (Donoghue y Wishart, 2000). Estas alteraciones se dan comúnmente durante la refrigeración del semen ya sea para la inseminación con semen diluido o en el caso de protocolos de congelación con tiempos prolongados de refrigeración.

El Triladyl® es un diluyente buffer comercial diseñado para bovinos que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, agua desionizada y antibióticos, se ha convertido en un diluyente clásico para la crioconservación de semen bovino, contiene glicerol como crioprotector, y se le adiciona yema de huevo. Recientemente fue utilizado por Ochoa

---

(2010) en un experimento *in vitro* con resultados satisfactorios en la conservación del espermatozoide de guajolote nativo.

### 2.6.2. Agentes crioprotectores para la congelación de semen aviar

El proceso de criopreservación ideal debe conservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide. La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Watson, 1995).

Los crioprotectores se han clasificado en dos grupos, según su capacidad de penetración a la membrana del espermatozoide: los que atraviesan la membrana celular, tales como: el glicerol, la dimetilacetamida (DMA) y el dimetilsulfóxido (DMSO). 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) (Wolfe *et al.*, 2001).

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.

**El Glicerol** actúa mediante un mecanismo de tamponamiento salino, puesto que la glicerina se une con el agua y disminuye acentuadamente el punto de congelación de cualquier temperatura dada, consecuentemente la concentración de solutos en el líquido residual se reduce. La influencia perjudicial de los solutos concentrados parece depender de la temperatura, de aquí que el glicerol, al reducir la temperatura a la que se obtienen tales concentraciones de soluto, disminuye posiblemente sus efectos perjudiciales (Salisbury *et al.*, 1978).

Sin embargo, con el uso del glicerol se daña la mucosa del tracto reproductor de la hembra aviar, disminuye la tasa de movilidad espermática e incrementa el porcentaje de espermatozoides muertos y con morfología anormal en el tracto reproductor de la hembra. Mostrando un efecto anticonceptivo (Long y Kulkarni, 2004).

La eliminación del glicerol antes de la IA se logra mediante la diálisis o por centrifugación, ambos métodos tienen desventajas; la diálisis tiende a consumir mucho tiempo y el centrifugado puede causar daño al espermatozoide. La trehalosa y la meticolosa son crioprotectores no penetrantes que se han utilizado en combinación con el glicerol para evitar el daño causado a los espermatozoides durante la congelación y mejorar la fertilidad post-descongelación (Steele y Wishart, 1996).

Los efectos tóxicos del glicerol han impulsado el estudio del empleo de otros crioprotectores como la **Dimetilacetamida (DMA)**, una sustancia hidrosoluble que disminuye el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido), mejora la viabilidad celular alterando el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación y ayuda a proteger las células del daño causado por la formación de hielo intracelular. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que en el momento en que se induce la nucleación en el espacio extracelular, la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congele (Tselutin, 1999).

Entre los estudios con los mejores resultados de fertilidad con semen post-descongelado aviar son los reportados por Tselutin (1999), quien congeló semen de gallo doméstico en dos experimentos diferentes, utilizando en el primero glicerol al 6.5% y en segundo DMA al 6.5%, un diluyente Lake y una tasa de dilución 1:4; en ambos casos, un tiempo de equilibrio de 30 y 60 minutos respectivamente y una concentración espermática de  $3.5 \times 10^6$ , obteniendo como resultado fertilidad de 63.9% y 92.7%, respectivamente.

El **dimetilsulfoxido (DMSO)** es uno de los crioprotectores más utilizados en aves desde 1959; es un solvente bipolar, hidrosoluble, de bajo peso molecular, lo que permite la entrada rápida a través de la membrana celular y modula la estabilidad y las fases de la bicapa de los fosfolípidos. 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).

La **Polivinilpirrolidona (PVP)** es un polímero soluble en agua, formado por cadenas de múltiples vinilpirrolidonas. 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).

Herrera (2005), congeló semen de gallo usando DMSO vs PVP con el método de pellets a  $-79^{\circ}\text{C}$  y obtuvo una fertilidad de 40% con DMSO y 39% con PVP. Congelando semen de faisán, utilizando DMSO y PVP reportó una fertilidad del 60% y 57% respectivamente. Por tanto, recomienda el uso de cualquier de estos dos crioprotectores para la congelación de semen de faisán y de gallo, ya que bajo un protocolo de congelación rápida se obtienen resultados similares de fertilidad.

Al comparar la eficacia de los diferentes crioprotectores, para los espermatozoides de aves, varios factores deben ser tenidos en cuenta; la especie animal, tasa de dilución, modo de envasado, concentración de crioprotector, la temperatura del equilibrio, tiempo de equilibrado, tasa de congelación, el método de congelación y tratamiento post-descongelación. La dificultad de comparar un crioprotector con otro es difícil ya que rara vez se repetirá un estudio el mismo diseño experimental.

El DMA, hasta la fecha, es el crioprotector que ha obtenido la tasa de fertilidad más alta (92%), misma que es similar con la tasa de fertilidad del semen fresco, sin embargo, estos resultados son reportados solo en la inseminación con semen congelado de gallo, por Tselutin (1999).

### **2.6.3. Tasas de congelación y descongelación**

Las tasas de 5 °C, 7 °C y 10 °C por minuto para mantener la fertilidad parecen mejor que 1 °C por minuto. Por otra parte, encontramos que la congelación de espermatozoides de 5 °C a -35 °C en presencia de glicerol o DMA mantiene los niveles de ATP de los espermatozoides, considerablemente mejor que dejar caer las muestras directamente en nitrógeno líquido. Además, el espermatozoide de pavo y de gallo, responden de manera diferente cuando son sometidos a temperaturas más bajas. La capacidad fecundante del espermatozoides de pavo se vio comprometida tan pronto como las temperaturas cayó por debajo de 15 ° C, mientras que el equilibrio en los 5 ° C no reduce la capacidad fecundante del espermatozoide de gallo (Sexton, 1981).

Las tasas de congelación utilizadas para la congelación de semen aviar son variables en cada protocolo de congelación, ya que esta dependerá del equipo e infraestructura con la que se cuente, del mismo modo, los resultados son diversos, ya que estos dependerán del diseño experimental.

En el Cuadro 7 se muestran algunos resultados obtenidos dependiendo de la tasa de congelación (°C/min) y a la pajilla utilizada, usando el crioprotector dimetilformamida (DMF) al 6% y el diluyente IGGK (tapón fosfato).

Este estudio demostró una mayor proporción de supervivencia de espermatozoides de gallos (37%) al utilizar una tasa de congelación intermedia (15 °C/min) y un tamaño de la pajilla de 0.5 ml, con la utilización de Dimetilformamida (DMF) al 6 % y el diluyente IGGK (tapón fosfato).

**Cuadro 7. Tasas (%) de supervivencia de los espermatozoides de gallo congelados-descongelados dependiendo de la velocidad de congelación y tipo de pajilla (Blesbois *et al.*, 2005)**

Envasado	Crioprotector	Diluyente	Tasa de congelación (°C/min)			
			60	30	15	7
			% Supervivencia			
<b>Pajillas de 0.50 ml</b>	Dimetilformamida (DMF) al 6 %	IGGK (tapón fosfato)	25%	28%	37%	25%
<b>Pajillas de 0.25 ml</b>	Dimetilformamida (DMF) al 6 %	IGGK (tapón fosfato)	12%	28%	30%	17%

#### 2.6.4. Congelación del semen de pavo

La congelación de semen de pavo ya sea en pellet o en pajillas, produce tasas de fertilidad menores a las obtenidas con semen fresco y con semen congelado de gallo, del 92%, en ambos casos; lo que indica que los espermatozoides de pavo son más afectados por la refrigeración y los procedimientos de congelación que los espermatozoides de gallo (Blanco *et al.*, 2000).

Los trabajos realizados en la congelación de semen de pavo son menores a los realizados en gallos.

Macpherson *et al.* (1969) congelaron semen de pavo bronceado, utilizando como crioprotectores una combinación de etilenglicol con glicerol y DMA con glicerol, obteniendo una fertilidad de 15% y 24 %, respectivamente.

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 30.4% de fertilidad post inseminación.

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.

En un estudio reciente (Ochoa, 2010) se encontraron resultados satisfactorios *in vitro* con semen de guajolote nativo crioconservado en Triladyl®, en donde se obtuvo 40±13% de movilidad progresiva y 50±14.1%, de viabilidad espermática. Es importante confirmar estos resultados obtenidos *in vitro* para conocer la eficacia del Triladyl® en la conservación de semen de guajolote nativo.

## **2.7. CAMBIOS DEL ESPERMATOZOIDE EN EL PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN**

La crioconservación es un método no fisiológico que implica un alto nivel de adaptación de células biológicas a los choques osmóticos y térmicos que se producen tanto durante el enfriamiento del proceso de congelación y durante el proceso de descongelación.

Dada la sensibilidad aparente de las mitocondrias del espermatozoide a la congelación y descongelación, no es de extrañar que la producción de ATP se vea comprometida después de la criopreservación (Watson *et al.*, 1992).

Los espermatozoides de aves son altamente susceptibles a cambios morfológicos durante la congelación. Espermatozoides congelados-descongelados de gallo tuvieron mayor incidencia de anomalías de las mitocondrias, pieza intermedia, y perforatorium. La microscopía electrónica también reveló que el 60% de los espermatozoides de gallo sufrieron un daño irreversible como piezas intermedias hinchadas (Xia *et al.*, 1988).

Los espermatozoides de aves son más largos (80 a 90 $\mu$ ) y menos compactos; lo que los hace más susceptibles a lesiones por manipulación mecánica, como el pipeteo y la centrifugación. El hecho de que la cola de los espermatozoides aviares sean de aproximadamente 8 veces la longitud de la cabeza también los predispone a ser más sensibles al daño de congelación (Donoghue y Wishart, 2000).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas 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 congelado y en consecuencia las tasas de fertilidad. La integridad de la membrana plasmática es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil. El espermatozoide con la membrana plasmática afectada no es capaz de mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y de cofactores esenciales como el nucleótido adenina, imprescindible para el movimiento flagelar (De Leeuw *et al.*, 1991).

La importancia del mantenimiento de esta característica del espermatozoide se justifica por la incapacidad de la célula espermática para sellar o restaurar la integridad de la membrana cuando sufre daños (Den Daas, 1992). La evaluación de la integridad de la membrana plasmática proporciona una valiosa información sobre los métodos de procesamiento del semen y la identificación de los puntos del proceso que más contribuyen a las alteraciones en la membrana del espermatozoide (Johnson *et al.*, 1996).

El grado de lesión de las membranas plasmática y acrosomal está relacionado con la fertilidad de la muestra de semen procesada. La desintegración del acrosoma derivada de la refrigeración y de la congelación es capaz de afectar a la capacidad fecundante del espermatozoide aviar (Xia *et al.*, 1988).

Una de las pruebas de evaluación de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide es la **microscopia de fluorescencia con clortetraciclina (CTC)**. En este examen se identifican diferentes patrones de distribución de la CTC en la membrana plasmática, estos patrones de fluorescencia de la CTC reflejan las alteraciones asociadas a los niveles del Ca<sup>2+</sup> intra-citoplasmáticos (Ward y Storey, 1984).

Esta prueba (CTC) ha sido utilizada ampliamente para la evaluación de espermatozoides de mamíferos domésticos , ya que es confiable y practica, sin embargo, no se ha utilizado para evaluar al espermatozoide de guajolote nativo, ni de ningún otra especie de ave.

## **2.8. PERIODO FÉRTIL DEL ESPERMATOZOIDE AVIAR**

Cuando el semen es depositado en el oviducto de la hembra, ya sea por cópula o por inseminación artificial, los espermatozoides gradualmente se ubican en los túbulos de almacenamiento espermático (SST, siglas en Inglés), conocidos comúnmente como “espermatecas” o “nidos espermáticos”, los cuales se localizan entre la región falopial posterior del infundíbulo y la región anterior del magnum, lugar donde se lleva a cabo la fecundación. Los SST también están ubicados en una banda de 3 a 4 cm entre la región posterior del útero y la región anterior de la vagina, región conocida como unión úterovaginal (UVJ). Son esencialmente glándulas tubulares con terminación ciega, que surgen como invaginaciones de la mucosa úterovaginal. Esta unión es el sitio más importante de almacén de espermatozoides en las aves, principalmente por las razones siguientes (Hermann, 2006):

- ✓ Almacena espermatozoides viables por un tiempo prolongado (de 8 a 15 semanas) en pavos.
- ✓ Elimina la necesidad de sincronizar la inseminación o cópula con el momento de la ovulación.
- ✓ Reduce el número de inseminaciones necesarias para la obtención de huevos fértiles.
- ✓ Protege y actúa como refugio de los espermatozoides con respecto a las fuerzas descendientes del efecto del ciclo ovulatorio.

Más del 80 % de todos los espermatozoides suministrados durante una inseminación son eliminados en el oviducto a los 30 minutos post-inseminación y solo entre el 1 a 5 % de

los espermatozoides permanecerán en los SST. Por lo que la pérdida espermática es considerable y es por esto que la unión úterovaginal es el sitio más importante de conservación de espermatozoides. El proceso de selección espermática tiene lugar a nivel de los SST en la UVJ y es poco probable que los espermatozoides muertos o débiles entren a los SST y menos probable que atraviesen todo el oviducto hasta el lugar de la fecundación. Esto implica que la integridad, motilidad y viabilidad son esenciales para lograr alcanzar el almacenamiento en los SST (Sauveur, 1991).

En pavos la capacidad máxima de almacenaje de espermatozoides en los SST se alcanza dos días después de la inseminación y pueden permanecer en los SST por un periodo de hasta de 8 semanas, durante el cual los espermatozoides se liberan cada vez que un ovocito ha sido ovulado, para su fertilización. El mecanismo de liberación de los espermatozoides de los SST aun se desconoce (Hermann, 2006).

El tiempo de almacenaje de los espermatozoides en los SST con capacidad fecundante fue denominado por Lake “periodo fértil” y la duración del periodo fértil se define como el tiempo transcurrido entre la última inseminación hasta la puesta del último huevo fecundado.

En pavos de línea comercial la duración del periodo fértil es amplia; se han reportado de 31 hasta 57 días post-inseminación (Lorens, 1950; Wentworth, 1975). Lo que indica que el periodo de fertilidad en pavos es mayor que en los gallos, de 21 días (Brillard y Mc Daniel, 1986).

Tanto en pavos como gallos, la tasa de fertilidad con semen fresco alcanza su nivel máximo el segundo día post-inseminación y se mantiene en ese nivel durante una semana en el caso del gallo y de 10 días en los pavos, una vez transcurrido el tiempo mencionado, la fertilidad comenzara a declinar paulatinamente durante los próximos días, por esta razón, los programas de inseminación para la obtención de huevo fértil en la industria avícola, tienen un intervalo entre una inseminación y otra de una semana en gallos y 10 días en pavos (Sauveur, 1991; Moya, 2003).

Sin embargo, la duración del periodo fértil del espermatozoide criopreservado en pavos no se ha reportado aun, por lo que es necesario basarse en los trabajos publicados en el gallo.

Hanzawa *et al.* (2005), reporto tasas de fertilidad con semen congelado de gallo de 45% y 25%, utilizando DMSO y DMA a los 7 días posterior a la inseminación, respectivamente, utilizando diluyente HS-1. En ambos casos, la fertilidad declina posterior al tercer día post-inseminación.

Fontgibell y Francesch (1998), realizaron un estudio inseminando gallinas catalanas con semen congelado, utilizando diluyente “Lake” y tres crioprotectores por separado; DMSO, Glicerol y DMA, obteniendo tasas de fertilidad del 3.12%, 4.0% y 3.02% respectivamente, a los 8 días post-inseminación.

A pesar de que en ambos trabajos publicados se obtuvieron diferentes tasas de fertilidad después de 7 y 8 días post-inseminación, los autores coinciden en que los días con mayor nivel de fertilidad son del 1 al 3 post-inseminación, disminuyendo significativamente del día 4 en adelante.

### **3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Por lo anterior, el presente trabajo pretende contestar las siguientes preguntas:

- a) ¿Cuál es el periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl®?
- b) ¿Cuál es la capacidad fertilizante del espermatozoide congelado en Triladyl®, vs semen en estado fresco en pavas nativas inseminadas?
- c) ¿Cuáles son los cambios que experimenta la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo durante el enfriamiento y la congelación-descongelación?

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Determinar la capacidad fertilizante y el periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl® mediante inseminación artificial y estudiar la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación.

### 4.2. Objetivos específicos

- a) Establecer la duración del periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl®.
- b) Determinar la tasa de fertilidad de las pavas nativas inseminadas artificialmente con semen criopreservado en Triladyl®.
- c) Identificar en qué etapa del proceso de criopreservación existe daño en la membrana plasmática y acrosomal y en qué proporción ocurren.
- d) Contribuir a la estandarización de un protocolo de congelación del semen de guajolote nativo como base para el establecimiento, a mediano y largo plazo, de un banco de germoplasma.

## 5. HIPÓTESIS

Se espera que el semen congelado en Triladyl® logre conservar una proporción suficiente de espermatozoides viables y con membranas intactas de tal manera que permita obtener tasas exitosas de fertilidad en pavas inseminadas artificialmente.

## 6. METODOLOGÍA

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

### 6.1. Entrenamiento de los guajolotes nativos para la colección de semen

Se utilizaron 12 guajolotes nativos en etapa reproductiva (7 a 20 meses de edad), con fotoperiodo natural y alimentación a libre acceso, los cuales fueron sometidos a entrenamiento durante un mes para la obtención de semen por el método de masaje abdominal no invasivo, descrito por Burrows y Quinn (1937).

La técnica consiste en un suave masaje alrededor de la cloaca, con el objetivo de exponer el fallo, una vez expuesto, el manejador presiona suavemente el fallo para que el semen salga a través de las papilas externas de la *deferentis ducti* y se extrae el semen con una pipeta o jeringa graduada.

Posteriormente a cada muestra de semen se le realizó un espermiograma individual, utilizando solo aquellos animales (8 machos) que respondieron al estímulo eyaculatorio y resultaron aptos para la reproducción. En la evaluación reproductiva de los sementales se utilizó una adaptación del procedimiento descrito por Moya *et al.* (2003), el cual consiste en una discriminación de machos evaluándose los indicadores de volumen, motilidad, viabilidad, concentración y anormalidades espermáticas (Cuadro 8.)

**Cuadro 8. Clasificación reproductiva de machos reproductores (Moya *et al.* 2003)**

CATEGORIA	VOL. (ml)	MOT Y VIAB. (%)	Concentración Espermática Viable ( $10^6$ /eyaculado)	ANORMALIDADES ESPERMATICAS
<b>APTO</b>	> 0.1 ml	> 70 %	> 800	< 30 % Anormalidades
<b>DUDOSO</b>	< 0.09 ml	< 70 %	Entre 600 y 799	> 30 % Anormalidades
<b>NO APTO</b>	< 0.05 ml	< 70 %	< 599	> 30 % Anormalidades

### 6.2. Colección de semen

Previo al proceso de colección, los machos fueron dietados, lo cual consistió en retirar el alimento 18 horas antes, para garantizar el vaciado de intestinos y evitar contaminación de la muestra. Posteriormente, el semen de varios machos (de 4 a 8 machos) se colectó en un mismo recipiente para formar un “pool” con los eyaculados de los machos que respondieron al estímulo.

### 6.3. Evaluación macroscópica

Inmediatamente después de la colecta se evaluó macroscópicamente (volumen, color y que el semen se encontrara libre de impurezas). Tras la recogida, el volumen de la fracción espermática de cada pool de los eyaculados fue determinado de inmediato en un tubo graduado (criotubo); mientras que el color y las impurezas se determinaron a simple vista.

### 6.4. Dilución y evaluación microscópica

Una vez evaluado macroscópicamente el pool de los eyaculados, se realizó la dilución (1:4) con Triladyl®, para posteriormente evaluarse microscópicamente (motilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad y anormalidades morfológicas) según Conejo (1991) y Etches (1996).

**La motilidad progresiva** se evaluó visualmente mediante la determinación del porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo, para lo cual se colocó una gota

entre un porta y un cubre objetos, precalentados a 38°C. Este examen se realizó con microscopio óptico bajo 40 X. Solamente se utilizaron eyaculados con una motilidad progresiva superior a 70%.

**La concentración espermática** se determinó por microscopía de campo claro, con una cámara de Neubauer y haciendo una relación con el volumen. El conteo espermático se realizó con el objetivo 40 X.

**La morfología y viabilidad espermática** se evaluaron simultáneamente, mediante un frotis. Se colocó una gota de semen sobre un cubreobjetos, se mezcló con una gota de Eosina-Nigrosina (1% eosina y 5% nigrosina); posteriormente se realizó la extensión, dejándola secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La muestra se observó con el objetivo de 100X y se contaron 100 espermatozoides para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, y el porcentaje de espermatozoides con anomalías,

Los eyaculados con más de 70 % de viabilidad espermática y menos de 30 % de anomalías espermáticas fueron procesados para la congelación.

### **6.5. Congelación de semen**

El semen diluido una vez evaluado microscópicamente se envasó en pajillas de 0,25ml a una concentración de  $300 \times 10^6$  espermatozoides y se colocaron 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 se sumergieron en nitrógeno líquido a -196°C para después ser almacenadas en un termo criogénico hasta su descongelación y evaluación.

### **6.6. Descongelación del semen**

Las pajillas se descongelaron en baño de agua a 30°C por 2 minutos para su posterior evaluación microscópica, cuyos parámetros fueron: motilidad progresiva, viabilidad espermática y anomalías morfológicas.

### **6.7. Inseminación Artificial (IA)**

Para la IA de las pavas se realizó una presión digital en la matriz, a través de la zona baja adyacente a la cloaca generando un prolapso parcial, y una vez expuesto el oviducto, se depositaron 0.25 ml de semen descongelado, con una jeringa de insulina. La dosis de semen congelado se preparó a una concentración de  $300 \times 10^6$  espermatozoides y en el caso del semen fresco fueron de  $150 \times 10^6$  espermatozoides. Después de depositado el semen se suprimió la presión en la región citada, con lo que la cloaca se cierra y vuelve a la posición normal.

### **6.8. Diseño experimental**

Se realizaron 3 experimentos para cumplir con los objetivos planteados:

#### **6.8.1. EXPERIMENTO 1. Establecimiento del periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl®**

Se formaron aleatoriamente dos grupos de 5 hembras adultas cada uno (grupo testigo y grupo tratado), de edades diversas (10 a 24 meses de edad), las cuales se mantuvieron en jaulas individuales y se les administró alimento comercial para gallina ponedora a libre acceso. Las hembras fueron estimuladas por medio de fotoperiodo de 16 horas para comenzar la postura.

Las pavas del grupo testigo, se inseminaron con semen fresco diluido en el extensor Betsville Poultry Semen Extender II (BPSE II®). En el Cuadro 6 se presentó la composición química de este diluyente.

Las pavas del grupo tratado, se inseminaron con semen congelado-descongelado en Triladyl®. En ambos casos, la inseminación se realizó por única vez los días 1 y 2, al inicio del experimento, una vez iniciada la postura. Las dosis utilizadas contenían una concentración espermática de  $150 \times 10^6$  y  $300 \times 10^6$  cuando se utilizó semen fresco y semen

congelado, respectivamente. La maniobra de inseminación siempre se realizó por la misma persona.

Los huevos se comenzaron a recolectar 24 horas después de la segunda inseminación, diariamente y se almacenaron por 7 días a temperatura ambiente. Posteriormente, los huevos fueron introducidos a una incubadora automática a 37.7 °C; las cargas a la incubadora se realizaron cada semana y así sucesivamente durante 4 semanas para su desarrollo embrionario.

Posterior a los 29 días de incubación, a los huevos no eclosionados se les realizó un embriodiagnóstico, el cual consistió en abrirlos para examinar los residuos embrionarios y determinar si el huevo era fértil o no, esto con el fin de medir la tasa de fertilidad y estimar el periodo fértil del espermatozoide criopreservado.

La tasa de fertilidad se midió conforme la siguiente fórmula (comunicado personal del Dr. Juárez Caratachea):

$$\text{Tasa (\%)} \\ \text{de} \\ \text{Fertilidad} = \frac{\text{Huevos picados} + \text{Pavipollos nacidos} + \text{embriones muertos}}{\text{Total de huevos introducidos a la incubadora}} \times 100$$

### **6.8.2. EXPERIMENTO 2. Determinación de la tasa de fertilidad en pavas nativas inseminadas artificialmente con semen criopreservado en Triladyl®**

Se inseminaron 20 hembras jóvenes en edad reproductiva (32 semanas) distribuidas aleatoriamente en 2 grupos (grupo testigo y grupo tratado), de 10 pavas cada uno. La inseminación se realizó por la misma persona. En el grupo testigo, las pavas se inseminaron con semen fresco diluido en el extensor Beltsville Poultry Semen Extender II (BPSE II ®) a una concentración espermática de 150X10<sup>6</sup>. En el grupo tratado, las pavas se inseminaron con semen descongelado a una concentración espermática de 300X10<sup>6</sup>.

Inicialmente cada pava se inseminó dos veces con un intervalo de 24 horas entre las inseminaciones. Posteriormente cada pava se reinseminó cada semana, durante 7 semanas, en los meses de febrero y marzo, una vez que inició la producción de huevo.

Los huevos se recolectaron 48 horas después de la primera inseminación, diariamente y se almacenaron por 7 días a 17 °C para posteriormente introducirlos a una incubadora automática a 37.7 °C. Las cargas a la incubadora se realizaron cada semana para su desarrollo embrionario y así sucesivamente durante 7 semanas.

Posterior a los 29 días de incubación, a los huevos no eclosionados se les realizó un embriodiagnóstico con el fin de identificar estructuras embrionarias y medir así la tasa de fertilidad del espermatozoide fresco y criopreservado.

La tasa de fertilidad se midió conforme la fórmula indicada anteriormente

### **6.8.3. EXPERIMENTO 3. Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide criopreservado en Triladyl® mediante clortetraciclina (CTC)**

Se utilizaron 6 machos en edad reproductiva (12 meses de edad) evaluados como aptos para la reproducción (según los criterios antes mencionados). Los machos se colectaron simultáneamente para la formación de un “pool” de semen el cual se evaluó macroscópicamente (volumen, color e impurezas), posteriormente se diluyó en Triladyl® (1:4) y se procedió a la evaluación microscópica (motilidad progresiva, viabilidad, concentración y anormalidades morfológicas). Una vez terminado el espermiograma, se evaluó el estado funcional de la membrana plasmática mediante clortetraciclina (CTC) fluorescente, ambas evaluaciones se realizaron durante las tres etapas de criopreservación: fresco, diluido y descongelado.

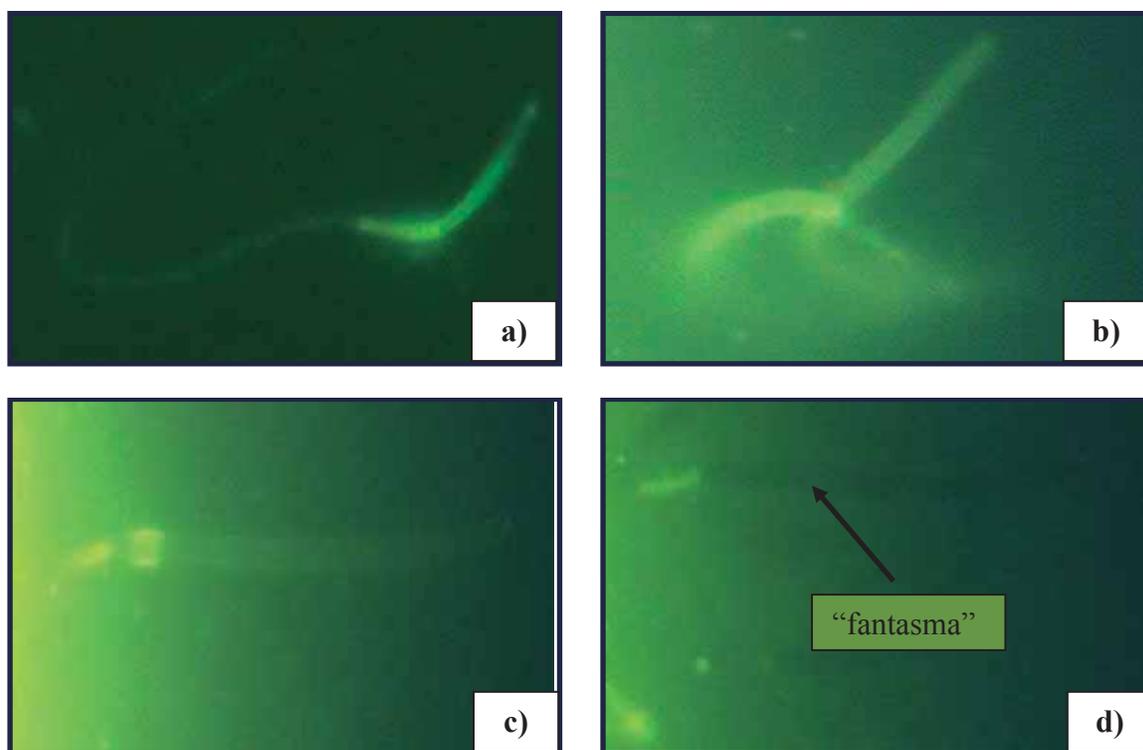
La solución de clortetraciclina (CTC) fue preparada inmediatamente antes de cada experimento y embasada en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio para protegerla

de la luz. En la preparación de esta solución se sigue el procedimiento descrito por Conejo-Nava (2003).

La CTC se preparó a una concentración de 750  $\mu$ M, en un amortiguador de Tris 20 mM, NaCl 130 mM, L-cisteína 5 mM, a un pH final de 7.8. La solución fue preparada en fresco y se mantuvo en obscuridad. El paquete de células espermáticas se fijó en 10  $\mu$ l de glutaraldehído al 0.2 %, en Tris 0.5 M y pH final de 7.4. Una suspensión de 5  $\mu$ l de espermatozoides fijados se mezcló con 5  $\mu$ l de CTC en un portaobjetos y se dejó reposar en la obscuridad por una hora. Finalmente, Se añadió una gota de 1,4-Diaza-biciclo (2.2.2) octano (DABCO) 0.22 M en glicerol al 90 %, para conservar la fluorescencia. Las preparaciones se analizaron bajo el microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss), a 1000 aumentos. El campo fue iluminado con luz ultravioleta a 495 nm para excitar a la CTC y determinar el estado funcional de los espermatozoides de acuerdo con los siguientes patrones de tinción (Figura 1.):

- a) Espermatozoides con fluorescencia verde-amarilla uniforme en la cabeza y cola (Figura 1a), se consideraron como no capacitados.
- b) Espermatozoides con una fluorescencia muy tenue en toda la cabeza y cola, fueron considerados como en etapa inicial de la capacitación o en etapa de transición entre no capacitación y capacitación (Figura 1b).
- c) Espermatozoides con fluorescencia concentrada en una pequeña franja en la región distal de la cabeza y de la porción medial de la cola y, el resto sin fluorescencia (Figura 1c), fueron considerados como capacitados.
- d) Espermatozoides sin fluorescencia en la totalidad de la cabeza y cola, los cuales se aprecian como “fantasmas”, fueron considerados como espermatozoides con reacción acrosomal (Figura 1d).

Se contaron como mínimo 100 células espermáticas por preparación.



**Figura 1.** Estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides de guajolote nativo teñidos con CTC (100 X). La flecha indica un espermatozoide reaccionado.

### 6.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar; para el caso de los datos obtenidos de la inseminación artificial (Experimentos 1 y 2) se realizaron tabulaciones cruzadas y pruebas de Chi-Cuadrada. Para el caso de los datos de la evaluación de la integridad de la membrana plasmática (Experimento 3), se analizaron a través de un análisis de varianza de una vía y los promedios se compararon empleando la prueba estadística prueba de Tukey. Empleándose para tal efecto el programa SPSS® versión 16.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Experimento 1. Establecimiento del periodo fértil del espermatozoide de guajolote nativo criopreservado en Triladyl®

Se obtuvo una fertilidad de 58.62 %, 29.16% y 18.75 % para la primera, segunda y tercera semanas post-inseminación en pavas nativas inseminadas con semen fresco; mientras que para el semen congelado la fertilidad fue de 25%, 10.54% y 0% para la primera, segunda y tercera semanas de post-inseminación, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.10$ ) entre tratamientos y entre semanas dentro de cada tratamiento (Cuadro 9).

Estos resultados muestran un periodo fértil de dos semanas para el semen congelado y de tres semanas para el semen fresco. Además, se encontró una mayor tasa de fertilidad para el semen fresco vs semen congelado y una disminución de la fertilidad conforme pasa el tiempo post-inseminación en ambos tratamientos.

**Cuadro 9. Periodo de fertilidad del semen congelado vs semen fresco en pavas nativas inseminadas artificialmente**

		(Huevos fértiles/Total de Huevos Incubados)			
		%			
		1 <sup>er</sup> Semana post-IA	2 <sup>da</sup> semana post-IA	3 <sup>ra</sup> semana post-IA	4 <sup>ta</sup> semana post-IA
TRATAMIENTO		Huevos fértiles /Total de huevos	Huevos fértiles/ Total de huevos	Huevos fértiles/ Total de huevos	Huevos fértiles/ Total de huevos
Semen Fresco	1 <sup>er</sup> y 2 <sup>da</sup> IA	<b>58.62</b> (17/29)	<b>29.16</b> (7/24)	<b>18.75</b> (5/27)	<b>0</b> (0/22)
Semen congelado	1 <sup>er</sup> y 2 <sup>da</sup> IA	<b>25.00</b> (6/24)	<b>10.54</b> (2/19)	<b>0</b> (0/22)	<b>0</b> (0/0)

Diferencias significativas entre tratamientos y semanas ( $p < 0.10$ ).

Existen estudios que revelan, que más de la mitad de los espermatozoides de pavo pierden su capacidad fecundante después de ser expuestos al proceso de congelación-descongelación; Bakst y Sexton (1979) por medio de microscopía electrónica encontraron que el 60% de los espermatozoides de pavo de línea comercial sufrieron daños irreversibles después de la criopreservación; en menor medida, en el presente trabajo (Experimento 3) se determinó por medio de la evaluación de CTC que el 39.38% de los espermatozoides de guajolote nativo pierden su capacidad fecundante una vez expuestos al proceso de congelación-descongelación.

Estos estudios explican la razón por la cual la tasa de fertilidad y la duración del periodo fértil del semen criopreservado (2 semanas) resultó más corto que el del semen fresco (3 semanas), ya que estos daños causados por el proceso de congelación, afectan el número de espermatozoides aptos para la fertilización y el almacenamiento en los SST, por lo que las pavas inseminadas con semen congelado tienen menor número de espermatozoides almacenados y se quedan sin reservas en un tiempo más corto que las inseminadas con semen fresco.

No existen trabajos publicados sobre la duración de la fertilidad con semen criopreservado en pavos, por lo que se tomaron como referencia los resultados encontrados en gallos:

Fontgibell y Francesch (1998), realizaron un estudio inseminando gallinas catalanas con semen congelado, obteniendo tasas de fertilidad del 3.12%, 4.0% y 3.02%, a los 8 días post-inseminación; Hanzawa (2005), reportó tasas de fertilidad con semen congelado de gallo de 45% y 25%, a los 7 días posterior a la inseminación; Lake y Stewart (1978) obtuvieron 53% de fertilidad en gallos para la primera semana post-inseminación.

Estos resultados difieren con respecto a la primer semana post inseminación con semen congelado en este estudio (25%), a excepción del segundo resultado reportado por Hanzawa (2005), sin embargo, todos los trabajos coinciden en que la fertilidad baja significativamente conforme pasa el tiempo post-inseminación; Siendo los días 1,2 y 3 post-inseminación donde alcanzan los niveles más altos de fertilidad.

Respecto a la duración del periodo fértil con semen fresco del guajolote nativo (3 semanas), es más corto que el periodo alcanzado por Wentworth (1975), quien inseminó con semen fresco pavas de la raza Large White mediante una inseminación vaginal de 2 y 7 cm de profundidad, obteniendo una duración de 40.4 y 31.2 días de fertilidad, respectivamente.

De igual manera Lorens (1950), obtuvo una duración del periodo fértil de 57 días al inseminar pavas de la raza Bronze con semen fresco sin diluir; mientras que con semen diluido utilizando un diluyente a base de albumina de huevo fresco de pava, obtuvo una duración de fertilidad de 46 días post-inseminación.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los reportados por estos autores, esto se puede deber a la especie utilizada, ya que las razas o líneas de pavos comerciales tienen diferencias biológicas, etológicas y reproductivas que los benefician con respecto al guajolote nativo, ya que los pavos de línea comercial, han sido mejorados genéticamente y sometidas a una selección intensiva para obtener mejores parámetros reproductivos, como son: mayor número de huevo por ciclo de postura, mayores tasa de fertilidad, mayor volumen de semen y por lo tanto, mayor concentración espermática, además de ser animales muy dóciles y de fácil manipulación.

Un factor importante el cual pudo intervenir en la duración del periodo fértil, fue el estado fisiológico de las hembras como es la edad, ya que en este caso se utilizaron hembras de diversas edades (10 a 24 meses), donde las hembras de mayor edad pudieron afectar de manera negativa la tasa de fertilidad y la duración del periodo fértil, esto debido a que la tasa de salida de los espermatozoides en las hembras de mayor edad es aproximadamente el doble de lo que se observa en las hembras jóvenes, por lo tanto, las hembras de mayor edad se quedan sin reserva de espermatozoides en un tiempo más corto que las jóvenes.

Un aspecto más, es la etología de la especie utilizada (guajolote nativo), ya que, a diferencia de las líneas comerciales de pavos, es sumamente nerviosa y por tanto, se dificulta su manejo; el hecho de ser animales sumamente nerviosos dificultaba el manejo durante la inseminación y en algunos casos había escurrimiento de semen por las

contracciones que la hembra ejercía al momento de depositar el semen en el oviducto. Por lo que es importante considerar estos aspectos mencionados, ya que pudieron afectar los resultados obtenidos (tasa de fertilidad y la duración del periodo fértil).

## **7.2. Experimento 2. Determinación de la tasa de fertilidad en las pavas nativas inseminadas artificialmente con semen criopreservado en Triladyl®**

En el Cuadro 10. se observan los porcentajes de fertilidad tanto de semen congelado como de semen fresco durante 7 semanas, con un intervalo entre inseminaciones de 7 días.

Se obtuvieron tasas de fertilidad en pavas inseminadas con semen congelado de 30.40 %, 31.20%, 35.70%, 32.10%, 25.70%, 30.80% y 28.60%, de la primera a la séptima semana respectivamente; para el semen fresco se obtuvieron tasas de fertilidad de 68.80%, 77.30%, 73.50%, 77.40%, 61.90%, 64.70% y 57.90%, de la primera a la séptima semana, respectivamente., existiendo diferencias significativas ( $p < 0.10$ ) entre tratamientos. Es decir, las tasas de fertilidad del semen fresco fueron superiores a las del semen congelado, en todas las semanas (Cuadro 10).

Las tasas de fertilidad se mantuvieron constantes a lo largo del periodo de estudio, sin encontrarse diferencias significativas ( $p < 0.10$ ) entre semanas de cada tratamiento, lo que significa que no hubo algún factor involucrado que afectara las tasas de fertilidad por semana.

**Cuadro 10. Fertilidad del semen criopreservado y del semen fresco en pavas inseminadas cada siete días durante siete semanas**

TRATAMI- ENTO	(Huevos fértiles/Total de Huevos Incubados)							Total en las 7 semanas
	N ú m e r o d e S e m a n a s							
	1	2	3	4	5	6	7	
	%							
Semen Fresco	<b>68.80</b> (11/16)	<b>77.30</b> (17/22)	<b>73.50</b> (25/34)	<b>77.40</b> (24/31)	<b>61.90</b> (13/21)	<b>64.70</b> (10/16)	<b>57.90</b> (11/19)	<b>69.81</b> (111/159)
Semen congelado	<b>30.40</b> (7/23)	<b>31.20</b> (10/32)	<b>32.70</b> (10/28)	<b>32.10</b> (9/29)	<b>25.70</b> (9/35)	<b>30.80</b> (7/25)	<b>28.60</b> (6/21)	<b>30.05</b> (58/193)
<b>Total de Huevos incubados:</b>							<b>354</b>	

En todas las semanas se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.10$ )

La mayor tasa de fertilidad del semen fresco (77.27%) con respecto a la obtenida por el semen criopreservado (35.70 %), es debido probablemente al daño que causa el proceso de congelación en los espermatozoides de pavo. En el presente trabajo (Experimento 3) se encontró una viabilidad espermática para el semen fresco de 93.23%, y 53.46% para el congelado; la motilidad fue de 87.53% y 32.53%, respectivamente; mientras que las anomalías morfológicas fueron de 13.53% y 25.13%, respectivamente, en los tres parámetros evaluados *in vitro* los espermatozoides fueron afectados de manera significativa por el proceso de congelación, lo cual pudo afectar las tasas de fertilidad del semen congelado.

Los resultados de fertilidad con semen criopreservado obtenidos superan los resultados encontrados por otros autores. Macpherson *et al.* (1969), obtuvieron un 24 % de fertilidad usando glicerol y DMA como crioprotectores.

Blesbois y Grasseau (2006), encontraron una tasa de fertilidad de 30.4 % en pavos de línea comercial usando como crioprotector DMA al 8 % y una tasa de congelación ultrarrápida por medio de la formación de pellets en nitrógeno líquido.

Sin embargo, los resultados del presente trabajo fueron inferiores a los observados por Sexton (1982) quien encontró un 61 % de fertilidad usando Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) como extensor y DMA al 4 % , como crioprotector en la inseminación de pavas de línea comercial.

La fertilidad obtenida con semen fresco (77.27 %) fue inferior a la obtenida en las explotaciones de líneas de pavo comercias de 92% y de las tasas de fertilidad con semen fresco alcanzadas por Moya (2003) de 98 % en pavos de línea comercial.

La actividad cíclica del oviducto de las pavas influye sobre las condiciones de tránsito y de almacenamiento de los espermatozoides inseminados, por lo que el éxito de las inseminaciones varía por tanto, con el estadio del ciclo de puesta en el momento de la aplicación de los espermatozoides. En pavas de línea comercial se obtienen mejores tasas de fertilidad, al realizarse la inseminación artificial 5 horas después de la puesta (Johnson y Parker, 1970).

Este aspecto se debe considerar en el presente trabajo, ya que las pavas nativas a diferencia de las líneas comerciales, la hora de postura es más amplia y esta se lleva a cabo en casi todo el transcurso del día. Por lo tanto, debido a este motivo, no se realizaron las inseminaciones 5 horas después de la puesta, lo cual pudo influir en los resultados.

La aplicación de varias inseminaciones antes de que inicie la postura de huevo, aumenta la fertilidad de manera significativa con respecto a las reproductoras que han sido inseminadas una vez ya iniciada la producción de huevo, esto se debe a la tasa de aumento en que los SST son activados y provistos con espermatozoides. Sin embargo, en el presente trabajo, todas las pavas fueron inseminadas una vez comenzada la postura, ya que en esta especie la sincronización de postura por medio del fotoperiodo no fue posible, debido a esta razón, las inseminaciones se realizaron una vez que las pavas habían comenzado la postura.

Sin embargo, al analizar los datos obtenidos de fertilidad por día post-inseminación durante siete semanas (Cuadro 11), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.10$ ) para los días del semen congelado, donde se muestra que la tasa de fertilidad más alta se encuentra en los días 2, 3 y 4 post-inseminación, con porcentajes de fertilidad de 40.60%, 51.80% y 49.30% respectivamente.

Respecto al semen fresco se obtuvo una fertilidad por día post-inseminación durante siete semanas de 55.00%, 72.40%, 82.10%, 81.00%, 78.30%, 63.20% y 50.00% del primero al séptimo día respectivamente, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre días en este tratamiento (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Porcentajes de fertilidad por día post-inseminación durante siete semanas**

TRATAMIENTO	(Huevos fértiles/Total de Huevos Incubados)						
	Días post-inseminación						
	%						
	1	2	3	4	5	6	7
Semen Fresco	55.00 (11/20)	72.40 (21/29)	84.00 (21/25)	80.90 (17/21)	78.20 (18/23)	63.10 (12/19)	50.00 (10/20)
Semen congelado	13.60 (3/22)	40.60* (12/30)	51.80* (18/35)	49.30* (13/26)	21.40 (6/28)	13.80 (4/29)	13.60 (3/22)

Diferencias significativas entre tratamientos y días post-inseminación del semen congelado\* ( $p < 0.10$ )

Estos resultados sugieren que al utilizar semen criopreservado en Tryladyl®, las pavas se deben de inseminar dos veces por semana, cada cuatro días lo cual permitirá obtener tasas de fertilidad más altas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kurbatov *et al.* (1984), quienes sugieren inseminar con semen criopreservado cada 3 días

---

ya que el espermatozoide congelado pierde su capacidad fertilizante en un 50 %, mientras que con semen fresco recomienda realizar una inseminación por semana.

Esta declinación de la fertilidad con semen congelado después del día 4 post-inseminación puede estar correlacionada por una parte a la hembra y su estado fisiológico (edad y estadio de la formación del huevo con relación al momento de la inseminación artificial) y por otra parte en función del número y calidad de los espermatozoides congelados.

Los resultados obtenidos en el tiempo transcurrido entre una IA y otra con semen fresco en el presente estudio (7 días) coinciden con lo observado por Moya (2003) quien recomienda inseminar a las pavas a intervalos de 7 días entre una y otra inseminación. Beaumont *et al.*, (1992), obtuvieron resultados similares, recomendando inseminar con un intervalo de hasta 10 días, para no afectar la tasa de fertilidad.

### **7.3. Experimento 3. Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide criopreservado en Triladyl® mediante clortetraciclina (CTC)**

Los datos obtenidos en este experimento, fueron promedios obtenidos de cada 100 espermatozoides contados por cada tratamiento (fresco, refrigerado y descongelado) en 13 repeticiones. Se encontró que el promedio de espermatozoides no capacitados (patrón A) fue alto en el semen fresco, con respecto al semen refrigerado y congelado, de 72.46, 57.85 y 20.23, existiendo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Estos resultados demuestran que conforme avanza el proceso de congelación se reduce el número de espermatozoides no capacitados (Cuadro 12).

Con respecto a los promedios de espermatozoides en etapa de transición entre no capacitados y capacitados (Patrón B), no se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tres tratamientos (Cuadro 12).

El promedio de espermatozoides capacitados (Patrón C) fue menor en el semen fresco, que en el semen refrigerado y congelado, de 9.38, 17.92 y 24.16 espermatozoides, respectivamente; existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 12).

Los promedios de espermatozoides con reacción acrosomal (Patrón D) fueron bajos en el semen fresco y refrigerado, con respecto al congelado, de 2.77, 3.85 y 39.38 espermatozoides, respectivamente, observándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre este último y los dos primeros (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Promedios de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en semen fresco, refrigerado y congelado de guajolote nativo (n=13)**

TRATAMIENTO	Patrón A X±EE	Patrón B X±EE	Patrón C X±EE	Patrón D X±EE
	<b>Espermatozoides con capacidad fecundante</b>		<b>Espermatozoides sin capacidad fecundante</b>	
Semen Fresco	72.46 <sup>a</sup>	15.38 <sup>a</sup>	9.38 <sup>a</sup>	2.77 <sup>a</sup>
Semen Refrigerado	57.85 <sup>b</sup>	20.38 <sup>a</sup>	17.92 <sup>b</sup>	3.85 <sup>a</sup>
Semen Descongelado	20.23 <sup>c</sup>	16.23 <sup>a</sup>	24.16 <sup>c</sup>	39.38 <sup>b</sup>
<i>EEM</i>	3.60	2.56	2.88	4.70

<sup>a b c</sup> Literales distintas son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Estos resultados indican que conforme transcurre el proceso de criopreservación los espermatozoides sufren daño en la integridad de las membranas de manera progresiva y fueron menores a los obtenidos por Duchi *et al*, (2004), quienes encontraron 68.5% de daños en la membrana plasmática del espermatozoide en el gallo Murciano. Así mismo, Long (2006) encontró 41% a 54% de espermatozoide con membranas intactas en cuatro

líneas de gallos comerciales después de la descongelación. Lo que sugiere, que la diferencia complementaria corresponden a espermatozoides con daño en las membranas.

Purdy *et al.*, (2009) obtuvieron menor proporción de espermatozoides con membranas intactas posterior a la congelación, de un 56.6%, en una línea comercial de gallos y empleando citometría de flujo y una combinación de tinciones fluorescentes (yoduro de propidíó y SYBR-14).

Sin embargo, Celeghini *et al.* (2007), obtuvieron una tasa de membranas dañadas tras la congelación de semen de gallo de 96.39%, utilizando yoduro de propidíó.

Estos datos varían probablemente debido a la especie estudiada, y a los diferentes protocolos de congelación utilizados en cada estudio y a los procedimientos utilizados en la evaluación de la membrana plasmática y acrosomal; sin embargo, en todos los casos coinciden en que el proceso de congelación afecta de manera negativa las tasas de integridad de las membranas espermáticas.

En los espermatozoides de aves no se ha reconocido el proceso de capacitación como tal, esto debido a que la reacción del acrosoma se induce tan rápidamente (pocos minutos) que el proceso previo a la reacción acrosomal no se ha estudiado y por lo tanto no se le ha denominado capacitación como tal. Sin embargo, debe existir un proceso previo a la reacción acrosomal el cual debe estudiarse a fondo (Lemoine, 2008).

De manera simultánea a la identificación del estado funcional del espermatozoide por (CTC) fluorescente, se evaluó la calidad de los eyaculados en estado fresco, refrigerado y descongelado, tomando en cuenta los parámetros de viabilidad, motilidad progresiva y anomalías espermáticas (Cuadro 13).

Los resultados obtenidos de viabilidad espermática mediante la evaluación con eosina-nigrosina, mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tres tratamientos, el semen fresco obtuvo un promedio de 92.23, el semen refrigerado 85.15, mientras que el semen descongelado 53.46 por cada 100 espermatozoides. Estos resultados demuestran que conforme transcurre el proceso de criopreservación se ve afectada de manera negativa la viabilidad del espermatozoide de guajolote nativo.

Los datos enfocados a la valoración de la calidad de semen fresco, refrigerado y descongelado, demuestran que el proceso de criopreservación disminuye la motilidad progresiva significativamente ( $p \leq 0.05$ ) observándose el valor de 87.53 para el semen fresco, 67.69 para el semen refrigerado y 32.53 para el semen descongelado por cada 100 espermatozoides. Por lo tanto, estas cifras indican que la motilidad se ve afectada por el proceso de refrigeración de 2 horas a 4 °C, la disminución de temperatura a -196 °C para la congelación y posteriormente la descongelación del espermatozoide.

Respecto a los resultados de anomalías espermáticas no se encontraron diferencias significativas entre el semen fresco y refrigerado, obteniendo valores de 13.53 y 16.92 respectivamente, por lo que se puede concluir que las dos horas de refrigeración a 5 °C no afecta la morfología del espermatozoide de guajolote nativo, sin embargo el semen descongelado sí mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) respecto a los otros dos tratamientos (fresco y refrigerado), obteniendo un promedio de 25.15 de anomalías espermáticas.

**Cuadro 13. Promedios de viabilidad, motilidad y anomalías espermáticas en el semen fresco, refrigerado y criopreservado de guajolote nativo (n=13)**

TRATAMIENTO	Viabilidad	Motilidad	Anormalidades
Semen Fresco	92.23 <sup>a</sup>	87.53 <sup>a</sup>	13.53 <sup>a</sup>
Semen Refrigerado	85.15 <sup>b</sup>	67.69 <sup>b</sup>	16.92 <sup>a</sup>
Semen descongelado	53.46 <sup>c</sup>	32.53 <sup>c</sup>	25.15 <sup>b</sup>
<i>EEM</i>	2.10	3.79	2.13

<sup>a b c</sup> Literales distintas son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Estos resultados difieren a los encontrados por Hernández *et. al.* (2005), quienes congelaron semen de gallo de la raza Plymouth Rock Barrada a -196°C utilizando

glutamato de sodio como diluyente y glicerol al 10%, reportando porcentajes de motilidad progresiva de semen post descongelado de 44.23%, y 35.61% de viabilidad.

De igual manera, Herrera (2005), congeló semen de gallo usando DMSO y PVP con el método de pellets a  $-79^{\circ}\text{C}$ , obteniendo una viabilidad del 84.7% y 89.2% respectivamente, obteniendo resultados más favorables que en el presente estudio.

Blesbois y Grasseau (2006) 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  $4^{\circ}\text{C}$  y una tasa de congelación ultrarrápida sumergiendo el semen directamente en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) para la formación de pellets, obteniendo un 25 % de viabilidad, siendo un valor más bajo que el encontrado en este estudio.

De igual manera Nicolaia *et al.*, (2009) congelaron semen de pavo utilizando DMA al 8 % como crioprotector, y una tasa de congelación ultrarrápida sumergiendo el semen en nitrógeno líquido directamente ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) obteniendo un 24.05 % de viabilidad espermática post- descongelación.

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.

Respecto a las anomalías morfológicas, los resultados encontrados son similares a los observados por Tselutin *et al.* (1999) cuando congelaron semen de gallo en pajillas a  $-196^{\circ}\text{C}$  utilizando glicerol, encontraron 24% de anomalías espermáticas.

Herrera (2005) congeló semen de gallo a  $-79^{\circ}\text{C}$  con el método de pellets obteniendo un 6% de anomalías morfológicas, este resultado difiere al encontrado en este estudio probablemente a la especie utilizada y al protocolo de congelación.

Los resultados de viabilidad, motilidad y anomalías espermáticas difieren en algunos casos de los encontrados por otros autores, esto se debe probablemente al

crioprotector y los métodos utilizados para la congelación de semen, la especie utilizada, y el diluyente.

## 8. CONCLUSIONES

La duración del periodo fértil del espermatozoide criopreservado en Triladyl® de guajolote nativo fue de dos semanas y de tres semanas para el semen fresco, sin embargo, en ambos casos, conforme transcurre el tiempo post-inseminación, la tasa de fertilidad declinó de manera significativa.

Las tasas de fertilidad de las pavas inseminadas con semen congelado en Triladyl® un vez por semana, fueron del 25% al 35.71%, obteniendo los valores más altos los días 2, 3 y 4 post-inseminación.

La congelación del semen de pavo nativo en Triladyl® produce un incremento de los espermatozoides con alteraciones en la membrana plasmática y de las anomalías morfológicas, así, como una marcada disminución de la movilidad y de la viabilidad.

En general, estos resultados permiten concluir que es posible la criopreservación del semen en Triladyl® como una herramienta para la conservación ex situ del guajolote nativo.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alderson, S. 1990. The relevance of genetic improvement programmes within a policy for genetic conservation. Genetic Conservation of Domestic Livestock. UK, CAB International. Wallingford. 46: 1037–1044.

Amann, R.P; Pickett, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Equine Veterinary Science 7: 145-176.

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. 2: 165-173.

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.

Bakst, M..R; Sexton, T.J., 1979. Fertilising capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. Journal Reproduction Fertility. 28: 108-120.

Beaumont, C. 1992. Genetic parameters of the duration of fertility in hens. Canadian Journal of Animal Science. 72: 193-201.

Blackburn, H.D. 2006. The national animal germplasm program: challenges and opportunities for poultry genetic resources. Poultry Science 85: 210-215.

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

Blesbois, E; Grasseau, I., Seigneurin, F. 2005. The first method of Cryopreservation of Guinea fowl semen. Reproduction, in in press.

Blesbois, E. 2006. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian criobank. Poultry Science. 86: 555-561

Blesbois, E; Dubos, F; Grasseau, I; Richrad. M; Roman, Y; Saint jalme, M; Seigneurin, F. 2006. Cryopreservation of avian spermatozoa and predictors of ability to freezing cold shock and freezing injury. Reproduction Domestic Animal. 1: 95-104.

Blesbois, E. y Grasseau, I. 2006 Seminal plasma affects liquid storage and cryopreservation of turkey sperm. *Cryobiology* 43: 334-339.

Brillard, J.P. y De Reviers, M. 1979. Donnes nouvelles sur l'insemination artificielle des pinta des. *L' Aviculteur*. 393: 63-69.

Burrows, W y Quinn, P. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry science* 23: 15-20.

Buss, EG. 1993. Cryopreservation of rooster sperm. *Poultry Science* 72: 944-954.

Camacho, E. M.A; Hernandez-Sanchez, V., Ramirez-Cancino, I., Sánchez-Bernal E.I., and Arroyo-Ledezma, J. 2008. Characterization of backyard guajolotes (*Meleagris gallopavo gallopavo*) in tropical zones of Mexico. *Livestock research for rural development*. 20: 50-52.

Camacho-Escobar, M.A; Ramirez, C.L; Lira, T.I; Hernandez, S.V. 2008a. Phenotypic characterization of the guajolote (*Meleagris gallopavo gallopavo*) in México. *Agricultura*. 43: 59-66.

Camacho, E.M.A (2009). Diferencias y similitudes entre el guajolote silvestre y el de traspatio. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 13: 53.

Camacho, E.M.A; Jimenez, H.E; Arroyo, L.J; Sanchez, B.E; Perez, L.E. 2011. Historia Natural, Domesticación y Distribución del Guajolote (*Meleagris gallopavo*) en México. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 353-356.

CDB. (1992) Artículo 8: Conservación *in situ*. Convenio de Diversidad Biológica. (<http://www.biodiv.org/convention/articles.asp>).

Celeghini, E.C.C; Arruda, R.P; Albuquerque, R; Silva, F.H.A; Faria, D.E; Andrade, A.F.C; Nascimento, J; Raphael, C.F. 2007. Utilization of Fluorescent Probe Association for Simultaneous Assessment of Plasmatic, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Rooster Spermatozo. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 3: 143-149.

Conejo, N.J. 1991. Manual de inseminación artificial del Ganado porcino con semen diluido. Editorial de la Universidad Michoacana. Morelia, Mich. México.

Conejo, N.J. 2003. Estado funcional de la membrana, capacitación *in vitro*, reacción acrosomal y capacidad de fertilización *in vitro* de espermatozoides porcinos almacenados en un diluyente de larga duración. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma metropolitana. Xochimilco. México D.F.

Corona-Martínez, E. 2006. Una ofrenda de guajolote en el sitio Oaxtepec km 27.5, Morelos. In: Canto AG, Ledezma GL; Tostado GM; Fuentes MM; Nau FJ; Morayta MM, editores. Memoria del IV Congreso Interno del Centro INAH Morelos. Colección Científica 499. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, pp. 49-52.

Crawford, R. D. 1992. Introduction to Europe and diffusion of domesticated turkeys from the America. *Zootecnia Biological Reproduction*. 41:307-314.

De Leeuw, A.M; Den daas, J.H; Woelders, H. 1991. The fix vital stain method simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal Andrology*. 12: 112-118.

Den daas, N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science*. 28: 87-94.

Donoghue, AM; y Wishart, GJ. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 213-232.

Duchi, D.N; Almela V.L; Peinado, R; Poto, R.A. 2004. Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza murciana. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

Etches, R. 1996. The male. *Reproduction Poultry*. New York, USA: CAB International. Pp. 208-233.

Fahy, G.M; Lilley, T.H; Lindsell, H; John Douglas, M.S.T; Meryman, H.T. 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27: 247-268.

FAO-UNEP (Food and agriculture organization-united nations environment program). 2000. World watch list for domestic animal diversity. FAO 3ed. Edition Edited by Beate Scherf Roma, Italy. pp. 726.

FAO. 2003. Lista Mundial de Vigilancia para la Diversidad de los Animales Domésticos. Roma, Italia.

FAO. 2005. World watch list for domestic animal diversity. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Second ed. FAO, Rome, Italy. Pp. 769.

Fontgibell, A. y Francesch, A. 1998. Primeros resultados en el estudio de los efectos de la congelación de semen de gallo en tres razas catalanas. *Archivos de Zootecnia*. 47: 335-341.

- Fulton, J.E. 2006. Avian Genetic stock preservation : an industry perspective. *Poultry Science* 85: 227-231.
- Graham, J.K y Foote, R.H. 1987. Effects of several lipids, fatty acil chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*. 24: 42-52.
- Hammerstedt, R.H; Graham, J.K; Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian for viability assessment. *Reproduction Domestic Animal* 31: 37-47.
- Hammon, K; Leitic, W. 1996. The FAO global program for the management of animal genetic resources. FAO, Roma.
- 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.
- Hermann, K. H. 2006. Inseminación Artificial. *International Poultry Consulting Services*. Everberg, Belgica. Rev.(7). 24: 24-26.
- 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. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53: 47-58.
- Holt, W.V. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62: 3-22.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (2004) Monografía del Estado de Michoacán. INEGI, México.
- Izquierdo, C; Hummel, J.D; Palma, J.M. 2005. Rescate urgente de un banco de germoplasma en riesgo de extinción: los borregos de la isla socorro. *Avances de Investigación Agropecuaria*. 9: 2-3.
- Johnson, L.A; Maxwell, W.M.C; Dobrinsky, J.R; Welch, G.R. 1996. Staining sperm fluorescent probe. *Journal Reproduction Fertility*. 42: 105-11.

- Jhonston N. P. y Parker, J. E. 1970. The effect of time of oviposition in relation to insemination on fertility of chicken hens. *Poultry science*. 21: 325- 327.
- Kurbatov, A.D; Narubina, L.B; Ubliaeva, G; Tselutin, K.V. 1984. Cryopreservation of cock semen. *Ptitsevodstvo* 11: 28–29.
- Lake, P.E., Stewart, J.M. 1978. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen — an improved method. *Poultry Science*. 19: 187–194.
- Lake, P. E. and Ravie, O. 1984. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 25: 145- 150.
- Lake, P.E., 1995. Historical perspective of artificial insemination technology. 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. Poultry Science Association, Savoy, IL, pp. 1–20.
- Lemoine, M., Grasseau, I., Brillard, J. P., and Blesbois, E. 2008. Reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction*. 136: 391–399.
- Leopold, S.A. 1990. Fauna Silvestre de México: Aves y Mamíferos de caza. 2a edición. Ediciones Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. México, D.F.
- Long, J. A. y G, Kulkarni. 2004. An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Science*. 83: 1594–1601.
- Long, J. A. 2006. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science*. 85: 232–236.
- Lorenz , F. W. 1950. Onset and duration of fertility in turkeys. *Journal Poultry Science*. 29: 20-26.
- Losada, H; Rivera, J; Cortes, J; Castillo, A; González, R. O; y Herrera, J. 2006. Un análisis de sistemas de producción de guajolotes (*Meleagris gallopavo*) en el espacio suburbano de la delegación Xochimilco al sur de la Ciudad de México., *Livestock Research for Rural Development*. 18: 52
- Macpherson, J.W; Chatterjee, S; Friars, G.W. 1969. Frozen turkey semen. *Canadian Journal Compend Medical*. 33: 37-38.
- Mallia, J. G. 1998. Indigenous domestic turkeys of Oaxaca and Quintana Roo, México. *Animal Genetic Resources Information* 23:69-78.
- Martínez, R ; Ávila, O; Pérez, J; Gallego, J; y Onofre, H. 2005. Estructura y función del banco de germoplasma in vitro en Colombia. *Archivos de Zootecnia*. 54: 545-550.

---

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Journal Physiology* 247: 125-128.

Moya, A. 2003. Introducción de la inseminación artificial en el desarrollo de la cría de pavos. *Revista Cubana Científica Veterinaria*. 27: 129-133.

Mukesh, K. 2005. Growth, efficiency of feed utilization and economics of different rearing periods of turkeys Nepal. *Agriculture Resources Journal*. 6: 84-85.

Nicolaia, I; Manchisi, A; Gambacorta, M; Di Iorio, M; Pina Rosato, M. 2009. Effect of different sperm concentrations on the post-thaw viability and motility of turkey spermatozoa cryopreserved by the pellet method. *Animal Science*. 2: 760-762.

Ochoa, A. F. 2010. Evaluación de agentes crioprotectores para la criopreservación del semen de guajolote criollo (*Meleagris gallopavo*). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México.

Ollero, M; Bescós, O; Cebrian-Peréz, J.A; Muiño-Blanco, T. 1998. Loss of membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 49: 547-555.

Parks, J.E. y Grahamm. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209-222.

Petite, J.N. 2006. Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cell? *Poultry Science*. 85: 237-42.

Polge, C; Smith, A.U; Parkest, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.

Purdy, P. H; Song, Y; Silversides, F. G. and Blackburn, H. D. 2009. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both 1, 2, 3. *Poultry Science*. 88: 2184-2191.

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

SAGARPA. 2007a. Inventario de pavo o guajolote (número de cabezas). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Naturales, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/FTP/invpa.pdf>.

Salisbury, G.W; Van Demark, N.L ; Lodge, J.R. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2ª edición, Ed. Acribia. pp. 518-532.

Saveur, B. (1991) *Reproduction des volailles et production d'oeufs*. INRA. Versailles, France. Pp. 275-276 y 280.

SEMARNAT. 2007. Plan de manejo tipo de guajolote silvestre. [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)

Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender I. 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 prefreeze techniques on the fertility of frozen and frozen-thawed semen. *Poultry Science* . 60: 1567–1572.

Sexton, T. J., and A. F. Giesen. 1982. Beltsville Poultry Semen Extender II. 6. Holding turkey semen for six hours at 15C. *Poultry Science*. 61: 1202–1208.

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

Stangel, P.W; Leberg, P.L; Smith, J.I. 1992. Systematics and population genetics. In *The Wild Turkey: Biology and Management* Ed Dickinson Jg. pp 18-28.

Steel, M.G. y Wishart, G.J. 1996. The effect of removing surface-associated proteins from viable chicken spermatozoa on sperm function *in vivo* and *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 45: 139-147.

Tamargo, C; De la Fuente, J; Rodríguez, A; Pérez, S; Fernández, A; Benito, J.M. y Hidalgo, C.O. 2009. Creación en Asturias de un banco de germoplasma de razas autóctonas. *Archivos de Zootecnia*. 58: 529-532.

Tselutin, K; Seigneurin, F. y Blesbois, E. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science* 78: 586-590.

Valadez, A. R. 1996. *La Domesticación Animal*. Plaza y Valdés- México, D.F. pp. 110.

Valadez, A. R; García, R. CH; Rodríguez, G. B; Gamboa, C. L. 2001. Los guajolotes y la alimentación prehispánica. *Ciencia y Desarrollo*. 27: 55-63.

Valadez, A.R. 2003. Domesticación y zootecnia en el México antiguo. *Imagen Veterinaria* 4: 32-45.

Watson, P.F. 1979. The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C.A. Oxford University Press, Oxford, pp 283.

Watson, P. F; Kunze, P. E; Cramer, R. y Hammerstedt, H. 1992. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *Journy Andrology*. 13: 131–138.

Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility Development* 7: 871-891.

Ward, C.R; Storey, B.T. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Development Biologyc*. 104: 287-296.

Wentworth, B.C., Wineland, M. .J, Paton, G.D. 1975. Fertility of turkey hens correlated with depth of insemination. *Poultry Science*. (3) 54: 682.

Woelders, H; Zuidberg, C.A. y Hiemstra, J.S. 2006. Animal Genetic Resources Conservation in The Netherlands and Europe: Poultry Perspective. *Poultry Science* 85: 218-219.

Wolfe, C.A; James, P.S; Gunning, A.P; Ladha, S; Christova, F.R. 2001. Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after Washing and exposure to macromolecules BSA and PVP. *Reproduction development*. 59: 306-313.

Xia, L. J; Lalli, M. F; Ansah, G. A. y Buckland, R. B. 1988. Ultrastructure of fresh and frozen-thawed spermatozoa of high and low fertility lines of chickens. *Poultry Science*. 67: 819–825.

10. ANEXO



**Figura 2.** Colección de semen por medio del masaje abdominal no invasivo descrito por Burrows y Quinn (1937).



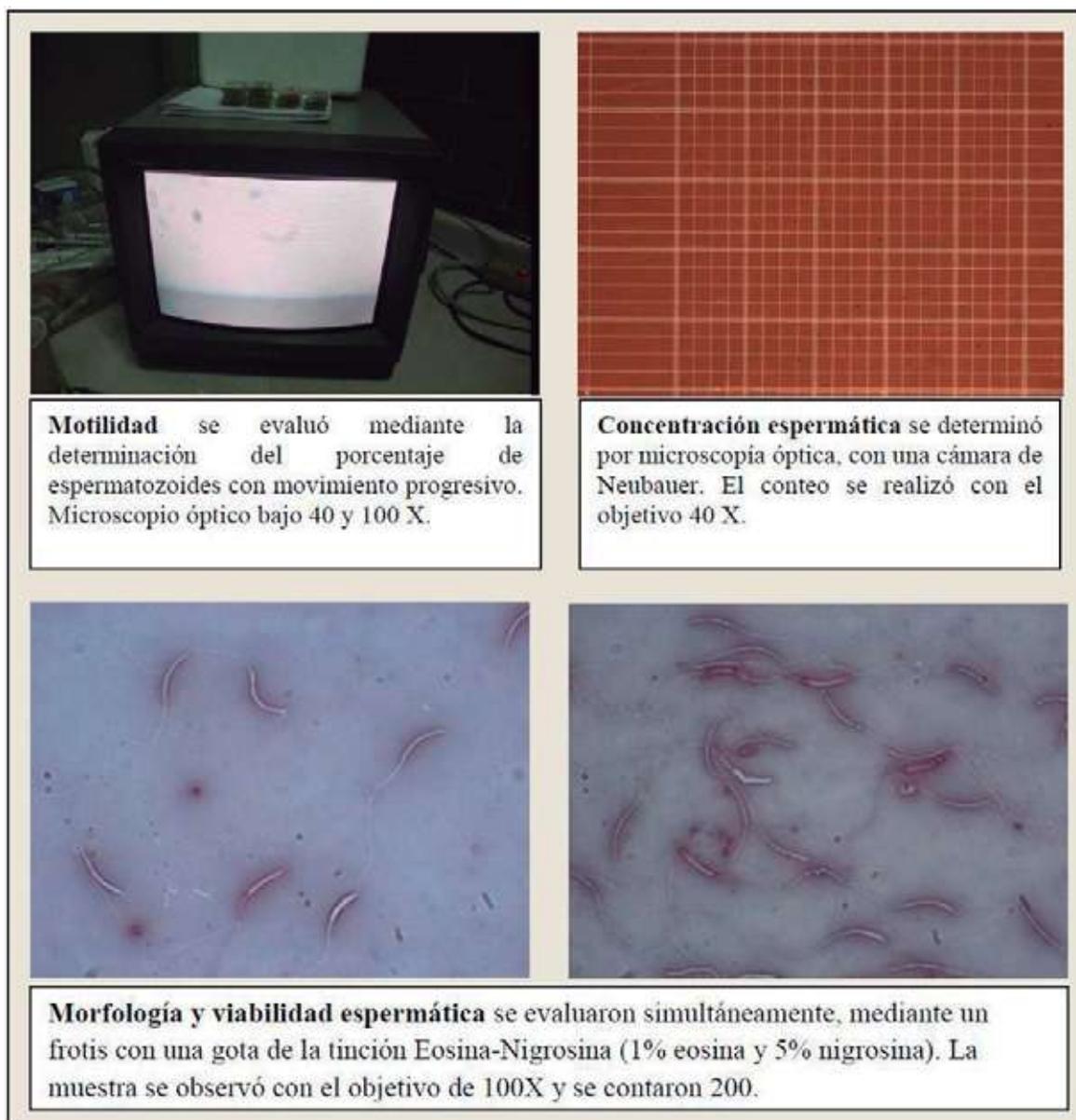
**Figura 3.** Técnica de colección de semen. La técnica consiste en un suave masaje alrededor de la cloaca, con el objetivo de exponer el falo, una vez expuesto, el manejador aprieta suavemente el falo para que el semen salga a través de este y se pueda extraer con una pipeta o jeringa graduada.



**Figura 4.** Dilución del semen. Formación de un pool de semen de los machos colectados, posterior a la evaluación macroscópica (volumen, color e impurezas) se realizó una dilución de 1:4 con el diluyente Triladyl®.



**Figura5.** Evaluación espermática y proceso de congelación del espermatozoide de guajolote nativo.



**Figura 6.** Evaluación de los indicadores del espermiograma (motilidad, viabilidad, concentración y anomalías espermáticas).



**Figura 7.** Proceso de Inseminación Artificial tanto de semen fresco como de semen congelado.



**Figura 8.** Proceso de la incubación de huevos de pavas nativa inseminada con semen fresco y congelado.



**Figura 9.** Evaluación de huevos fértiles por medio del embriodiagnostico (29 días de incubación).



**Figura 10.** Pavipollos nacidos por medio de Inseminación Artificial con semen fresco y criopreservado.