

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Calidad Seminal del semen caprino refrigerado por 48 horas utilizando yema de huevo de Codorniz y Gallina

Por:

MIGUEL ANGEL GAYTAN AGUILERA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Calidad seminal del semen caprino refrigerado por 48 horas utilizando yema de
huevo de Codorniz y Gallina

Por:


MIGUEL ANGEL GAYTAN AGUILERA

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:




Dr. Oscar Ángel García
Presidente



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Vocal



Dr. Ramiro González Avalos
Vocal



Dra. Guadalupe Calderón Leyva
Vocal Suplente



M.C. FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS
Coordinador de la División Regional de Ciencias Agrarias



Torreón, Coahuila, México

Junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Calidad seminal del semen caprino refrigerado por 48 horas utilizando yema de
huevo de Codorniz y Gallina

Por:

MIGUEL ANGEL GAYTAN AGUILERA


TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Oscar Angel Garcia
Asesor principal


Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Coasesor


Dr. Ramiro González Avalos
Coasesor


MC. FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México

Junio 2022

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por brindarme un espacio en sus filas.

A mis padres José Vicente Gaytan Alemán y Guadalupe Aguilera que durante toda mi carrera me apoyaron.

A mi Tía- Maestra- Asesora y Tutora, la Dra. Leticia Romana Gaytan Alemán.

A todos y a cada uno de mis amigos y compañeros que estuvieron, están y estarán apoyándome en mi vida.

Al Dr. Oscar Angel García por su apoyo y paciencia para realizar este trabajo.

A mis maestros que me compartieron su conocimiento y sabiduría para poder lograr esta meta.

DEDICATORIA

Este trabajo tiene dedicación especial a mis padres, pero sobre todo a mi papa José Vicente Gaytan que en este tiempo que estaba realizando este trabajo me apoyo con distinción y por motivarme a seguir estudiando y hacer cosas nuevas en mi camino a la superación.

A mi madre María Guadalupe Aguilera que con su amor me preparaba mis alimentos para seguir con mi día.

A mis asesores que me ayudaron a la realización de este proyecto.

A mi familia que estuvieron al pendiente de mi educación y de mi avance profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iii
INDEICE DE CUADROS Y FIGURAS	iv
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II.- REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Criopreservación espermática	3
2.2 Uso de yema de huevo como diluyente	3
2.3. Comparación de la composición de huevo de gallina y codorniz.	4
2.3.1 Yema de huevo de gallina	5
2.3.2 Yema de huevo de codorniz	6
2.4 Espermatogénesis	7
2.5 Factores que afectan la fertilidad al utilizar semen congelado	8
2.5.1 Shock de frío.	9
2.5.2 Estrés osmótico	9
2.6 Factores que afectan la criopreservación.	10
HIPOTESIS	11
OBJETIVO	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
General	12
3.1 Localización del estudio y manejo de los animales.....	12
2.2 <i>Colección y procesamiento del semen</i>	12
2.3 <i>Preparación de diluyentes y proceso de congelado</i>	13
2.5 Variables evaluadas	14
2.6 <i>Análisis estadístico</i>	14
IV. RESULTADOS.....	15
V. DISCUSIÓN.....	17
VI. CONCLUSIONES.....	19
VII. LITERATURA CITADA	20

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

No.	ÍNDICE DE CUADROS	Pág.
1		6
2		7
	INDICE DE FIGURAS	
1		8
2		16

CUADRO DE ABREVIATURAS	
LN	Latitud Norte
PV	Peso Vivo
Kg	Kilogramos
CC	Condición Corporal
d	Día
UI	Unidades Internacionales
mg	Miligramos
n	Número de animales
CE	Circunferencia Escrotal
CSA	Comportamiento Sexual Apetitivo
CSC	Comportamiento Sexual Consumatorio
<i>P</i>	Probabilidad
GT	Grupo Tratado
GC	Grupo Control
%	Porcentaje
FAO	Organización Mundial de las Naciones Unidad para la Alimentación y Agricultura
Vit-A	Vitamina A
Vit-E	Vitamina E
Vit- D	Vitamina D
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
LH	Hormona Luteinizante
Se	Selenio
RA	Ácido <i>trans</i> -retinoico
VAD	Deficiencia de vitamina A
UVB	Rayos ultravioletas
VDR	Receptor de vitamina D
IGF1	Factor de crecimiento semejante a la insulina
GH	Factor de Crecimiento
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropina
PUFAS	Ácidos grasos poliinsaturados esterificados
ATP	Adenosina trifosfato
Mpio	Municipio
°	Grado centígrado
PC	Proteína cruda
NRC	National Research Council
mL	Mililitros
CE	Circunferencia escrotal
T4	Testosterona
<i>et al.</i> ,	Colaboradores

RESUMEN

Uno de los procesos fundamentales para realizar la técnica de la inseminación artificial (IA) es la criopreservación del espermatozoides en los animales domésticos. Se ha reportado que durante la criopreservación las células seminales pueden sufrir daños importantes, por lo tanto, se utilizan compuestos que ayuden a disminuir estos daños, la yema de huevo es uno de los crioprotectores más utilizados durante el proceso de congelación-descongelación del semen.

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la yema de huevo de dos especies aves, gallina doméstica (*Gallus domesticus*), codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) sobre la calidad seminal del semen refrigerado de machos cabríos. Un total de 12 eyaculados de 3 machos (4 de cada uno) fueron utilizados en el experimento. Cada eyaculado fue dividido en dos partes iguales y diluido con dos diluyentes a base citrato- yema de huevo de codorniz (CYC), o gallina (CYG). El semen fue equilibrado a 4°C por 3 h y para lo cual, previo al equilibrio se colocó a baño maría (37°C) y después se mantuvo por 48 horas en refrigeración. Los parámetros de calidad seminal posteriores a la refrigeración del semen no difirieron entre diluyentes. Los resultados del actual estudio muestran que los diluyentes a base de YHC y YHG mantienen la calidad seminal en el semen refrigerado ($P < 0.05$) de manera similar. Finalmente se puede concluir que el uso de yema de huevo de codorniz o gallina resulta efectiva para conservar la calidad seminal del semen en el macho cabrío.

Palabras claves: Yema de Huevo de Codorniz, Semen, Refrigeración, Macho Cabrío

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen ha sido aplicado como una técnica de rutina para el procesamiento del esperma en la inseminación artificial (IA). La yema de huevo o leche son agregados al semen para la preservación de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante la crioconservación (Lima-Verde *et al.*, 2017; Ansari *et al.*, 2017). La yema de huevo es el componente por excelencia entre los diluyentes para almacenamiento y criopreservación del semen en especies como el toro, el carnero y el macho cabrío (Moussa *et al.*, 2002). La lipoproteína de baja densidad que posee la yema de huevo es el mejor componente en la protección de los daños inducidos a la integridad estructural de membrana durante el proceso de criopreservación del semen (Sieme *et al.*, 2016).

El choque frío causado por los cambios bruscos de temperatura en el proceso de crioconservación aumentan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) reduciendo el potencial de integridad de la membrana del esperma (Gororo *et al.*, 2019; Seifi-Jamadi *et al.*, 2017). La yema de huevo ayuda a los espermatozoides a resistir el choque frío, en asociación con otros componentes y proporciona mayor protección al semen contra el choque frío y se usa ampliamente comercialmente como Triladyl® (Minitube) u Optidyl (biovet, Francia), que usualmente son utilizados al 20% de yema de huevo (v/v) (Amirat *et al.*, 2004).

El choque térmico, el estrés osmótico, la formación de cristales durante el proceso de congelado y el daño por estrés oxidativo son las principales causas de daño durante el proceso de crioconservación de los espermatozoides, que finalmente causan la pérdida de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides (Amirat *et al.*, 2004). Se ha reportado una alta tasa de sobrevivencia y fertilidad de espermatozoides en varias especies con el uso de diluyentes comerciales que contienen el 20% de yema de huevo. Lo anterior, debido a el componente efectivo de la yema de huevo que contienen lipoproteínas de baja densidad que contienen estos diluyentes, como fracción crioprotectora que ayudan a mantener el semen de mejor calidad (Amirat *et al.*, 2004; Forouzanfar *et al.*, 2010).

Tradicionalmente el uso de yema de huevo de gallina (*Gallus domesticus*) es utilizado para la preservación de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides durante la crioconservación debido a que protege al esperma de los daños inducidos por la crioconservación durante el enfriamiento, congelación y descongelación debido a su acción crioprotectora que son los fosfolípidos, colesterol y proteínas de baja densidad (Andrabi *et al.*, 2008; Sieme *et al.*, 2016), ya que puede ayudar en la resistencia del shock por frío en asociación con otros componentes (Amirat *et al.*, 2004). Los fosfolípidos de la yema del huevo reemplazan a los fosfolípidos de la membrana espermática con mayor facilidad para mantener la estructura y función de la membrana plasmática durante el proceso de crioconservación (Amirat *et al.*, 2004).

Los medios que contienen yema de huevo de distintas especies de aves, los de la gallina domestica han resultado ser significativamente mayores en motilidad y longevidad en espermatozoides congelados de Jabalí y caballo. Varios estudios han mostrado que la yema de huevo de pato, codorniz o gallina tienen diferentes componentes de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, lo que resultó en diferentes efectos en el proceso de crioconservación sobre los espermatozoides (Trimeche *et al.*, 1997). Sin embargo, son pocos los estudios que comparen los efectos de la yema de huevo de codorniz en diluyentes para la crioconservación del semen en el macho cabrío. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la yema de huevo de dos diferentes especies aves, (gallina y codorniz y un diluyente comercial (Optidyl®) sobre la calidad del esperma sobre la congelación y descongelación del semen en el macho cabrío.

II.- REVISION DE LITERATURA

2.1 Criopreservación espermática

La criobiología es una rama de la biología que estudia los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas, ya que el frío prolonga el tiempo biológico puesto que retrasa estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso libre de problemas ya que puede provocar variaciones extremas en las propiedades químicas, eléctricas y térmicas que pueden modificar la pared celular, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en éstas y tejidos a conservar (Woods *et al.*, 2004). La criopreservación del semen es el método más útil para el almacenamiento a largo plazo de los espermatozoides (Safranski *et al.*, 2011). El objetivo de la conservación en nitrógeno líquido es aumentar la viabilidad de los espermatozoides de forma indefinida, ya que mediante la refrigeración y a temperatura ambiente los espermatozoides no sobreviven por mucho tiempo, ya que las células pierden sus reservas energéticas. La inseminación artificial con semen criopreservado ha resultado ser la tecnología reproductiva que ha ayudado a mejorar el progreso genético de las diferentes especies de importancia ganadera, mayormente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, para que esta tecnología sea efectiva depende de que, tras su descongelación el semen mantenga su poder fecundante para que se pueda conservar y utilizar posteriormente. Para lograr el objetivo deseado de congelación,

se deben de llevar a cabo rigurosamente todos y cada uno de los pasos a seguir que constituyen el proceso de crioconservación, y de forma minuciosa los que interactúan más cercanos sobre la función y estructura del metabolismo celular y las membranas espermáticas (Hammerstedt *et al.*, 1990).

2.2 Uso de yema de huevo como diluyente

Los espermatozoides pueden llegar a vivir poco tiempo fuera del organismo. Ya que el semen recolectado deberá proceder inmediatamente a su dilución para inseminar lo antes posible y evitar que se mueran las células.

Los diluyentes seminales están formados por soluciones amortiguadoras con un doble propósito, el primero de ellos es evitar los cambios de pH mediante la neutralización del ácido láctico que se produce en la actividad metabólica de los espermatozoides. Mientras que el segundo propósito tiene que ver con mantener un medio isotónico. Los diluyentes utilizados en los carneros son de fabricación sintética que básicamente están compuestos de sustancias buffer como el citrato o el tris. La fuente de energía la proporciona la fructosa o la glucosa. Como agente protector durante el congelamiento y enfriamiento a 5 °C se utiliza la yema de huevo, cuya principal función es proteger de las paredes celulares, es importante mencionar que las sales utilizadas no deben ser tóxicas (Evans y Maxwell, 1990; Cueto *et al.*, 2004). La yema de huevo es un ingrediente comúnmente utilizado para ayudar a proteger a los espermatozoides contra el cambio térmico por frío, además la porción lipídica de la yema de huevo (cefalina y lecitina) tiene una cualidad protectora y la porción lipoproteica un efecto conservador (Daza, 1994), ya que conserva la integridad y la motilidad de las mitocondrias del espermatozoide y membranas del acrosoma, además es un buffer osmótico, se ha comprobado que la yema de huevo actúa como agente protector durante la congelación, ya que se adhiere a la pared celular del espermatozoide y la recubre, esta facultad de protección se le confiere a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas (Carpio, 2015).

2.3. Comparación de la composición de huevo de gallina y codorniz.

De manera general las composiciones químicas de la yema de huevo de codorniz y de gallina son similares. Sin embargo, hay que mencionar algunas diferencias significativas. La cantidad de fosfolípidos es diferente entre ambas yemas. La yema de huevo de codorniz contiene una mayor cantidad de fosfatidilcolina y menos fosfatidiletanolamina además la proporción de estos dos compuestos fue del doble comparada con la yema de huevo de gallina. Por lo tanto, la yema de huevo de gallina contiene mayor cantidad de fosfatidiletanolamina y menos de fosfatidilcolina. Los lípidos netos de yema de huevo de codorniz se conforman principalmente de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) de 51.6%, ácidos grasos saturados (SFA) de 34.0 y

14.4% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los ácidos grasos principales fueron ácido oleico (18: 1), ácido palmítico (16: 0) y ácido linoleico (18: 2 n-6). Los lípidos absolutos de yema de codorniz contienen significativamente más MUFA y menos PUFA que la yema de huevo de gallina, mientras que las proporciones de SFA eran semejantes en ambas yemas de huevo. Por ejemplo, los lípidos finales de yema de codorniz constituyen entre 1.5 y 2 veces menos ácido linoleico, ácido araquidónico (20: 4 n-6) y ácido docosahexaenoico (22: 6 n-3) y más ácido oleico y ácido palmitoleico 16: 1) que la yema de huevo total (Trimeche *et al.*, 1997).

Las yemas de huevo de gallina y codorniz tienen una cantidad de lípidos y proteínas similares. Por otra parte, el oleato de metilo [18:1 (n-9)]; palmitato de metilo (16:0) y metil linoleato (18:2) representan el 86 % de ácidos grasos totales (AGT) en el huevo de gallina. Mientras que en el huevo de codorniz está conformado por un 83 % de ácidos grasos totales, además de una mayor concentración de fosfatidil serina comparado con la yema de huevo de gallina (Bathgate *et al.*, 2006).

2.3.1 Yema de huevo de gallina

El huevo de gallina contiene aproximadamente un 32 % de yema, 57 % de clara y 12 % de cáscara (Mendiola, 2002). El peso de un huevo que se considera grande oscila alrededor de los 58 g. Este peso se distribuye entre la cáscara 11 %, clara 58 % y la yema el 31 %. Si se analiza la parte interior del huevo correspondería un 35 % a la yema y un 65 % a la clara. Cuando un huevo se rompe comercialmente, los rendimientos suelen ser generalmente del 43 al 45% de yemas y del 55 al 57 % de las claras, porque parte de la clara permanece sobre la yema en la separación.

El huevo entero contiene aproximadamente un 88 % de clara, un 65.5 % de agua, y 48 % de la yema. La coagulación ocurre rápidamente a 60 °C. Cuando la temperatura oscila entre los 56.6 y 57.2 °C se observa un cambio en la viscosidad del albumen de la clara con un pH de 9. Cuando se agregan otros aditivos, por ejemplo: azúcar, sal entre otros la temperatura de coagulación aumenta. La yema de huevo coagula aproximadamente a los 65 °C.

Cuadro 1. Composición química del huevo de gallina.

Componente	Unidades	Componente	Unidades
Agua	74 g.	Hierro.	2.10 mg.
Energía, kilocalorías	158 kcal	Fosforo.	180 µg.
Proteínas.	12.10 g.	Vitamina B1 (tiamina).	1.44 mg.
Hidratos de carbono.	1.20 g.	Niacina (Acido nicotínico).	0.09 mg.
SFA	3.35 g.	Ácido fólico.	0.10 µg.
MUFA	4.08 g.	Vitamina B12 (cianocobalamina).	65 mg.
PUFA	1.24	Vitamina B6 (piridoxina).	66 mg.
Colesterol.	548 mg.	Vitamina C (Acido ascórbico).	0.12 mg.
Fibra dietética.	0 g.	Vitamina A (equivalentes de retinol).	0 µg.
Calcio.	56 mg.	Vitamina D3.	1.80 µg
Magnesio.	12 mg.		

Tomado de Taller, 2008.

2.3.2 Yema de huevo de codorniz

La composición estructural del huevo de codorniz es: clara (46.1%), yema (42.3%), membranas (1.4%), y cascara (10.2%). Desde el punto de vista de la nutrición la yema es la parte más importante ya que en ella se encuentran las vitamina, lípidos y minerales. Su contenido en agua es de cercano al 50 %. Comparando el huevo de gallina con el de codorniz, este último tienen una mayor concentración de proteínas, extracto etéreo y calcio ($p < 0.05$). Así mismo, el huevo de codorniz tiene una concentración tres veces mayor de omega 3 del tipo ácido eicosapentaenoico comparado con el huevo de gallina (Mendiola, 2002).

Cuadro 2. Composición proximal de huevos de codorniz (g/100 de porción comestible).

Detalle	Clara	Yema	Huevo entero
Humedad	86 ± 1.4	51± 7.4	69.49± 4.0
Proteína (N x 6.68)	11.63 ± 2.6	15.63± 1.9	13.63± 2.1
Lípidos	n.d	33.61± 2.2	12.59± 2.2
Colesterol		1.13± 0.2	

Tomado de González, 2011.

2.4 Espermatogénesis

La espermatogénesis en el macho adulto es un mecanismo sumamente complejo que tiene principalmente dos objetivos: continuar la multiplicación de la célula espermatogonia madre para la producción de esperma y una renovación permanente de estas espermatogonias que constituyen un almacén de futuro esperma.

La espermatogénesis presenta su etapa inicial con la división mitótica de las espermatogonias, las cuales son células inmaduras en el testículo incluyendo las espermatogonias tipo A, intermedias (solo presentes en roedores) y tipo B (O'donnell *et al.*, 2006). Las espermatogonias experimentan múltiples divisiones mitóticas para generar células germinales de reserva disponibles para la producción de espermatozoides mientras que otras se transforman en espermatogonias intermedias y posteriormente en tipo B (Pineda y Dooley, 2003), estas últimas se dividen para formar los espermatocitos primarios los cuales entran en estado de meiosis, formando los espermatocitos secundarios y finalmente las espermátidas (Figura 1), éstas darán como resultado final la formación de los espermatozoides.

La espermatogénesis es un proceso de división celular y diferenciación mediante el cual el macho produce espermatozoides. El proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos en estrecha relación con las células de Sertoli (Ross y Pawlina, 2007). La espermatogénesis se divide en dos fases: la

fase proliferativa en la que las espermatogonias se divide por mitosis y la división meiótica, si se generan las células haploides (espermátidas) y en espermiogénesis que es la fase de diferenciación celular, donde el núcleo y el citoplasma de las espermátidas se transforman y así genera la formación característica del espermatozoide (Pineda y Dooley et al., 2003).

Las espermatogonias antes de su división son de tres tipos (1) espermatogonia tipo A: (2) espermatogonia tipo intermedio originaria del tipo anterior (original) y finalmente (3) espermatogonia tipo B resultante de la multiplicación del tipo intermedio. Estas células, las espermatogonias son células diploides (carnero $2n= 54$; macho cabrío $2n= 60$).

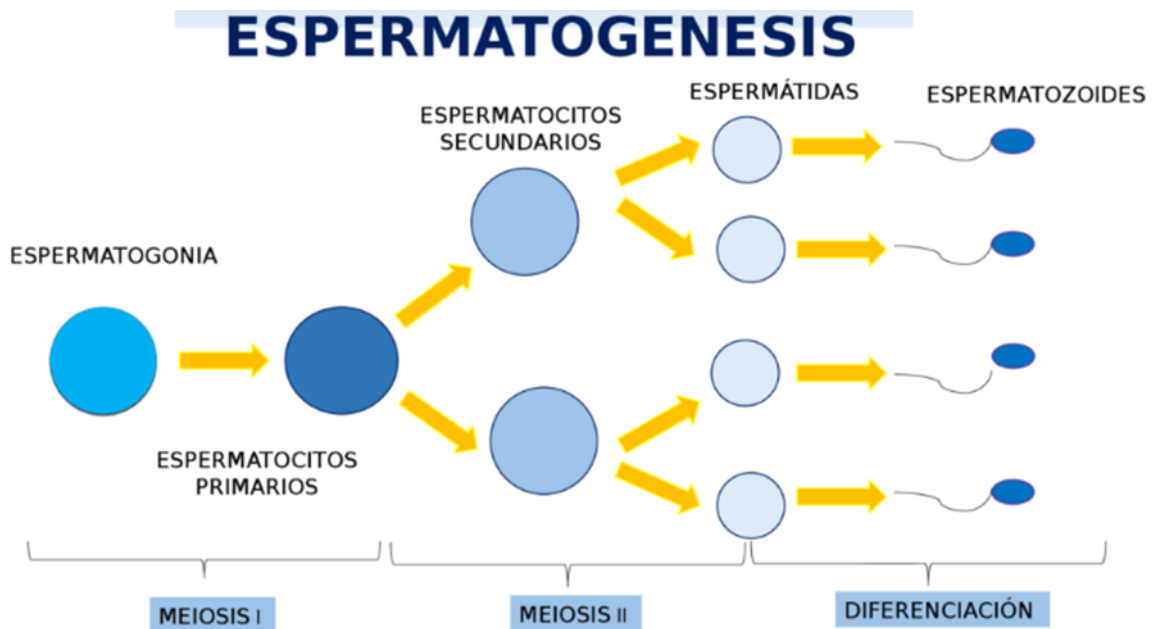


Figura 1. Representación esquemática de la espermatogénesis.

2.5 Factores que afectan la fertilidad al utilizar semen congelado

La criopreservación y utilización de semen congelado para la inseminación artificial han causado gran impacto sobre la reproducción animal y humana. Muchísimas crías de diferentes especies se han desarrollado a partir del uso de semen criopreservado. Con la finalidad de tener una mejor supervivencia espermática y fertilidad del semen a treves del tiempo se han realizado modificaciones en los protocolos de congelación. Para evitar en mayor medida los daños que se pueden generar en lo espermatozoides es fundamental conocer

como estos responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales, así como los procesos de congelación y descongelación influyen en la generación de estrés celular.

Durante el proceso de descongelación y congelación pueden ocurrir cambios en la célula que disminuyen de la fertilidad del semen congelado o en comparación con el semen recién obtenido. Los espermatozoides no toleran el proceso de congelación y descongelación y esto se asocia con la disminución en la fertilidad; además que en la población que sobrevive al proceso queda instaurada una disfunción no letal (Watson *et al.*, 2000).

La pérdida de gametos masculinos que ocurre al momento de la criopreservación se puede compensar en parte por la inseminación artificial (IA) de un gran número de espermatozoides, o por medio de la aplicación del semen en la porción craneal del tracto reproductivo. En el primer caso, al colocar un número mayor de espermatozoides totales se esperaría que con un mayor número de espermatozoides viables que han sobrevivido luego de soportar las inclemencias ocurridas durante el proceso congelación-descongelación, aumente la probabilidad de que ocurra la fecundación (Mazur, 1970).

2.5.1 Shock de frío.

El enfriamiento de los 30 °C a los 0 °C se debe de realizar con extremo cuidado, ya que un enfriamiento acelerado puede generar estrés que terminará en la muerte celular. También se debe de considerar que un enfriamiento demasiado lento no es lo ideal, ya que el tiempo prolongado afecta de manera principal la membrana del espermatozoide, esto se ha asociado con un cambio en el estado funcional de la pared celular y de la fase lipídica (Crowe *et al.*, 1989; Watson, 1995).

2.5.2 Estrés osmótico

Si el tiempo de congelación es muy rápida o lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Mazur, 1984). El estrés generado por la formación de cristales de hielo está relacionado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (Watson y Duncan, 1988). Cuando una solución a base de agua es enfriada por debajo del punto de congelación los

cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo, perjudicando a los espermatozoides.

2.6 Factores que afectan la criopreservación.

El proceso de la criopreservación es un proceso agresivo, la congelación-descongelación genera que aproximadamente un 50% de los espermatozoides se estropean. Durante estos procesos se describen modificaciones radicales que generan un estrés físico-químico que después impacta en la viabilidad y la funcionalidad espermática (Benson *et al.*, 2012; Nijs y Ombelet, 2001).

El choque osmótico es el principal proceso asociado con la descongelación-congelación. Este proceso se ve beneficiado con la adición de agentes crioprotectores y después por la coexistencia de un medio hipertónico, es decir la presencia de una fase líquida y una fase sólida que provoca la salida de agua intracitoplasmática durante la congelación. Mientras que en la descongelación ocurre un fenómeno opuesto, se crea un medio hiposmótico con la entrada de agua al interior del espermatozoide y la consiguiente rehidratación, esto debido a que el agua pasa del estado sólido al estado líquido (Holt, 2000).

Calidad seminal: Entre los factores intrínsecos se incluyen la calidad seminal, así como aquellos que determinan las características estructurales y genéticas de los espermatozoides. Entre las que se pueden destacar la composición lipídica (Martínez-Soto *et al.*, 2012), las características espermáticas como la fluidez de la membrana plasmática (Giraud *et al.*, 2000), las diferencias genéticas entre individuos (Thurston *et al.*, 2002) o bien diferencias en el sistema antioxidante (Meseguer *et al.*, 2004) que pueden condicionar el éxito de la criopreservación.

Existe un debate entre diversos autores, algunos de ellos proponen la calidad seminal inicial como un punto importante para el éxito de la congelación espermática, es decir que previamente al proceso de congelación se tengan excelentes parámetros de concentración, motilidad y morfología seminal (Freour *et al.*, 2009), sin embargo, algunos otros autores consideran que estos parámetros iniciales no influyen en el proceso anteriormente mencionado (Amelar y Dubin, 1980).

HIPOTESIS

La calidad seminal del semen caprino será mejor utilizando yema de huevo de codorniz como diluyente.

OBJETIVO

Evaluar la calidad seminal del macho caprino refrigerado por 48 horas utilizando yema de huevo de codorniz y gallina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

General

Todos los métodos y manejo de las unidades experimentales utilizadas en este estudio fueron en estricto acuerdo con los lineamientos para el uso ético, cuidado y bienestar de animales en investigación a nivel internacional (FASS, 2010) y nivel nacional (NAM, 2002) con número de referencia de aprobación institucional UAAAN-UL/38111-425501002-2706.

3.1 Localización del estudio y manejo de los animales

El experimento se realizó en el Centro Caprino de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (26° LN, 104° LO), durante los meses de septiembre a octubre (época natural de reproducción). El área de estudio se encuentra a una altitud 1120 msnm, con una precipitación media anual de 230 mm y con temperatura promedio de 24 °C, máxima de 41 °C en mayo y junio, y mínima de -1 °C en diciembre y enero (CONAGUA, 2015). Se utilizaron machos adultos de la raza Alpino-francés (n = 8, de 1.5 a 2 años), los cuales fueron divididos en dos grupos (GV y GC, de 4 animales cada uno), homogéneos en cuanto a peso vivo (PV; 46.2 ± 6.6 kg) y condición corporal (CC; 2.4 ± 0.1 unidades), con fertilidad probada previo al estudio experimental a través de evaluaciones frecuentes de calidad seminal. Los machos se alimentaron dos veces al día (800 h y 1800 h) a libre acceso, con una dieta basada en heno de alfalfa (18% PC, 1.95 Mcal de EM) y 100 g de concentrado comercial (21% PC, 1.7 Mcal EM) en base a sus requerimientos nutricionales (NRC, 2007) y tuvieron libre acceso al agua limpia y sales minerales, y un periodo de adaptación de 3 semanas previas a la investigación.

3.2 Colección y procesamiento del semen

El semen fue colectado durante la mañana (800 a 1000 h) cada 3 días y se usó como estímulo a la monta una hembra en estro. Para la recolección del semen se utilizó una vagina artificial estándar para caprinos, mantenida a una temperatura de 38 °C, por lo que se precalentó a 42 °C previo a recolección. Se utilizaron un total de 12 eyaculados, después de cada extracción el semen fue

sumergido inmediatamente en baño maría a 37 °C para su posterior análisis durante los siguientes 10 minutos.

3.3 Preparación de diluyentes y proceso de congelado

Para el proceso de crioconservación, se utilizaron 2 diluyentes, y su composición fue la siguiente: para preparar los diluyentes a base de citrato-yema de huevo de codorniz (CYC) o gallina (CYG), Se utilizaron huevos frescos. Los huevos se rompieron manualmente, separado y cuidadosamente enrollado sobre papel de filtro absorbente para eliminar cualquier rastro de albúmina que se adhiriera a la membrana vitelina. Esta membrana fue perforada con una aguja de jeringa, y se recogieron 15 ml de la yema y colocado en un vaso de precipitado. Luego, se agregaron 2.37 g de citrato de sodio, 0.50 g de glucosa, 7 ml de glicerol, 100 000 UI de penicilina y 100 mg de estreptomina en 100 ml de agua destilada (Salamon y Maxwell, 2000). El diluyente Optidyl (OP) (Optidyl®, CRYO-VET, Francia) se prepararon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Cada uno de los eyaculados fue dividido en dos partes iguales y cada parte se diluyó con dos diluyentes a base de citrato-yema de huevo de codorniz (CYC) ó citrato-yema de huevo de gallina (CYG).

En el experimento fueron considerado únicamente muestras con un volumen ≥ 0.5 mL, una concentración de 2.5×10^9 mL, una motilidad masal ≥ 3.0 y una viabilidad $\geq 70\%$. Posteriormente, las muestras de semen fueron divididas y sometidas a 3 etapas para su evaluación: semen fresco (SF); semen refrigerado (SR), enfriado de 37 a 4 °C durante 3 horas; y semen congelado (SC). Después de refrigerar el semen se llenaron pajillas de 0.25 mL (IMV, Francia) y sellado con alcohol polivinílico (APV) a una concentración de (80×10^6) espermatozoides/mL. Las pajillas se equilibraron a 4°C durante 3 h en el refrigerador y para el proceso de congelación se colocaron a 4 cm de nitrógeno líquido (NL) a vapores (-140°C) por 10 min; después de este tiempo, las pajillas se sumergieron directamente en el NL (-196°C) y se guardaron hasta su análisis (Jerez *et al.*, 2016). En cada una de las etapas de conservación (SF, SR y SC), el semen se analizó para evaluar la motilidad masal, viabilidad, morfología y prueba de integridad de la membrana (HOST). En el caso del SC, la pajilla se descongeló sumergiéndola en un baño maría (37° C durante 30 s).

3.5 Variables evaluadas

Las muestras de semen se evaluaron para determinar los parámetros de calidad seminal fueron: motilidad masal, MM (%), la cual se evaluó con el uso de una escala arbitraria de 1 a 5; donde 1 = 25% y 5 = 100% espermatozoides móviles (Mahsud *et al.*, 2013); se determinó con el uso de una plataforma precalentada (37 °C), colocando una alícuota de semen puro (20 µl) sobre una lámina portaobjetos en el microscopio óptico con objetivo de 10x. La viabilidad espermática, VE (%), se evaluó mediante el uso de la tinción con eosina-nigrosina (Kafi *et al.*, 2004), se registraron al menos 200 espermatozoides por muestra mediante microscopio óptico (1000X), y se cuantificó el porcentaje de células vivas (sin teñir) y de células muertas (de color rosa), la prueba de hinchazón hiposmótica (HOST) se utilizó para evaluar la integridad funcional de la membrana espermática. La prueba de HOS se realizó bajo la técnica descrita por Rahmatzade *et al.* (2017), Todos los parámetros de calidad seminal se determinaron en las etapas de SF, SR y SC y las evaluaciones fueron realizadas por el mismo técnico.

3.6 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el procedimiento Modelo Lineal General (GLM). Las medias obtenidas de los parámetros seminales fueron comparadas usando una prueba de *t-Student*. Todos los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc. Cary. NC. USA, V9.1). Las diferencias fueron consideradas significativas a un valor de $P \leq 0.05$

IV. RESULTADOS

Los resultados de la motilidad masal se muestra en la figura 1. Después del proceso de equilibrio la motilidad masal de ambos diluyentes disminuyo manteniéndose una muy baja calidad durante las 48 horas de refrigeración. En la Figura 2, se muestra lo resultados de la motilidad individual, la cual se puede observar que de la misma manera que la motilidad masal, después del proceso de equilibrio disminuyo manteniéndose una muy baja motilidad durante las 48 horas de refrigeración. Mientras que la viabilidad se comportó de la misma manera la cual se muestra en la Figura 3.

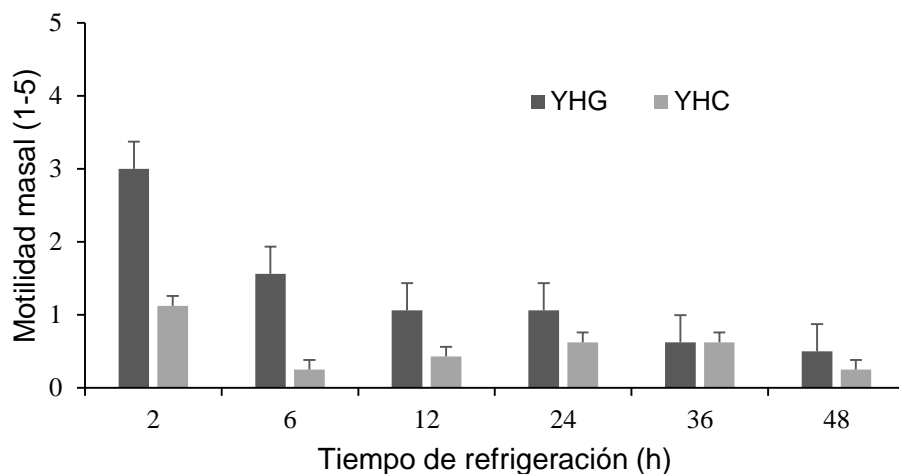


Figura 1. Motilidad masal del semen caprino refrigerado por 48 horas con yema de huevo de gallina (YHG) o yema de huevo de codorniz (YHC) refrigerado por 48 horas.

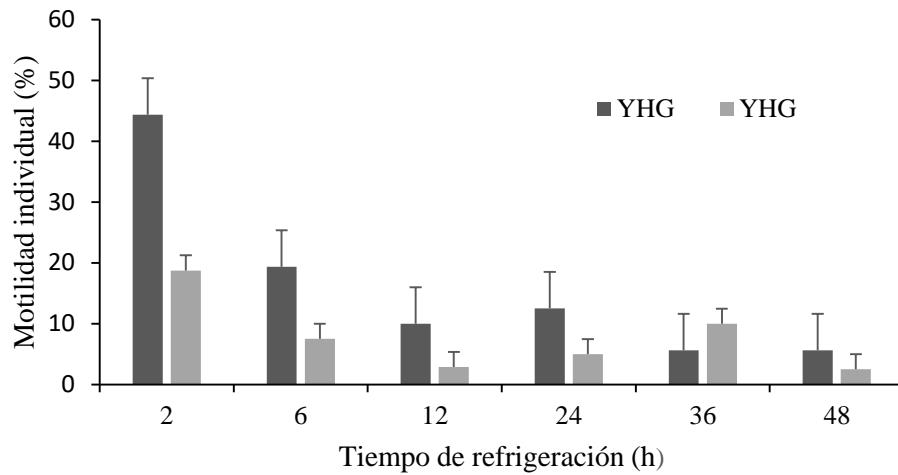


Figura 2. Motilidad individual del semen caprino refrigerado por 48 horas con yema de huevo de gallina (YHG) o yema de huevo de codorniz (YHG) refrigerado por 48 horas.

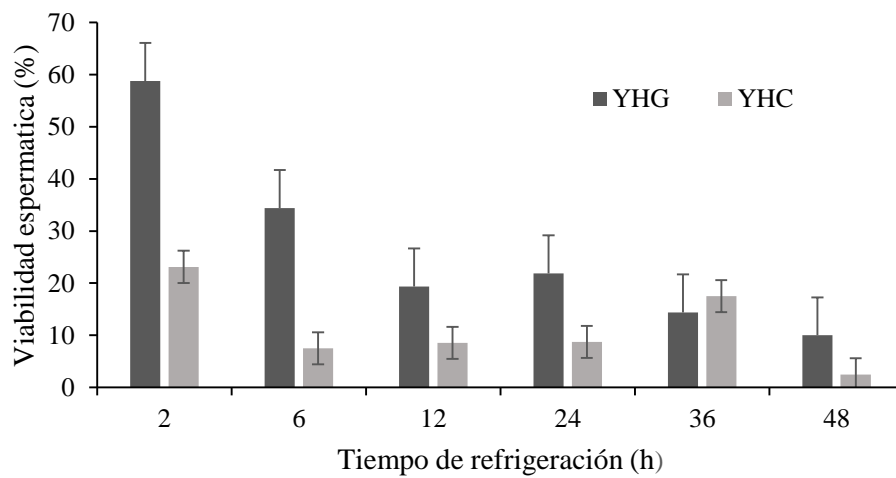


Figura 3. Viabilidad espermática del semen caprino refrigerado por 48 horas con yema de huevo de gallina (YHG) o yema de huevo de codorniz (YHG).

V. DISCUSIÓN

Estos resultados demuestran que la yema de huevo de gallina mantiene por más tiempo el semen refrigerado (4°C) sin embargo, los parámetros de calidad seminal después de las 6 horas de refrigeración se mantuvieron de muy baja calidad. Cabe mencionar que estos resultados no mostraron diferencias significativas a pesar de las diferencias en la composición química de las yemas, ya que la yema de huevo de gallina contiene más ácidos grasos monoinsaturados seguida de la yema de huevo de codorniz, la yema de huevo de codorniz contiene significativamente más fosfatidilcolina, y menos fosfatidiletanolamina y una proporción menor de ácidos grasos poliinsaturados a saturados que la yema de huevo de gallina (Trimeche *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de las diferencias químicas en las yemas de huevo, en nuestros resultados no se encontró diferencia en ninguno de los parámetros evaluados de calidad seminal semen refrigerado.

Por el contrario, cuando se congela semen con diluyentes que contienen diferentes tipos de yema de huevo existen diferencias en la calidad seminal postdescongelación, lo que puede deberse a la variación que existe en la composición de la yema de huevo.

Nuestros resultados son similares a los encontrados por otros estudios que muestran que la adición de yema de huevo de diferentes especies de aves en el diluyente mejoró significativamente los parámetros de calidad del semen postdescongelado en equinos (Tremiche *et al.*, 1997).

Los diluyentes en base a Tris- yema de huevo de codorniz tenían una mejor motilidad, viabilidad e integridad de la membrana (HOST) antes del congelamiento y descongelamiento. En efecto, las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo, fosfolípidos y proteínas están implicadas durante el proceso de criconservación ya que probablemente esta actúa a nivel de la membrana celular, protegiendo a los espermatozoides durante el proceso de congelación al inducir la resistencia contra el choque frío (Amirat *et al.*, 2004; Aboagla y Terada, 2004).

Por otra parte, a pesar de las variaciones que existen en la composición de la yema de huevo en las diferentes especies de aves, nuestros resultados no

mostraron diferencias estadísticas en los parámetros de calidad seminal evaluados durante el proceso de congelamiento y descongelamiento. Lo anterior, probablemente se deba al espermatozoide del macho cabrío que fue menos susceptible a sufrir daño. En efecto, una de las principales causas de la baja fertilidad de los espermatozoides en el búfalo posteriores a la congelación se debe a que los espermatozoides de búfalo son más susceptibles al proceso de congelación y descongelación debido a que su membrana espermática está compuesta de una mayor proporción de ácidos grasos saturados y poliinsaturados (PUFAs) (Andrabi *et al.*, 2009; Hol, 2009). Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados son uno de los componentes vitales de los lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides que mantienen su integridad estructural y funcional y brindan protección contra las lesiones criogénicas durante la criopreservación (Naz *et al.*, 2019).

(Trimeche *et al.*, 1997) mostraron un efecto benéfico de la yema de codorniz en comparación con la yema de gallina en el semen del burro, utilizando un 10% en el diluyente.

Cabe mencionar, que los diluyentes utilizados en nuestro estudio y base a citrato-yema de huevo de codorniz o gallina contenían el 15% de yema de huevo y 20% del diluyente comercial. Sin embargo, a pesar de las diferencias en cuanto al porcentaje de yema de huevo en los diluyentes en nuestro estudio los parámetros de calidad seminal fueron similares en las tres etapas de evaluación. En contraste, resultados encontrados por (Fourouzanfar *et al.* 2010), muestran que la motilidad y viabilidad espermática posdescongelación son superiores cuando se utiliza una concentración de yema de huevo al 20% en comparación con el 15% de yema de huevo en el diluyente.

VI. CONCLUSION

Los resultados de este trabajo demuestran que, aunque el diluyente a base de yema de huevo de gallina resulta ser menos efectiva a largo plazo que el diluyente de yema de huevo de codorniz a grandes rasgos no tienen diferencia por lo que se puede concluir que el uso de cualquiera de estos resulta ser efectiva para conservar la calidad seminal en el macho cabrío.

VII. LITERATURA CITADA

- Aboagla, E. M. E., & Terada, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1160-1172.
- Amelar, R., Dubin, L. (1980). For donor insemination do you prefer fresh or frozen semen? What are the bases for your preferences? *International Journal of Fertility* 25, 4-15.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, JL y Anton, M. (2004). Fertilidad in vitro del semen de toro después de la criopreservación usando LDL de yema de huevo: una comparación con Optidyl®, un diluyente de yema de huevo comercial. *Teriogenología* , 61 (5), 895-907.
- Andrabi, T., Das, J., & Khwaja, A. I. (2008). A dime a day: The possibilities and limits of private schooling in Pakistan. *Comparative Education Review*, 52(3), 329-355.
- Andrabi, SMH. (2009). Factores que afectan la calidad de los espermatozoides de toro de búfalo (*Bubalus bubalis*) criopreservados. *Reproducción en animales domésticos*, 44 (3), 552-569.
- Azqueta, O.D. (2007). Valoración económica en empresas pecuarias. Mc Graw Hill, España. 299 p.
- Baca, U.G. (2007). Evaluación de proyectos. Mc Graw Hill. México, D. F. 339 p.
- Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M., Critser, J.K., (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78: 1682-1699.
- Carpio, S.V. (2015). Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: Yema de huevo vs leche descremada. (Tesis profesional). Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Crowe, J., Carpenter, J., Crowe, L., Anchoroguy, T. J. (1989). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26th Annual meeting of the society for cryobiology, Charleston, South Carolina; 219-224.
- Daza, J. (1994). Inseminación artificial y andrología bovina. Montería (Cordoba): Editorial Multimpresos.
- Delgadillo J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.G., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpoux, B. (2002). Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80: 2780-2786.
- Evans G., Maxwell W.M. (1987). Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Ed. Acribia, S. A. 192.
- FOROUZANFAR, M., Sharafi, M., Hosseini, S, M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Nasr-Esfahani, MH. (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73(4):480-487. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>

- Freour, T., Jean, M., Mirallie, S., Langlois, M.L., Dubourdiou, S., Barriere, P., 2009. Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm. *International Journal of Andrology* 32, 498-504.
- Galina, C., Valencia, J. (2006). *Reproducción de los animales domésticos*. 2da. Edición. Limusa, México. 577 p.
- Gonzalez, J. (2011). Evaluación sensorial de huevos de codorniz en conserva y composición nutrimental. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(8): 1-10.
- Gororo, E., Prince, T. Zulu, Fungayi, P. Chatiza, Christine, M. (2016). Effects of different extenders and storage temperatures on longevity of small East African goat (*Capra hircus*) semen, *Small Ruminant Research*, Volume 175, 83-89.
- Giraud M.N., Motta, C., Boucher D, G, G., (2000). Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction* 15: 2160-2164.
- Hafez E.S.E. (1996). *Reproducción e inseminación artificial en animales*, Ed. Mc. Graw Hill. 542 p.
- Hammerstedt, R., Graham, J., Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11: 73-88.
- Holt, W., (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62: 3-22.
- Martínez-Soto, J.C., Landeras, J., Gadea, J. (2012). Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. DOI:10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x.
- Martinez, J., Duverger, O., Diaz, N., Interian, L., Gonzales, D. (2011). Efecto de diferentes niveles de yema de huevo en la congelación del semen caprino en un medio liofilizado a base de Tris. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 5(1): 33- 3.
- Mazur, P., 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 168, 939-94.
- Mellado, M., Foote, R.H., Rodríguez, A., Zárate, P. (1991). Botanical composition and nutrient content of diets selected by goats grazing on desert grassland in northern Mexico. *Small Rumin Res.* 6:141-150.
- Mendiola, E. (2002). Evaluación comparativa nutricional entre los huevos de codorniz: japónica (*coturnix coturnix*) y gallina criolla (*gallus gallus*) en la primera etapa de postura. (Tesis profesional). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Peru.
- Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. (2004). Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 25: 773-780.
- Nijs, M., Ombelet, W. (2001). Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility* 4, 158-163.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 1695- 1706.

- O'Donnell L., Meachem S.J., Stanton P.G., McLanchlan R.I. (2006). Endocrineregulation of spermatogenesis. En: Neill JD, Ed. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. San Diego, CA: El sevier; 1017-69.
- Pineda M.H., Dooley M.P. (2003). Endocrinología veterinaria y reproducción de McDonald's (No. Ed. 5). Prensa del estado de Iowa.
- Ramírez, R.G., Alonso, D.S., Hernández, G. Ramírez, B. (1996). Nutrient intake of range sheep on a buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*) pasture. *Appl. Anim. Behav Sci.* 48:215-224.
- Red Mexicana de Investigación en Política Agroalimentaria (AGROPROSPECTA). 2010. Resumen ejecutivo de Unidades Representativas de Producción PECUARIA. Panorama económico 2008-2018. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México. 56 pp.
- Ross MH, Pawlina W. (2007). Histología. Ed Médica Panamericana.
- Safranski, T.J., Ford, J.J., Rohrer, G.A., Guthrie, H.D. (2011). Plenary contribution to International Conference on Boar Semen Preservation (2011). Genetic selection for freezability and its controversy with selection for performance. *Reproduction Domestic Animal.* 46: 31-34.
- Salamon, S., Maxwell, WMC. (2000). Almacenamiento de semen de carnero. *Ciencia de la reproducción animal*, 62 (1-3), 77-111.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2011) http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=330. (consultado abril, 2011).
- SIAP.(2020).https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655389/Inventario_2020_caprino.pdf.
- Sieme, H., Harriette, O., Willem, F., Wolkers. (2016) Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation, *Animal Reproduction Science*, Volume 169, 2-5.
- Swenson, J., Reece O. (1999). Fisiología de los Animales Domésticos de Dukes. Ed. Uteha. 925 p.
- Taller, N. (2008). E1 huevo como aliado de la nutrición y la salud. *Revista Cabana de Alimentacion y Nutricion*, 18(2 Supl 1), S1-S15.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jacas sperm. *Cryobiology.* 34(4): 385-393.
- Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., Holt, W.V. (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction* 66: 545-554.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science.* 61: 481-492.
- Watson, P., (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 871-891.

Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., Critser, J.K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48(2): 146-156.