

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



“Estudio de la criopreservación de espermatozoides de *Coturnix coturnix*”

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

BIÓLOGA: Dulce Elisette Ramiro Alvarado

TUTORA: Dra. Rosalina María De Lourdes Reyes Luna

CO-DIRECTOR: Dr. Andrés Eduardo Estay Stange

Enero 2024



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

H. Puebla de Z. a 11 de diciembre de 2023

Asunto: Voto Aprobatorio

**Comité Académico del Posgrado
PRESENTE**

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

“Estudio de la criopreservación de espermatozoides de *Coturnix coturnix*”

Que presenta la estudiante Dulce Eliserte Ramiro Alvarado con número de matrícula 221470309, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: “ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE LOS SERES VIVOS”, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.



Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Doctora en Ciencias Dalia Molina Romero 

Tutor Externo: Doctor en Ciencias Ubaldo Quiróz López 

Revisor: Doctor en Ciencias Pablo López de Jesús 

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.



GOBIERNO DE
MÉXICO



COAD PUEBLA
Jefatura de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud
Centro de Investigación Biomédica de Oriente

Metepec, Atlixco, Pue., a 12 de diciembre de 2023
Asunto: Voto aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
Maestría en Ciencias Biológicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Como miembro del Comité revisor, después de haber dado lectura al manuscrito de la tesis titulada “Estudio de la criopreservación de espermatozoides de *Coturnix coturnix*” de la estudiante Ramiro Alvarado Dulce Elisette con número de matrícula 221470309, aspirante al grado de Maestra en Ciencias Biológicas, considero que reúne los requisitos para su defensa. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO** y autorizo la réplica oral en el examen de grado.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

Revisor de Tesis para Examen de Grado

Dr. CBS. Pablo López De Jesús



La maestría en Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla pertenece al padrón de posgrados de excelencia del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) con número de registro PNPC 005671.

El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) otorgó una beca a la estudiante del posgrado de la maestría en Ciencias Biológicas a DulceElisette Ramiro Alvarado con número (CVU/ BECARIO): 840688.

Este estudio se realizó en el laboratorio de Biología de la Reproducción, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Declaratoria de originalidad

Nombre del autor: Dulce Elisette Ramiro Alvarado

Programa: Maestría en ciencias biológicas

Título de tesis: Estudio de la criopreservación de espermatozoides de *Coturnix coturnix*

Director de tesis: Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Co-director de tesis: Andrés Eduardo Estay Stange

Lugar: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Por medio de la presente **declaro que:**

El siguiente trabajo de tesis presentado es una obra original que ha sido desarrollada con el fin de culminar el grado de maestría en la facultad de ciencias biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla durante el periodo 2021-2023. Declaro que asumo la originalidad de dicho documento en el sentido de que no se han utilizado ideas o imágenes sin haber sido citadas correctamente.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por financiar este trabajo, identificado con el número 840688.

Al laboratorio de biología de reproducción de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme realizar los experimentos necesarios para la realización de esta tesis

Agradezco de manera muy especial y con total admiración a la Doctora Rosalina María de Lourdes Reyes Luna quien me brindó de manera incondicional su apoyo para la realización de esta tesis y permitirme concluir esta etapa importante en mi vida.

Mi más sentida gratitud a la Bióloga Zaira Zambrano Caselín por su amistad, los consejos que me diste y el conocimiento que compartiste conmigo, fuiste parte fundamental para que este trabajo se llevara a cabo.

Al Doctor Andrés Eduardo Estay Stange por brindarme las muestras del ave de Harris.

A todos los miembros del comité por tomarse el tiempo de revisar y darme consejos para mejorar a través de los años de maestría.

A todos los chicos del laboratorio de biología de la reproducción, por todos esos momentos divertidos que compartimos.

A mi esposo por las porras que me dio. Por todo tu cariño y apoyo, me alentaste cuando pensaba que ya no podría.

A quien también fue partícipe de este proceso Elian, porque siempre me acompañaste y espero que un día leas este trabajo.

Dedicatoria

Muy especialmente a la Doctora Rosalina quien desde hace años me introdujo en el mundo de la biología de la reproducción y me permitió ser parte de ese hermoso laboratorio donde aprendí muchas cosas, además de haber sido parte fundamental en mi formación académica. Gracias doctora por haberme dado todo su apoyo y sus conocimientos.

A mi querido padre, gracias por todas las enseñanzas y el amor incondicional que siempre me brindaste, sé que estarías orgulloso, te extraño.

Elian, eres mi motor.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	14
Introducción	15
1.1 Material biológico	20
1.2 Aparato reproductor	22
1.3 Espermatogénesis	23
ANTECEDENTES.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	32
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	33
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS PARTICULARES	36
METODOLOGÍA	37
1.1 Diseño	37
MOVILIDAD.....	37
VIABILIDAD.....	38
DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS	38
PRESENCIA DE OTRAS CÉLULAS.....	38
1.2 CRIOPRESERVACIÓN.....	39
1.3 DESVITRIFICACIÓN.....	40
1.4 Análisis estadístico	41
RESULTADOS.....	42
1.1 Experimentos previos	42
1.2 Resultados de codorniz.....	47
1.3 Análisis Estadístico	48
1.4 Comparación de viabilidad espermática recién obtenido y post- criopreservación	48
1.5 Comparación de movilidad espermática en el control y después de la criopreservación.....	49
Discusión	52
Conclusiones.....	58
Recomendaciones.....	59
Bibliografía	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 BPSE y HTF	40
Tabla 2. Viabilidad y movilidad en espermatozoides recién obtenidos (control) y después de la vitrificación	47

ÍNDICE DE IMÁGENES

figura 1	18
Figura 2.....	18
Fig. 3.....	21
Figura 4.....	22
Figura 5.....	24
Figura 6.....	37
Figura 7.....	41
Figura 8.....	44
Figura 9.....	45
Figura 10.....	46

ÍNDICE DE GRAFICAS

GRÁFICA 1	49
Gráfica 2	50
Gráfica 3	51

Resumen

La criopreservación espermática como parte de las técnicas de reproducción asistida, es de gran utilidad en la producción de aves domésticas y la cría en cautiverio de aves silvestres. Permite mantener congelados los espermatozoides a temperaturas de -196°C con vida latente por tiempo indefinido. Sin embargo, la supervivencia de las células puede verse afectada por la misma congelación, ya que al formarse hielo intracelular las estructuras internas se dañan provocando la muerte, por lo que el uso de crioprotectores es indispensable para evitar el daño que la congelación o la descongelación puedan causar a la célula, debido a que elimina la posibilidad de que se formen cristales de hielo. Al ser técnicas poco desarrolladas en aves no se cuenta con los protocolos apropiados. Por ello, el objetivo de este estudio fue criopreservar espermatozoides de codorniz (*Coturnix coturnix*) con el uso de dos crioprotectores permeables (dimetilsulfóxido y glicerol) y la combinación de estos, además de mantener a las células en dos medios de cultivo: el diluyente de semen para aves de corral de Beltsville (BPSE) así como el fluido tubárico humano (HTF) para después evaluar la viabilidad y movilidad espermática.

Se colectaron espermatozoides de 12 ejemplares de codorniz común en los medios BPSE y HTF, se evaluó viabilidad y movilidad. Posteriormente 300 μl de cada medio se criopreservaron por vitrificación rápida en Nitrógeno Líquido (NL) al re-suspenderlas en dimetilsulfóxido al 10%, con glicerol al 12% y la combinación de ambos, por 30 días. Después del periodo de criopreservación, las células se desvitrificaron y se evaluó la viabilidad y movilidad. Los datos obtenidos se compararon con una MANOVA, donde observamos que existe una diferencia significativa en la movilidad espermática debido a que en el medio HTF hubo una tasa más alta de recuperación de espermatozoides móviles (23%) en contraste con el BPSE (19%).

Palabras clave. Criopreservación, *Coturnix coturnix*, crioprotectores, medios.

Introducción

El agua es esencial para la vida, ya que es indispensable para las funciones básicas de los seres vivos, por lo tanto, la falta o solidificación de esta pone en riesgo al organismo, sin embargo, en la preservación de células vivas a bajas temperaturas (criopreservación) es indispensable su eliminación ya que el material genético se mantiene por largos periodos de tiempo gracias a la congelación de las células. Pues si se congela el agua intracelular las muestras se dañan porque se forman cristales de hielo (Mazur 1984). La criopreservación es una técnica utilizada para la conservación de células o tejidos, no obstante, a pesar de que es de gran utilidad en la fertilización *in vitro* también suele causar ciertas alteraciones en las células tales como: daños estructurales en las membranas (plasmática, acrosómica y mitocondrial), lo que conduce a disminuciones en la viabilidad y la movilidad espermática que se traduce a un daño en la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Watson, 2000). Uno de los daños que pueden ser provocados en la membrana plasmática, puede deberse a la pérdida de colesterol y fosfolípidos, ya que estos ayudan con la flexibilidad de la membrana y la estabilidad (Dufourc, 2008 & Williams, 2013).

También las funciones dependientes de la energía se ven afectadas, como la movilidad espermática, ya que la criopreservación puede causar daños en la mitocondria o fragmentación en el ADN (Kurland y Andersson, 2000).

La criopreservación de semen también modifica el medio interno: dándose alteraciones en el balance iónico de sodio, zinc y calcio que se acumulan en el espacio intracelular, así como el potasio y magnesio que salen de la célula (Williams, 2013). Esto se debe a que las proteínas de la membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad con el descenso de temperatura. En el caso del citoesqueleto, afecta su función estabilizadora debido a la despolimerización y a la re-polimerización dependientes de la temperatura (Williams, 2013).

En la región acrosomal, tiene mucho que ver el tamaño del espermatozoide, ya que en las especies donde la cabeza del espermatozoide es de mayor tamaño se ve mayormente afectada como los espermatozoides de cerdo, contrario a las especies que cuentan con una cabeza pequeña y convexa (Williams, 2013).

Los ovocitos son células de gran tamaño que poseen un volumen mayor de agua intracelular, en contraste con los espermatozoides y la criopreservación de éstas células reproductivas es una técnica que puede ayudar en la producción y la conservación de recursos genéticos tanto en especies de importancia económica como en especies silvestres (Brisioli, 2006). Por lo que, en el procedimiento de la congelación es necesario dar tiempo al agua de salir de la célula y así evitar la formación de hielo, por el contrario la descongelación debe ser rápida para no dar tiempo a la recristalización durante la rehidratación, en cambio el espermatozoide posee poca agua y mucha membrana, característica que le ayuda a sobrevivir mejor a la criopreservación debido a que hay mucho “espacio” por donde el agua puede salir y los crioprotectores pueden entrar; además los cromosomas del espermatozoide están super enrollados, característica que les permite sobrevivir a potenciales daños que pueda sufrir el ADN (Macferlane,1987).

Dentro de las ventajas que nos ofrecen los espermatozoides para la criopreservación en contraste con los ovocitos están:

- La cantidad de espermatozoides.
- Son más simples (no poseen zona pelúcida u organelos corticales).
- El poco volumen de agua que posee.

Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas sobre su contraparte (el ovocito) no se ha podido superar el promedio de recuperación de la movilidad y supervivencia de este (50 -60%) (Bisioli, 2006).

La criopreservación ofrece muchas ventajas dentro de las cuales están:

- Conservación de animales que se encuentren en riesgo o en peligro de extinción y su reproducción en cautiverio.
- Reducción en costos de almacenamiento
- Reducción en transmisión de infecciones
- Intercambio genético a larga distancia
- En el caso de animales de granja, ofrece la preservación de razas o líneas de especial interés para asegurar la conservación en caso de epidemia, como en el caso de la fiebre aftosa que ataca cerdos, vacas, ovejas y cabras, o la gripe aviaria en gallos (Ramonez., 2013).

En la criopreservación las muestras celulares se mantienen en tanques con nitrógeno líquido y se pueden procesar por dos vías: congelación y vitrificación; en esta última se identifican la rápida y ultrarrápida. En la congelación, con ayuda de refrigeradores especiales la temperatura de las células o tejidos se baja paulatinamente, hasta alcanzar los $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, posterior a esto las muestras se guardan en los tanques de nitrógeno líquido (NL) que alcanza los -196°C (Ávila-portillo., *et al.* 2006; Pegg., 2007).

En la vitrificación rápida se usan los vapores del nitrógeno para la congelación de las muestras (fig.1)

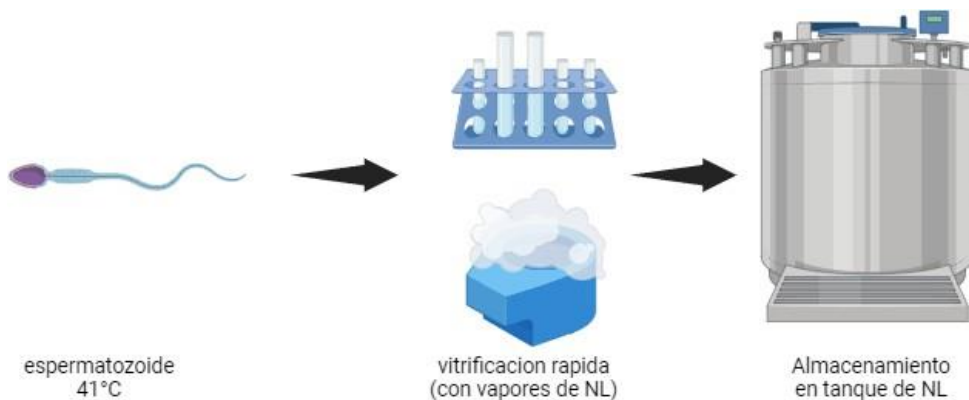


Figura 1. Esquema de la vitrificación rápida de espermatozoides (imagen creada con BioRender).

En la vitrificación ultrarrápida las muestras se sumergen directamente en el NL, con ayuda de una rejilla y una micropipeta, para ello, se van soltando gotas de la muestra hasta que estas se congelan completamente y forman perlas (fig.2).

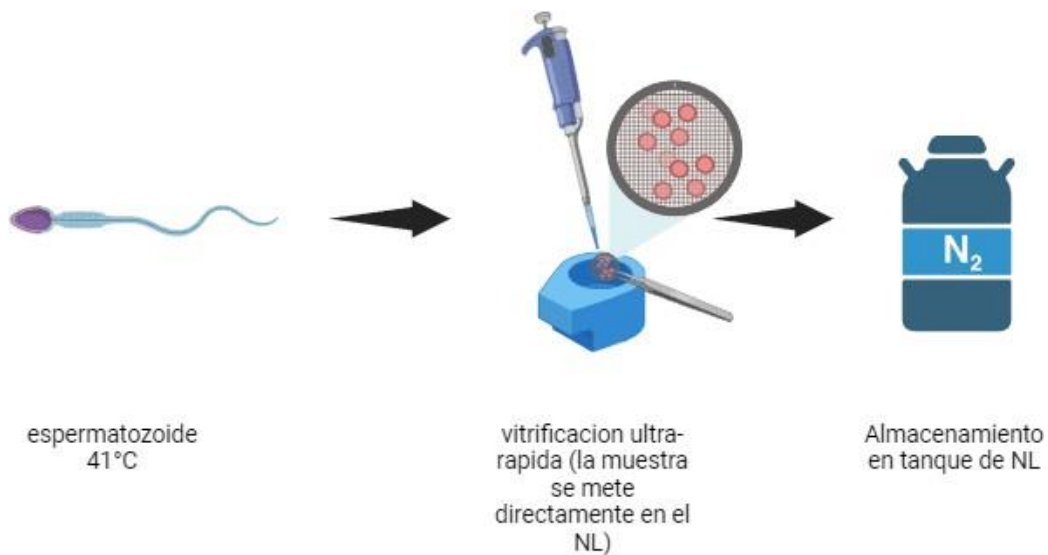


Figura 2. Esquema de la vitrificación ultrarrápida de espermatozoides (imagen creada con BioRender).

Las bajas temperaturas prolongan el tiempo de vida de las células debido a que ralentiza su metabolismo (Ávila - Portillo *et al.*, 2006). Sin embargo, es posible que provoque alteraciones en las estructuras celulares por la exposición de las células a temperaturas extremas, estas alteraciones pueden ser en la membrana celular, los organelos y en la interacción célula — célula (Woods *et al.*, 2004). Para evitar estos daños, se han utilizado diferentes sustancias que funcionan como crioprotectores; los cuales evitan la formación de hielo intracelular debido a que deshidratan a las células sustituyendo el agua intra o extracelular, además de los crioprotectores, también es necesaria la participación de soluciones que simulen las condiciones fisiológicas del organismo (Ávila — portillo *et al.*, 2006).

Los crioprotectores pueden dividirse en permeables y no permeables; los permeables presentan bajo peso molecular propiedad que les permite penetrar fácilmente a la célula, sustituyendo el agua intracelular por medio de la ósmosis, de esta forma se evita la formación de cristales de hielo, que son los responsables del daño que este pueda causar a las estructuras internas de la célula; sin embargo, algunos crioprotectores son densos por lo que disminuyen la movilidad espermática e incluso resultan tóxicos para las células (Medeiros *et al.*, 2002). Un ejemplo de esto es el dimetilsulfóxido (DMSO) que posee un efecto bifásico que depende de la concentración que se utilice, esto quiere decir que, a concentraciones más bajas, provoca un efecto de adelgazamiento de la membrana que facilita el flujo de agua; por otro lado en altas concentraciones el DMSO puede formar poros en la membrana, provocando la muerte de la célula (Ramirez & Luza., 1967). El glicerol es otro ejemplo de crioprotector permeable, es un alcohol de tres grupos hidroxilos, posee alta viscosidad y una masa molecular de 92.09 g/mol, es el crioprotector más usado en espermatozoides de gallos y pavos, ya que al ser eliminado antes de la fecundación da resultados favorables; sin embargo, tiene efectos anticonceptivos, ya que disminuye la movilidad espermática e irrita la mucosa vaginal (Hammerstedt & Graham 1992). El glicerol afecta la membrana del espermatozoide aumentando su fluidez y el metabolismo de la célula al provocar una hiperactividad prematura que disminuye la capacidad de fertilizar del espermatozoide.

Dentro de los crioprotectores permeables más usados están: el glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida y polivinilpirrolidona. (Hammerstedt & Graham 1992).

Por otro lado, los crioprotectores no permeables presentan un alto peso molecular que les imposibilita entrar a la célula, por lo tanto, actúan desde afuera de esta, cubriendo a la membrana, aumentando la viscosidad y presión osmótica para deshidratarla de manera rápida (Mac Gann, 1978). Los crioprotectores no permeables son principalmente azúcares como: trehalosa, sacarosa, dextrano, etc.

1.1 Material biológico

La codorniz (*Coturnix coturnix*) (figura 3) es un ave galliforme que pertenece a la familia *Phasianidae* (Linnaeus 1758).

Es de tamaño pequeño ya que posee una longitud de pico a cola de 17.5 cm y pesa aproximadamente 70 a 155 g es de color marrón con manchas blancas, su alimentación está basada en vegetales e invertebrados, posee una gran capacidad de adaptación que le ha permitido distribuirse a distintas regiones como Europa, África y América, siendo originarias de Japón y China (SEO/birdlife., 2018).

La codorniz alcanza la madurez sexual cuando cumple 6 semanas de vida, su temporada de apareamiento es durante los meses de mayo y agosto cuando la codorniz puede realizar de dos a tres puestas y poner entre 8 a 13 huevos. El proceso de incubación es de 17 a 20 días y los polluelos pueden valerse por sí mismos pocas horas después de la eclosión (SEO/birdlife., 2018).

Actualmente muchas granjas se dedican a la crianza de estas aves por su precocidad de puesta, crecimiento rápido, gran resistencia a enfermedades, fácil adaptabilidad y la calidad de los huevos, ya que son considerados una exquisitez culinaria, además la cáscara de los huevos de codorniz presenta alta resistencia durante el transporte, ya que la cantidad de huevos rotos es menor contrastado con los huevos de gallina, haciendo más fácil su distribución. (González - Sánchez, *et.al.* 2018). Entre las propiedades de los huevos tenemos:



Figura 3. Codorniz común (*Coturnixcoturnix*) fuente: flickr

- una cantidad baja de calorías
- cuenta con 64 miligramos de calcio
- cuenta con algunas vitaminas como la A y B

Por estas razones la codorniz común no se encuentra en la lista de especies amenazadas; sin embargo, la población silvestre ha disminuido a causa de la destrucción de su hábitat y a su caza (SEO/birdlife, 2018).

Pese a que son aves de fácil cuidado y rápida adaptabilidad, en las granjas, existen variables que pueden afectar la fertilización de los huevos, mencionando algunas: los machos por motivos de conducta propios de cada especie prefieren a ciertas hembras lo que causa huevos infértiles (Cecil & Bakst, 1990) e incluso la temperatura ambiental puede intervenir en la producción espermática (Atlas animal., 2022).

Por sus características y su fácil manejo estas aves son utilizadas como un modelo animal para experimentación en laboratorio; de modo que en este trabajo se utilizó como modelo para estudiar la criopreservación de espermatozoides en aves.

1.2 Aparato reproductor

El aparato reproductor de aves macho lo conforman: los testículos, los conductos deferentes y el órgano copulador o papila eréctil (Herrera, *et al.*, 2013). Los espermatozoides se ubican en los testículos, a su vez localizados, en el centro de la cavidad corporal, en el área dorsal cerca de los riñones, adyacentes a las glándulas adrenales y sostenidos por ligamentos de la superficie dorsal (Etches, 1996), debido a la ubicación de los testículos, los espermatozoides deben mantenerse a una temperatura de 42°C. Los espermatozoides de las aves a diferencia de los mamíferos son alargados, tienen una medida que va de los 80 a los 90 μm de largo y se identifican tres zonas: cabeza, pieza media y cola (figura 7)(Herrera *et al.*, 2005). La cabeza es curva y tiene un promedio de 12 a 13 μm de largo, el acrosoma que contiene enzimas necesarias para la fertilización y se encuentra en la punta de la cabeza presenta un tamaño de 2 μm de largo; la pieza media que cuenta con las mitocondrias tiene 4 μm de largo y la cola tiene una longitud aproximada de 80 μm y alrededor de 0.5 μm de ancho (Long, 2006).

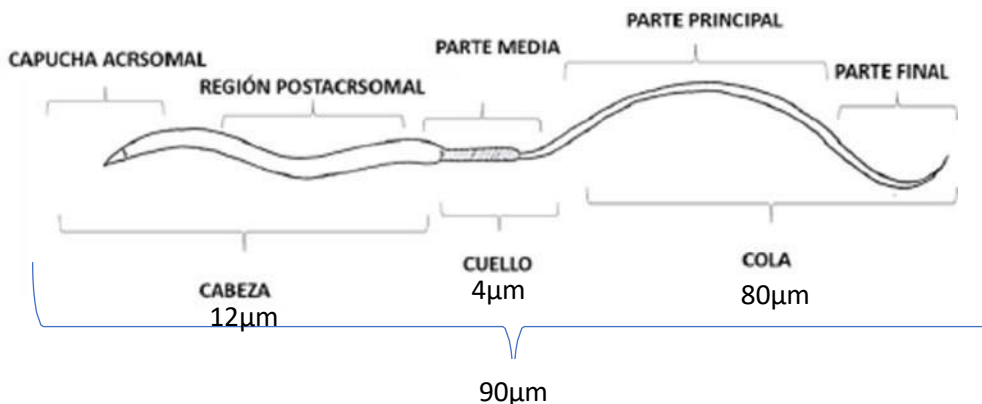


Figura 4. Dibujo que muestra la morfología del espermatozoide de las aves. (Huitrón, 2019)

Cuando la temporada de cópula comienza los espermatozoides pasan por los conductos deferentes hasta el aparato reproductor femenino y es ahí donde

terminan su maduración, esta consiste en una serie de cambios que ayudan a la fecundación de los óvulos, dentro de los cambios están (Olivera, *et al.*, 2016):

- Movimiento del flagelo: el movimiento debe ser simétrico para un desplazamiento progresivo.
- Capacitación: potencial de un espermatozoide a hiperactivarse (cambio en su movimiento) y lograr la reacción acrosomal.
 - o Reacción acrosomal: es un proceso donde las membranas (citoplasmática y acrosomal externa) se fusionan para dar paso a la liberación de enzimas fundamentales para que el espermatozoide pueda atravesar la zona pelúcida (Olivera *et al* 2006).

1.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual las espermatogonias se diferencian y dan lugar a espermatozoides, existen 3 etapas:

- Fase espermatogonial. - la espermatogonia se divide por medio de la mitosis y se transforma en espermatozocito I
- Fase espermatocitaria. - aquí ocurren dos divisiones meióticas donde el espermatozocito I cambia a espermatozocito II y posteriormente a espermátida
- Fase espermiogénica. - en esta fase ocurre la diferenciación, ya no hay divisiones celulares (Figura 8) (Simon, 2003)

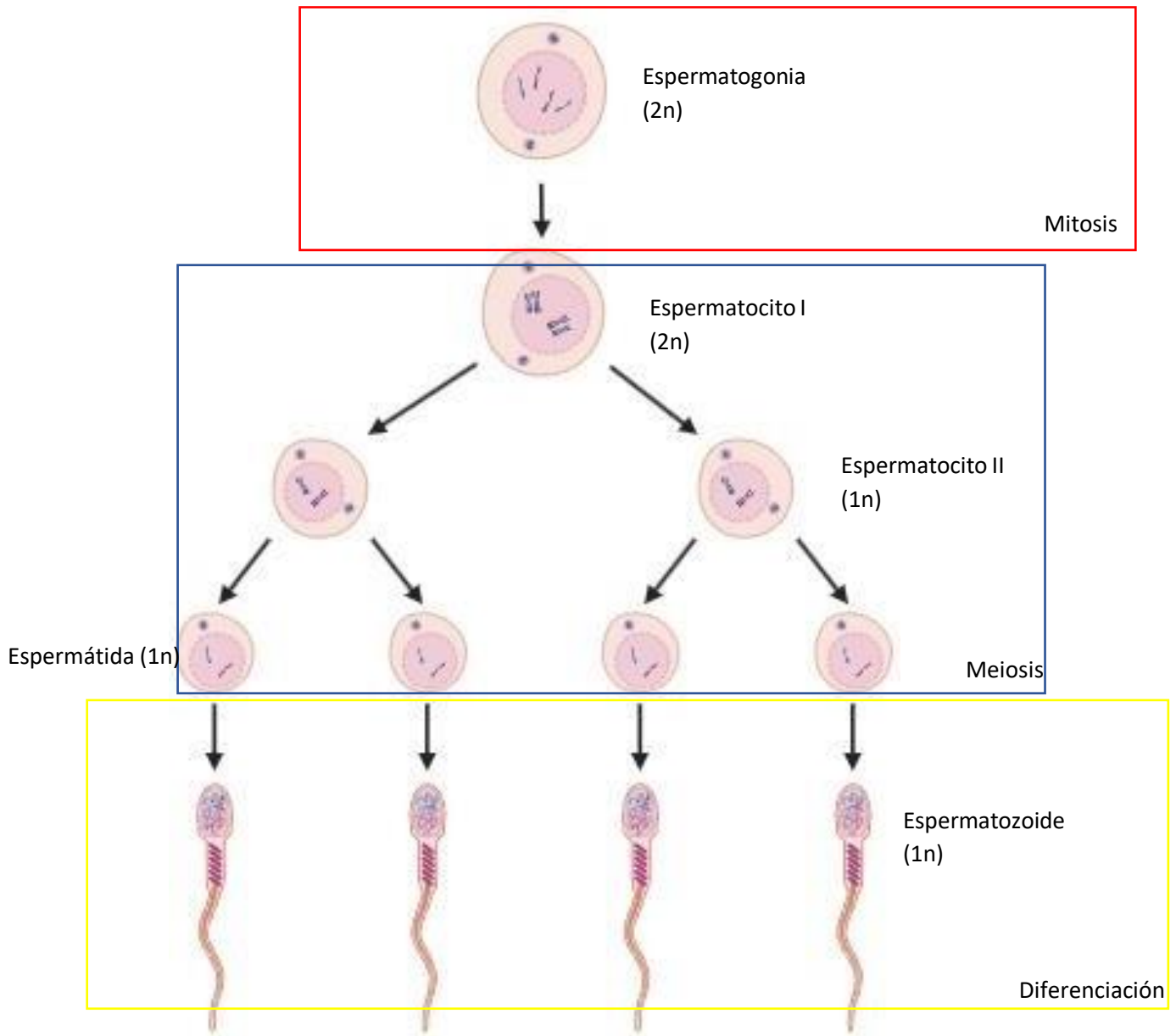


Figura 5. Esquema de la espermatogénesis. (imagen creada con BioRender)

ANTECEDENTES

El primer reporte de congelación de semen fue en 1776 por Spallanzani, él observó por primera vez la movilidad de espermatozoides humanos después de someterlos a temperaturas bajas, en 1866 Mantegazza congeló semen humano que sobrevivió a este proceso, por lo que él propuso los bancos de semen congelado, pero fue hasta 1949 que Polje descubrió de manera accidental el uso del glicerol como crioprotector (Natarajamani, 2017). A pesar de que los espermatozoides fueron los primeros tipos de células criopreservadas (Ávila- portillo *et al.*, 2006), se sigue intentando mejorarla debido a su baja sobrevivencia después de la descongelación.

Posteriormente, en 1978 Lake y Stewart utilizaron glicerol para proteger a las células y los resultados obtenidos fueron favorables, de esta manera Lake y Stewart se convirtieron en los primeros en criopreservar semen de gallo con éxito.

La concentración que se utiliza de crioprotector es un factor importante en el resultado que obtendremos, ya que, al ser un agente externo, los crioprotectores tienen cierto grado de toxicidad en las células germinales. Dentro de los crioprotectores permeables más utilizados en gallos destacan: el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA) (Asano, & Tajima, 2017). Sin embargo, con el glicerol se han obtenido porcentajes más altos de recuperación de movilidad después de la criopreservación; no obstante, la concentración utilizada es un factor importante ya que si se utiliza una concentración mayor a 0.163 M causa un efecto anticonceptivo, otro contratiempo es que si los espermatozoides se utilizan para fecundar, el glicerol debe eliminarse antes de utilizar los espermatozoides, ya que crea irritación en el tracto vaginal, además al ser una solución muy viscosa dificulta a los espermatozoides su movilidad a través del tracto femenino. Otros crioprotectores como DMSO y DMA generan menores porcentajes de fertilidad después de criopreservar a los espermatozoides; sin embargo, muchos autores

prefieren utilizar estos crioprotectores en lugar del glicerol por los contratiempos que provoca (Lake *et al.*, 1981).

Una ventaja que la criopreservación brinda es la disponibilidad y el fácil manejo de las muestras seminales y el mantenimiento en líneas de aves de interés comercial ya sea por la calidad de los huevos o la cantidad de carne; sin embargo, la especie más estudiada ha sido el gallo doméstico y los protocolos que se utilizan en esta ave son utilizados en otras especies, incluidas las silvestres y aves de corral, lo cual es un error ya que la membrana espermática presenta distintas proporciones de sus componentes dependiendo de la especie, esto hace que la permeabilidad de la membrana sea distinta (Long, 2006; Celeghini *et al.*, 2007).

El gallo es el modelo biológico que más se ha utilizado en la criopreservación ya que ofrece ciertas ventajas, como: su fácil acceso, debido a que no se encuentra en peligro de extinción, la cantidad de semen que produce y el tiempo durante el que se puede almacenar sin tener que criopreservar (24h) (Donoghe & Wishart, 2000). Otra ave de corral que se utiliza en trabajos de criopreservación es el pavo, en donde se ha reportado semen almacenado hasta por 6 hr en refrigeración (Donoghe & Wishart, 2000). Sin embargo, las tasas de fertilización y de movilidad de semen criopreservados son considerablemente menores en pavos comparado con gallos, ya que los espermatozoides de pavo son más sensibles a los cambios de temperatura (Blanco *et al.*, 2000) y la constitución de la membrana plasmática entre ambas especies es distinta, esto provoca que se utilicen técnicas de congelación/descongelación distintas dependiendo de las especies (Long *et al.*, 2006), esto también se observa dentro de la misma especie pero en distintas líneas, ya que hay razas de gallos en las que la tasa de recuperación de viabilidad de semen es mayor que otras después de la criopreservación, como en el caso de gallos de la raza gallina valenciana de chulilla donde la recuperación de espermatozoides fue de 81% con glicerol (al 11%) y 40% con DMA (al 5.1%) (Blanch *et al.*, 2014) y en el caso de gallos de la raza gallina murciana la viabilidad fue de 63% con glicerol (al 10.83%) (Duchi *et al.*, 2009). En la gallina de guinea (*Numida meleagris*), los porcentajes de recuperación de espermatozoides, utilizando 6% de

dimetilformamida (DMF), después de la congelación fueron del 20% (Singneurin & Blesbois, 2006). En gallos domésticos (*Gallus gallus domesticus*) la recuperación de espermatozoides es de 95%, con DMSO (3%) contrastando con los porcentajes de movilidad que fueron muy bajos (36%) (Herrera *et al.*, 2005).

En los espermatozoides de patos la recuperación es muy variable dependiendo de la especie, ejemplo de esto son los espermatozoides de patos de Moscovia que son más resistentes al congelamiento que los de patos de Pekín. Otro trabajo realizado donde se compararon diversos crioprotectores, se obtuvieron porcentajes más altos de movilidad con el glicerol al 8% donde el porcentaje fue de 68%, con el DMSO al 10% el porcentaje de movilidad fue de 73%, en el caso de DMA al 10% el porcentaje de recuperación fue de 61% y con DMF al 8% el porcentaje de recuperación de movilidad fue de 58%, los cuales son porcentajes considerablemente altos considerando que el porcentaje de recuperación de espermatozoides móviles recién obtenidos fue de 80% (Han *et al.*, 2005).

En pavos, se realizó un trabajo donde se compararon diversos diluyentes, que fueron BPSE, IMV (instruments for veterinary medicine) y MTGA (Minnesota turkey growers association) adicionado con gentamicina, donde el BPSE fue el medio donde se recuperó un mayor número de espermatozoides móviles (49%) en contraste con los otros medios 35% IVM y 33% MTGA (Sexton, 1988).

Con el crioprotector permeable dimetilacetamida (DMA) se han realizado varios experimentos, uno de ellos fue con el 6% de concentración; sin embargo, la recuperación de viabilidad espermática fue baja (38%) (Lemoine *et al.*, 2011). Un trabajo con resultados similares se realizó con el 8% de DMA donde el porcentaje de viabilidad fue de 41% (Cerolini *et al.*, 2009), por otro lado, los porcentajes más altos reportados fueron con el 10% de DMSO y el 11% de glicerol donde la viabilidad fue de 53% y 84% respectivamente (Iaffaldano *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2014).

En gaviotas (*Larinae sp*) las tasas de fertilización con semen congelado son mayores al 60%, porcentaje similar en gallos, esto contrasta con los

pavos donde la tasa de huevos fecundados es aproximadamente del 30% (Lukaszewicz., 2001).

En faisán (*Phasianus colchicus*), halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*) y gallo (*Gallus domesticus*) se observó la motilidad espermática pos-criopreservación, cuando se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) y polivinilpirrolidona (PVP) y como medio Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE), en faisán (*P.colchicus*) la motilidad fue del 82% en espermatozoides recién obtenidos la cual disminuyó a 42% y 34% (DMSO y PVP), en el halcón cola roja (*B. jamaicensis*) la movilidad en espermatozoides recién obtenidos fue de 67% y post criopreservación de 34% y 39% (DMSO,PVP) en el gallo los espermatozoides recién obtenidos mostraron una motilidad promedio de 84% y post criopreservación de 36% con ambos crioprotectores (Herrera *et al.*, 2005).

En el 2016, Cruz utilizó DMSO y glicerol como crioprotector y sometió el semen del halcón de Harris a vapores de nitrógeno para el congelamiento del semen, observando que la movilidad de espermatozoides no era significativamente diferente entre el DMSO (16.8 %) y glicerol (20%); por el contrario, sí encontró diferencia significativa en el número de espermatozoides vivos de 58.1% de DMSO en contraste con el glicerol de 73.6%.

En el caso de halcón peregrino (Cardoso *et al.*, 2020) la movilidad pos-criopreservación fue de 14% con DMSO y 4% con DMA, por otro lado, en la viabilidad espermática se obtuvo el 21% con el 8% de DMA.

Otro factor importante en la congelación de las muestras de semen además de los crioprotectores son los diluyentes, de los cuales se han utilizado distintos con el fin de mantener la viabilidad y la movilidad de los espermatozoides en aves.

La finalidad de estos es semejar el medio fisiológico interno de las aves lo más posible, proveer energía y fungir como agente quelante, estos no deben deteriorarse al almacenarse y evitar el crecimiento bacteriano (Bootwalla & Miles, 1992). Los componentes principales son fosfatos, citratos y moléculas orgánicas como BES (N,N-bis(2hidroxiethyl)- 2aminoetano de ácido sulfónico) o TES (N-

(hidroxiethyl)metil-2-aminoetano de ácido sulfónico) que ayudan a mantener el pH, ya que un pH ácido reduce la movilidad espermática mientras que uno alcalino reduce la fertilidad. También debe de contar con ácido glutámico, que es un componente importante que ayuda a regular la presión osmótica en el semen (Bootwalla & Miles, 1992).

El BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender) es un diluyente que se creó especialmente para espermatozoides de aves domésticas ya que está diseñado de acuerdo con las características metabólicas de estas aves. Por otro lado, está el medio Lake del que se han obtenido mejores resultados para almacenamiento en fresco (Herrera 2017).

Herrera *et al.*, (2017) realizaron un trabajo donde compararon BPSE y Lake, utilizaron como modelo biológico al halcón de Harris (*Parabuteo unicinctus*) y dimetilsulfóxido 64.1M como crioprotector. Concluyendo que con BPSE se obtienen mejores porcentajes de recuperación de espermatozoides móviles después de la criopreservación, ya que se recuperó un 37.9% de movilidad en comparación con el medio Lake donde la recuperación de movilidad fue de 30.9%; sin embargo, para la conservación en fresco el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor en el medio Lake 68.4% en contraste con la movilidad espermática del BPSE 63%. Otro punto destacable de este trabajo es que la recuperación de espermatozoides móviles disminuyó un 50% después de la congelación. En la viabilidad, los autores notaron que no hubo diferencia significativa entre ninguno de los dos diluyentes post-criopreservación (semén recién obtenido; BPSE, 98%, Lake 96%, semén criopreservado BPSE, 95%, Lake 94%).

Santiago-Moreno *et al.*, (2019) trabajaron con semen de dos especies de pingüino (pingüinos de patas negras y pingüinos papúas) y compararon la viabilidad espermática post-criopreservación y semen recién recolectado, como diluyente utilizaron un medio a base de glutamato-polivinilpirrolidona y como crioprotector utilizaron 8% de glicerol. Santiago-Moreno *et al.*, (2019). Observaron que con el pingüino de patas negras obtuvieron un mayor porcentaje de viabilidad (71%) y

Movilidad (58%) con espermatozoides recién obtenidos, en contraste con el papúa donde la viabilidad fue de 69% y la movilidad de 48% demostrando que no existe diferencia significativa entre las dos especies; sin embargo cuando descongeló utilizó dos temperaturas distintas 5 y 37°C y observaron que la descongelación a 5°C es recomendada para pingüinos de patas negras y en el caso de pingüino papúa no hubo diferencia significativa entre 5 o 37°C, a pesar de esto, el pingüino de patas negras resultó ser más sensible al proceso de congelación/descongelación. Esto podría explicarse a partir del tamaño de la cabeza del espermatozoide, ya que este influye en la respuesta a la criopreservación debido a la cantidad de agua que la célula contiene, un ejemplo es el pingüino rey donde el área de la cabeza del espermatozoide es de 19.7 μm y de los pingüinos papúa es de 18.2 μm (Santiago-Moreno *et al.*, 2016). En el pingüino de patas negras no se ha determinado el tamaño de la cabeza del espermatozoide, pero en otras especies como: gallo doméstico el espermatozoide es de tamaño pequeño 14 μm , en pavo 11 μm en codorniz japonesa 21 μm y algunas rapaces como águila dorada ohalcón peregrino 7 μm (Santiago-moreno *et al.*, 2016)

Otro factor importante que puede modificar los resultados es la técnica que se utiliza para la congelación/descongelación, debido a que son los puntos críticos de la criopreservación, la entrada o la salida del agua intracelular para evitar la formación de los cristales de hielo. Blanco (2000) realizó un estudio con distintas especies de aves donde comparó distintas cantidades de un crioprotector permeable (DMA) y dos técnicas distintas de criopreservación que fueron la vitrificación ultrarrápida, donde sumergió la muestra directamente en NL y la congelación donde fue disminuyendo la temperatura paulatinamente de 1°C por minuto hasta llegar a los -20°C posteriormente fue disminuyendo 2°C por minuto hasta llegar a los -70°C y después de esto sumergió la muestra en NL. En los resultados pudo observar que los porcentajes de viabilidad espermática fue muy distinta entre especies, ya que las muestras reaccionaban de manera diferente dependiendo de la cantidad de crioprotector y la técnica que se utilizó (congelación/vitrificación). Por ejemplo, en especies como el gallo la viabilidad fue del 48% y en águila imperial 72% estos

Porcentajes se dieron con la vitrificación ultrarrápida y la concentración del crioprotector fue de 2.06 y 2.70 respectivamente. En el pavo (36%), halcón peregrino (50%), águila dorada (59%) y águila de Bonelli (70%) la viabilidad espermática reaccionó mejor al congelamiento y se utilizó 2.06M en la mayoría de las especies, solamente en el águila de Bonelli se utilizó 0.68M de DMA.

Dados los antecedentes de criopreservación de espermatozoides de aves se puede decir que todas las especies reaccionan de manera distinta, por lo tanto, es necesario analizar cada especie por separado para poder ver los porcentajes de recuperación de espermatozoides post-congelación al usar diferentes medios de incubación y el uso de distintos crioprotectores.

JUSTIFICACIÓN

La criopreservación es una herramienta que a través de la congelación permite el mantenimiento adecuado de los espermatozoides por un tiempo prolongado, sin que se vea afectada su viabilidad, por lo tanto, constituye una herramienta para la conservación de distintas especies o el mantenimiento de líneas de interés económico, así como el manejo de muestras seminales a bajos costos en zonas donde el acceso es difícil.

La criopreservación es perjudicial para los espermatozoides, altera su morfología, lo que podría causar su muerte. Por lo tanto, se requieren técnicas para cada especie y poder así conservar la integridad de los espermatozoides, sin embargo, la evaluación de los indicadores como la viabilidad y la movilidad ayudan a predecir que tanto éxito tendrá un espermatozoide en la fertilización de un huevo.

Los crioprotectores más utilizados y confiables son glicerol y DMSO. Sin embargo, estos estudios se han enfocado en aves de corral como gallos y pavos y en otras especies silvestres como águilas, los resultados no han sido tan favorables como en gallos; por lo tanto es necesario buscar distintos medios y crioprotectores que contribuyan a la metodología de criopreservación y permitan un mayor éxito reproductivo.

El uso de aves domésticas como modelos, permite optimizar y mejorar esta técnica que podría ayudar en la producción y crianza de las aves de importancia económica y a su vez el protocolo establecido puede ser aplicado en especies como aves en peligro de extinción.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿De qué método para la criopreservación de los espermatozoides de *Coturnix coturnix* se obtendrá una tasa de recuperación más alta de viabilidad y movilidad si se emplean los crioprotectores permeables, dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol o la combinación de ambos (DMSO + glicerol) aunado a los medios de incubación HTF y BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender) después de la criopreservación?

HIPÓTESIS

El medio de incubación BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender), en conjunto con los crioprotectores permeables, darán una tasa de recuperación más alta en la viabilidad y la movilidad espermática, en contraste con el medio de incubación HTF, después de la vitrificación de las muestras de espermatozoides de *Coturnix coturnix*

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de los crioprotectores DMSO, glicerol y DMSO + glicerol, así como los distintos medios de cultivo, HTF y BPSE sobre la viabilidad y la movilidad de los espermatozoides de *Coturnix coturnix*, después de su criopreservación.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar el efecto del uso de los medios de incubación BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender) y HTF para la conservación de la movilidad y viabilidad de los espermatozoides de *Coturnix coturnix*.

Determinar la tasa de recuperación de espermatozoides móviles y viables con el uso de glicerol al 12% como crioprotector de los espermatozoides de *Coturnix coturnix*.

Analizar la tasa de recuperación de la movilidad y viabilidad de los espermatozoides de *Coturnix coturnix* criopreservados con el uso de dimetilsulfóxido al 10% como crioprotector.

Cuantificar el número de espermatozoides viables y móviles con el uso de dos medios de incubación (BPSE, HTF) y los diferentes crioprotectores en el proceso de desvitrificación.

METODOLOGÍA

1.1 Diseño

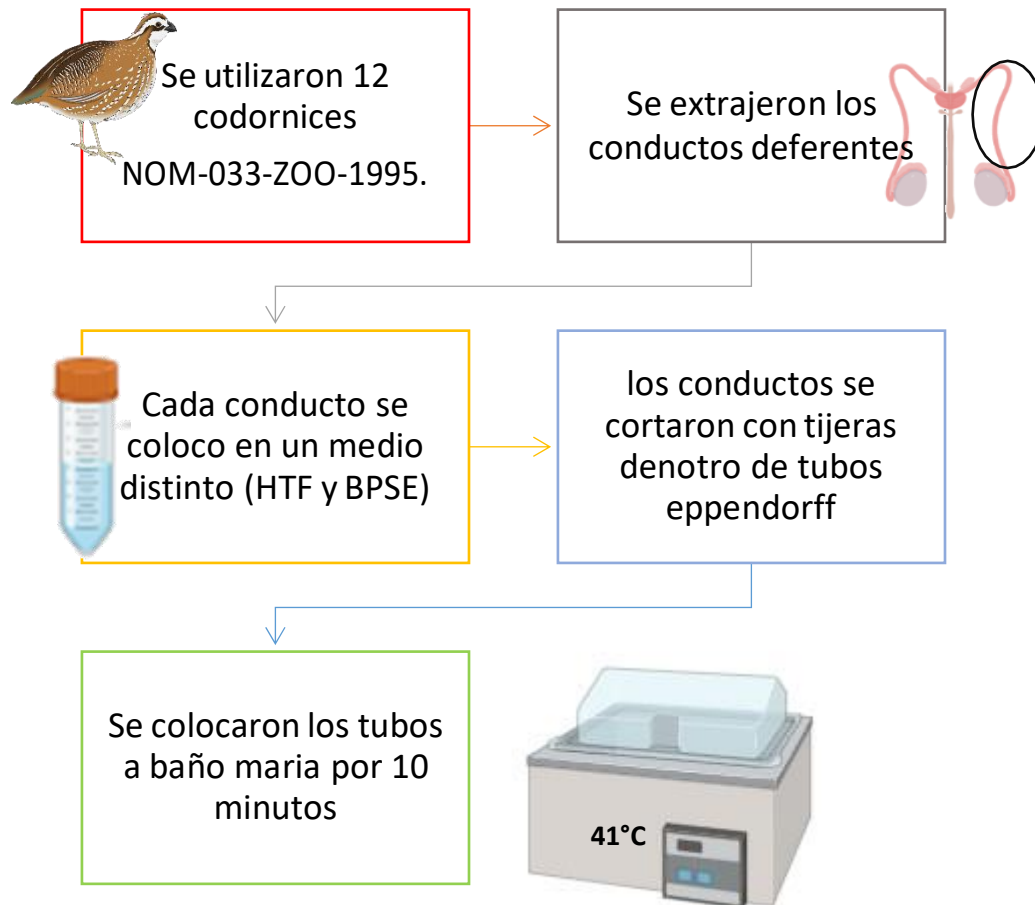


Figura 6. Esquema de la metodología

A los espermatozoides en suspensión se les realizó un análisis de semen, utilizando la metodología de la OMS (2021) para semen humano, donde se determinó:

MOVILIDAD

La movilidad progresiva y total. Para ello se tomó una muestra de 10 μ l del tubo eppendorf y se observó al microscopio óptico con un objetivo a 40x.

Se procedió a hacer un conteo de al menos 200 espermatozoides y se determinó el porcentaje en las siguientes categorías:

- A. Movilidad progresiva: espermatozoides que se mueven rápida y linealmente.

- B. Movilidad de grado 2: espermatozoides que se desplazan, pero de forma más lenta
- C. Movilidad no progresiva: ausencia de progresión
- D. Inmóviles: espermatozoides que no presenta ningún movimiento

La movilidad total se expresa en porcentaje y es la suma de la movilidad A más la movilidad B.

VIABILIDAD

La viabilidad proporciona información sobre el porcentaje de espermatozoides vivos. Para su determinación y evaluar la integridad de la membrana, las células, se someten a la solución kit EspermaVit

®. Vitalidad (FertiMexico, S.A de C.V.). Para hacer la prueba de la viabilidad se coloca la misma cantidad de colorante (25 μ l y de la muestra 25 μ l) en un tubo eppendorf y se mezcla homogéneamente posteriormente se toma una muestra de 10 μ l, se coloca en un portaobjetos para ser analizados al microscopio óptico bajo un objetivo de 40x y hacer un conteo de al menos 200 espermatozoides entre teñidos (muertos) y no teñidos (vivos).

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

Para la determinación del número de células se utilizó la cámara de Neubauer, se realizó una dilución de semen y el conteo se realizó en la cuadrícula de glóbulos rojos de la misma cámara con un aumento de 40x bajo un microscopio óptico.

PRESENCIA DE OTRAS CÉLULAS

Se analizó una preparación de 10 μ l de la muestra bajo un microscopio óptico para observar si se encuentra otro tipo de células, por ejemplo, células del epitelio, espermatozoides o leucocitos.

1.2 CRIOPRESERVACIÓN

Para la criopreservación por vitrificación rápida, cada conducto deferente se colocó en 1 ml de cada uno de los siguientes medios: BPSE y HTF, los cuales se describen en la tabla 1 y se procedió a seccionar los conductos con la finalidad de que salgan los espermatozoides, posterior a esto los medios se diluyeron en una proporción de 1:2 con cada uno de los siguientes crioprotectores,

- a) glicerol 12% +DMSO 10%
- b) glicerol al 12%
- c) DMSO 10%

Después se tomaron muestras de 350 μ l que se introdujeron en crioviales previamente rotulados y se colocaron sobre varillas suspendidas dentro del tanque de NL durante 10 minutos para que el vapor congelara las muestras y posteriormente se metieron por completo al tanque.

Tabla 1 BPSE y HTF

BPSE		HTF	
Fructuosa	0.027M	NaCl	101.60mM
Citrato de potasio	0.0019M	KCl	4.70mM
Fosfato dipotásico	0.072M	MgSO4	0.20mM
Acetato de sodio	0.031M	KH2PO4	0.37mM
Fosfato mono potásico	0.0047M	CaCl2 2H2O	2.04mM
Cloruro de magnesio	0.0027M	NaHCO3	25mM
Tris (hidroximetil) aminometano	0.016M	Glucosa	2.78mM
		Piruvato de sodio	0.33mM
		Lactato de sodio	21.40mM
		Penicilina-G	100 UI/ml
		Estreptomicina-SO4	50mg/ml

Tabla 1. contenido del medio BPSE y el medio HTF con las concentraciones de cada reactivo.

1.3 DESVITRIFICACIÓN

Tras un mes de almacenamiento se retiraron los crio-viales del tanque de nitrógeno líquido. En cada vial se adicionó el mismo volumen de medio y se colocó en baño María a 41°C por 2 minutos, posteriormente se realizó una preparación de 10 µl de los espermatozoides desvitrificados y determinó la movilidad, para la viabilidad se utilizó la solución del kit EspermaVit el cual tiñe a los espermatozoides que tienen la membrana dañada, lo que quiere decir que ya están muertos (figura 8), se realizó un conteo de 200 espermatozoides en distintos campos a 40x en el microscopio óptico.

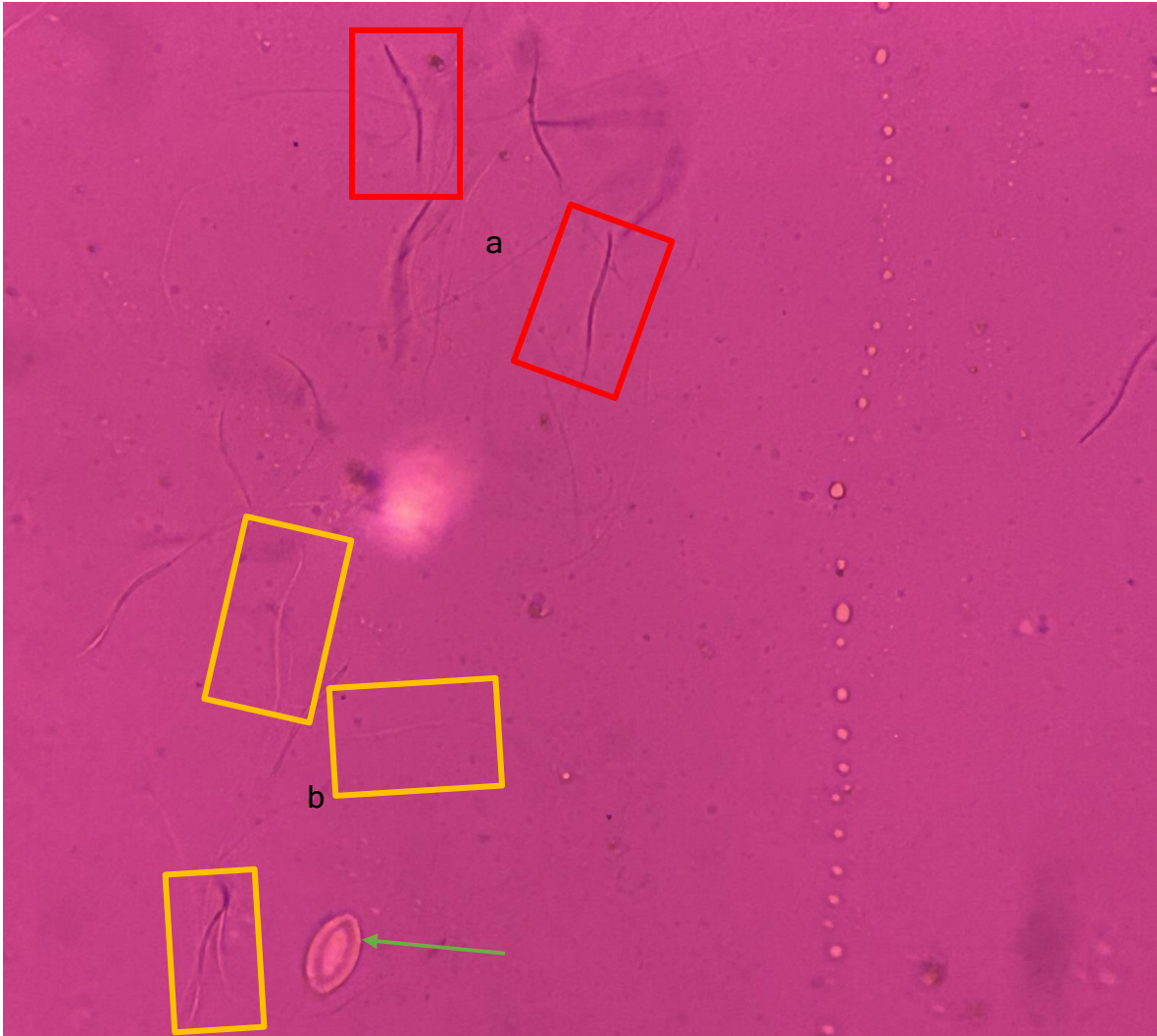


Figura 7. Micro-imágenes en microscopia de campo claro a 40x de: a) espermatozoides de *Coturnix coturnix* que presenta tinción, lo que indica que están muertos (cuadros rojos). b). Espermatozoides que no presenta daño en la membrana por lo tanto no presentan tinción (cuadros amarillos) y célula de eritrocitos (flecha verde)

1.4 Análisis estadístico

Los porcentajes de viabilidad y movilidad de los espermatozoides de *Coturnix coturnix* se analizaron con la prueba de MANOVA. Posteriormente, los datos significativos ($p \leq 0.05$) se analizaron con una ANOVA de una vía, todos los análisis se realizaron con el programa estadístico NCSS¹⁰ DATA ANALYSIS.

RESULTADOS

1.1 Experimentos previos

Para hacer este trabajo se realizaron distintas pruebas para determinar la metodología para la criopreservación de espermatozoides, en un principio se trabajó con un macho de *Parabuteo unicintus* y para la metodología las muestras se centrifugaron a 1,100 rpm durante 10 minutos para lavar las células. Sin embargo, estas se dañaron (figura 9) por lo que la centrifugación se eliminó. No obstante, aún después de omitir la centrifugación de las muestras no se obtuvieron resultados favorables ya que después de descongelarlas observamos que las células se disolvían (figura 10), por tal motivo probamos los diluyentes y los crioprotectores en otro espécimen para determinar que estas no eran las que dañaban las muestras y utilizamos un gallo doméstico (*Gallus gallus domesticus*) y al analizar las pruebas notamos que estas no presentaban ningún problema morfológico por lo tanto se determinó que los crioprotectores y los medios no eran los responsables de dañar las muestras de semen del *Parabuteo unicintus*,

Se realizaron experimentos con otro medio que fue el LAKE que también ha sido utilizado en la criopreservación de semen de aves, sin embargo, no encontramos resultados favorables este diluyente por tal motivo se eliminaron y buscamos un medio que tuviera más similitud fisiológica con las aves, por esta razón elegimos el HTF (Human Tube Fluid).

Por lo tanto en los estudios del semen, dichas variables son analizadas para determinar si se pueden utilizar en una inseminación artificial, un ejemplo de esto son los trabajos con semen crio-preservado, ya que su almacenamiento a bajas temperaturas y transporte ha ayudado al sector ganadero y avícola en la disminución de costos al permitir el intercambio de material genético a larga distancia o a granjas con dificultad de acceso, las muestras pueden usarse durante un periodo de tiempo largo (el tiempo de almacenamiento de una muestra) y se puede realizar un control genético y sanitario antes de ser usado.

Para este estudio se determinó que el mejor prospecto de investigación era *Coturnix coturnix* (codorniz común), debido al tamaño pequeño, a su fácil acceso.

Sin embargo, cuando iniciamos la criopreservación de los espermatozoides de este modelo animal, empleamos la técnica de congelamiento donde mantuvimos a 8 minutos en un refrigerador a 4 °C posteriormente lo metimos a otro a -5°C y por último sumergimos las muestras en NL. Cuando descongelamos las muestras estaban destruidas, lo que sugirió que la membrana plasmática de los espermatozoides de la codorniz común no soportaba la congelación, por lo tanto comenzamos con la vitrificación rápida (someter a las muestras a vapores de NL) y la descongelación rápida (sumergir las muestras a baño maría a 41°C por 2 minutos) (figura 11).

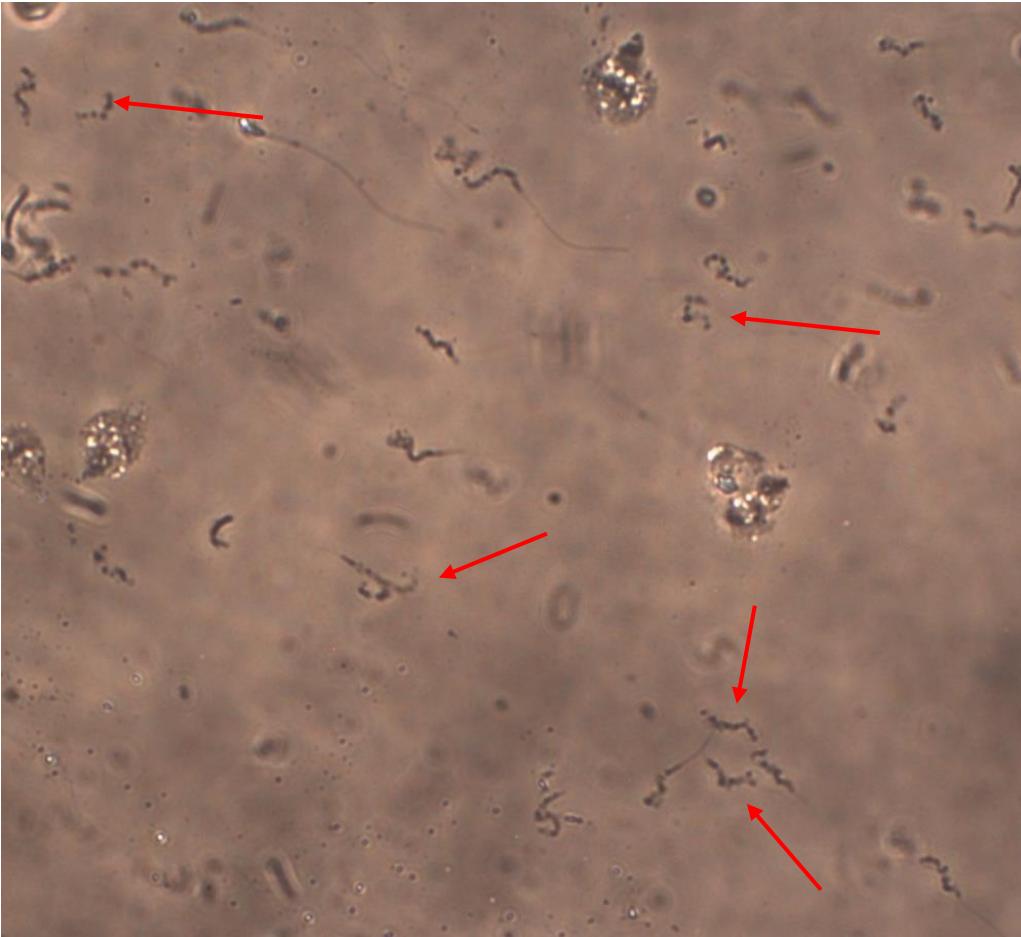


Figura 8. Espermatozoide de *Parabuteo Unicinctus* en medio BPSE, visto en microscopio óptico a 40x, dañado después de la centrifugación, ya no presentaban movimiento.

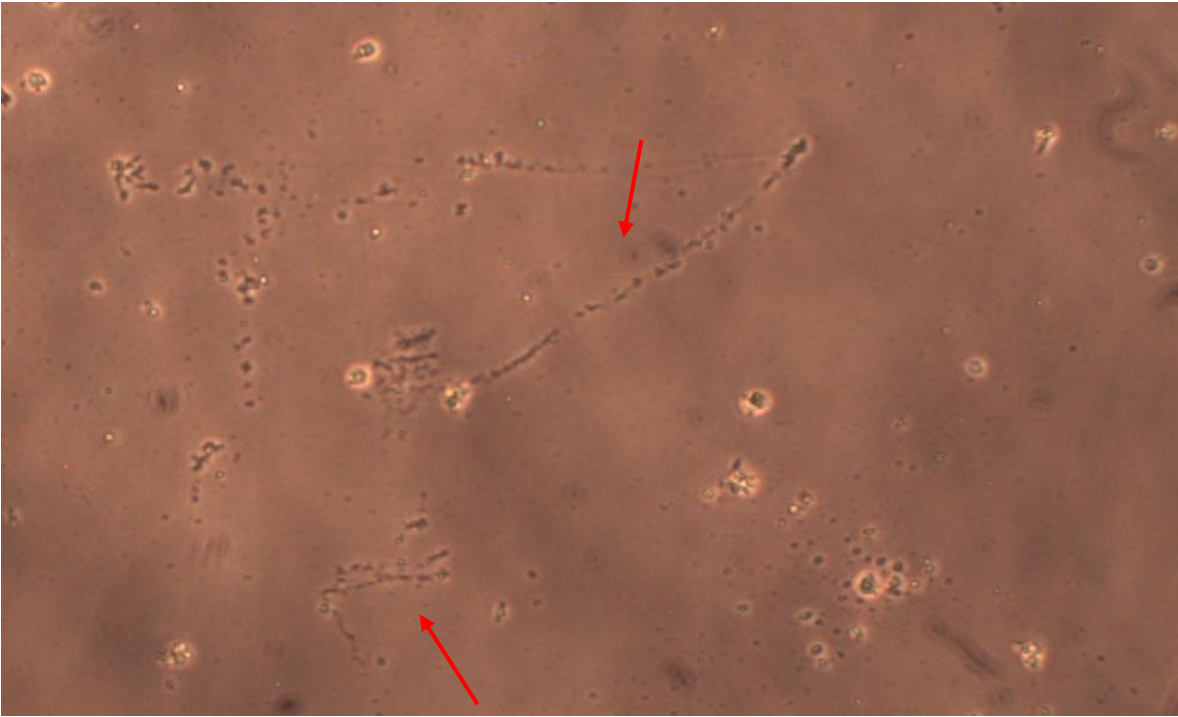


Figura 9. Espermatozoide de *Parabuteo unicintus*, dañado después de la criopreservación. Observados al microscopio óptico a 40x en medio BPSE con la combinación de crioprotectores.



Figura 10. Microfotografía en contraste de fases de espermatozoides en buen estado de *Coturnix coturnix* en medio HTF con glicerol como crioprotector después de la congelación, estos presentaban buena movilidad. En fechas rojas están señalados algunos eritrocitos que contaminaron la muestra.

1.2 Resultados de codorniz

Al analizar las muestras de espermatozoides de *Coturnix coturnix* recién obtenidas se obtuvo un promedio de concentración espermática de $2.1 \pm 0.2 \times 10^8$, el promedio de la movilidad con BPSE fue de $40 \pm 5\%$ y con HTF $39 \pm 14\%$, la viabilidad con BPSE fue de $53 \pm 5\%$ y con HTF fue del $50 \pm 14\%$. En la tabla 2 se puede observar que los valores de los dos parámetros medidos disminuyeron después de la criopreservación.

Tabla 2. Viabilidad y movilidad en espermatozoides recién obtenidos (control) y después de la vitrificación.

CRIPROTECTORES				
Variable (%)	CONTROL	GLICEROL	GLICEROL + DMSO	DMSO
MOVILIDAD BPSE	40 ± 16 (12)	9 ± 5 (12)	14 ± 6 (12)	10 ± 6 (12)
MOVILIDAD HTF	39 ± 14 (11)	14 ± 8 (11)	21 ± 12 (11)	13 ± 7 (11)
VIABILIDAD BPSE	53 ± 13 (12)	23 ± 14 (12)	31 ± 14 (12)	30 ± 17 (12)
VIABILIDAD HTF	56 ± 14 (11)	28 ± 17 (11)	35 ± 17 (11)	29 ± 15 (11)

Tabla 2. Porcentajes de espermatozoides antes y después de la criopreservación, se presentan los promedios \pm la desviación estándar de cada variable y con los distintos crioprotectores.

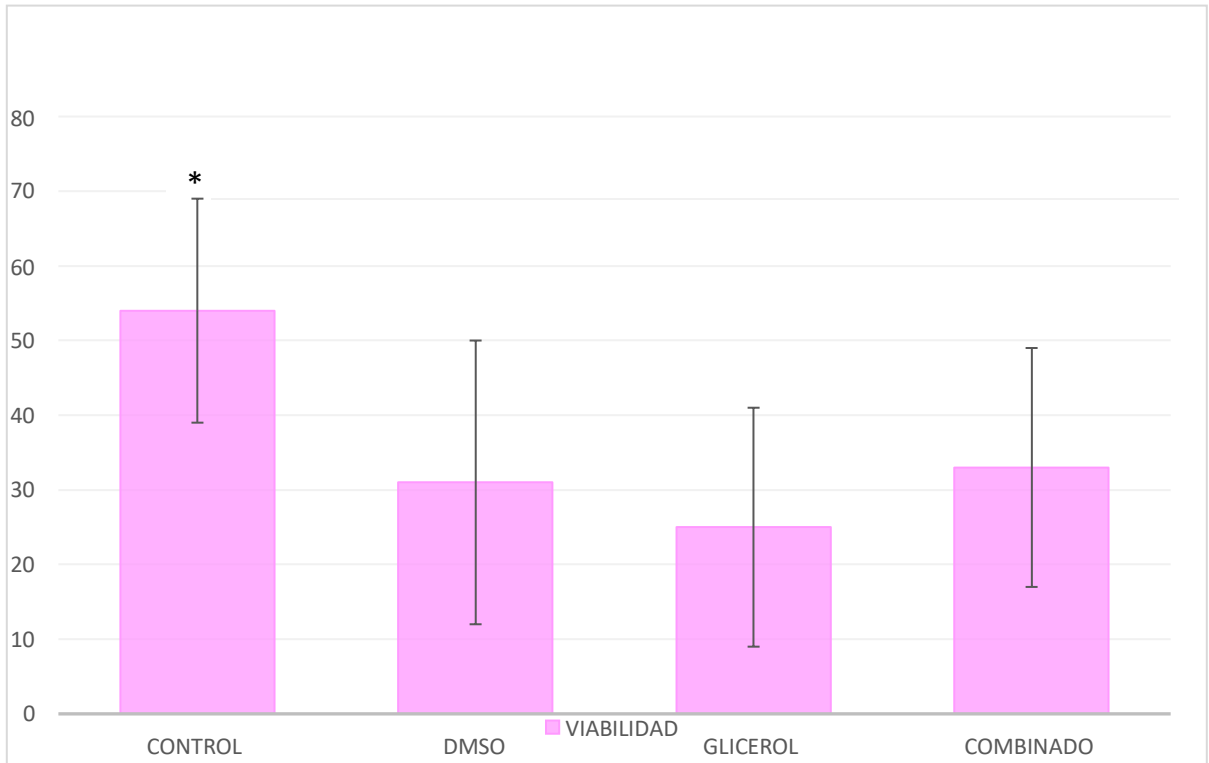
1.3 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis multivariado de varianza (MANOVA) para determinar si es que existía una relación entre todas las variables de respuesta. Una vez comprobada la relación se procedió a hacer un análisis de varianza de una vía (ANOVA), para establecer la diferencia entre las variables de respuesta (prueba de Fisher) para determinar las medias entre los espermatozoides recién obtenidos crioprotectores y los diluyentes.

1.4 Comparación de viabilidad espermática recién obtenido y post- criopreservación.

El porcentaje de espermatozoides viables, recién obtenidos contra los espermatozoides post- criopreservación se muestran en la gráfica 1, donde los valores indican que los crioprotectores afectaron significativamente la viabilidad de los espermatozoides ($P < 0.05$), Sin embargo, los resultados no mostraron una diferencia significativa entre los medios HTF (37%) y BPSE (34%), por lo tanto, se puede decir que los medios no afectaron los resultados de la viabilidad espermática, en el caso de los crioprotectores que fueron glicerol (12%), DMSO (10%) y la combinación de estos. Los resultados fueron significativamente diferentes ya que resultó que son significativamente diferentes, la diferencia radica en la comparación de las muestras de espermatozoides control (54%) y después de congelar pues los porcentajes de viabilidad tras la criopreservación fueron considerablemente menores a los del control, siendo el grupo con los crioprotectores combinados el más alto (33%) y el glicerol donde se obtuvieron porcentajes más bajos (25%).

GRÁFICA 1. Comparación entre el grupo control y los tratamientos con los dos distintos diluyentes.



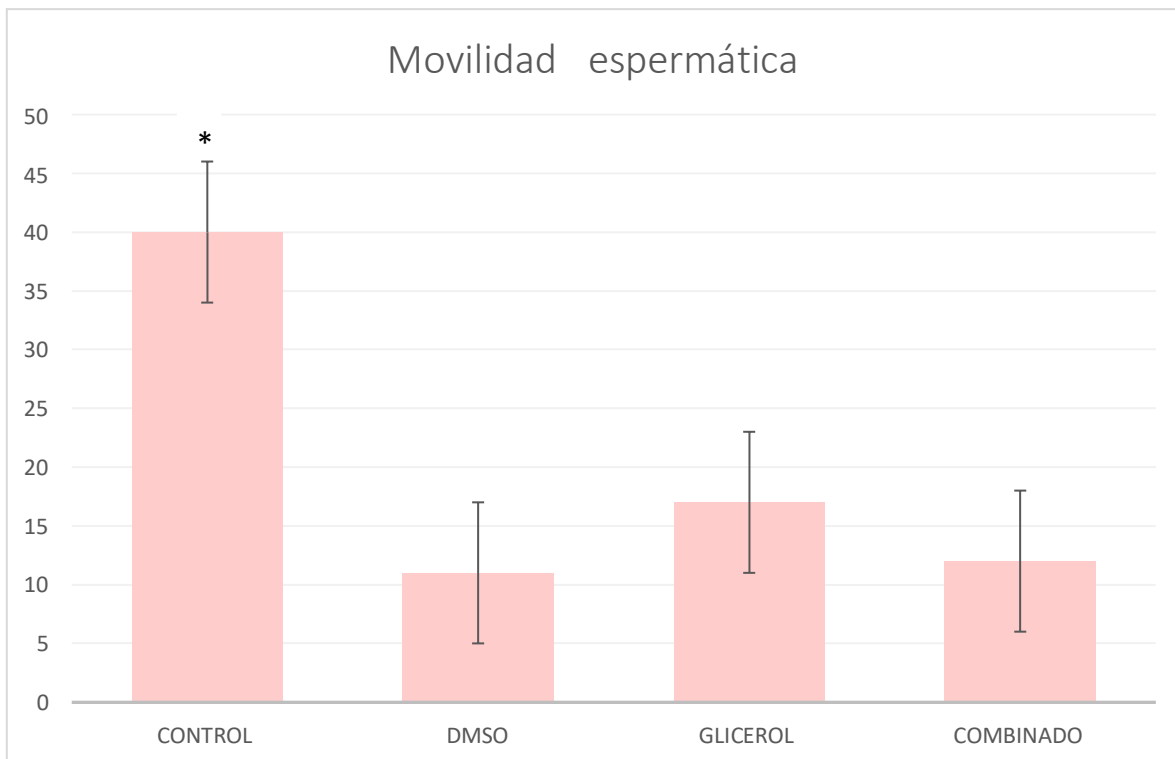
Gráfica 1. MANOVA para los porcentajes obtenidos de viabilidad espermática de codorniz común, aquí se indica que el grupo control es significativamente diferente ($p < 0.05$) a los demás grupos que tenían el tratamiento con los crioprotectores.

1.5 Comparación de movilidad espermática en el control y después de laciopreservación.

Para la movilidad espermática total, se midió la movilidad progresiva (A) + la progresiva no rápida (B) y la no progresiva (C) a una temperatura de 42°C en el microscopio óptico a 40x, después de la comparación de medias entre las muestras recién obtenidas y después de la vitrificación, no se mostraron diferencias

significativas entre los crioprotectores. Sin embargo, hubo una reducción después de la congelación de muestras, arrojando una diferencia de medias ($P < 0.05$), donde la movilidad de espermatozoides recién obtenidos fue de $40 \pm 13\%$ y post-criopreservación de $21 \pm 7\%$, también pudo verse que entre los crioprotectores el que dio mejores resultados fue el glicerol ($17 \pm 8\%$) y el más bajo fue el DMSO ($11 \pm 6\%$) (gráfica 2).

Gráfica 2. Comparación de los resultados de la movilidad espermática en muestras recién obtenidos y después de vitrificar con los distintos tratamientos

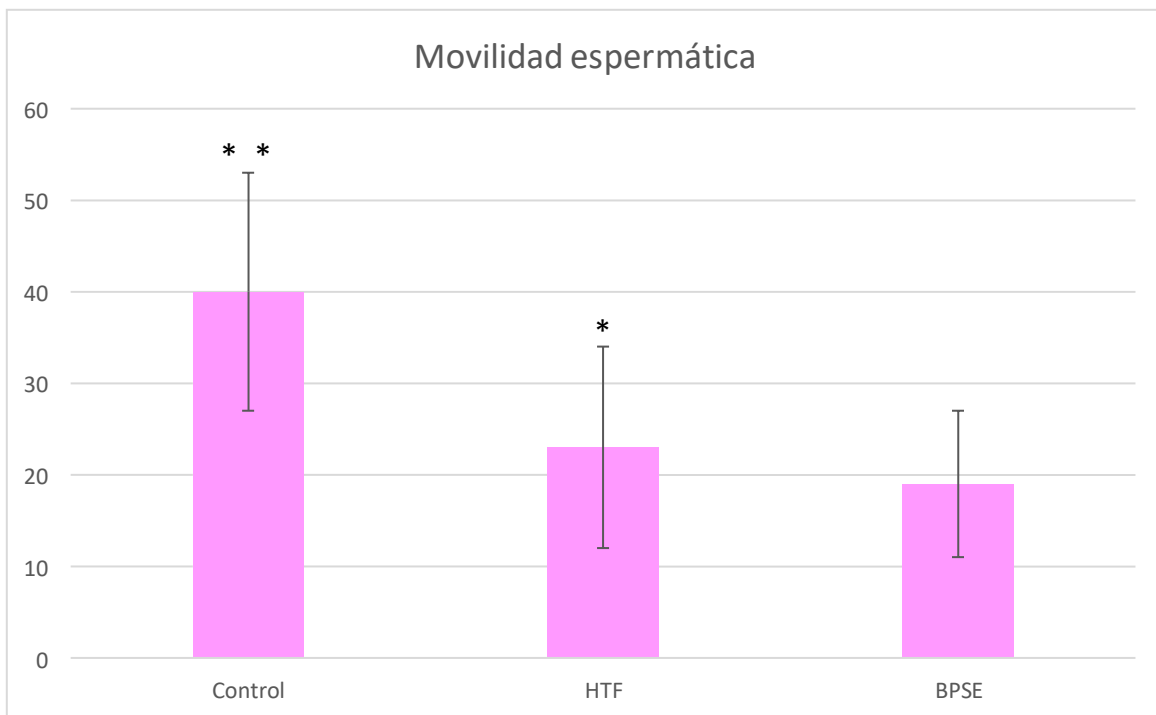


Gráfica 1. Análisis multivariado que muestra los porcentajes de movilidad total de los espermatozoides, obtenidos antes y después de la criopreservación de *Coturnix coturnix*. Donde puede verse una diferencia significativa entre el grupo control y las muestras que fueron criopreservadas ($P < 0.05$)

Además de la diferencia, entre los resultados obtenidos con los crioprotectores, de la MANOVA se obtuvo una diferencia significativa entre los diluyentes BPSE y HTF, mostrando que había una diferencia en la movilidad espermática entre los

Medios ya que el HTF ($23 \pm 11\%$) daba mejores resultados con respecto al BPSE ($19 \pm 8\%$) a pesar de que este último es un medio pensado para la congelación de espermatozoides de aves (gráfica 3).

GRÁFICA 3. Resultados entre los medios BPSE y HTF en la movilidad espermática.



Gráfica 3. Comparación de graficas que muestra la recuperación de la movilidad espermática con los dos distintos diluyentes HTF y BPSE y el grupo control, donde puede apreciarse que HTF es significativamente diferente a BPSE ($P < 0.05$), sin embargo, la movilidad espermática disminuyó después de la criopreservación.

Discusión

Aunque la criopreservación permite conservar potencialmente fértiles a los espermatozoides, suelen ocurrir alteraciones en su movilidad y viabilidad (Stornelli, et al., 2005). En espermatozoides de gallos de la raza gallina valenciana se reportó una movilidad del 90% que se redujo a 68% con 8% de glicerol tras la criopreservación (Blanch, 2014); con el gallo doméstico el porcentaje de recuperación de semen recién obtenido de 81% se redujo a 52% con DMSO al 3% y 31% con polivinilpirrolidona al 6% tras la congelación; en faisán la movilidad en espermatozoides recién obtenidos de 84% disminuyó al 40% con DMSO y 37% con PVP y en halcón cola roja del 67% cambió a 34% con DMSO y 39% con PVP (Herrera *et al.*, 2005); similar a dicho comportamiento en el presente trabajo, los resultados sobre la viabilidad de espermatozoides de *Coturnix coturnix* en el grupo control (antes de congelar) fueron de $54 \pm 15\%$ y de $40 \pm 13\%$ para la movilidad, los cuales disminuyeron a 30% y a 15%, respectivamente después de ser congelados.

Respecto a la viabilidad espermática, independientemente del crioprotector empleado, también se ha reportado su reducción tras someter los espermatozoides a la congelación durante la criopreservación, aunque su reducción no es significativa, contrario de la movilidad del semen de aves la cual disminuye hasta un 50% (Herrera et al., 2016; Froman, 2013). De modo que en semen de gallo recién obtenido se han reportado porcentajes de viabilidad de 94% que cambian a 85% con DMSO y de 89% con PVP, en el semen recién obtenido de faisán porcentajes de 93% que disminuyeron a 83% con DMSO y 90% con PVP y en halcón cola roja la viabilidad inicial de 89% cambió a 82% con DMSO y 83% con PVP. Coincidiendo con este trabajo la viabilidad se redujo a 25% con glicerol, 31 % con el DMSO y 33% al combinarlos.

La diferencia de espermatozoides móviles y viables entre las especies después de los procesos de criopreservación, puede deberse a la distinta sensibilidad de los

Espermatozoides propia de cada especie y determinada genéticamente, que involucra características como la estructura de la membrana, su composición lipídica y proteica, su actividad enzimática, entre otras (Stornelli, et al., 2005). A su vez, la reducción de ambos parámetros es una respuesta que se presenta generalmente en todas las especies como resultado de la exposición de los espermatozoides a los compuestos empleados para criopreservar y los procesos que conlleva la criopreservación; mencionando algunos están los cambios de volumen que sufren por la deshidratación e hidratación, el estrés osmótico provocado por los crioprotectores que modifican la proporción de agua líquida y de electrolitos al interior de las células, la posible toxicidad que pudieran ocasionar los crioprotectores, el estrés oxidativo o daños en las estructuras celulares ocasionados por la congelación-descongelación, la formación de hielo intracelular y demás eventos (Partyka, Łukaszewicz, & Niżański, 2012).

Respecto a los medios crioprotectores, en algunas razas de gallo se han reportado porcentajes de movilidad y viabilidad más elevados con BPSE en lugar de Lake (Herrera *et al.*, 2016), con *Parabuteus unicintus* los valores más altos se obtuvieron con glicerol en comparación con DMSO (Cuauhtémoc-cruz, 2016) y en espermatozoides de grulla de arena y pavo, águilas, halcón y gallo (Blanco, 2012) tratadas con varias concentraciones de dimetilacetamida (DMA) se observó que los efectos del crioprotector varía dependiendo de la especie, en el caso de la grulla, águila dorada y águila imperial las concentraciones más altas de DMA ayudaron a la recuperación de una tasa mayor de espermatozoides vivos, contrario a pavo, gallo y águila de Bonelli donde las dosis más altas disminuyeron el porcentaje de espermatozoides vivos, esto podría deberse a que al aumentar la concentración de los crioprotectores también aumenta la osmolaridad que produce un shock osmótico, produciendo daño en los espermatozoides (Blanco,2012). Mientras que en este trabajo se observó que la viabilidad y la movilidad espermática de codorniz común disminuye de manera considerable después de la criopreservación; sin embargo, la movilidad tuvo un porcentaje mayor con el medio HTF en comparación con BPSE, además los resultados más altos se obtuvieron con glicerol. En el caso de la viabilidad fue lo contrario ya que el glicerol fue donde se

Obtuvieron porcentajes más bajos (25%) en contra del DMSO (31%) y los combinados (33%) y con el medio Lake debido a los daños estructurales observados, se eliminaron los resultados obtenidos.

Coincidiendo con lo mencionado por Janosikova, *et al.*, (2023), el éxito de los diferentes medios, además de estar influenciado por la distinta composición y fluidez de la membrana de los espermatozoides, es determinado también por las condiciones físicas y químicas generadas por la naturaleza misma de los medios de dilución; de modo que los procedimientos para la criopreservación no pueden ser generalizados, sino que es preferible desarrollar protocolos particulares para las distintas especies. Por ejemplo, los daños provocados por el medio Lake podrían deberse 1) a que está desarrollado para emplearse en semen de humanos o mamíferos, de modo que este medio es enriquecido simulando las condiciones del medio fisiológico humano para que no se dañen los espermatozoides del mismo y

2) a las diferencias entre los espermatozoides de aves y mamíferos, pues en aves: la membrana contiene mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, menos colesterol y menor fluidez; las cabezas espermáticas tienen un volumen citoplasmático menor y almacenan menor cantidad de crioprotector; la cola espermática generalmente suele ser más larga lo que podría explicar su mayor sensibilidad en los procesos de criopreservación (Long, 2006; Çiftci, & Aygün, 2018; Janosikova, *et al.*, 2023). Y en el caso del glicerol, aunque suele tener un efecto tóxico para los espermatozoides, se considera como uno de los crioprotectores más adecuados para aves porque su toxicidad es menor que otros crioprotectores y su permeabilidad es más alta (Abouelezz, Sayed, & Santiago-Moreno, 2017).

Los espermatozoides de aves suelen ser más sensibles al estrés osmótico y a los procesos de la criopreservación en comparación con los espermatozoides de mamíferos (Meyers, 2005). Incluso entre especies de aves las características de los espermatozoides varían, lo cual se hace evidente al comparar los resultados obtenidos con las pruebas iniciales con los espermatozoides de aguilillas de Harris cuyos porcentajes de recuperación fueron muy bajos, o al analizar los reportes del ave rapaz *Gyps fulvus* cuya tolerancia a la congelación y la descongelación permite

a los espermatozoides permanecer viables *in vitro* durante 4 horas (Madeddu, 2009); contrario a la respuesta observada en los espermatozoides analizados en este trabajo que dejaron de ser funcionales (movilidad) al transcurrir 15 minutos después de la descongelación (Partyka & Nizanski, 2022 Janosikova, *et al.*, 2023), este comportamiento puede deberse a que las especies responden diferente al proceso de criopreservación debido a varios factores tales como: 1) la concentración de lípidos - proteínas de la membrana espermática de cada especie pues menos lípidos hacen más fluida la membrana y tolerante al frío, 2) variaciones en la morfología espermática (tales como la longitud de la cola, la región del cuello y la cabeza) que influyen en su sensibilidad al frío y capacidad para almacenar el medio crioprotector y 3) las diferencias en las técnicas y medios crioprotectores usados.

Asimismo, contrario a Cardoso (2020) que indica que el tiempo y la temperatura de descongelación de las muestras no influye en la movilidad; en el presente trabajo hallamos que las tasas de recuperación de espermatozoides móviles de *Coturnix coturnix* disminuyeron a temperaturas menores de 40°C, similar a lo reportado con el pingüino (*Pygoscelis papua*) donde la temperatura de descongelación fue de 37°C y 5°C y el porcentaje de recuperación de espermatozoides móviles fue de 23% y 20% respectivamente (Santiago-Moreno, 2019) y con el pingüino de patas negras, donde la temperatura si afectó la movilidad, recuperando 7% y 19% respectivamente. Las diferencias aquí presentadas, pueden deberse a que en el proceso de congelación del semen, frecuentemente se generan productos dañinos como compuestos reactivos de oxígeno, los cuales actúan en los grupos metileno de los fosfolípidos y los ácidos grasos altamente poliinsaturados que suelen integrar a la membrana plasmática, lo que provoca la degradación de los lípidos y en consecuencia la reducción de la viabilidad y movilidad de los espermatozoides, que en especies cuya membrana plasmática contenga mayor proporción de colesterol y ácidos grasos, tenderán a ser bajos estos parámetros (Appiah, *et al.*, 2020).

Cardoso (2020) utiliza como modelo el halcón peregrino e indica que para obtener un porcentaje de recuperación espermático bueno se debe tener especial atención

en el procedimiento de congelación (vitrificación rápida, ultrarrápida o congelación) y el tipo de crioprotector que, a utilizar, reportó que con la congelación lenta se obtienen altas tasas en movilidad y viabilidad espermática en comparación con la vitrificación ultrarrápida. Coincidiendo con los reportes de Blanco (2000) quien trabajó con espermatozoides del pavo y la grulla de arena, los trató con distintas concentraciones del crioprotector permeable dimetilacetamida y utilizó la congelación, vitrificación rápida y ultrarrápida de semen, hallando que la congelación rápida destruye la membrana espermática en todas las concentraciones de DMA. Posteriormente, comparó la vitrificación ultra rápida y congelación con espermatozoides del águila, gallo, pavo y halcón peregrino y observó que la viabilidad espermática variaba dependiendo de la especie, la vitrificación ultra rápida dio mejores resultados en gallos y en águila imperial, por el contrario, en el águila de Bonelli y halcón peregrino la membrana espermática se dañó (Blanco, 2012). Dichos resultados difieren con los hallados en el presente trabajo, pues al realizar la congelación lenta de espermatozoides de codorniz común, estos se dañaron y no se obtuvieron resultados; mientras que en otras especies Cardoso (2020) reporta que existen mejores resultados cuando los espermatozoides se preservaron por congelación lenta en comparación con los sometidos a tasas de enfriamiento rápido. Este comportamiento puede deberse a la anchura de la región hidrofóbica en la membrana, por ejemplo especies como el halcón peregrino o pavo tienen una baja permeabilidad al agua y cuentan con regiones hidrofóbicas muy delgadas en su membrana, dando como resultado mayor resistencia a temperatura ambiente; por otro lado, si la célula cuenta con regiones hidrofóbicas más anchas en el proceso de enfriamiento rápido, la célula no es capaz de perder suficiente agua intracelular de manera rápida, por lo tanto el citoplasma puede congelarse, dando como resultado un daño permanente a la célula por la formación de cristales de agua (Avila-portillo 2006).

Cuauhtémoc-Cruz (2016) reporta valores de viabilidad espermática de 58.1% post-criopreservación con DMSO y 73.6% con glicerol en *Parabuteo unicinctus*, contrastando con los datos obtenidos en este trabajo, 32% DMSO y 23% glicerol con BPSE, 29% DMSO y 28% glicerol con HTF (Váradi 2013) quien obtuvo una

recuperación de 28.6% en gallinas de guinea, igualmente Blesbois & Seigneurin (2006) obtuvo porcentajes de recuperación de espermatozoides viables de gallo de 32%, de pavo de un 13% y gallina de guinea de 25%. Esto podría deberse a la flexibilidad de la membrana espermática, la variación en la proporción entre el colesterol y los fosfolípidos entre las diferentes especies o a sus conductas sexuales, ya que aves como el gallo se reproducen con varias hembras durante el periodo de apareamiento por lo que es necesario eyacular de manera continua y las hembras pueden poner decenas de huevos, aunado a esto el periodo reproductivo es significativamente mayor (primavera a verano), contrario a otras aves silvestres, donde el tiempo reproductivo es corto (en el caso de codorniz común el tiempo va de mayo a agosto) y en algunos casos son monógamas, la diferencia de estos comportamientos ocasiona que la producción de esperma sea menor (Gilbert, 1996). Estas características son vistas fácilmente en los eyaculados, pues sus concentraciones son diferentes. Esto también puede repercutir en el metabolismo ya que las especies que tienen una menor concentración de eyaculados necesitan una actividad metabólica mayor, habiendo un desgaste energético más rápido en comparación con especies que tengan un mayor volumen de eyaculados (Gilbert 1996).

En mamíferos son numerosos los protocolos que aseguran la obtención exitosa de espermatozoides móviles y viables; sin embargo, sobre las aves la estandarización de protocolos eficaces para la criopreservación de espermatozoides aún es escasa. Por ello es indispensable ahondar en el estudio de la composición de la membrana celular y la morfología de espermatozoides de aves y sobre todo profundizar en el análisis de métodos y técnicas que involucren distintos crioprotectores y medios endiferentes especies, pues como se demuestra en este trabajo y en trabajos anteriores, los resultados obtenidos son muy distintos entre sí.

Conclusiones

La movilidad espermática de codorniz común es susceptible a los cambios de temperatura, ya que estos se inmovilizaban aun antes del tratamiento si la temperatura es $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

El medio HTF favoreció a una mejor recuperación de la movilidad de los espermatozoides (23%) que el medio BPSE (19%).

Los crioprotectores ayudaron a la recuperación de espermatozoides móviles y viables, sin embargo, debido a las tasas bajas es necesario desarrollar metodologías eficientes para cada especie.

La hipótesis que se propuso se acepta ya que los crioprotectores si ayudaron a mantener la viabilidad y la movilidad espermática.

Recomendaciones

Es necesaria la investigación en otras especies de aves, así como otros crioprotectores, técnicas para congelar y descongelar y determinar si los espermatozoides preservan la capacidad fertilizante. La criopreservación puede ser de gran ayuda en la conservación de especies que se encuentran en peligro de extinción, con la creación de bancos de semen.

Bibliografía

Atlas Animal | Licenciado en Biología. (2022, July 6). ▷ *Codorniz " Características, Alimentación, Hábitat, Reproducción, depredadores.* Atlas Animal. <https://atlasanimal.com/codorniz/#:~:text=Los%20huevos%20de%20codorniz%20son%2C%20en%20t%C3%A9rminos%20generales%2C,permanecen%20con%20sus%20padres%20hasta%20el%20primer%20verano.>

Asano, A., Tajima, A. (2017). Development and Preservation of Avian Sperm in T. Sasanami (ed.), *Avian Reproduction. Advances in Experimental Medicine and Biology* vol 1001. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 214: 59-73. DOI https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_4

Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J., Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), pp.291-300.

Bisioli, C. (2006). Criobiología de gametos. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*, 13(2), 23-33

Bootwalla, S.M., & Miles, R.D. (1992). Development of diluents for domestic fowl semen. *Worlds Poultry Science Journal*, 48, 121-128.

Boeta, M., Quintero, L. (2000). Utilización de leche descremada ultra pasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Revista veterinaria de México*. 31(1); 67-69.

Blanch, E., Tomás, C., Casares, L., Gómez, E. A., Sansano, S., Giménez, I., Mocé, E. (2014). Development of methods for cryopreservation of rooster sperm from the endangered breed "Gallina Valenciana de chulilla" using low glycerol concentrations. *Theriogenology*, 81(9), 1174-1180. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.019>

Blanco, J.M., Gee, G., wildt, D.E., 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.

Blanco, J.M., Long, J.A., Gee, G.F., Wildt, D.E., & Donoghue, A.M. (2012). Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: effects of freezing and thawing rates on turkey and sandhill crane sperm cryosurvival. *Animal reproduction science*, 131 1-2, 1-8 .

Cardoso, B., Sánchez-Ajofrín, I., Castaño, C., García-Álvarez, O., Estes, M. C., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Garde, J. J., Santiago-Moreno, J., Soler, A. J. (2020). Optimization of sperm cryopreservation protocol for peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Animals*, 10(4), 691. <https://doi.org/10.3390/ani10040691>

Cecil, H.C., & Bakst, M.R. (1990). Effect of the presence of hens on the semen production of male breeder turkeys. *Poultry science*, 69 6, 1003-5 .

Ceroini S., Zaniboni L., Mangiagalli M.G., Cassinelli C., Marzoni M., Castillo A., Romboli I., Rosato M.P., Iaffaldano N. (2009). Sperm cryopreservation by the pellet method in chickens, turkeys and pheasants: a comparative study. *Avian. Biol. Res.*, 1: 1758-1559.

SEO/BirdLife. 2023, February 28). *Codorniz Común*. <https://seo.org/ave/codorniz-comun/>

Cruz, C. (2016). Indicadores de capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides criopreservados con dimetilsulfóxido o glicerol de Halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*). (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, CDMX.

Duchi, N., Poto, A., Peinado-Begoña R., Almela- Veracruz, L. (2009). Estudios preliminares sobre la influencia del tipo de descongelación en el semen de gallo murciano. *Archivos de Zootecnia (España) Num.1 Vol.58. Calidad seminal, Crioconservación.*

Dufourc, E.J. (2008). Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol* 1, 63-77 <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6>

Donoghue, A. M., Wishart, G. J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 213-232. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00160-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00160-3)

Etches, R. (1996). The male, *Reproduction in poultry*. Edited by International, C. Cambridge. Ontario Canadá, CAB International, 208, 2033. ISBN: 0851987389

Froman DP. 2013. Short-term preservation of fowl sperm in buffered potassium chloride. *Poultry Science* 92, 1336-1342

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The Enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26-38. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90004-I](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90004-I)

X.F. Han, Z.Y. Niu, F.Z. Liu, C.S. Yang. (2005). Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *International Journal of Poultry Science*, 4(4), 197-201. <https://doi.org/10.3923/ijps.2005.197.201>

Herrera, J., Quintana, J., López, M., Betancourt, M., Fierro, R. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of Andrology*, 51(5), 353-360. DOI 10.1080 / 014850190944401

Herrera, J., Ávalos, A., Rodríguez, I., González, J., Rosales, A. (2013). Técnicas de Reproducción Asistida en Aves Domésticas Y Silvestres. México, D.F: Universidad Autónoma Metropolitana. pp. 11-37. ISBN 978-607-28-0028-1

Herrera, J., Calderón, G., Guzmán, A., Vargas, A., Ávalos, A., Rosales, A. (2017). Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved semen of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*). *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 49(1), 39-43. ISSN (electronic) 0719-8132

Iaffaldano N., Dilorio M., Miranda M., Zaniboni L., Manchisi A., Cerolini S. (2016). Cryopreserving turkey semen in straws and nitrogen vapor using DMSO or DMA:

effects of cryoprotectant concentration, freezing rate and thawing rate on post-thaw semen quality. *Br. Poultry Sci.*, 57: 264-270

Ikegami, K., & Yoshimura, T. (2016). Comparative analysis reveals the underlying mechanism of vertebrate seasonal reproduction. *General and comparative endocrinology*, 227, 64-8.

Janosikova, M., Petricakova, K., Ptacek, M., Savvulidi, F. G., Rychtarova, J., & Fulka Jr, J. (2023). New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa. *Poultry Science*, 102(2), 102386.

Kurland, C.,G., & Andersson, S.,G.,E. (2000) Origin And Evolution Of The Mitochondrial Proteome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*;64:786-820.

Lake, P., Ravie, O., McAdam, J. (1981). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *British Poultry Science*, 22(1): 71-7. DOI <https://doi.org/10.1080/00071688108447865>.

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

Long, J. (2006). Avian Semen Cryopreservation: ¿What Are the Biological Challenges? *Poultry Science*, 85(2): 232-236. DOI <https://doi.org/10.1093/ps/85.2.232>

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

Lukaszewickz, E. (2001) Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. *Theriogenology* 55, 1819-1829

Macferlane, D. (1987) physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology*.24:181-195.

Mac Gann, L. (1978). "Differing action of penetrating and non – penetrating cryoprotective agents". *Cryobiology*. 15: 382 - 390.

Madeddu, M., Berlinguer, F., Ledda, M., Leoni, G.G., Satta, V., Succu, S., Rotta, A., Pasciu, V., Zinellu, A., Muzzeddu, M., Carru, C., Naitana, S. (2009) Ejaculate collection efficiency and post-thaw semen quality in wild-caught Griffon vultures from the Sardinian population. *Reprod Biol Endocrinol*. Feb 19;7:18. doi: 10.1186/1477-7827-7-18. PMID: 19228408; PMCID: PMC2649137.

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology*, 247(3 Pt 1), C125-C142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>

Medeiros, C., M., Forell, F., Oliveira, A., T., Rodrigues, J., L. (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 1;57(1):327-44. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00674-4. PMID: 11775978

Meyers, S. A. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.026>

Natarajamani, S. (2017). Cryopreservation of Human Semen. In: Gunasekaran, K., Pandiyan, N. (eds) *Male Infertility*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3604-7_14

Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., Giraldo, C. (2006) El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias [online]*., vol.19, n.4, pp.426-436. ISSN 0120-0690.

Pegg D. E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 368, 39-57. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_3

Palacios, A., Quintero, L. (1996). Efecto de la sustitución de yema de huevo por albumina sérica bovina, suero equino o suero bobino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad pos-descongelación del espermatozoide equino. *Revista Veterinaria de Mexico*. 2(3); 221-227.

Partyka, A., & Nizański, W. (2022). Advances in storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 246, 106921.

Ramírez, E. y Luza, S. 1967. Dimethyl sulfoxide in the treatment of mental patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141: 655-667. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb34937.x

Ramónéz -Cárdenas, J.C.(2013) Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino [tesis de maestría] Universidad de cuenca.

Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estesó, M. C., Martínez-Nevado, E., Gimeno-Martínez, J., López-Goya, A. (2019). Semen cryopreservation in black-footed (*Spheniscus demersus*) and gentoo (*Pygoscelis papua*) penguins: Effects of thawing temperature on semen characteristics. *Animal reproduction science*, 200, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.011>

Santiago-Moreno J., Estesó MC., Villaverde-Morcillo S., Toledano-Déaz A., Castaño C., Velázquez R., López-Sebastián A., Goya A.L., Martínez J.G. (2016) Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian J Androl*. 18(6):882-888. doi: 10.4103/1008-682X.188660. PMID: 27678467; PMCID: PMC5109880.

Seigneurin, F.; Blesbois, E. (2006). The first method of cryopreservation of guinea fowl semen. *World Poultry Science Journal*. Under press.

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

Sexton, T. J. (1988). Comparison of commercial diluents for holding Turkey semen 24 hours at 5 C. *Poultry Science*, 67(1), 131-134. <https://doi.org/10.3382/ps.0670131>

Simon, M., (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista iberoamericana de fertilidad*, 20 (4), 213-225.

Stornelli, M. C., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*, 25(2), 28-35.

Tai, J.L.; Chen, J.C.; Wu, K.C., Wang, D.S., Tai, C. (2001) Cryopreservation of gander semen. *British Poultry Science* 42: 384-388.

Váradi É., Végi B., Liptói K., Barna J. (2013) Methods for cryopreservation of guinea fowl sperm. *PLoS One*. 8(4):e62759. doi: 10.1371/journal.pone.0062759. PMID: 23658648; PMCID: PMC3639159.

Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60, 481-492

Williams, S. (2013) Swain semen cryopreservation: challenges and perspectives. *Revista brasileña de reproducción animal*. 37 (2) :207-212

Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., Critser, J.K. (2004) Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 48:146-56

Zavos, P.M., Graham, E.F. (1983) Effects of various degrees of supercooling and nucleation temperatures on fertility of frozen turkey semen. *Cryobiology* 20: 553-559.