





**Universidad Autónoma de Ciudad Juárez**

**Instituto de Ciencias Biomédicas**

**Departamento de Ciencias Veterinarias**

**Maestría en Ciencia Animal**

**“COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE  
OBTENCIÓN DE EYACULADO EN *Gallus gallus  
domesticus*”**

Tesis para obtener el grado de

Maestro en Ciencia Animal

Oscar Armando González López

“Becado (a) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”

**Bajo la Dirección del**

**Dr. Andrés Quezada Casasola**

**Y la Codirección del**

**Dr. José María Carrera Chávez**

Ciudad Juárez, Chihuahua, 19 de agosto de 2019

## **APROBACION DE LA TESIS**

Comparación de dos técnicas de obtención de eyaculado en *Gallus gallus domesticus*, reporte de investigación preparado por Oscar Armando González López como requisito parcial para obtener el grado de

### **MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

Ha sido aprobado y aceptado por:

---

**Dr. Andrés Quezada Casasola**

**DIRECTOR DE TESIS**

---

**Dr. José María Carrera Chávez**

**CODIRECTOR DE TESIS**

---

**Dra. Ana Bertha Gática Colima**

**ASESOR**

---

**Dr. Mateo Fabián Itzá Ortiz**

**ASESOR**

---

**PhD Ernesto Orozco Lucero**

**ASESOR**

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

### **COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE EYACULADO EN *Gallus gallus domesticus***

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

---

**Dr. José María Carrera Chávez**

**COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

---

**Dr. Ramón Rivera Barreno**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VETERINARIAS**

---

**C.D. Salvador Nava Martínez**

**DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

## **DEDICATORIA**

Quisiera dedicar mi tesis en primer lugar a mis padres que además de darme la vida han estado pendiente de mis luchas diarias, también quisiera dedicar esta tesis a mi hermano que me ha apoyado y acompañado a lo largo de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mi asesor el Doctor Quezada que sin duda alguna sin sus conocimientos y su guía esto no hubiera sido posible, gracias por tanto apoyo. Agradezco a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez por todo el apoyo brindado, a mis profesores que tuvieron la paciencia para transmitir todos sus conocimientos, a mis compañeros Julián, Laura, Cristina y Sharai, que sin duda fueron un pilar para sobrellevar todos esos momentos difíciles que pasamos juntos, así como también me gustaría agradecer a CONACYT por el apoyo brindado ante tan complicado reto ya que sin el apoyo brindado por esta instancia de gobierno esto no hubiera sido posible.

A mi codirector el Doctor Carrera quien me ayudó lo más que pudo en este trabajo tan difícil de realizar, al igual que mis asesores el Dr. Orozco y la Dra. Ana Gatica.

Y quisiera brindar un agradecimiento especial al doctor Mateo Itzá por el apoyo brindado, no sé qué hubiera sido de este proyecto sin su importante y clave colaboración.

**RESUMEN**  
**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE EYACULADO EN**  
***Gallus gallus domesticus***

Por:  
Oscar Armando González López

Actualmente se trabaja con técnicas de reproducción asistida en aves para evitar que se extingan en un futuro no muy lejano. Sin embargo, existen dificultades para obtener el semen en algunas aves silvestres. Por lo que tener una técnica adecuada de obtención de eyaculado es imperativo. El objetivo de este estudio fue comparar dos métodos de obtención de semen en aves sobre las características espermáticas y seminales usando al *Gallus gallus domesticus* como modelo. Se utilizaron cinco individuos machos de *Gallus gallus domesticus*. Las técnicas fueron, 1) la electroestimulación (EE) y 2) estimulación dorso abdominal (EDA). Se tomaron como variables la cantidad de muestras viables, muestras contaminadas, el tiempo que se demoró el individuo en eyacular, el volumen de eyaculado y el análisis de características espermáticas usando el sistema de análisis de semen asistido por computadora (CASA) del semen en fresco, además de evaluar la integridad acrosomal, viabilidad e integridad de la membrana con los métodos de tinción Giemsa, eosina-nigrosina y el método hiposmótico respectivamente. Los datos fueron analizados con un diseño completamente al azar y con el procedimiento ANOVA. Los resultados obtenidos arrojaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la cantidad de muestras contaminadas de eyaculado obtenido con un porcentaje de 55% por parte de la EDA y un porcentaje de 30% para la EE, también existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la concentración con  $197 \pm 20$  mill/mL para la EDA y  $121.5 \pm 77$  mill/mL para la EE, así como también se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para el volumen de eyaculado con  $0.16 \pm 0.09$   $\mu$ L para EDA y  $0.23 \pm 0.13$   $\mu$ L para EE, Motilidad, con  $94.34 \pm 10.01\%$  para la EDA y  $85.96 \pm 19.57\%$  para la EE, así como para motilidad progresiva, con  $89.88 \pm 14.32\%$  para EDA y  $80.13 \pm 23.35\%$  para EE. Se concluye que la EDA otorga muestras de eyaculado de mejor calidad debido a que presentan mayor motilidad y mayor concentración, características que son muy importantes para las aves al tiempo de fertilizar el ovocito. Sin embargo, la EDA muestra una mayor probabilidad de arrojar muestras contaminadas.

**Palabras clave:** Electroestimulación, *Gallus gallus domesticus*, masaje dorso abdominal, características espermáticas.

## CONTENIDO

INDICE DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>1. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Problemas de conservación en aves silvestres y posibles soluciones .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Anatomía reproductiva en aves .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Fisiología de la reproducción aviar.....</b>	<b>4</b>
<b>2.4 Técnicas de reproducción asistida .....</b>	<b>5</b>
2.4.1 Electroestimulación .....	5
2.4.2 Estimulación dorso abdominal .....	7
2.4.3 Método por cooperación .....	8
2.4.4 Método de colección de eyaculado post mortem .....	8
<b>2.5 Procesos y daños celulares en semen fresco.....</b>	<b>9</b>
<b>2.6 Evaluación de la calidad del semen.....</b>	<b>10</b>
2.6.1 Evaluación de características espermáticas .....	11
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5.1 Especie utilizada.....</b>	<b>18</b>
<b>5.2 Obtención de semen .....</b>	<b>18</b>
5.2.1 Técnica de estimulación dorso abdominal .....	19
5.2.2 Técnica de electroestimulación .....	20
<b>5.3 Viabilidad de las muestras seminales .....</b>	<b>22</b>
<b>5.4 Tiempo de obtención de eyaculado .....</b>	<b>22</b>
<b>5.5 Cantidad de eyaculado .....</b>	<b>22</b>
<b>5.6 Evaluación de características espermáticas.....</b>	<b>22</b>
<b>5.7 Evaluación de viabilidad espermática .....</b>	<b>23</b>
<b>5.8 Evaluación de la integridad del acrosoma .....</b>	<b>23</b>
<b>5.9 Evaluación de la integridad de la membrana .....</b>	<b>23</b>
<b>5.10 Análisis estadístico.....</b>	<b>24</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>32</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>33</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Efecto de la técnica de extracción de eyaculado sobre porcentaje de efectividad, contaminación de muestras, tiempo, cantidad y concentración del semen de <i>Gallus gallus domesticus</i> .....	<b>26</b>
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de la técnica de extracción de eyaculado sobre características espermáticas del semen de <i>gallus gallus domesticus</i> .....	<b>28</b>
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de la técnica de extracción de eyaculado sobre la integridad de la membrana, integridad del acrosoma y viabilidad espermática del semen de <i>gallus gallus domesticus</i> .....	<b>29</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Individuo <i>Gallus gallus domesticus</i> del cual se tomaron las muestras de eyaculado..	<b>19</b>
<b>Figura 2</b> Zona de la cloaca donde se realiza la toma de muestra de eyaculado, así como la zona adyacente a la cloaca la cual debe estar limpia y libre de plumas .....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b> Electroeyaculador utilizado como tratamiento, el cual consta de una fuente de energía, un cable y la vaina con tres electrodos .....	<b>21</b>
<b>Figura 4</b> Reacciones espermáticas observadas en el microscopio a muestras de eyaculado de <i>Gallus gallus domesticus</i> a los cuales se les realizó la prueba hiposmótica; A) Cabeza doblada, B) Cabeza doblada, C) Sin reacción .....	<b>30</b>
<b>Figura 5</b> Reacciones espermáticas observadas en el microscopio a muestras de eyaculado de <i>Gallus gallus domesticus</i> a los cuales se les realizó la tinción de eosina-nigrosina donde encerrados en un círculo se observan aquellos espermatozoides teñidos de color rosa, por acción de la eosina sobre los espermatozoides muertos .....	<b>30</b>
<b>Figura 6</b> Reacciones espermáticas observadas en el microscopio a muestras de eyaculado de <i>Gallus gallus domesticus</i> a los cuales se les realizó la tinción de Giemsa: A) Acrosoma intacto teñido uniformemente B) Acrosoma dañado y no teñido .....	<b>31</b>

## INTRODUCCIÓN

Una de las principales intenciones de la conservación animal es mantener, y en la medida de lo posible, incrementar la biodiversidad. La aproximación ideal para alcanzar estos objetivos es la de preservar el hábitat natural. Sin embargo, las estrategias de conservación *in situ* en muchas de las ocasiones son insuficientes para la propagación de pequeñas poblaciones, así como para mantener la diversidad genética adecuada. Por lo anterior es imperante que se realicen programas *ex situ* para auxiliar con el establecimiento de poblaciones viables a través de reproducción en cautiverio y criopreservación de recursos genéticos animales (León-Quinto *et al.*, 2009).

En la actualidad se estima que la tasa de extinción se encuentra hasta 1,000 veces por encima de la tasa natural de extinciones, lo que significa que en las próximas décadas un 30% de especies quedarán extintas, incluyendo mamíferos, reptiles, peces, anfibios y aves. Las causas del aceleramiento de este proceso son la fragmentación y destrucción extensiva del hábitat, la caza, la caza furtiva, la deforestación, la introducción de especies invasivas, la contaminación del aire, el agua y los suelos, la acidificación del océano y la interferencia con el ciclo del nitrógeno. Todas estas causas han provocado la disminución de las poblaciones en un gran número de especies, convirtiéndolas en poblaciones pequeñas y altamente fragmentadas, resultando en un gran número de especies clasificadas ahora en alguna categoría de riesgo (Prieto *et al.*, 2014).

En las últimas décadas se ha reportado que las distintas poblaciones de aves han disminuido gradualmente hasta dejar algunas de las especies en grave peligro de extinción. Se conoce un aproximado de 9159 especies distintas de aves, de las cuales 503 especies se encuentran clasificadas en alguna de las categorías de riesgo (Blanco *et al.*, 2009; Barrowclough *et al.*, 2016), como lo son las guacamayas, las aves del paraíso, algunas especies de faisanes y muchas especies de aves más (IUCN, 2015). Dentro de la clase de las aves se encuentra el orden Galliforme, cuyo Orden es considerado el de mayor porcentaje de especies en riesgo con un 42%, a diferencia de un 10% que tienen en promedio el total de las especies de la clase de aves (Marzoni *et al.*, 2003). Uno de los recursos con los que se cuenta para contrarrestar la extinción de las especies en vida libre, además de contribuir a mantener los recursos genéticos de las poblaciones en cautiverio, es la criopreservación espermática, que puede evitar el traslado de individuos de una institución zoológica a otra (Lacy, 2000). Tradicionalmente se han utilizado protocolos de criopreservación para semen de especies silvestres con los modelos desarrollados para aves de corral, produciendo de esta forma bancos de germoplasma, manteniendo así la diversidad genética de especies de aves valiosas y garantizando la descendencia de estas al poder realizar la inseminación artificial de estas especies con el semen congelado (Madeddu *et al.*, 2009; Blanch *et al.*, 2014).

No obstante, lo expuesto anteriormente, existen dificultades al momento de tomar las muestras en especies no domésticas. Esto debido a que no en todas las especies es posible utilizar los mismos métodos de extracción por las dificultades del buen manejo en las especies silvestres (Villaverde-Morcillo *et al.*, 2016), ya que algunos de estos métodos requieren de entrenamiento como la estimulación dorso abdominal y el método por cooperación. De la misma manera se pueden presentar dificultades en la obtención de eyaculado debido a la inhibición del ejemplar por estrés propio del manejo (Gee *et al.*, 2004). Aún existe falta de información con el uso de algunas otras técnicas de extracción de eyaculados como la electroestimulación en aves no domésticas (Lierz *et al.*, 2013; Bublat *et al.*, 2017). La electroestimulación (EE) ha sido probada con éxito en distintas especies animales como los armadillos de seis bandas; (*Euphractus sexcintus*, Serafim *et al.*, 2010); tigre siberiano (*Pantera tigris tigris*, Fukui *et al.*, 2013), murciélago frutero común; (*Carollia perspicillata*, Fasel *et al.*, 2015), borrego; (*Ovis aries*, Marco-Jiménez *et al.*, 2005), cabras; (*Capra aegagrus hircus*, Jiménez- Rabadán *et al.*, 2012) y varias especies de aves como psitácidos (Lierz *et al.*, 2013), Cathartiformes, Piciformes, Strigiformes, Anseriformes y Accipitriformes (Fedriani *et al.*, 2019). Sin embargo, aún falta información más detallada sobre las diferencias entre las distintas técnicas de extracción de eyaculado, ya que los estudios realizados hasta la fecha con el uso de electroeyaculador solo indican características seminales y concentración (Lierz *et al.*, 2013; Frediani *et al.*, 2019). El objetivo de este estudio fue el comparar el uso de dos diferentes métodos de obtención de semen en aves sobre las características seminales y espermáticas usando al *Gallus gallus domesticus* como modelo.

# 1. REVISIÓN DE LITERATURA

## 2.1 Problemas de conservación en aves silvestres y posibles soluciones

En las últimas décadas, tanto la sociedad en general como la comunidad científica se han preocupado más por garantizar la existencia de muchas especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo o cuyos números de individuos en vida libre disminuyen de una manera alarmante. Además, es generalmente aceptado que las principales causas de extinción son provocadas por el hombre, siendo las causas principales la fragmentación y degradación del hábitat, así como la caza ilegal (Blesbois *et al.*, 2008; Valiente-Banuet *et al.*, 2015).

A pesar de los esfuerzos que se llevan a cabo actualmente para disminuir la cantidad de especies de aves que se encuentran en alguna categoría de riesgo, estas han ido en aumento. Un ejemplo son las especies de faisanes, de las cuales, de un total de 50 especies registradas 21 se encuentran en alguna categoría de riesgo (Lamont, 2009). Debido a la urgencia de contrarrestar la tasa de extinciones es necesario generar bancos de germoplasma para las distintas especies de aves domésticas y especies de aves no domésticas en riesgo de extinción (Varadí *et al.*, 2013). La congelación de semen es la técnica más accesible en cuanto a técnicas de congelación de gametos en aves, esto debido a la dificultad que representa congelar ovocitos o incluso embriones debido a la estructura de la yema (Liu *et al.*, 2010).

## 2.2 Anatomía reproductiva en aves

El aparato reproductor del macho en aves no domésticas es similar al que presentan las aves domésticas como el gallo (*Gallus gallus domesticus*) o el pavo común (*Meleagris gallopavo*). Está compuesto de un par de testículos, conductos deferentes, una papila genital y un falo. Contrario a los mamíferos, las aves no presentan glándulas accesorias (Fujihara, 1992). La papila genital desemboca en el urodeo, el cual es el compartimiento central de la cloaca. El proctodeo, el compartimiento más posterior que se encuentra en la cloaca es el origen del falo, ya sea este intromitente o no intromitente, así como de las secreciones cloacales (Gee *et al.*, 2004). En sí las aves no presentan pene, sino que algunas especies de aves presentan falo. Algunas otras especies de aves se reproducen con el solo contacto de la cloaca, acto conocido como beso cloacal, produciendo las hembras una eversión de la parte distal del oviducto hacia la apertura de la cloaca. El falo intromitente se encuentra en las ratites, tinamus y en la familia anseriforme. El falo no intromitente se encuentra en los gallos "*Gallus gallus domesticus*" y los pavos "*Meleagris gallopavo*", así como en algunos paseriformes como los azulillos siete colores "*Passerina siris*", gorriones "*Passer domesticus*" y juncos "*Junco phaeonotus*" (Pollock

y Orosz, 2002). A diferencia de algunos mamíferos, en las aves los testículos son funcionales a una temperatura corporal de 41 °C, ya que los testículos se encuentran dentro de la cavidad celómica cercanos a los riñones. Previo a la madurez sexual su peso es de aproximadamente 2.0 gr cada uno. A las 18 semanas presenta un aumento de tamaño considerable, llegando a pesar hasta 20 gramos. La producción espermática y el tamaño testicular están directamente relacionados, al igual que el tamaño testicular está relacionado con el tamaño corporal del individuo. La producción diaria de espermatozoides es de aproximadamente 100 millones de células por gramo de peso testicular, producción que es constante no importando si existe apareamiento o una frecuencia elevada de colección de eyaculado (Kharayat *et al.*, 2016). Al igual que los ovarios, los testículos están parcialmente rodeados por el saco aéreo abdominal. La capa más externa del testículo es la túnica albugínea. Los testículos aviares, a diferencia de los mamíferos, no son lobulados. Estas últimas dos características le dan a la superficie testicular un aspecto suave en apariencia (Pollock y Orosz, 2002).

### **2.3 Fisiología de la reproducción aviar**

La producción inicial de espermatozoides empieza con una adecuada secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) proveniente del hipotálamo, seguida de una secreción de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) provenientes del lóbulo anterior de la pituitaria y por último de la secreción de los esteroides gonadales (testosterona y estrógeno). La LH va a actuar en las células de Leydig que se encuentran en los testículos para estimular la producción de progesterona, misma que será convertida en testosterona, la cual es esencial para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Getachew, 2016).

Histológicamente el testículo está cubierto de una capsula de tejido conectivo, y el estroma del testículo no posee mediastino y las células de Leydig se distribuyen en grupos entre el tejido conectivo, el cual llena el espacio libre entre los túbulos seminíferos. Las células germinales y las de Sertoli constituyen el principal componente del epitelio seminífero, en el cual se encuentran las espermatogonias de tipo A, espermatogonias de tipo I y las espermatogonias de tipo B. Estas últimas pasan a través del prolepteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diagenesis. Los espermatoцитos primarios dan origen a los espermatoцитos secundarios para posteriormente ingresar a la segunda división meiótica para formar espermatozoides, los cuales pasaran por un proceso de cambios estructurales a través de varios estados para finalmente formar los espermatozoides (Kadhem, 2014). Este proceso de cambios morfológicos puede cambiar dependiendo la especie de ave. En la gallina de Guinea (*Numida meleagris*) el proceso conlleva 10 pasos distintos de cambios morfológicos, a diferencia del gallo doméstico (*Gallus gallus domesticus*) el cual requiere 8-10 pasos y de la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japónica*) que requiere de 12 pasos para completar el

proceso (Abdul-Rhaman *et al.*, 2016). El proceso de maduración dura aproximadamente 14 días para poder realizarse en su totalidad, desde el inicio del proceso hasta que el espermatozoide llegue a la parte distal de los vasos deferentes en proximidad con la cloaca. Una vez que alcanzan los vasos deferentes, estos espermatozoides se convierten en reservas espermáticas. Estas reservas de espermatozoides extragonadales son sometidos a un proceso de maduración mediado por intercambio de iones provocado por el plasma seminal contenido en los vasos deferentes (Pizzari *et al.*, 2007). El consumo de  $\text{Ca}^+$  por parte de la mitocondria combinado con una pérdida de  $\text{K}^+$  son fenómenos relacionados con la maduración espermática y los canales de glutamato son los responsables de mediar el flujo de estos iones al nivel de la membrana plasmática (Froman y Kirby, 2004).

## **2.4 Técnicas de reproducción asistida**

En el aspecto de problemas reproductivos y con el avance de la tecnología reproductiva cada vez es más importante obtener semen de buena calidad. Esto debido a que la calidad del semen para otras técnicas de reproducción asistida requiere de semen de buena calidad para obtener mejores resultados. Técnicas como la fertilización *in vitro* requieren de semen de buena calidad ya que con las mejoras en la congelación del semen es posible aumentar el porcentaje de éxito en dicha técnica (Vandevoort, 2004). Caso similar ocurre con las aves debido a la incapacidad de poder preservar embriones de éstas debido al gran tamaño y cantidad de vitelo que contiene el huevo. Esto limita las tecnologías reproductivas a la criopreservación del semen como el método más eficiente de manejo reproductivo disponible para aves (Blesbois *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010).

La colección de semen en aves es posible por varios métodos para la obtención del eyaculado. Puede ser mediante la electroestimulación, estimulación dorso abdominal, el método por cooperación (para este método y la estimulación dorso abdominal se necesita un condicionamiento previo del animal) y el rescate de gametos post-mortem (Gee *et al.*, 2004).

### **2.4.1 Electroestimulación**

La eyaculación es un proceso fisiológico complejo que resulta en la expulsión de fluidos seminales y consiste en dos fases sucesivas (Clement *et al.*, 2006). La primera de las fases es la fase de emisión, la cual consiste en la secreción de varios componentes de fluido seminal, mismos que contienen una mezcla compleja de moléculas que son costosas de producir en las aves y que condicionan el accionar de los espermatozoides (Cornwallis y O'Connor 2009). Estos componentes del fluido seminal derivan de células epiteliales y sustentaculares que se encuentran en el epidídimo y en los conductos deferentes (Pollock y Orosz 2002). La segunda fase es la de expulsión vía los conductos deferentes y el ducto eyaculatorio. Estos conductos presentan en su estructura histológica

una cobertura de epitelio pseudoestratificado y tejido conectivo en su parte proximal, de los cuales gradualmente cambian a epitelio simple cuboidal conforme se acercan a la porción terminal. De igual forma el grosor de las paredes aumenta debido a la presencia de tejido muscular, mismo que aumenta en presencia conforme se acerca al urodeo. La porción terminal, también conocida como ducto eyaculatorio, desemboca en el urodeo vía una papila redondeada y eréctil (Razi *et al.*, 2010). Las estructuras anatómicas que se ven envueltas en la eyaculación están inervadas por axones derivados de neuronas postganglionares, las cuales llegan al abdomen y a la zona pélvica vía el nervio esplácnico bajo y los plexos aórtico, hipogástrico, pélvico y cloacal (Clement *et al.*, 2006). El mecanismo de la electroestimulación se da por estimulación directa a las uniones neuromusculares periféricas provocando una contracción y relajación de los órganos pélvicos, resultando en una emisión del contenido de dichos órganos (Fusell *et al.*, 1967). La electroestimulación en aves no es un proceso que sea muy utilizado e incluso muy pocos estudios existen sobre esta forma de obtener el semen en aves. Sin embargo, es una técnica que sí es utilizada de manera correcta puede arrojar resultados muy benéficos para la preservación de especies en riesgo, como ya se ha logrado obtener información acerca de la concentración espermática de hasta 100 especies de la familia psitacidae (Lierz *et al.*, 2013). En el comienzo del uso de la electroestimulación en aves, esta fue desarrollada principalmente para obtener muestras de semen en patos, para incrementar la contribución reproductiva en machos que eran considerados sobresalientes en su uso comercial, utilizado en conjunto con inseminación artificial (Samour, 2004).

La técnica de electroestimulación como técnica de reproducción asistida puede proveer diferentes porcentajes de éxito para la obtención de eyaculados, ya que utilizando esta técnica estos porcentajes han sido muy variables, como el 41% de efectividad de extracción de eyaculado obtenido en cotorra de la española (*Amazona ventralis*), o el 89% en amazona de San Vicente (*Amazona guildingii*) así como un 54.5% en una variedad de guacamayas (Lierz *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2014). Esta técnica de extracción además de ser de gran utilidad para la evaluación de las características seminales o características espermáticas ha sido útil para identificar las diferencias estacionales en la concentración espermática de varias especies de psittacidos como las diferencias observadas en ocho diferentes especies de guacamayas, 13 especies de amazona, 10 especies de cacatuas y dos especies de eclectus, teniendo estos últimos grupos dos periodos de producción de espermatozoide más amplio que el obtenido con guacamayas (Bublath *et al.*, 2017). Los protocolos para la electroestimulación en aves indican que un proceso llevado a cabo con una estimulación eléctrica de 5.0 a 10.0 V se obtiene una motilidad espermática mayor que con un protocolo de alto amperaje de 5.0 a 30.0 V. Sin embargo, con ambos protocolos es posible obtener semen de buena calidad (Kanatyanont *et al.*, 2012).

Anteriormente se ha realizado comparación de métodos de obtención de eyaculado en otras especies de mamíferos como los borregos (Marco-Jiménez *et al.*, 2008) y toros (Palmer *et al.*, 2005), en los cuales se ha demostrado que sí existen diferencias entre la técnica de electroestimulación y otras técnicas como la vagina artificial o el masaje rectal. Esta variación en cuanto a calidad de eyaculado puede deberse a la composición del fluido seminal, situación que puede ser observada en aves debido a que en aves el fluido seminal es secretado en el área de la cloaca y las posibilidades de contaminación de muestra con orina o con excremento son muy elevadas (Kanatiyanont *et al.*, 2012). Una de las diferencias que se ha encontrado en estudios comparativos previos realizados en patos, es la composición en coloración del líquido seminal, el cual con el método de obtención de estimulación dorso abdominal se obtuvo el eyaculado con una coloración lechosa, a diferencia de lo encontrado con electroestimulación, la cual arrojó eyaculados con coloración transparente, así como también se observó un eyaculado con apariencia espesa en estimulación dorso abdominal y una apariencia acuosa con el método de obtención de electroestimulación (Watanabe, 1957).

#### 2.4.2 Estimulación dorso abdominal

Esta técnica involucra una restricción simple del animal. Se realiza sujetando las patas y alas tratando de dejar despejada la zona dorsal del ave ya que justo en esa zona se realiza el primer estímulo. Se comienza con un estímulo táctil firme desde la zona toracolumbar hasta el pigostilo, abarcando la zona de los testículos y los conductos deferentes. Seguido de esta acción debe existir tumescencia (erección) del falo, momento en el que se da la segunda fase. En esta fase se debe realizar una estimulación en forma de apretón con las puntas de los dedos índice y pulgar alrededor de la cloaca. De esta forma se produce la expresión del semen a través de la papila externa del conducto deferente (Chelmonska *et al.*, 2008).

La erección del falo y el reflejo eyaculatorio en gallos domésticos (*Gallus gallus domesticus*), pavos (*Meleagris gallopavo*), gallinas de Guinea (*Numida meleagris*) y codorniz (*Coturnix coturnix*) ocurren simultáneamente en respuesta al masaje y la mayor porción de los espermatozoides es obtenida en el primer eyaculado (Mohan *et al.*, 2018).

El semen puede extraerse en gallos a partir de las 16 semanas, pero un semen con alto porcentaje de fertilización solo se podrá obtener en gallos a partir de la semana 28 de haber nacido. Para obtener mayores cantidades de eyaculado lo ideal es realizar la extracción a tempranas horas del día, al igual que se da en la copula natural (Frediani *et al.*, 2019). El promedio de volumen de eyaculado que se puede obtener va de los 0.05 a los 0.5 ml, llegando incluso a 1.0 ml en las razas pesadas como la Ross, Hybro, Cobb o Hubbard. La capacidad fertilizante del gallo a la edad de los tres años es la misma. Sin embargo, la cantidad va disminuyendo con el paso de los años. Es importante tener en cuenta la proporción de espermatozoides degenerados naturalmente en el conducto deferente,

los cuales aumentan cuando los períodos de colecta son muy espaciados entre uno y otro. Este proceso degenerativo es debido a que los espermatozoides son reabsorbidos por cierto tipo de células de revestimiento, un proceso que es conocido como vasoligación (Mohan *et al.*, 2018).

Esta técnica permite al operador obtener muestras de aves que no han sido improntadas o entrenadas para utilizar el método por cooperación, ya sea de aves cautivas o de vida libre. Sin embargo, el estrés que pueda llegar a producirse en aves no domésticas debido al estrés producido por la contención y el excesivo manejo, impiden la colecta de una muestra de semen de calidad, por lo que es necesario llevar a cabo un procedimiento de entrenamiento previo cuando se utilice esta técnica (Gee *et al.*, 2004; Frediani *et al.*, 2019)

#### 2.4.3 Método por cooperación

Los entrenadores de halcones han sido los pioneros en el uso de aves improntadas sexualmente para poder realizar la colección de semen bajo el método de colección por cooperación. Esta toma puede ser funcional para poder inseminar hembras que están condicionadas para recibir inseminación artificial. El manejo que se le ha dado a los halcones ha incentivado a que estos rapaces acepten sin ningún problema el socializar, así como posteriormente ser una pareja sexual de manera artificial con un humano. Esta técnica depende de lo voluntarioso que puede ser el ave y permita colectar con este método de cooperación las muestras de semen necesarias para poder realizar la inseminación artificial de una hembra de su misma especie (Gee *et al.*, 2004). La colección de semen consiste en una copulación voluntaria falsa que se realiza sobre la espalda del entrenador del ave, o incluso con el uso de maniqués que harán las veces de la hembra, como en el caso de algunas ratites como *Struthio camelus* (Rybnik *et al.*, 2007), que se comienza al inicio de la temporada reproductiva. El proceso se lleva a cabo en el lugar donde habita el ave y siempre por la misma persona. Esta técnica puede tener un porcentaje de hasta 57% de recuperación de eyaculados. Sin embargo, el tiempo de entrenamiento que se requiere para poder realizar esta técnica puede llegar a tomar periodos tan largos como los dos años (Villaverde-Morcillo *et al.*, 2015). Las ventajas que se pueden obtener con este método son la reducción del estrés y el riesgo de traumas o fracturas, así como la reducción en las muestras contaminadas con heces, orina o líquido transparente (Prieto *et al.*, 2014).

#### 2.4.4 Método de colección de eyaculado post mortem

El rescate de gametos post mortem se debe realizar en época reproductiva de la especie a colectar. El método se utiliza una vez que ha fallecido el individuo o se ha eutanasiado el animal y debe realizarse en un tiempo no mayor a 60 minutos. La muestra de semen se toma de dos diferentes formas. Una es el método de flotación, en el cual se toman segmentos de los vasos deferentes y se colocan en el medio en el cual se quieren conservar para después incubarlos a temperaturas de 38 °C y después retirar el tejido y de esa forma recuperar los espermatozoides (Du

Plessis y Soley, 2014). La otra técnica se realiza con una jeringa de 2.0 mL. Y se realiza inyectando 1.5 mL del extensor a utilizar, previamente calentado a 38 °C, en el extremo proximal del vaso deferente utilizando una aguja 27 G. Una vez introducido el extensor se recupera el mismo para obtener de esa forma los espermatozoides. Siendo este último método con el que mejores resultados se obtienen ya que se logran obtener hasta 596 millones de espermatozoides por 341 millones que se logran obtener con la técnica de inmersión (Villaverde-Morcillo *et al.*, 2016).

## **2.5 Procesos y daños celulares en semen fresco**

A pesar de que en los análisis seminales se pueden observar parámetros normales en la mayoría de los valores a evaluar, en algunos animales, estos pueden tener bajos porcentajes de fertilidad. Es posible que algún daño a nivel de ADN se presente en estos individuos siendo este uno de los principales factores de la disminución de la fertilidad produciendo pérdidas de preñez sucesivas y fallas en las técnicas de reproducción asistida. Los daños a nivel de ADN que se pueden observar son daños a una porción de la cadena, rotura de las dos cadenas de ADN o fragmentación de estas, deleciones, adiciones o modificaciones de las bases. El daño del ADN espermático es evaluado por ensayo de la estructura cromatínica del espermatozoide (SCSA), ensayo de electroforesis alcalina de células individuales embebidas en microgel (comet) y el marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL) (Takeda *et al.*, 2015). Sin embargo, el daño al ADN no es el único culpable de la muerte celular en fresco. Durante las primeras fases del trastorno generado a las funciones de la membrana, ocurre una asimetría de las membranas de fosfolípidos, antes de que la integridad de la membrana se vea dañada de una forma progresiva. Esto ocurre previo a la apoptosis celular, una vez que el espermatozoide es eyaculado y entra al tracto reproductor de la hembra, termina su proceso de modificaciones, que lo hace capaz de reconocer al ovocito y que culminará en la fertilización. Los espermatozoides de las aves se caracterizan por tener una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), los cuales están asociados a un incremento en la susceptibilidad a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica (Khan *et al.*, 2012).

Una de las causas que desencadenan la apoptosis es la sobreproducción de ROS por parte de la mitocondria debido a un desarreglo de la cadena transportadora de electrones, que genera lipoperoxidación de la membrana. Este evento favorece dos procesos, el primero es la salida de los componentes mitocondriales tales como el citocromo c que desencadenarán la cascada intrínseca de la apoptosis y la oxidación del colesterol de la membrana; este otro desencadenante facilita que la membrana de la mitocondria sea más fluida, favoreciendo la cascada intrínseca de la apoptosis (Jiang

y Wang, 2004). La producción de especies reactivas de nitrógeno (ERN) por la NADPH oxidasa, localizada en la membrana del espermatozoide, también puede contribuir a este mismo proceso de desestabilización de la membrana plasmática favoreciendo, además, que el espermatozoide pierda movilidad y que la membrana deje de ser funcional. Seguido de la generación de ROS o ERN y la pérdida de la movilidad, el espermatozoide presentará una externalización de fosfatidilserina y posteriormente después de 4 horas presentará caspasas activas (Trinidad *et al.*, 2016), las cuales son uno de los principales actores del complejo de señalizaciones inductoras de apoptosis (Menges *et al.*, 2010).

En machos adultos, la muerte de las células germinales durante la espermatogénesis normal juega un papel importante en la producción de espermatozoides. Aproximadamente un 25-75% de espermatozoides potenciales son degenerados y mueren en los testículos. De igual forma una falla en la remoción de células germinales apoptóticas se va a traducir en espermatozoides anormales en semen y baja en la fertilidad (Anzar *et al.*, 2002)

## **2.6 Evaluación de la calidad del semen**

Existen dos razones de peso para realizar la evaluación seminal durante los procesos de conservación, una de ellas es para asegurarse de que la muestra de semen que se utilizará para congelar tiene la suficiente calidad para llevar a cabo ese proceso y la segunda es para medir la concentración y hacer las diluciones necesarias. En las aves el semen está compuesto de plasma seminal y espermatozoides, los cuales son secretados por el epidídimo y los conductos deferentes. Los espermatozoides son producidos en los testículos, y en el caso de las aves, el fluido seminal es producido de igual forma por los testículos. Todas estas secreciones producidas por los testículos son controladas por hormonas endocrinas que son acarreadas hasta esta vía sanguínea. La hipófisis anterior regula esta producción testicular vía FSH y LH, las cuales van a producir secundariamente testosterona, hormona que regula el crecimiento gonadal y la producción espermática por parte de estas últimas (Getachew, 2016).

Una muestra de semen de buena calidad debe tener como característica un aspecto espeso y de color blanco aperlado, cualquier otro color es signo de contaminación, como lo es el color amarillo con verde, el cual indica contaminación por heces y orina o cualquier color rojizo, lo cual significa que se contaminó con sangre. De cualquier forma, el semen de las aves puede variar desde un fluido opaco y denso hasta un fluido acuoso y transparente. Este semen consta de dos componentes principales, el plasma seminal y el líquido transparente. El plasma seminal es producido en los testículos y por los vasos deferentes (Borziak *et al.*, 2016). El líquido transparente, sin embargo, es producido por los pliegues cloacales. Otra característica del semen del gallo es que tiene una pequeña

cantidad de glucosa, sin embargo, una alta presencia de líquido transparente eleva la cantidad de glucosa contenida en el semen, llegando a ser positivo para el eyaculado (Biswas *et al.*, 2009). Sin embargo, un exceso de líquido transparente puede ser detrimental para los espermatozoides, debido a que este fluido es rico en iones de calcio, provocando agrupamientos en los espermatozoides (Mohan *et al.*, 2018).

#### 2.6.1 Evaluación de características espermáticas

Los espermatozoides fueron avistados por primera vez en el siglo XVII. Sin embargo, los mecanismos básicos de la fertilización fueron comprendidos hasta el momento en que se descubrió la existencia del ovocito en el año de 1827. Como resultado de esto, el interés en desarrollar tecnologías para el análisis de las muestras de semen no ocurrió sino hasta los comienzos de 1900. Incluso, las metodologías estandarizadas para el análisis de las muestras seminales fueron desarrolladas en la primera mitad del siglo XX (Andrade-Rocha, 2017). En la actualidad han sido muchas las especies a las cuales se les han realizado estas evaluaciones como los caballos, bovinos, cerdos, perro y algunas aves (Brokehuijse *et al.*, 2012). Las evaluaciones más importantes son la evaluación de la morfología espermática, motilidad y concentración (Du Plessis y Soley, 2014). Estas evaluaciones con el tiempo han ido evolucionando de una evaluación estándar, la cual es una técnica subjetiva ya que existe mucha variación entre criterios de las personas que evalúan, a pesar de que existen manuales realizados por la OMS para homogenizar criterios (Larson *et al.*, 2000), hasta los métodos de evaluación más modernos como lo es el análisis de semen asistido por computadora (CASA, por sus siglas en inglés), el cual cuenta con un microscopio de refracción de fases, facilitando así la visualización de las células sin necesidad de tinción, unido a una cámara de alta resolución. El análisis completo de un solo campo se lleva a cabo en un segundo, arrojando resultados de concentración espermática, motilidad y morfología (Talarczyk-Desole *et al.*, 2017).

El espermatozoide aviar es único entre las especies animales, son denominados del tipo saurópsido, al igual que los espermatozoides presentes en reptiles, siendo de una forma denominada filiforme y de presentar una superficie plana y elongada. De igual manera presenta una relación superficie-volumen muy pequeña, cabeza y núcleo cilíndrico, el cual junto con el cuello presenta una cantidad variable de mitocondrias con una presencia media de 30 en gallos y más de 180 en la codorniz (Blesbois, 2011). El núcleo está cubierto por un acrosoma también cilíndrico, mismo que si se llegase a dañar provocaría infertilidad en el espermatozoide debido a que pierde la capacidad de penetrar la zona pelúcida (Getachew, 2016). La pieza media puede variar en su longitud, siendo de tamaño corto en la mayoría de las aves con excepción en las palomas (*Columba livia*) y las tortolas (*Streptopelia risoria*). Las mitocondrias están situadas cercanas a la parte distal del centriolo, con algunas variedades en la configuración central. La pieza media finaliza en el anulus, el cual es un

anillo con diferencias en la densidad que se localiza en la parte interna de la membrana celular (Aire, 2014). También presenta un citoplasma mínimo y un flagelo bastante largo, características que proveen menor posibilidad para que un agente criopreservante permeable se acumule dentro de la célula. El flagelo es el principal aparato locomotor y abarca el axonema que comprende una configuración típica microtubular de 9+2. Las dos fibras densas centrales son rodeadas por nueve pares de fibras periféricas. Esta configuración esta mejor conformada en ratites que en galliformes. De igual manera, es conocido que durante el proceso de criopreservación el mayor daño se va a observar en la cola, esto debido al gran tamaño que puede presentar el largo de la cola del espermatozoide de las aves, volviéndose más propenso a daño celular (Rakha *et al.*, 2018).

#### 2.6.1.1 Motilidad

En la mayoría de las especies, una vez formado, el espermatozoide permanece inmerso en un fluido en el que permanece inmóvil y con un nivel metabólico muy bajo. Este estatus de inmovilidad es justificado por el hecho de que el espermatozoide debe guardar energía, así como evitar alteraciones en alguna de sus membranas, estructuras internas o compuestos bioquímicos por alguno de los agentes oxidantes producidos por la actividad mitocondrial (Hamamah y Gati 1998). La motilidad en los espermatozoides de aves está directamente relacionada con el proceso de la fertilización y el grado de motilidad espermática tiene una correlación positiva con la fertilidad (Santiago-Moreno *et al.*, 2009; Ahammad *et al.*, 2011; Andraszek *et al.*, 2018). Una de las razones por las cuales es tan importante la motilidad en los espermatozoides aviares es por la competitividad, ya que muchas especies de aves tienen la posibilidad de fertilizar con más de un macho durante un solo periodo reproductivo (Birkhead *et al.*, 1999). El comienzo de la adquisición del potencial de motilidad por parte de los espermatozoides de las aves se va a dar debido a la influencia de una fuente de calcio y glutamato, los cuales son secretados en los fluidos testiculares, del epidídimo y los ductos deferentes (Froman y Feltmann, 2005). En aves el batido flagelar es dependiente de la temperatura, como por ejemplo en la paloma (*Columba livia*) el máximo de motilidad se da a una temperatura de 18 a 24°C, declinando a partir de los 28°C (Cheng *et al.*, 2002) así como en el gallo doméstico se observa que el movimiento más vigoroso se da cuando alcanza temperaturas de 30°C y disminuye a temperatura corporal (41°C) siendo esta inmovilidad completamente reversible (Ashizawa y Sano, 1990). También la motilidad está relacionada con el descenso de la temperatura ya que existe un aumento en la motilidad cuando el eyaculado es trasladado hacia cloaca de la hembra (Ashizawa *et al.*, 2004). De la misma forma la motilidad puede verse afectada por el alto consumo de calcio por parte de la mitocondria, esto provocado por una alta concentración de glutamato disponible para la motilidad del espermatozoide. Los espermatozoides aviares expresan canales de glutamato debido al efecto del ácido N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos receptores NMDA son permeables al Ca<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>

y Na<sup>+</sup> (Froman y Kirby, 2004). La presencia de calcio no solo es benéfica para mejorar la motilidad espermática, sino también es importante para otras funciones fisiológicas como la maduración espermática epididimal, la función de la membrana y el metabolismo interno del espermatozoide (Kanyinji y Maeda, 2010). La presencia de este ion es de importancia para la regulación de actividad de las quinasas, fosfatasas, activación genética y traslación de proteínas. Este mismo es requerido en altas concentraciones y por periodos cortos de tiempo permitiendo que la célula active varios mecanismos para regular de manera fina la concentración intracelular, así como para mantener un gradiente fisiológico del calcio. Así, de forma transitoria varias señales incrementan el calcio intracelular, el cual es indicativo de la activación de los procesos celulares (Parodi, 2013).

Para la evaluación de la motilidad el sistema CASA es una herramienta que auxilia en la evaluación e identificación de machos con características seminales específicas de una manera más precisa en comparación con la evaluación tradicional con microscopia de luz, en el cual la subjetividad del criterio del evaluador puede provocar variaciones en la evaluación. Existe evidencia suficiente para demostrar que la aplicación de métodos de evaluaciones modernos mejora el manejo reproductivo de las especies (Herreros, 2016). El CASA puede evaluar además de motilidad, la motilidad progresiva, motilidad lineal, motilidad circular e inmóviles entre otras características (Paluch *et al.*, 2013)

#### 2.6.1.2 Concentración

En aves la capacidad de producción espermática es particularmente importante en el contexto de la teoría de la competición espermática debido a que el éxito de fecundación está fuertemente relacionado por el numero relativo y calidad espermática de los eyaculados de los machos rivales (Lupold *et al.*, 2011). Por lo regular en aves se observa que los machos depositan muchos más espermatozoides de los que en realidad se necesitan para fertilizar un huevo, incrementando con esto la posibilidad de éxito en la competición espermática (Hemmings y Birkhead, 2015). Por lo tanto, es muy importante determinar la concentración espermática que se pueda llegar a obtener del eyaculado de un ave, ya que puede ayudar en dos situaciones específicas, como lo es la facilidad que otorga el conocer la concentración para poder calcular las concentraciones necesarias para preparar las dosis inseminadoras así como para poder determinar la calidad reproductiva del macho (Mohan *et al.*, 2018).

En el caso de la concentración, la calidad de la muestra se puede ver afectada por varios factores. Uno de ellos se puede observar cuando la muestra de eyaculado es obtenida artificialmente, el eyaculado por lo regular viene mezclado con un líquido transparente tipo fluido linfático que se presenta en la superficie de la cloaca denominado fluido transparente. Este fluido transparente es derivado de los cuerpos vasculares paracloacales y entra a la cloaca vía los pliegues linfáticos,

pudiendo afectar de esta manera la concentración y la motilidad espermática debido a la concentración de minerales que presenta. En este sentido, afectando positivamente la alta concentración de cobre y zinc y negativamente la presencia de alta concentración de potasio (Aghaei *et al.*, 2010). La concentración espermática puede llegar a variar de manera significativa dependiendo de la especie. En gallos juveniles se ha observado una concentración de  $3.0$  a  $7.0 \times 10^9$  de células por mL (Mohan *et al.*, 2018). Sin embargo, esa concentración puede verse afectada con el paso de los años en el individuo ya que se ha observado que existe una disminución marcada de concentración a partir de los 14 y hasta los 18 meses de edad, con valores menores a los  $2.0 \times 10^9$  células. Así mismo, la edad, la raza y la época del año pueden afectar, solos o en combinación la concentración espermática del individuo, actuando sobre la conducta reproductiva del animal (Juárez-Caratachea *et al.*, 2018). La cantidad mínima para poder llevar a cabo la inseminación artificial ya sea pre o post-descongelación de semen es de  $6 \times 10^6$  espermatozoides/hembra/inseminación (Blesbois *et al.*, 2005). Otra de las formas en que se puede afectar la concentración es con la frecuencia de estimulación, ya que mientras más días de separación exista entre las estimulaciones se puede encontrar mayor concentración (DeMatteo *et al.*, 2004; Zahraddeen *et al.*, 2005).

#### 2.6.1.3 Integridad del acrosoma

El acrosoma de los espermatozoides es un organelo derivado del aparato de Golgi que forma una especie de casco en la parte anterior del núcleo espermático. Este acrosoma contiene enzimas proteolíticas parecidas a la tripsina o acrosina, las cuales están ubicadas en la matriz del acrosoma y estas van a ser las responsables de llevar a cabo la reacción acrosomal (Ahammad *et al.*, 2013). La reacción acrosomal, la cual es una secreción celular en respuesta a un estímulo (exocitosis), es requerida para que el espermatozoide penetre y se fusione con la membrana plasmática del espermatozoide. Este proceso envuelve la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, vesiculación y desaparición de la fusión de las membranas, para terminar con la liberación de las enzimas y otros componentes contenidos dentro de la matriz del acrosoma (Ashizawa *et al.*, 2004).

El funcionamiento adecuado del flagelo del espermatozoide, así como de su acrosoma son de vital importancia para el proceso de fertilización en aves, ya que incluso son factores determinantes para el potencial de fertilidad (Ahammad *et al.*, 2011). La evaluación de la integridad del acrosoma es una parte muy importante de la evaluación seminal debido al rol que representa esta estructura en el mantenimiento de la habilidad del espermatozoide para penetrar la zona pelúcida o la envoltura del ovocito, así como de la habilidad de fusionarse con la membrana plasmática del mismo espermatozoide para poder llevar a cabo la reacción acrosomal (Partyka *et al.*, 2010).

#### 2.6.1.4 Integridad de la membrana

Los espermatozoides aviares son células que contienen una superficie muy larga de membrana celular y contenido citoplasmático muy bajo. Aunado a esto, el líquido intracelular contenido en el espermatozoide es muy bajo para ser el espermatozoide de un vertebrado (55-60%). Por lo tanto, para poder asegurar que existe salud en la membrana celular existen algunos factores que unidos indicarán que existe integridad en la membrana. Uno de ellos es el factor de la alta regionalización de los componentes celulares espermáticos; otro factor es el alto contenido de membrana y el último es el bajo contenido de agua (Blesbois, 2011). Estudios han demostrado que la peroxidación lipídica de la membrana plasmática espermática ocurre apenas unas horas de almacenado *in vitro* a temperaturas de 0 y 41 °C (Partyka *et al.*, 2011) o incluso al mismo momento de la eyaculación (Biswas *et al.*, 2014). De esta membrana plasmática emanan proteínas y lípidos formando una capa denominada glicocáliz. Este glicocáliz espermático es modificado ampliamente conforme transcurre su transporte y su maduración, y representa la primer interfase entre el ambiente y el gameto masculino. Alteraciones en la composición del glicocáliz han sido asociadas con infertilidad; esto debido a que se produce una reducción en la presencia de espermatozoides en los túbulos de almacén espermático (TAE) de las hembras, ya que el mecanismo de almacén requiere de una interacción cabeza-cabeza por parte de los espermatozoides, la cual es mediada por los residuos de carbohidratos contenidos en la superficie espermática (Peláez *et al.*, 2011; Sasanami *et al.*, 2013). De igual manera, la interacción huevo-espermatozoide se verá afectada si el espermatozoide no es capaz de entrar o ser almacenado en los TAE. La tasa de liberación espermática por parte de los TAE es dependiente de la topografía de la superficie espermática y una alteración en la proporción de lípidos y carbohidratos de la membrana plasmática produce un decremento en la posibilidad del espermatozoide de ser seleccionado y almacenado en los TAE reduciendo de esta forma la fertilidad (Bongalhardo *et al.*, 2009). Una de las formas para evaluar la integridad de la membrana es realizando la prueba hiposmótica (HOST, hipo-osmotic swelling test), la cual se lleva a cabo exponiendo la muestra de eyaculado a una solución hiposmótica; si la membrana plasmática se encuentra funcional se produce una endosmosis produciendo con esto algunos cambios en la fisionomía espermática. Los principales cambios que se logran distinguir en el espermatozoide es un aumento de tamaño de la cabeza o del cuerpo del espermatozoide, así como un doblez muy notorio de la cola, esto debido a la maleabilidad de la región caudal en comparación con la cabeza (Vázquez *et al.*, 2013). Esta prueba es tan eficaz para proveer información sobre capacidad de fertilización que incluso provee mejor información que algunos parámetros convencionales que se utilizan para evaluar características espermáticas (Zubair *et al.*, 2014).

#### 2.6.1.5 Evaluación de la viabilidad espermática

En la actualidad existen varios métodos de evaluación de la calidad espermática y de la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Algunos de estos métodos son catalogados como poco específicos y otros requieren de instalaciones específicas para su efectiva operación. La eosina-nigrosina es una tinción comúnmente utilizada en los laboratorios y esta tinción permite realizar análisis a las estructuras espermáticas. Cuando estas tinciones son observadas al microscopio de luz, es posible observar el porcentaje de espermatozoides viables, vivos, formados correctamente, no viables e incluso parcialmente dañados (Chalah *et al.*, 1999; Lukaszewicz *et al.*, 2008). Estas mismas tinciones no son capaces de penetrar la membrana plasmática de espermatozoides vivos, pero sí son capaces de penetrar la membrana plasmática de células muertas, evaluando al mismo tiempo la viabilidad espermática, así como la integridad estructural de la membrana. Los espermatozoides vivos permanecerán sin colorante dentro de ellos dando una coloración blanca sobre el fondo azul que proporciona la nigrosina y en el caso de los espermatozoides muertos van a absorber la eosina y se tornan de una coloración rosa (Gliozzi *et al.*, 2003; Tarif *et al.*, 2013).

## **2. HIPÓTESIS**

Las características seminales y espermáticas en el eyaculado de *Gallus gallus domesticus* son diferentes cuando se obtiene con el método de estimulación dorso abdominal en comparación con la técnica de electroestimulación favoreciendo o mejorando las características espermáticas.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Comparar el uso de dos diferentes métodos de obtención de semen en aves sobre las características seminales y espermáticas usando al *Gallus gallus domesticus* como modelo.

### **4.1 Objetivos específicos**

1.- Determinar el efecto de el masaje dorso abdominal y la electroestimulación sobre el tiempo y la cantidad de eyaculado obtenido de *Gallus gallus domesticus*.

2.- Determinar el efecto de la electroestimulación y el masaje dorso abdominal sobre la viabilidad de los eyaculados.

3.- Determinar el efecto de la la técnica de masaje dorso abdominal y la electroestimulación sobre la motilidad espermática del semen obtenido de *Gallus gallus domesticus*.

4.- Determinar el efecto de la técnica de electroestimulación y el masaje dorso abdominal sobre la vitalidad, integridad de la membrana e integridad del acrosoma de los espermatozoides obtenidos de *Gallus gallus domesticus*.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de eyaculado se obtuvieron de gallos (*Gallus gallus domesticus*) alojados en el Parque Recreativo San Jorge. El cual se encuentra en el valle de Juárez, del Municipio de Juárez, localizado en las coordenadas geográficas 31°36'31"N 106°19'13"O y a una altitud de 1,120 metros sobre el nivel medio del mar (INEGI, 2019). La toma de muestras fue autorizada por el comité de bioética de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez del Instituto de Ciencias Biomédicas (dictamen CIEB-2018-1-73). Una vez obtenidas las muestras estas fueron trasladadas al Laboratorio de Nutrición y Reproducción de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez que se localiza dentro del Instituto de Ciencias Biomédicas de dicha universidad para su posterior evaluación.

La colecta de semen se llevó a cabo cada tercer día en los meses de febrero, marzo y abril de 2019, realizando el procedimiento a los cinco individuos que se utilizaron para todo el proceso.

##### 5.1 Especie utilizada

Los ejemplares que se utilizaron correspondían a individuos de *Gallus gallus domesticus*. Se utilizaron cinco individuos de la raza Sweater con una edad promedio de uno a dos años y un peso entre 3.0 a 5.0 kilos (Figura 1). Estos se estaban alojados en jaulas de 5 x 5 m y separados del contacto directo entre uno y otro individuo. La dieta de estas aves comprendió de varios tipos de granos comerciales entre los cuales destacaban sorgo, el cual era intercalado con trigo, así como también se les incluía en la dieta grano de maíz y grano de maíz quebrado, una premezcla de alimento peletizado conocido como alimento de gallinas ponedoras con 17% de proteína bruta y 2850 kg/EM ; ocasionalmente se les ofrecía una premezcla de verduras en los cuales incluía varios tipos de lechuga, tomate, brócoli y alcachofa, de igual forma se les ofreció ocasionalmente frutas como uvas, melón, sandía y fresa. Además, fueron expuestos a horas naturales de luz, durante los meses de febrero y marzo. De la misma manera también tenían agua disponible *ad libitum* las 24 horas de los días en los que se tuvieron a los animales en su recinto.

##### 5.2 Obtención de semen

Previo a la realización del estudio todos los gallos fueron entrenados para lograr obtener eyaculados con contenido espermático. Este entrenamiento constó de realizar la técnica de estimulación dorso abdominal por cuatro días consecutivos por la mañana.



**Figura 1.-** Individuo *Gallus gallus domesticus* del cual se tomaron las muestras de eyaculado. (Fuente: Colección personal Oscar A. González López).

La estimulación se realizó hasta que el animal eyaculara o en caso de no hacerlo hasta un máximo de 90 seg de estimulación continua. Una vez realizada la técnica durante los cuatro días consecutivos se dejó un descanso de dos días para dar por terminada la etapa de entrenamiento.

Para comenzar la técnica de estimulación dorso abdominal, así como la técnica de electroestimulación, primero se retiraron y recortaron las plumas que estaban cerca de la cloaca y se realizó una limpieza con solución salina en dicha zona. Esto con la intención de evitar al máximo la contaminación de las muestras (Figura 2). Las tomas de eyaculado se llevaron a cabo los días martes, jueves y sábado de los meses de febrero, marzo y abril. Las muestras se tomaron de manera continua hasta completar siete repeticiones por individuo tanto para la técnica de estimulación dorso abdominal como para la electroestimulación.

#### 5.2.1 *Técnica de estimulación dorso abdominal*

Para la técnica de estimulación dorso abdominal se realizó primero la limpieza de la zona y se prosiguió realizando un masaje en el dorso del ave pasando la palma de la mano firmemente desde el final de las costillas hasta la base del pigóstilo, produciendo de esta manera la exteriorización de la papila genital. Una vez exteriorizado el órgano copulatorio, se realizó un masaje firme con el dedo índice y el dedo pulgar en las cercanías de la cloaca para producir la eyaculación. El tiempo máximo que se realizaba el estímulo fue de 90 s.



**Figura 2.-** Zona de la cloaca donde se realiza la toma de muestra de eyaculado, así como la zona adyacente a la cloaca la cual debe estar limpia y libre de plumas. (Fuente: Colección personal Oscar A. González López).

Una vez eyaculado el individuo, se colectó la muestra con pipetas Pasteur (Deltalab Barcelona, España) directo de la cloaca y se depositó en tubos calibrados de 2.0 mL safe lock (Eppendorf Ibérica S.L.U. Madrid, España). Con la ayuda de una micropipeta con capacidad de 20  $\mu$ L (Eppendorf Research plus Alemania) se colectó el eyaculado directo del tubo de 2.0 mL, se contabilizó de forma exacta la cantidad eyaculada y se realizó la dilución del eyaculado en el extensor (Bealtsville Poultry Semen Extender, Continental USA) en una dilución 1:1 v/v (Burrows y Quinn, 1936; Mohan *et al.*, 2018). Una vez que la muestra era diluida se depositaba en un termo eléctrico (Cito Warm Water Thaw, Cito Products Inc. Wisconsin, USA), el cual contenía agua calentada a una temperatura sostenida de 38°C y se trasladaba a las instalaciones del Laboratorio de Nutrición y Reproducción de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

### 5.2.2 Técnica de electroestimulación

Para la técnica de electroestimulación primero se manejó al gallo y se colocó fijo con la ayuda de una persona que auxilio en la colección. El manejo y colocación del gallo se realizó sujetando de las patas con una mano y con la otra sujetándolo de las alas, obteniendo con esto la inmovilización. El manejo no se realizó bajo ningún anestésico o sedación, debido a que es un procedimiento indoloro y no se violenta el bienestar del sujeto de estudio (Lierz *et al.*, 2013). La colección del eyaculado se llevó a cabo induciendo una estimulación eléctrica al ave con un electroeyaculador (Folio MX/E/2018/010171, Solicitud MX/u/2018/000080) el cual generaba impulsos eléctricos con una intensidad de corriente eléctrica de hasta 9.0 voltios y hasta 1.0 ampere.



**Figura 3.-** Electroeyaculador utilizado como uno de los tratamientos. (Fuente: Colección personal Oscar A. González López).

El electroeyaculador contó con una vaina que presenta tres electrodos en su parte dorsal separados entre sí por material no conductor como se observa en la Figura 3.

Lo primero que se realizó fue introducir la vaina completa por la cloaca hasta que no se visualizaran los electrodos, entrando por los pliegues cloacales y pasando por proctodeo, urodeo y hasta llegar al coprodeo, asegurando con esto el contacto del electrodo con la pared dorsal de la mucosa.

El protocolo de voltajes se llevó a cabo dando corriente eléctrica continua por un periodo de cinco segundos con descanso de tres segundos entre periodos largos, el voltaje en el primer periodo fue de 4 V y cada dos periodos se elevó un voltio la potencia eléctrica hasta una máxima de 6 V. El procedimiento se repitió hasta que eyaculara el ave o hasta un máximo de 11 periodos (Lierz *et al.*, 2012).

Una vez eyaculado el individuo, se colectó la muestra con pipetas Pasteur (Deltalab Barcelona, España) directo de la cloaca y se depositó en tubos calibrados de 2.0 mL (Safe Lock Eppendorf Ibérica S.L.U. España). Con una micropipeta con capacidad de 20  $\mu$ L (Eppendorf Research Plus, Alemania) se colectó el eyaculado directo del tubo de 2.0 mL, se contabilizó de forma exacta la cantidad eyaculada y se realizó la dilución del eyaculado en el extensor (Bealtsville Poultry Semen Extender, Continental USA) en una dilución 1:1 v/v (Burrows y Quinn, 1936; Mohan *et al.*, 2018). Una vez que la muestra era diluida se depositaba en un termo eléctrico (Cito Warm Water Thaw, Cito Products inc. Wisconsin, USA), el cual contenía agua calentada a una temperatura sostenida de 38°C y se trasladaba a las instalaciones del Laboratorio de Nutrición y Reproducción de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

### **5.3 Viabilidad de las muestras seminales**

Para obtener los resultados de viabilidad de las muestras se contabilizaron las muestras que en el proceso de obtención del eyaculado eran contaminadas ya sea con excremento y orina o con sangre. Cuando la muestra era contaminada con excremento la muestra tomaba una coloración verde, para la contaminación con orina la muestra se tornaba color amarillo y para la contaminación con sangre la muestra se tornaba de un color rojo o rosa. De las muestras totales se obtuvo el número de muestras contaminadas para el análisis de información.

### **5.4 Tiempo de obtención de eyaculado**

En el caso de la estimulación dorso abdominal el tiempo se comenzó a tomar a partir de que se comenzó el primer contacto con el dorso del individuo y terminó hasta que el animal lograra eyacular. En el caso de la electroestimulación, la toma de tiempo se llevó a cabo a partir de que se comienza a emplear la corriente eléctrica del electroeyaculador y se termina hasta que el animal eyacula.

### **5.5 Cantidad de eyaculado**

La medición de la cantidad de eyaculado se realizó en el momento en que eyaculo el individuo al colectarse la muestra con pipetas Pasteur (Deltalab, España) directo de la cloaca y se depositó en tubos calibrados de 2.0 mL (Safe Lock Eppendorf Ibérica S.L.U., España). Posteriormente con la ayuda de una micropipeta con capacidad de 20  $\mu$ L (Eppendorf Research Plus Alemania) se colectó el eyaculado directo del tubo de 2.0 mL, se contabilizó de forma exacta la cantidad eyaculada y se realizó la dilución del eyaculado en el extensor (Bealtsville Poultry Semen Extender, Continental USA) en una dilución 1:1 v/v (Burrows y Quinn, 1936; Mohan *et al.*, 2018).

### **5.6 Evaluación de características espermáticas**

La evaluación de las características espermáticas se determinó tomando la cantidad de 6.0  $\mu$ L de muestra, colocándola en un portaobjetos previamente calentado a 37°C en una termoplatina (Androvision, Minitube Alemania) para posteriormente realizar el análisis de las características espermáticas con el sistema CASA (Androvision, Minitube Alemania). La medición de estas características espermáticas en el sistema CASA se llevó a cabo realizando el análisis de tres campos

distintos y tomando el promedio de estos tres campos. De esta forma se midió concentración, motilidad, motilidad progresiva, motilidad circular, motilidad rápida, motilidad lenta, motilidad local y espermatozoides inmóviles.

### **5.7 Evaluación de viabilidad espermática**

Para llevar a cabo la evaluación de estas características espermáticas se utilizó la tinción eosina-nigrosina Live/dead Semen Stain (Jorvet, Hawarden USA). Se realizaron frotis aplicando sobre una laminilla de 4.0  $\mu$ L de muestra enseguida de 4.0  $\mu$ L de tinción para después con otra laminilla colocada a un ángulo de 45° forzar la mezcla de estas dos deslizándola sobre la primera laminilla, dejando una leve capa de células y tinción. Se dejaron secar sobre una termoplatina (Androvision, Minitube Alemania) a una temperatura de 39°C. La viabilidad y la morfología espermática fueron examinadas bajo el objetivo de aceite de inmersión (100X) con un microscopio de luz (VE-BC1, Velab, México) En cada laminilla teñida se evaluaron 200 células. Los espermatozoides fueron categorizados como células “completamente vivas” (aquellos que no se lograron teñir) y espermatozoides muertos (teñidos en color rosa por efecto de la eosina (Hudson *et al.*, 2016).

### **5.8 Evaluación de la integridad del acrosoma**

Para la evaluación de la integridad del acrosoma se realizó una evaluación con tinción de Giemsa (Hycel, Mexico. Catalogo 6303). La laminilla se preparó colocando 5.0  $\mu$ L de muestra seminal la cual fue secada y fijada con formaldehído diluido al 5% p/v (Hycel, México. Catalogo 197) por 30 min. Las laminillas una vez fijadas se tiñeron con Giemsa permaneciendo sumergidas en la solución por 90 min. En cada laminilla teñida se evaluaron 200 células, las cuales se clasificaron como con el acrosoma normal, las cuales resultaron teñidas del acrosoma de una forma uniforme y con el acrosoma dañado, los cuales fueron espermatozoides no teñidos (Rakha *et al.*, 2018).

### **5.9 Evaluación de la integridad de la membrana**

Para la evaluación de la integridad de la membrana se utilizó la prueba hiposmótica, en la cual se preparó una solución, agregando 1.0 gr de citrato de sodio a 100 mL de agua destilada. La muestra de semen (25  $\mu$ L) se mezcló con 500  $\mu$ L de la solución y se incubaron a 37°C por 30 min. Una gota de la solución incubada se colocó sobre una laminilla previamente calentada a 37°C, se fijó

con glutaraldehído al 2%, se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio. Los espermatozoides que mostraron inflamación de la cabeza y de la cola se clasificaron como normales y con la membrana plasmática intacta, así como aquellos que no presentaran ningún tipo de inflamación se clasificaron como anormales y con su membrana plasmática dañada. Se realizó un conteo de 200 células en cuatro campos separados y los resultados fueron expresados en porcentaje (Santiago-Moreno *et al.*, 2009; Rakha *et al.*, 2016).

### 5.10 Análisis estadístico

Las variables que se utilizaron en el análisis estadístico fueron las siguientes: para las variables independientes se utilizaron los tratamientos aplicados a las unidades experimentales, los cuales fueron la técnica de electroestimulación y la técnica de estimulación dorso abdominal. Para las variables dependientes se utilizaron las variables de tiempo (expresado en segundos), cantidad de eyaculado (expresado en  $\mu\text{L}$ ) concentración (expresado en millones) y motilidad progresiva, motilidad circular, motilidad lenta, motilidad rápida, inmóviles, integridad de la membrana, integridad del acrosoma y viabilidad espermática y seminal (expresados en porcentaje).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$y_{ij}$  = Puntuación obtenida en la variable dependiente por el sujeto  $i$  bajo el  $j$ -ésimo nivel de la variable de tratamiento.

$\mu$  = Media común a todas las observaciones.

$T_i$  = Componente específico del tratamiento de las observaciones al sujeto  $i$

$\epsilon_{ij}$  = Componente de error específico asociado al sujeto  $i$  y al  $j$ -ésimo nivel de la variable de tratamiento.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SAS 9.4 (Inst. Cary, NC, USA). El procedimiento utilizado para realizar el análisis con el sistema SAS fue PROC GLM, resultando con esto la aleatorización de los datos, evitando de esta forma sesgos en las comparaciones, derivados de la asignación de tratamientos a las mejores o peores unidades experimentales. Estos análisis estadísticos se realizaron con un análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significancia considerado para todas las evaluaciones fue  $P < 0.05$ . Todos los datos que arrojaron las variables de intentos fallidos/efectivos, muestras contaminadas, motilidad, motilidad progresiva, motilidad circular, motilidad rápida, motilidad lenta, motilidad local, integridad del acrosoma, integridad de la membrana y viabilidad se transformaron en seno inverso o  $\text{sen}^{-1}$  interpretándose en datos porcentuales.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las aves utilizadas en este estudio probaron ser eficientes para la realización del experimento, toda vez que se encontró contenido espermático en sus eyaculados. Esto sucedió con las dos distintas técnicas de obtención de eyaculado.

Para poder realizar una evaluación completa de ambas técnicas de obtención de eyaculado es necesario realizar una evaluación sobre todas las características evaluadas en el experimento. Ya que el realizar una conclusión con solo una de las variables sería caer en un error de evaluación, debido a que se deben tomar en cuenta factores tan importantes como la contaminación de la muestra hasta características espermáticas como lo es la motilidad espermática. De esta manera, en el Cuadro 1 se puede observar que estadísticamente existe una diferencia estadísticamente significativa sobre la cantidad de muestras contaminadas, por lo tanto, estos datos indican que una de las ventajas de la electroestimulación es el hecho de que las muestras están menos propensas a ser contaminadas ya sea con orina, excremento o inclusive sangre.

En cuanto al porcentaje obtenido en el apartado de intentos efectivos/fallidos, se observa que no existe diferencia significativa al igual que en el apartado de tiempo, en el cual tampoco se observan diferencias significativas. Estas igualdades son importantes, ya que esto demuestra que el tiempo que puede tomar el obtener la muestra con la estimulación dorso abdominal no va a ser diferente si se utiliza la electroestimulación. Dentro de estas variables en la cual se puede observar que no existe una diferencia significativa ( $p=0.05$ ) es la del tiempo que se requiere para obtener el eyaculado entre una técnica y otra, sin embargo habría que tener en cuenta que para la técnica de estimulación dorso abdominal se requiere de un periodo de entrenamiento para que el individuo otorgue muestras viables, ya que las primeras muestras obtenidas de la estimulación cloacal no arrojaron espermatozoides debido a que no estaban acostumbrados a que se les realizara el manejo para obtener dichas muestras, así como se ha demostrado en otras especies de aves no domesticas como la gallina de guinea *Numida meleagris* o la grulla canadiense *Antigone canadensis* (Gee *et al.*, 2004) y en especies domesticas como el pavo común *meleagris gallopavo* y el gallo *gallus gallus domesticus* (King *et al.*, 2002).

En el Cuadro 1 se puede observar una diferencia en la variable de volumen de eyaculado, la cual puede deberse a que el estímulo provocado por la estimulación eléctrica produce un efecto sobre los ductos deferentes del individuo, mismos que son los que producen el líquido seminal en conjunto con los testículos y el epidídimo (Santiago-Moreno *et al.*, 2011), funcionando este último, además, como reservorio de los espermatozoides maduros en aves de corral (Razi *et al.*, 2010).

**CUADRO 1.** Efecto de la técnica de extracción de eyaculado sobre porcentaje de efectividad, contaminación de muestras, tiempo, cantidad y concentración.

	Estimulación dorso abdominal	Electroestimulación
Intentos efectivos/fallos	35/5 (87.5%)	37/3 (92.5%)
Contaminados	22/40 (55%) <sup>a</sup>	12/40 (30%) <sup>b</sup>
Tiempo (segundos)	38 ±17.65	38.2 ±25.83
Volumen (mL)	0.16 ±0.09 <sup>a</sup>	0.23 ±0.13 <sup>b</sup>
Concentración (mill/mL)	187 ±.07 <sup>a</sup>	149 ± 0.08 <sup>b</sup>

<sup>a b</sup> Letras distintas en diferentes columnas indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

Por lo tanto, la explicación a esta diferencia es la presencia de líquido transparente, este contenido es imposible de evitar ya que proviene de la zona paracloacal, lugar donde se lleva a cabo la estimulación, siendo entonces normal encontrar las muestras con este líquido, además de ser muy variable la presencia o no de este líquido, como ya se ha demostrado en estudios anteriores en aves de corral (Riaz *et al.*, 2010). Esta situación puede compararse con lo que sucede en algunos mamíferos como los caprinos (Jimenez-Rabadan *et al.*, 2012) y los ovinos (Marco-Jimenez *et al.*, 2008) en donde se observa mayor cantidad de eyaculado cuando se utiliza la técnica de electroestimulación en comparación con el uso de vagina artificial, siendo esta varianza producida por la expulsión del contenido de las glándulas accesorias que son estimuladas con la electricidad. De esta forma la cantidad de eyaculado producido por los ductos deferentes fue mayor en la técnica de electroestimulación en comparación con la técnica de masaje dorso abdominal.

Asimismo, una de las variables en las que también se observó una diferencia significativa (P<0.05) fue la concentración espermática, la cual fue mayor en la técnica de estimulación dorso abdominal en comparación con la técnica de electroestimulación. Esta diferencia puede deberse a la composición seminal de la muestra como se ha demostrado anteriormente en gallos de pelea siameses (*Gallus gallus domesticus*) en los que la obtención de semen por electroestimulación aumenta la cantidad de líquido seminal, afectando la concentración de espermatozoides en el eyaculado (Kanatnayont *et al.*, 2012). No obstante que la cantidad total de espermatozoides por eyaculado es aproximadamente la misma en las dos técnicas, pero teniendo en cuenta que la cantidad de líquido seminal es mayor en las muestras obtenidas por electroestimulación, esto produce una dilución en la cantidad de espermatozoides totales en cada muestra

En el Cuadro 2 se ve el efecto de la técnica de obtención de eyaculados en los porcentajes de motilidad. Esta diferencia estadística que se observa en la motilidad y la motilidad progresiva puede ser debido a que los espermatozoides son vulnerados cuando son obtenidos vía la electroestimulación, esto debido al cambio en el contenido del líquido seminal. El contenido del líquido seminal es bajo en calcio, con una concentración de menos de 1.0 mM de  $\text{Ca}^+$ , además de una concentración de 30-40 mM de  $\text{K}^+$  y aproximadamente 80 mM de glutamato. En contraste el plasma sanguíneo contiene 5.0 mM de  $\text{Ca}^+$ , 5.0 mM de  $\text{K}^+$  y 0.2-0.3 mM de glutamato (Froman y Kirby, 2004). Teniendo en cuenta que el líquido transparente obtenido en las muestras tiene como principal componente el plasma sanguíneo (Lake, 1957), se deduce que este puede ser el responsable de la baja motilidad ya que al realizar la obtención del eyaculado por método de electroestimulación se produce un exceso de líquido transparente en el eyaculado. Puede incluso aumentar el volumen de eyaculado, provocando además la remoción de una gran variedad de proteínas que se acumularon durante el proceso de maduración epididimal y en el proceso de expulsión, siendo que estas proteínas tienen un rol muy importante en la capacitación espermática, así como la tiene en la fertilización, sugiriendo de esta forma que la remoción de proteínas plasmáticas, así como el aumento en el consumo de  $\text{Ca}^+$  y eliminación de  $\text{K}^+$  producido por el exceso de líquido transparente modifica las características funcionales de los espermatozoides dañándolos y disminuyendo con esto la calidad del eyaculado de las aves (Siudzinka y Lukazewicz, 2008).

Así mismo, la presencia del  $\text{Ca}^+$  es clave para varias funciones espermáticas como la regulación de la motilidad y la reacción acrosomal, pero un exceso en la presencia de este ion puede ser detrimental para los espermatozoides (Nguyen *et al.*, 2016). Esto debido a que la electroestimulación varía en comparación con una eyaculación fisiológica, así como la composición seminal, induciendo cambios en el espermatozoide provocando que disminuya la resiliencia de la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide, disminuyendo así la calidad del semen en aves, así como se demostró en un estudio realizado en aves, grupo de vertebrados en el que se ha demostrado que el eyaculado viene mezclado con un líquido transparente (Riaz *et al.*, 2010). Este fluido transparente es derivado en parte por los cuerpos vasculares paracloacales, entrando a la cloaca vía los pliegues linfáticos, pudiendo afectar de esta manera la concentración y la motilidad espermática debido a la concentración de iones que contiene (Froman y Kirby, 2004; Pizzari *et al.*, 2007).

Ya que los espermatozoides se ven afectados negativamente por la eliminación de altas concentraciones de  $\text{K}^+$ , así como la disminución en la concentración de selenio, produciendo inestabilidad en el espermatozoide y disminuyendo la calidad de su motilidad (Aghaei *et al.*, 2010).

**CUADRO 2.** Efecto de la técnica de extracción de eyaculado sobre características espermáticas del semen de *Gallus gallus domesticus*

	Estimulación dorso abdominal	Electroestimulación
Motilidad (%)	94.34 ±10.01 <sup>a</sup>	85.96 ±19.57 <sup>b</sup>
Motilidad progresiva (%)	89.88 ±14.32 <sup>a</sup>	80.13 ±23.35 <sup>b</sup>
Motilidad circular (%)	13.85± 12.91	9.11± 8.88
Motilidad rápida (%)	58.96± 23.49	50.92± 24.56
Motilidad lenta (%)	16.49± 13.94	20.10± 12.55
Motilidad local (%)	4.54± 5.86	5.84± 4.88

<sup>a b</sup> Letras distintas en diferentes columnas indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Anteriormente se ha demostrado que las deficiencias en selenio provocan disminución en la fertilidad en aves de corral, así como impiden el buen rendimiento espermático. Las selenoproteínas contribuyen a la estabilidad del espermatozoide, por lo tanto, cuando existe deficiencia de selenio la calidad del eyaculado disminuye (Khan, 2011). Otro de los minerales que se puede ver afectado es el calcio, el cual se ha demostrado en aves su importancia en varias funciones del metabolismo espermático como lo es la motilidad, capacitación y maduración (Kanayinji y maeda, 2010).

En este mismo Cuadro 2 se puede observar que no existieron diferencias en las variables de motilidad circular, motilidad rápida, motilidad lenta y motilidad local. Estas características espermáticas pueden verse afectadas cuando existe un ambiente de competencia y repeticiones consecutivas sin descanso programado (Pizzari, 2007), sin embargo, en el proceso controlado en el que se llevó a cabo la investigación es posible que la calidad de las muestras fuera constante.

En el Cuadro 3 se observan los resultados de la comparación de integridad del acrosoma, integridad de la membrana y vitalidad espermática, en los cuales no se observa ninguna diferencia significativa (P<0.05). Sin embargo, a pesar de que la lipoperoxidación comienza incluso antes de que el animal logre eyacular (Partyka *et al.*, 2007), en ninguna de las dos técnicas de obtención de eyaculado que se realizaron en esta investigación se observó que se produjera mayor daño a la integridad de la membrana del espermatozoide. El daño que se puede llegar a observar en la membrana plasmática se puede presentar ya que el contenido de fosfolípidos y la permeabilidad de la membrana pueden presentar un daño significante con la presencia de plasma seminal y el contenido de diferentes iones después de 48 horas de almacenamiento. Mientras que el daño producido al contenido de ATP, así como la disminución de la fertilidad, ocurren a las 24 h después de su almacenamiento por la misma presencia del plasma seminal (Douard *et al.*,2005).

**CUADRO 3.** Efecto de la técnica de extracción de eyaculado sobre la integridad de la membrana, integridad del acrosoma y viabilidad espermática en *Gallus gallus domesticus*.

	Estimulación dorso abdominal	Electroestimulación
Membrana intacta (%)	98.30 ±1.46	98.78 ±1.17
Viable (%)	96.48 ±3.21	96.26 ±3.08
Integridad del Acrosoma (%)	98.4 ±1.09	98.17 ±1.98

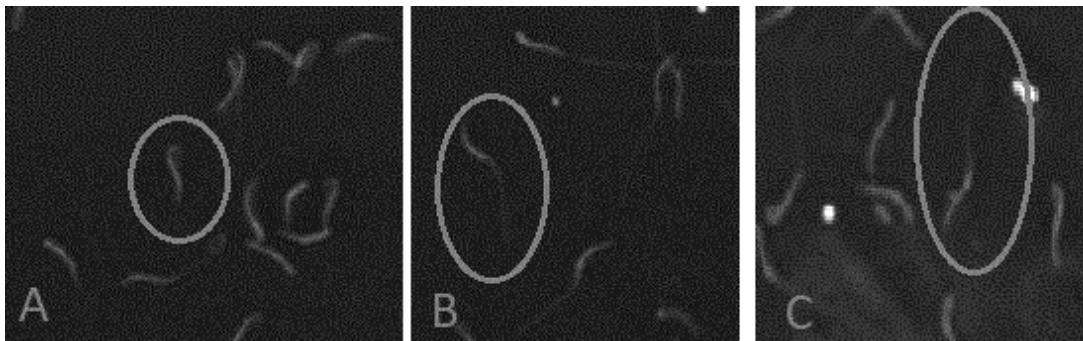
No se encontró diferencia estadística (P<0.05)

Por lo tanto, en este estudio no se observó ninguna diferencia entre las técnicas de obtención de eyaculado que se utilizaron, ya que en ambas técnicas demostraron ser efectivas para mantener la membrana espermática integra.

En la Figura 4 se observan las reacciones encontradas con la técnica hiposmótica, en la cual se distinguen las diferentes reacciones que tuvieron varios espermatozoides a la solución a la que fueron expuestos. Las muestras que se consideraron como efectivas son aquellas en las que se visualizaban en el microscopio de contraste de fases las modificaciones que provocaba la reacción. Las reacciones observadas fueron el doblez de la cabeza en forma de horquilla o inflamación de la cabeza, inflamación del cuello y cola o el mismo doblez de la cola (Santiago-Moreno *et al.*, 2009; Valverde y Madrigal, 2018). Por lo tanto, se contabilizaba el espermatozoide como positivo a prueba hiposmótica (lo cual indica que la membrana esta integra), a todo aquel que presentó cualquier reacción mencionada anteriormente. La integridad de la membrana puede llegar a dañarse cuando existe un exceso de peroxidación lipídica, ya que se promueve la cadena de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como también provoca cambios en la fluidez de la membrana, pérdida de la compartimentalización y daño en la membrana (Partyka *et al.*, 2011). De esta manera se observa en el Cuadro 3 que no existe diferencia estadística entre ninguna de las técnicas utilizadas para esta variable. Los resultados obtenidos demuestran que ambas técnicas pueden ser utilizadas sin el riesgo de que se pueda dañar la membrana espermática. Así como también en la variable de integridad de la membrana, se observa en el Cuadro 3 que no existe diferencia significativa (P<0.05) en la comparación entre técnicas de obtención de eyaculado.

En la Figura 5 se observan las reacciones encontradas con la técnica de eosina-nigrosina, en la cual se distinguen las distintas reacciones que tuvieron los espermatozoides a la solución a la que fueron expuestos. Bajo el microscopio con el objetivo 100X se pueden observar el porcentaje de espermatozoides viables o muertos. Los espermatozoides viables y desarrollados correctamente

poseen una membrana plasmática intacta ya que no permiten la penetración de la eosina. Bajo el microscopio estos espermatozoides se observan de una coloración blanca sobre un fondo morado que corresponde a la nigrosina. Sin embargo, aquellos espermatozoides que no fueron teñidos con el colorante de nigrosina eran contabilizados como vivos o muertos, los vivos fueron aquellos que además de no teñirse con la nigrosina tampoco se teñían con la eosina (Łukaszewicz *et al.*, 2008).



**Figura 4.-** Clases de reacción espermática de *Gallus gallus domesticus* con la prueba hiposmótica: A) Cabeza doblada; B) Cola doblada; C) Sin reacción.

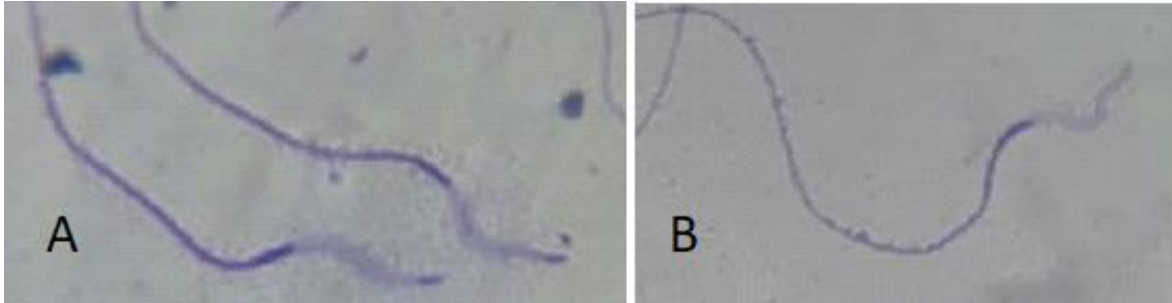
Los espermatozoides muertos presentaban un daño en su membrana plasmática ya que permitían la entrada de la eosina, tiñéndose de una coloración rosa. En esta variable tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre una técnica y otra, lo que nos indica que ambas técnicas pueden ser utilizadas sin el riesgo de aumentar o disminuir la posibilidad de provocar muerte en los espermatozoides. Por lo tanto, los resultados obtenidos implican que la integridad de la membrana espermática se encuentra normal debido probablemente al equilibrio de los fluidos que se encuentran dentro de los compartimentos espermáticos y el ambiente externo, creando estos un ambiente idóneo para poder conservar la viabilidad del espermatozoide (Santiago-Moreno *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Reacciones espermáticas observadas en el microscopio a muestras de eyaculado de *Gallus gallus domesticus* a los cuales se les realizó la tinción de eosina-nigrosina donde encerrados

en un círculo se observan aquellos espermatozoides teñidos de color rosa, por acción de la eosina sobre los espermatozoides muertos.

En la Figura 6 se observan los resultados obtenidos con la tinción de Giemsa para la evaluación de la integridad del acrosoma espermático. La principal reacción observada en el espermatozoide teñido con Giemsa fue la de la zona del acrosoma, estructura que se encuentra en la punta de la cabeza del espermatozoide.



**Figura 6.** Reacciones espermáticas observadas en el microscopio a muestras de eyaculado de *Gallus gallus domesticus* a los cuales se les realizó la tinción de Giemsa: A) Acrosoma intacto teñido uniformemente B) Acrosoma dañado y no teñido.

En el caso de que el acrosoma logre captar la tinción uniformemente se considera que el acrosoma se encuentra integro. En el caso de no teñirse esa zona del espermatozoide entonces se considera como acrosoma dañado. Por lo tanto, los resultados encontrados en este estudio no mostraron ninguna diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre los resultados de una técnica de obtención de eyaculado y otra, ya que ambas técnicas resultaron no tener un impacto negativo en la integridad del acrosoma.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio lograron obtener diferencias en algunas variables de suma importancia para la reproducción aviar. En la parte de las características seminales se observó que la técnica de electroestimulación tiene menor posibilidad de ser contaminada, ya que presenta menor porcentaje de contaminación de la muestra en comparación con la estimulación dorso abdominal. Del mismo modo, la técnica de electroestimulación también demostró ser capaz de obtener mayor volumen de eyaculado que aquel obtenido por la técnica de estimulación dorso abdominal. En la parte de las características espermáticas, también se lograron observar diferencias en tres de las variables evaluadas, las cuales son características importantes para determinar la calidad espermática. Una de ellas es la motilidad, en la cual se observó que la técnica de estimulación dorso abdominal proporciona porcentajes más elevados que los que otorga la electroestimulación. La otra es la concentración espermática, la cual se demostró que fue mayor en la técnica de estimulación dorso abdominal en comparación con los resultados obtenidos con la técnica de electroestimulación. También se demostró que la técnica de estimulación dorso abdominal proporciona mayores porcentajes de motilidad progresiva que los obtenidos con la técnica de electroestimulación.

La técnica de electroestimulación puede ser una alternativa eficiente para obtener eyaculados de calidad inseminante para otro tipo de aves no domesticas como las galliformes, ya que la cantidad y la concentración de los eyaculados obtenidos pueden llegar a ser utilizados para inseminar artificialmente o incluso para intentar realizar alguna técnica de reproducción asistida como lo es la criopreservación. Es importante tener en cuenta que en aves no domesticas la técnica de masaje dorso abdominal conlleva dificultades a la hora de obtener la muestra ya que es más complicado lograr un entrenamiento. El no requerir de un periodo de entrenamiento, hace a la técnica de electro eyaculación una técnica apropiada para obtener eyaculados de aves no domésticas.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdhul-Rhaman I. I., F. Y. Obese, J. E. Robinson. 2016. Spermatogenesis and cellular associations in the seminiferous epithelium of Guinea cock (*Numida meleagris*). *Can. J. Anim. Sci.* 97: 241-249.

Agahei A., S. Tabatabaei, M. Nazari. 2010. The correlation between mineral concentration of seminal plasma and spermatozoa motility in rooster. *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 1476-1478.

Ahammad M.U., C. Nishino, H. Tatemoto, N. Okura, Y. Kawamoto, S. Okamoto, T. Nakada. 2011. Maturational changes in motility, acrosomal proteolytic activity, and penetrability of the inner perivitelline layer of fowl sperm, during their passage through the male genital tract. *Theriogenology.* 76:1100-1109

Ahammad M. U., C. Nishino, H. Tatemoto, N. Okura, S. Okamoto, Y. Kawamoto, T. Nakada. 2013. Acrosome reaction of fowl sperm: Evidence for shedding of the acrosomal cap in intact form to release acrosomal enzyme. *Poult. Sci.* 92: 798-803.

Aire T. A. 2014. Spermiogenesis in birds. *Spermatogenesis.* 4: 3

Alvarez M, J. Tamayo-Canul, C. Martínez-Rodríguez, E. López-Ureña, S. Gomes-Alves, L. Anel, F. Martínez-Pastor, P. de Paz. 2012. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Anim. Reprod. Sci.* 132: 145-154.

Andrade-Rojas F. T. 2017. On the Origins of the Semen Analysis: A Close Relationship with the History of the Reproductive Medicine. *Jour. Hum. Reprod. Sci.* 10: 242-255.

Andraszek K., D. Banaszewzka, B. Biesiada-Drzazga. 2018. The use of two staining methods for identification of spermatozoon structure in roosters. *Poult. Sci.* 0: 1-7

Anzar M., L. He, M. M. Buhr, T. G. Kroetsch, K. P. Pauls. 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biol. Reprod.* 66: 354-360.

Ashizawa K., G. J. Wishart, A. R. Ranasinghe, S. Katayama, Y. Tsuzuki. 2004. Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. *Repro.* 128: 783-787.

Ashizawa K., R. Sano. 1990. Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the male reproductive tract of the domestic fowl, *gallus domesticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2: 297-301

Burrowclough G., J. Cracraft, J. Klicka, R. Zin. 2016. How many kinds of birds are there and why does it matter. *Plos one.* 11(11).

Birkhead T. R., J. G. Martinez, T. Burke, D. P. Froman. 1999. Sperm motility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proc. R. Soc. B.* 266: 1759-1764.

Biswaws A., J. Mohan, H. V. H. Sastry. 2009. Effect of higher dietary vitamin E concentrations on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. *Poult. Sci.* 50: 733-738

Blanch, E., C. Tomás, L. Casares, E. Gómez, S. Sansano, I. Giménez, L. Mocé. 2014. Development of methods for cryopreservation of rooster sperm from the endangered breed “Gallina Valenciana de Chulilla” using low glycerol concentrations. *Theriogenology.* 81: 1174-1180.

Blanco J., D. Wildt, U. Höfle, W. Voelker, A. Donoghue. 2009. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation for endangered avian species. *Theriogenology,* 79: 200-213.

Blesbois E., I. Grasseau, F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reprod.* 129: 371-378.

Blesbois E., F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzine, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerelle, P. Rault, M. Tixier-Boichard. 2006. Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poult. Sci.* 86:555-564.

Blesbois E., I. Grasseau, F. Seigneurin, S. Mignon-Grasteau, M. Saint Jalme, M. M. Mialon-Richard. 2008. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology.* 69: 252-261.

Blesbois E. 2011. Freezing avian semen. *Avian Biology Reserve.* 4: 52-58.

Bongalhardo D. C., S. Lesson, M. M. Buhr. 2009. Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. *Poult. Sci.* 88: 1060-1069.

Borziak K., A. Álvarez-Fernández, T. L. Karr, T. Pizarri, S. Dorus. 2013. The Seminal fluid proteome of the polyandrous Red junglefowl offers insights into the molecular basis of fertility, reproductive ageing and domestication. *Sci. Rep.* 6: 1-15.

Broekhuijse M., E. Šoštarić, H. Feitsma, B. Gadella. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J. Anim. Sci.* 90:779-789.

Bublath A., D. Fischer, S. Bruslund, H. Schneider, S. Meinecke-Tillmann, A. Wehrend, M. Lierz. 2017. Seasonal and gender-specific variations in semen availability and semen characteristics in large parrots. *Theriogenology*. 91: 82-89.

Burrows W., J. Quinn. 1936. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult. sci.* Vol 16: 19-24.

Chalah T., F. Seigneurin, E. Blesbois, J. P. Brillard. 1999. In Vitro Comparison of Fowl Sperm Viability in Ejaculates Frozen by Three Different Techniques and Relationship with Subsequent Fertility in Vivo. *Cryobiology*. 39: 185-191

Chelmonska B., A. Jerysz, E. Lukaazewicz, A. Kowalczyk, I. Maleky. 2008. Semen collection from Japanese Quail (*Coturnix japonica*) using a Teaser Female. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 32: 19-24.

Cheng F. P., T. J. Guo, J. T. Wu, T. E. Lin, P. J. F. Ursem, B. Colenbrander, H. P. Fung. 2002. Annual Variation in Semen Characteristics of Pigeons (*Columba livia*). *Poult. Sci.* 81: 1050-1056.

Clement P., J. Bernabe, H. K. Kia, L. Alexander, F. Guiliano. 2006. D<sub>2</sub>-Like Receptors Mediate the Expulsion Phase of Ejaculation Elicited by 8-Hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetralin in Rats. *J. pharmacol. Exp Ther.* 316: 830-834.

Cornwallis C. K., E. A. O'Connor. 2009. Sperm: seminal fluid interactions and the adjustment of sperm quality in relation to female attractiveness. *Proc. R. Soc. B.* 276: 3467-3475.

DeMatteo K. E., K. L. Karagiannis, S. Cheryl, M.S. Macek, T. L. Snyder, A. M. Tieber, P. G. Parker. 2004. Semen collection and artificial insemination in the common piping guan (*Pipile cumanensis cumanensis*): potential applications for cracidae (aves: galliformes). *J. Zoo. Wild. Med.* 35: 447-458.

Doudard V., D. Hermier, C. Labbe, M. Magistrini, E. Blesbois. 2005. Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during in vitro storage. *Theriogenology*. 63: 126-137.

Du Plessis L., J. Soley. 2014. Light microscopic features and morphometry of sperm in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Theriogenology*. 81. 203-209.

Fasel N., F. Helfestein, S. Buff, H. Richner. 2015. Electroejaculation and semen buffer evaluation in the microbat *Carollia perspicillata*. *Theriogenology*. 83:904-910.

Frediaini M., F. Guida, P. Salgado, D. Goncalves, M. Blank, G. Novaes, R. Pereira. 2019. Semen collection by electro-stimulation in a variety of birds orders. *Theriogenology*. 140-151.

Froman D. P., A. J. Feltmann, 2005. Fowl (*Gallus domesticus*) Sperm Motility Depends Upon Mitochondrial Calcium Cycling Driven by Extracellular Sodium. *Biol. Rep.* 72: 97-101.

Froman D. P., J. D. Kirby. 2004. Sperm Mobility: Phenotype in Roosters (*Gallus domesticus*) Determined by Mitochondrial Function. *Biol. Rep.* 72: 562-567.

Fukui D., M. Nagano, R. Nakamura, G. Bando, S. Nakata, M. Kosuge, H. Sakamoto, M. Matsui, Y. Yanagawa, Y. Takahashi. 2013. The effects of frequent electroejaculation on the semen characteristics of a captive Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). J. Rep. Dev. 59(5); 491-495.

Fussell E., J. Roussel, C. Austin. 1967. Use of the rectal probe method for electrical ejaculation of apes, monkeys and a prosimian. Lab. Anim. Care. 17(5).528-30.

Garcia-Herreros. 2016. Sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and Guinea fowl (*Numida Meleagris*). Asian J. Androl. 18: 889-894.

Gee G., H. Bertschinger, A. Donoghue, J. Blanco, J. Soley. 2004. Reproduction in non domestic birds: Physiology, Semen Collection, Artificial insemination and Cryopreservation. Avian Poult. Biol. Rev. 15(2). 47-101.

Getachew T. 2016. A review article of artificial insemination in poultry. World's Vet. J. 6(1);25-33.

Glizzoli T. M., F. Luzi, S. Cerolini. 2003. Assessment of sperm viability in boar, rabbit and rooster: a modification of the fluorometric ethidium bromide exclusion procedure. Theriogenology. 60:635-645.

Hamamah S., G. Jean-Luc. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. Hum. Reprod. 13: 20-30.

Hemmings N., T. R. Birkhead. 2015. Polyspermy in birds: sperm numbers and embryo survival. Proc. R. Soc. B. 282: 1-6.

Hudson G., A. Omprakash, K. Premavalli. 2016. Effect of semen diluents, dilution rates and storage periods on live and abnormal spermatozoa of pearl guinea fowls. Asian J. Anim. Vet. Adv. 11(7). 411-416.

Jiang X., X. Wang. 2004. Cytochrome c-mediated apoptosis. Annu. Rev. Biochem. 73:87-106.

Jiménez- Rabadán P., A. J. Soler, M. Ramón, O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, M. Iniesta-Cuerda, M. R. Fernández-Santos, V. Montoro, M. D. Pérez-Guzmán, J. J. Garde. 2012. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. Anim. Rep. Sci. 167: 103-108.

Jimenez-Rabadan P., M. Ramón, O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, E. del Olmo, A. Bisbal, M. R. Fernández-Santos, M. D. Pérez-Guzmán, J. J. Garde, A. J. Soler. 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. Anim. Rep. Sci. 132: 88-95.

- Juarez-Caratachea A., S. Jiménez-Aguilar, E. Gutiérrez-Vázquez, J. C. Segura-Correa. 2018. Efecto de la edad sobre la calidad del semen en gallos rhode island rojos. *Actas iberoamericanas en conservación animal*. 11: 11-18
- Kadhem A. Z. 2014. The cycle event of spermatogenesis and spermiogenesis in the testes of indigenous duck (*Anas platyrhynchos*). *Bas. J. Vet. Res.* 1: 16-22.
- Kanatinayont N., K. Kornkaewrat, P. Suthanmapinunt, A. Pinyopummin. 2012. Effect of Semen Collection Techniques on Semen Quality and Sperm Motility Parameters in Siamese Fighting Cock (*Gallus gallus*). *Thai. J. Vet. Med.* 42: 439-445.
- Kanyinji F., T. Maeda. Additional dietary calcium fed to Barred Plymouth Rock roosters reduces blood cholesterol, elevates seminal calcium, and enhances sperm motility, thermo-tolerance and cryosurvivability. *Anim. Rep. Sci.* 120: 158-165.
- Khan R. U., R. Zia-ur, I. Javed, F. Muhammad. 2012. Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders. *Anim. Rep. Sci.* 135: 85-90.
- Kharayat N. S., G. R. Chaudhary, R. Katiyar, B. Balmurugan, M. Patel, S. Uniyal, M. Raza, G. K. Mishra. 2016. Significance of Artificial Insemination in Poultry. *J. Vet. Sci. Technol.* 5: 15-19.
- King L., J. P. Brillard, M.R. Bakst, A. M. Donoghue. 2002. Segregation of spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens. *Reproduction*. 123(1);79-86.
- Lacy C. 2000. Considering threats to the viability of small populations using individual-based models. *Ecol. Bull.* 48:39-51.
- Lake P. E. 1957. The male reproductive tract of the fowl. *J. Anat.* 91: 116-129.
- Lamont M. 2009. Conservation introduction: a potential tool for galliform conservation management?. *Int. J Gallif. Cons.* 1:63-71.
- Larsen L., T. Scheike, T. Jensen, J. Bonde, E. Ernst, N. Hjollund, Y. Zhou, N. Skakkebak, A. Giwercman. 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictor for fertility for men from the general population. *Hum. Rep.* 15(7).1562-1567.
- Leon-quinto T., M. Simon, R. Cadenas, J. Jones, F. Martinez-Hernandez, S. J. Moreno, A. Vargas, F. Martinez, B. Soria. 2009. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Anim. Rep. Sci.* 112 (3-4);347-361.
- Lierz M., M. Reinschmidt, H. Müller, M. Wink, D. Neumann. 2013. A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). *Sci Rep.* 3: 1-8.

Liu J., Y. Song, K. M. Cheng, F. G. Silversurfer. 2010. Production of Donor-Derived Offspring from Cryopreserved Ovarian Tissue in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Biol. Rep.* 83: 15-19.

Lüpold S., J. Wistuba, O. S. Damm, J. W. Rivers, T. R. Birkhead. 2011. Sperm competition leads to functional adaptations in avian testes to maximize sperm quantity and quality. *Reproduction.* 141: 595-605.

Lukaszewicz E., A. Jerysz, A. Partyka, A. Siudzinska. 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. *Res. Vet. Sci.* 85:583-588.

Madeddu M., F. Berlinguer, M. Ledda, G. Leoni, V. Satta, S. Succu, A. Rota, V. Pasciu, A. Zinellu, M. Muzzeddu, C. Carru, S. Naitana. 2009. Ejaculate collection efficiency and post-thaw semen quality in wild-caught Griffon vultures from the Sardinian population. *Rep. Biol. Endo.* 7:1-18.

Marco-jimenez F., J. Vicente, M. Viudes-de-Castro. 2008. Seminal Plasma composition from Ejaculates Collected by Artificial Vagina and Electroejaculation in Guirra Ram. *Rep. Dom. Anim.* 43:403-408.

Marzoni M., A. Castillo, R. Chiarini, I. Romboli. 2003. Comparison of different extenders for holding pheasant semen. *Ital. J. Anim. Sci.* 2:184-186.

Menges S., D. Altomare, J. Testa. 2010. FAS-Associated Factor 1 (FAF1): diverse functions and implications for oncogenesis. *Cell cycle.* 8(16);2528-2534.

Mohan J., S. Sharma, G. Kolluri, K. Dhama. 2018. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. *World's Poult. Sci. Assoc.* 74:1-14.

Nguyen T. M., A. Duittoz, C. Praud, Y. Combarrous, E. Blesbois. 2016. Calcium channels in chicken sperm regulate motility and the acrosome reaction. *FEBS.* 283: 1902-1920.

Palmer C. W., L. F. C. Brito, A. A. Arteaga, L. Söderquist, Y. Persson, A. D. Barth. 2005. Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Anim. Rep. Sci.* 87: 25-31.

Paluch J., T. Slanina, P. massányi, R. Starwars. 2013. The effect of in vitro semen storage temperature and age of males on spermatozoa motility parameters of turkeys semen. *J. Microbiol., Biotechnol. Food Sci.* 2: 1642-1649.

Partyka, A., A. Jerysz, and P. Pokorny. 2007. Lipid peroxidation in fresh and storage semen of Green-legged partridge. *EJPAU.* 10: 1-9.

Partyka A., W. Nizanski, E. Lukaszewicz. 2010. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology.* 74: 1019-1027.

- Parodi J. 2013. Motility, viability, and calcium in the sperm cells. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60: 65-71
- Peláez J., D. C. Bongalhardo, J. A. Long. 2011. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poultry Science.* 90: 435-443.
- Pizzari T., C. K. Cornwallis, D. P. Froman. 2007. Social competitiveness associated with rapid fluctuations in sperm quality in male fowl. *Proc R Soc B.* 274: 853-860.
- Pollock G. C., S. E. Orosz. 2002. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *Vet. Clinic Exot. Anim.* 5: 441-474.
- Prieto M., M. Sanchez-Calabuig, T. Hildebrandt, J. Santiago-Moreno, J. Saragusty. 2014. Sperm cryopreservation in wild animals. *Eur J Wildlife Res.* 60: 851-864.
- Rakha B., M. Ansari, S. Akhter, I. Hussain, E. Blesbois. 2016. Cryopreservation of indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Anim. Rep. Sci.* 174: 45-55.
- Rakha B., M. Ansari, S. Akhter, Z. Zafar, I. Hussain, J. Santiago-Moreno, E. Blesbois. 2017. Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen with polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology.* 1-7
- Rakha B., M. Ansari, S. Akhter, E. Blesbois. 2018. Cryoprotective effect of glycerol concentrations on Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) spermatozoa. *Avian Biol Res.* 11: 0-88.
- Razi M., S. H. Hassanzadeh, G- R- Najafi, S. Feyzi, M. Amin, M. Moshtagion, H. Janbaz, M. Amin. 2010. Histological and anatomical study of the White Rooster of testis, epididymis and ductus deferens. *Int. J. Vet. Res.* 4: 229-236.
- Riaz A., M. Aleem, A. Ijaz, M. A. Saeed, A. Latif. 2010. Effect of collection frequency on the semen quality of broiler breeder. *Brit. Poult. Sci.* 45: 823-827.
- Rybnik P. K., J. O. Horbanczuk, H. Naranowicz, E. Lukaszewickz, I. A. Maleki. 2007. Semen collection in the ostrich (*Struthio camelus*) using a dummy or a teaser female. *Brit. Poult. Sci.* 48: 635-643.
- Samour J. H. 2004. Semen Collection, Spermatozoa Cryopreservation, and Artificial Insemination in Nondomestic Birds. *J. Avian Med. Surg.* 18:219-223.
- Santiago-Moreno J. S., C. Castaño, M. A. Coloma, A. Gómez-Brunet, A. Toledano-Díaz, A. López-Sebastián, J. L. Campo. 2009. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. *Poult. Sci.* 88: 2661-2669.

Santiago-Moreno J. S., A. López-Sebastián, C. Castaño, M. A. Coloma, A. Gómez-Brunet, A. Toledano-Díaz, M. T. Prieto, J. L. Campo. 2009. Sperm variables as predictors of fertility in Black Castellana roosters; use in the selection of sperm donors for genome resource banking purposes. *Span. J Agric. Res.* 7: 555-562.

Santiago-Moreno J. S., C. Castaño, A. Toledano-Díaz, M. A. Coloma, A. López-Sebastián, M. T. Prieto, J. L. Campo. 2011. Influence of Season on the Freezability of Free-Range Poultry Semen. *Reprod. Domest. Anim.* 47:578:583.

Sasanami T., M. Matsuzaki, S. Mizushima, G. Hiyama. 2013. Evaluation of semen quality among four chicken lines. *J. Reprod. Dev.* 59: 334-338.

Serafim M., R. Lira, L. Costa, I. Gaddelha, C. Freitas, A. Silva. 2010. Description of semen characteristics from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) collected by electroejaculation. *Anim. Rep. Sci.* 118: 362-365.

Takeda K., K. Uchiyama, M. Kinukawa, T. Takami, M. Kaneda, S. Watanabe. 2015. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *J. Rep. Dev.* 61: 185-190.

Talarczyk-Desole J., A. Berger, G. Taszarek-Hauke, J. Hauke, L. Pawelczyk, P. Jędrzejczak. 2017. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice. *Ginekol. Pol.* 88(2).56-60

Tarif A. M., M. M. B. Uddin, R. F. Nasrin, N. S. Juyena, B. R. Mollah. 2013. Evaluation of semen quality among four chicken lines. *IORS-JAVS.* 6: 7-13.

López-Trinidad B. P., M. Konigsberg, A. Avalos-Rodríguez, A. Rodríguez-Tobon, E. Rodríguez-Tobon, F. M. Retana, E. Arenas-Ríos. 2016. Apoptosis en espermatozoides. *Revista Iberoamericana de Ciencias.* 6: 22-27.

Valiente-Banuet A., M. Aizen, J. Alcántara, J. Arroyo, A. Coucci, M. Galetti, M. Garcia, D. Garcia, J. Gómez, P. Jordano, R. Medel, L. Navarro, J. Obeso, R. Oviedo, N. Ramírez, P. Rey, A. Traveset, M. Verdú, R. Zamora. 2015. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Funct. Ecol.* 29: 299-307.

VandeVoort CA. 2004. High quality sperm for nonhuman primate ART: production and assessment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16-33.

Varadí E., B. Vegi, K. Liptoi, J. Barna. 2013. Methods for Cryopreservation of Guinea Fowl Sperm. *PLoS ONE* 8(4).

Vázquez J., E. A. Florentini, L. A. Camargo, J. Gonzales, M. Valdivia. 2013. Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. *Livest. Sci.* 157: 618-622.

Villaverde-Morcilla S., R. García-Sánchez, C. Castaño, E. Rodríguez, F. Gonzalez, M. Estesó, J. Santiago-Moreno. 2015. Characterization of natural ejaculates and sperm cryopreservation in a golden eagle (*aquila chrysaetus*). *J. Zoo Wild. Med.* 46:335-338.

Villaverde-Morcillo S., M. Estesó, C. Castaño, J. Santiago-Moreno. 2016. Influence of Post-Mortem Sperm Recovery Method and Extender on Unstored and Refrigerated Rooster Sperm Variables. *Rep. Dom. Anim.* 51: 40-46.

Watanabe M. 1957. An Improved Technique of the Artificial Insemination in Ducks. *J. Fac. Fish Anim.* 1: 363-368.

Zubair M., M. Ahmad, H. Jamil. 2014. Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test. *Andrologia.* 6: 1-7.

Zahraddeen D., I. S. R. Butswat, D. J. U. Kalla, S. M. Sir, M. T. Bukar. 2005. Effect of frequency of ejaculation on semen characteristics in two breeds of turkeys (*Meleagris gallopavo*) Raised in a tropical environment. *Int. J. Pou. Sci.* 4: 217-222.