

Caracterización del semen y criopreservación de los espermatozoides de Aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*)

Luna Acametitla Nancy Angélica¹, Reyes Luna Rosalina¹, Estay-Stange Andrés^{1,2*}

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

²Centro de Conservación de Vida Silvestre Konkon

*andres.estay@correo.buap.mx

Resumen

La reproducción asistida de aves en cautiverio, puede ser una herramienta para ayudar a las poblaciones naturales de especies, principalmente, en alguna categoría de riesgo. En este estudio se analizaron muestras de semen de aguilillas de Harris (*Parabuteo unicinctus*), obtenidas de forma voluntaria a través del manejo conductual, con el fin de brindar información específica sobre dicha especie. En la actualidad no existen técnicas de preservación del semen ni parámetros específicos del semen aviar comparado con otros organismos como los mamíferos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue realizar un análisis seminal macroscópico y microscópico, así como la comparación de dos crioprotectores, el primero constituido por yema de huevo, glicerol, glucosa y el segundo por suero fetal de bovino, glicerol y DMSO, de igual manera se compararon dos técnicas de vitrificación, rápida y ultra rápida que puedan ayudar en la criopreservación de los espermatozoides de la Aguililla de Harris. El crioprotector 1 (85 y 15%) preservó en mejor capacidad los parámetros de viabilidad y movilidad a comparación del crioprotector 2 (87 y 9%) y la técnica rápida conservó mejores condiciones de capacidad fertilizante en los espermatozoides.

Palabras clave: Criopreservación, Técnicas de reproducción, Halcón Harris.

Introducción

Introducción

México es un país que destaca por su diversidad de aves con 1323 de las cuales 63 pertenecen al grupo de aves diurnas y 43 de ellas se encuentran en alguna categoría de riesgo (Gordillo y Navarro, 2006). Entre ellas se encuentra el aguililla Harris (*Parabuteo unicinctus*) que está sujeto a protección especial (Pr) bajo la (NOM-059-SEMARNAT, 2010).

Estas aves tienen una gran importancia ecológica ya que son determinadas como indicadores de la calidad ambiental por su sensibilidad a las perturbaciones, además de contribuir al control de plagas en cultivos (Quintero *et al.*, 2009). Actualmente muchas poblaciones de aves rapaces se encuentran en declive debido a la fragmentación de sus hábitats por motivos de la deforestación, industrialización, contaminación ambiental, envenenamiento, caza furtiva y accidentes eléctricos (Blanco *et al.*, 2002).

Existen causas antrópicas como la caza ilegal, contaminación, tráfico de vida silvestre, entre otros, que propician el traslado de aves rapaces silvestres a centros de rescate y rehabilitación (Ovalle y Carvajal, 2013). Las aves que se encuentran en cautiverio pueden permanecer en un mejor estado de salud, viviendo sin estrés bajo algún condicionamiento lo cual brinda mejores alternativas para diferentes técnicas de reproducción asistida.

Las unidades de manejo ambiental para la conservación de vida silvestre (UMA), cumplen un importante papel para la conservación como centros de pies de crías, banco de germoplasma además de ser una alternativa para la reproducción de especies que se encuentren en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2009), ya sea a través de la rehabilitación y liberación de ejemplares o a través de reproducción asistida.

Las técnicas de reproducción asistida como la criopreservación de semen y la inseminación artificial se han convertido en una herramienta ideal para la conservación de especies en alguna categoría de riesgo (Prieto *et al*, 2014). Lamentablemente existe poca investigación sobre la criopreservación de espermatozoides de aves, así como del uso de crioprotectores, en comparación de los mamíferos (Liu *et al*, 2013).

Por otro lado, los animales en cautiverio juegan un papel muy importante en la conservación de algunas especies, ya que estos no pueden sobrevivir en la naturaleza, de tal manera que se puedan reproducir con la ayuda de técnicas de reproducción asistida, para poder reintroducir individuos y así repoblar la disminución de poblaciones en categoría de riesgo (Prieto *et al*, 2014).

Por lo anterior es necesario desarrollar protocolos de criopreservación seminal, para poder usar los espermatozoides en las TRA en aves rapaces en cautiverio y así contribuir de manera directa en su conservación.

El desarrollo de esta investigación contribuye al conocimiento reproductivo de la aguililla de Harris, aportando conocimientos y la caracterización de los parámetros de semen de dicha especie, que en un futuro permitan el desarrollo de técnicas de reproducción asistida para la reproducción en cautiverio, con el fin contribuir a la conservación de aves rapaces.

Metodología

Para el desarrollo de esta investigación se trabajaron con 30 muestras de semen obtenidas mediante la técnica de masaje dorso ventral, de un ejemplar macho de Aguililla de Harris, (*Parabuteo unicinctus*), proveniente de la UMA Konkon.

Cada eyaculado se recolectó sobre la tapa de un frasco para muestras biológicas, totalmente estéril y con la ayuda de una jeringa de insulina, se recolectó todo el volumen de la muestra y posteriormente se trasladó al laboratorio para su análisis a 37°C.

Análisis seminal

Se realizó un seminograma a 10 muestras, bajo las recomendaciones de las técnicas de la OMS (2010). En el cual se midieron aspectos macroscópicos y microscópicos.

Aspectos macroscópicos: se midió la viscosidad, la cual consistió en soltar gotas de la muestra a una altura de 10 cm, con ayuda de una pipeta pasteur. Posteriormente se midió el pH, con tiras reactivas al colocar una gota sobre la tira y comparar el color desarrollado con el estándar. Para

establecer el volumen se utilizó una micropipeta de 10 μ L y se fue absorbiendo, hasta obtenerlo, finalmente se determinó el aspecto de la muestra.

Aspectos microscópicos: El estudio se realizó bajo un microscopio óptico, al determinar la movilidad espermática, para ello se colocó 10 μ L de la alícuota del semen totalmente homogeneizada, en un portaobjetos, se le colocó un cubreobjetos y se observó con un objetivo de 40x. Se realizó un conteo de más de 200 espermatozoides en diferentes campos, contándolos en dirección a las manecillas del reloj y clasificándolos en tres categorías de movilidad:

A-Movilidad progresiva: Se tomaron en cuenta los espermatozoides con movimiento lineal activo, independientemente de la velocidad.

B-Movilidad No progresiva: Se tomaron en cuenta espermatozoides con cualquier patrón de movilidad, menos progresivo.

C-Inmóviles: Espermatozoides sin presencia de movimiento.

La movilidad total se expresó en porcentaje, tomando en cuenta la movilidad A más la movilidad B.

Concentración espermática

Para analizar la concentración espermática se utilizó una cámara de Neubauer, a la cual se le colocó 10 μ L constituidos por semen y diluyente para la inmovilización espermática, la solución se homogeneizó totalmente, manteniéndola en un ambiente húmedo para su estabilización, se realizó un conteo de 5 cuadros, ya que el número de espermatozoides encontrados superó los 40 espermatozoides por campo (OMS, 2010), posteriormente se realizó la interpretación de resultados para obtener el número de espermatozoides por eyaculado.

Morfología espermática

La morfología espermática se determinó bajo un microscopio óptico, en un frotis realizado con una alícuota de 30 μ L, éste se dejó secar al aire, posteriormente se sumergió en el fijador del kit EspermaForm por 3 minutos, posteriormente se enjuagó con agua destilada y dejó secar nuevamente, para la tinción se introdujo al colorante A durante 5 minutos y se realizó el proceso de enjuagar y secar, por último, se introdujo al colorante B durante 7 minutos se enjuagó y secó. Las células teñidas fueron observadas con un objetivo de 100x para determinar su morfología.

Para el análisis de la presencia de otros tipos celulares se tomó una alícuota de 10 μ L y se valoró en un objetivo de 40x, posteriormente se realizó la interpretación de resultados.

Criopreservación

Para la criopreservación de las muestras, éstas se recolectaron 20 minutos antes de realizar los experimentos, posteriormente se colocaron en baño María a una temperatura de 41°C. A cada muestra se le realizó un análisis de viabilidad y movilidad para obtener sus porcentajes pre y post descongelación. Se trabajaron con 20 muestras, 10 para el crioprotector 1 y 10 para el crioprotector 2.

Seguido del análisis de movilidad y viabilidad se prepararon las muestras al colocar 20 μL de semen, 80 μL de PBS y 100 μL del crioprotector 1 en un tubo eppendorf, la mezcla de 200 μL se homogeneizó, rotuló y se colocó a baño María a 41°C por 15 minutos, el mismo procedimiento se realizó con el crioprotector 2. Posteriormente de un tanque de nitrógeno líquido (-196°C), se vació nitrógeno sobre un recipiente de unicel, se colocó una gradilla dentro del molde con dos portaobjetos y una coladera metálica pequeña. El crioprotector 1, contenía yema de huevo, glicerina y glucosa y el crioprotector 2 suero fetal de bovino, glicerol y dimetilsulfóxido (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de los crioprotectores

Crioprotector 1	Crioprotector 2
Yema de huevo 20%	SFB 10%
Glicerol 12%	Glicerol 12%
Glucosa 11 mM	DMSO 2.1 M

Vitrificación

Posterior al análisis de movilidad y viabilidad, se prepararon las muestras al colocar 20 μL de semen, 80 μL de PBS y 100 μL del crioprotector 1 en un tubo eppendorf se homogeneizó totalmente para obtener un total de 200 μL , se rotuló y se colocó a baño maría a 41°, el mismo procedimiento se realizó con el crioprotector 2. Posteriormente, en el recipiente de unicel con nitrógeno líquido, se colocó una gradilla dentro del mismo con dos portaobjetos y una coladera pequeña.

Vitrificación rápida

Se tomaron tres alícuotas de 30 μL , con una micropipeta de 50 μL , y se colocó cada una sobre los portaobjetos formando una perla, se esperaron unos segundos hasta que las perlas se congelan totalmente, posteriormente se colocaron dentro de un criovial previamente atemperado y rotulado, posteriormente el criovial se pasó rápidamente a una varilla para poder introducirlo a un tanque de nitrógeno.

Vitrificación ultra rápida

De los 110 μL restantes se tomaron aproximadamente 100 μL , con ayuda de una pipeta Pasteur para dejar caer 3 gotas de aproximadamente 30 μL a una distancia de 10 cm, sobre la coladera metálica sumergida en el nitrógeno líquido en el recipiente de unicel, se esperaron unos segundos hasta la solidificación de las gotas, se pasaron a otro criovial atemperado y rotulado, se colocaron sobre la varilla y se introdujeron al tanque de nitrógeno líquido

Resultados y Discusión

Análisis macroscópicos

Se obtuvieron los siguientes resultados: El aspecto de la muestra de semen fue de color blanco opalescente, con una viscosidad similar a gotas de agua, un pH de 8.5 y el volumen de $45 \pm 6 \mu\text{L}$, como se muestra en la siguiente tabla (2).

Tabla 2. Parámetros obtenidos en los análisis macroscópicos del semen de aguililla Harris

Aspecto	Viscosidad	pH	Volumen
Blanco opalescente	Gotas de agua	8.5	$45 \pm 6 \mu\text{L}$

Análisis microscópicos

Al determinar la movilidad de las células se encontró que presentaban una movilidad progresiva (A) de $49 \pm 8\%$, la cual determina que su movimiento es activo tanto lineal o circular independientemente de la velocidad. La movilidad total se determinó al sumar la movilidad A más la movilidad B (no progresiva), y fue de $62 \pm 8\%$. La viabilidad de las células fue de $76 \pm 7\%$ y la concentración de $236 \times 10^6 \pm 81/\text{eyaculado}$. Se pudo observar otros tipos celulares como células vacuoladas 15 ± 3 por campo.

Tabla 3. Parámetros obtenidos del análisis microscópico

Movilidad	Viabilidad	Concentración	Otros tipos celulares
Progresiva = $49 \pm 8\%$ Total = $62 \pm 8\%$	$76 \pm 7\%$	$236 \times 10^6 \pm 81/\text{eyaculado}$	Células vacuoladas 15 ± 3



Figura 1. Microfotografía en contraste de fases de un espermatozoide eyaculado de la aguililla de Harris en donde se observa su morfología.

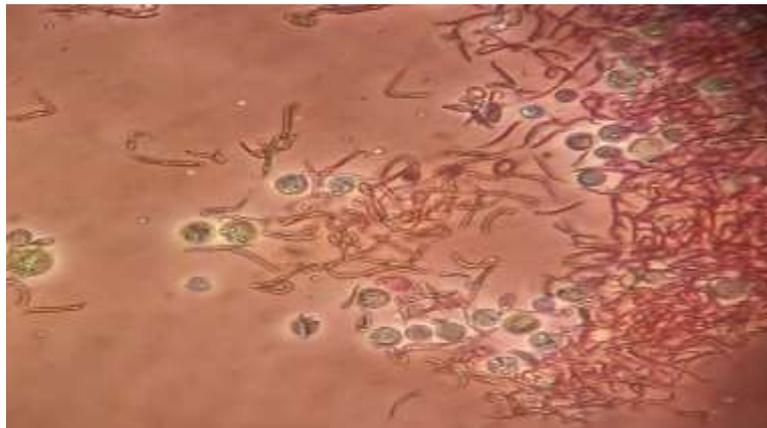


Figura 2. Microfotografía de contraste de fases de una muestra de semen de la aguililla de Harris en donde se observa la presencia de células vacuoladas.

Los resultados obtenidos del análisis del semen de la aguililla de Harris pueden representar los diferentes valores normales de cada uno de parámetros del semen. Debido a la facilidad de la obtención de un eyaculado voluntario por masaje dorso ventral del aguililla en cautiverio fue factible realizar este estudio, en otras condiciones, se tendrían que llevar a cabo a partir de muestras obtenidas del epidídimo de especímenes muertos y no representan un eyaculado. En un futuro, es necesario realizar este estudio en más especímenes para obtener datos más precisos y confirmar los ya obtenidos.

Criopreservación

De las 20 muestras vitrificadas se obtuvieron los siguientes resultados: La mitad de las muestras tratadas con el crioprotector 1 (yema de huevo, glicerol, glucosa) y la técnica de vitrificación rápida en la post-descongelación se determinó un porcentaje de movilidad de 15% y una viabilidad de 85%. Con la técnica ultra rápida se obtuvo una movilidad de 8% y una viabilidad de 84%. Con respecto al crioprotector 2 (suero fetal de bovino, glicerol y DMSO) y la técnica rápida se obtuvo una movilidad de 9% y una viabilidad de 87% y con la técnica ultra rápida se obtuvo una movilidad de 1% y una viabilidad de 91%. Con estos datos se demuestra que el crioprotector 1 preserva un mayor porcentaje de células móviles y viables que el crioprotector 2.

Con respecto a las técnicas de vitrificación se obtuvo un porcentaje más alto de movilidad espermática (15%) con la técnica rápida a comparación de la ultra rápida (8%) y un mejor porcentaje en viabilidad con la técnica ultra rápida (91%) a comparación de la rápida (87%).

Tabla 4. Representación de los porcentajes obtenidos con los tratamientos post-descongelación

Crioprotector 1 técnica rápida		Crioprotector 2 técnica rápida	
Móviles	Vivos	Móviles	Vivos
15%	85%	9%	87%
Crioprotector 1 técnica ultra-rápida		Crioprotector 2 técnica ultra-rápida	
Móviles	Vivos	Móviles	Vivos
8%	84%	1%	91%

De acuerdo con los datos obtenidos de ($F=8,97$) y ($P<.0.05$) existen diferencias significativas con respecto a los parámetros de movilidad con el crioprotector 1 y la técnica de vitrificación rápida ya que es estadísticamente diferente con respecto a la técnica ultra rápida y el crioprotector 2. En la figura 3 se puede observar que con el crioprotector 1 y la técnica rápida se obtuvieron mejores porcentajes de supervivencia a comparación de la técnica ultra rápida y el crioprotector 2.

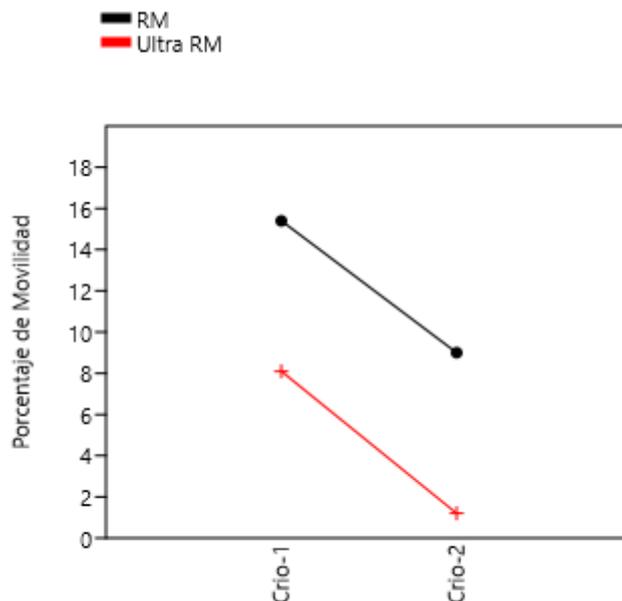


Figura 3. Gráfica comparativa entre técnicas y crioprotectores con el parámetro de movilidad. RM – técnica rápida, Ultra RM – técnica ultrarápida.

Con respecto a los parámetros de viabilidad se obtuvo ($F=3,501$) y ($P>0.05$) por lo tanto no existen diferencias significativas entre las dos técnicas y los crioprotectores.

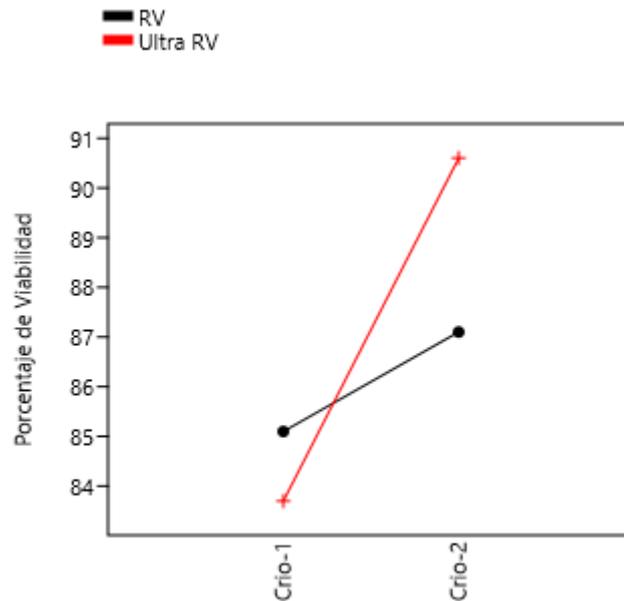


Figura 4. Gráfica comparativa entre técnicas y crioprotectores con el parámetro de viabilidad. RM – técnica rápida, Ultra RM – técnica ultrarápida

Los valores obtenidos de la movilidad nos indican que ambos procedimientos de vitrificación y los dos crioprotectores mantienen la viabilidad de los espermatozoides y con ello abre la posibilidad de que en un futuro se pruebe capacitar a las células para la reactivación de la movilidad y uso en inseminación. También, la preservación de la viabilidad nos indica que tanto los dos procedimientos como los dos crioprotectores mantienen la integridad de la membrana celular.

En cuanto a la movilidad el uso de la técnica de vitrificación rápida como el crioprotector a base de yema de huevo, glicerol y glucosa fueron los que dieron mejores resultados. En cuanto al crioprotector, tanto la yema de huevo como la glucosa son crioprotectores no permeables y el glicerol es permeable, el uso de la combinación de ambos, en la preparación del crioprotector nos garantiza una mejor criopreservación de los espermatozoides. Es necesario realizar más estudios y probar otras combinaciones para tener una mejor recuperación de la movilidad de las células.

Conclusiones

Con los datos obtenidos en el análisis de semen, se puede concluir que representan valores normales de un eyaculado de aguililla de Harris (*Parabuteo unicinctus*), en condiciones de cautiverio. Con respecto a los parámetros de movilidad y viabilidad, el criopreservador 1 compuesto por yema de huevo, glicerol y glucosa preservó en mejores condiciones la capacidad fertilizante en los parámetros de movilidad, con respecto a las técnicas se logró obtener un

mayor porcentaje de movilidad con la técnica rápida de vitrificación a comparación de la ultra rápida.

Por otro lado, el crioprotector 2 compuesto por DMSO, SFB y glicerina no mostró diferencias significativas con respecto a las técnicas y crioprotectores.

Se debe realizar el análisis de más muestras de semen de aguililla Harris, para establecer los parámetros promedio para dicha especie. La obtención de datos sobre las características de semen de otras aves rapaces, podría significar un aporte importante en los programas de reproducción asistida de especies en alguna categoría de riesgo con fines de conservación.

Referencias

- [1] Blanco, J.M., Gee, G.F., Wildt, D.E., & Donoghue, A.M. (2002) Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramaginal insemination approach. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33(1), 1-7. Blunkett, D. (1998, July 24). Cash for competence. *Times Educational Supplement*, p. 15.
- [2] Contreras Ovalle, P., & Ubilla Carvajal, M.J. (2013) Evaluación del bienestar animal de aves rapaces en rehabilitación, descripción de técnicas que lo promuevan y mejoren su tasa de reintroducción *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2).
- [3] Gordillo, A., & Navarro, A.G., (2006) Catálogo de autoridad taxonómica de la avifauna de México.
- [4] Quintero, A. L., Barreras, R.C., Orozco, J.A., & Rangel, G. (2009). Determinación de especies de aves rapaces, en el área de abastecimiento de caña de azúcar (*Sacharum offi cinarum*) de la Cía. Azucarera de Los Mochis S. A. de C. V., susceptibles de ser utilizadas como control biológico en el manejo integrado de plagas. *Ra Ximhai*, 5(2): pp. 239-244
- [5] Liu, J., Cheng, K. M., & Silversides, F. G. (2013). Fundamental principles of cryobiology and application to ex situ conservation of avian species. *Avian Biology Research*, 6(3), 187-197.
- [6] OMS (Organización Mundial de la Salud). "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. fifth Edition (2010). http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
- [7] Prieto, M. T., Sanchez-Calabuig, M. J., Hildebrandt, T. B., Santiago-Moreno, J., & Saragusty, J. (2014). Sperm cryopreservation in wild animals. *European journal of wildlife research*, 60(6), 851-864.
- [8] SEMARNAT (2009) Manejo de vida silvestre, Manual técnico para beneficiarios. Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico. México