



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2023; 13:1-13. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.13>
Artículo Original. Recibido: 21/11/2023. Aceptado: 20/05/2023. Publicado: 27/06/2023. Clave: e2022-77.
<https://www.youtube.com/watch?v=0rYTQI3wmoU>

Efecto no capacitante de proteínas oviductales en espermatozoides de gallo *in vitro*

Decapacitating effect of oviductal proteins in rooster spermatozoa *in vitro*



Cruz-Valencia Cuauhtémoc*¹ , Guerrero-Barrera Alma² , Quintanar-Stephano
José³ , Herrera-Barragán José**⁴ , Pérez-Rivero Juan⁴ 

¹Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad # 940, C.U., 20131 Aguascalientes, México. ²Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria., 20131 Aguascalientes, México. ³Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad # 940, C.U., 20131 Aguascalientes, México. ⁴Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Villa Quietud. Coyoacán. CP. 04960. CDMX, México. *Autor responsable: Cruz-Valencia Cuauhtémoc. **Autor para correspondencia: Herrera-Barragán José. E-mail: cuaubiol@hotmail.com, alguerre@correo.uaa.mx, jlquinta@correo.uaa.mx, jherrerab@correo.xoc.uam.mx, jjperez1_1999@yahoo.com

RESUMEN

En las aves, no se ha descrito totalmente el proceso de maduración espermática. El objetivo del estudio fue determinar parámetros *in vitro*, del efecto no capacitante de las proteínas oviductales, en espermatozoides de gallo. Alícuotas con espermatozoides, fueron incubadas *in vitro* para inducir estados metabólicos de capacitación, no capacitación y reacción acrosomal para determinar porcentajes de espermatozoides vivos, su movilidad y concentraciones de Malondialdehído, Glutathion reducido y Adenosin tri fosfato, como parámetros del estado metabólico de los espermatozoides. Los resultados mostraron porcentajes de movilidad y espermatozoides vivos en semen fresco y capacitado similares ($P > 0.05$), pero mayores ($P < 0.05$) a los determinados en espermatozoides con reacción acrosomal. Los nmol/ml de MDA en semen fresco (1.59) fue mayor ($P < 0.5$) que en semen capacitado (1.05), con reacción acrosomal (1.07) y en semen no capacitado (1.05). Los nmol/ml de GSG fueron similares ($P > 0.05$) en semen fresco (72.6) y capacitado (62.04), y entre semen con reacción acrosomal (99.09) y no capacitado (86.07). La mayor concentración de ATP fue en semen capacitado con 69.9 $\mu\text{mol/ml}$, con concentraciones similares ($P < 0.05$) en semen fresco, con reacción acrosomal y no capacitados. Los parámetros determinados, demostraron que la fracción proteica de la unión útero-vaginal, *in vitro* produce no capacitación y mantiene la viabilidad espermática.

Palabras clave: adenosin trifosfato, glutathion reducido, malondialdehido, oxidación, semen

ABSTRACT

In birds, the process of sperm maturation has not been fully described. The objective of this study was to determine *in vitro* parameters for the decapacitating effect of oviductal proteins on rooster spermatozoa. Aliquots with spermatozoon were incubated to *in vitro* induce metabolic states: capacitation, decapacitation, and the acrosomal reaction to again determined percentages of live spermatozoa, motility, and concentrations of Malondialdehyde, reduced Glutathione and Adenosine triphosphate. The percentages of



motility and live sperm in fresh and capacitated semen were similar ($P>0.05$), but higher ($P<0.05$) than those determined in decapacitated semen and with acrosome reaction. The determination of nmol/ml of MDA in fresh semen (1.59) was higher ($P<0.005$) than in capacitated semen (1.05), with acrosomal reaction (1.07) and decapacitated semen (1.05). GSH nmol/ml were similar ($P>0.05$) in fresh (72.6) and capacitated (62.04) semen, similarly ($P<0.05$) between acrosome reaction (99.09) and decapacitated (86.07) semen. The highest concentration of ATP was in capacitated semen with 69.9 $\mu\text{mol/ml}$, with similar concentrations ($P<0.05$) in fresh, with acrosomal reaction, and decapacitated semen. The parameters, determined, demonstrated that the protein fraction of the utero-vaginal junction, *in vitro*, produces decapacitation and successfully maintains sperm viability.

Keywords: adenosine triphosphate, reduced glutathione, malondialdehyde, oxidation, semen.

INTRODUCCIÓN

Las aves presentan características morfofisiológicas reproductivas específicas distintas a las de los mamíferos. En el aparato reproductor del gallo, estas incluyen la ausencia de glándulas accesorias que suministren fluidos al eyaculado (Álvarez *et al.*, 2020), y de una estructura como el epidídimo de los mamíferos, que participa en la maduración y almacenamiento espermático (Asano & Tajima, 2017). Existen informes que indican que el semen de gallo "no requiere capacitación espermática" para alcanzar la capacidad fecundante (Lemoine *et al.*, 2011), pero un estudio independiente identificó un periodo necesario de capacitación espermática de 40 minutos de duración que puede inducirse *in vitro* utilizando un medio enriquecido con Ca^{2+} .

Se han identificado túbulos de almacenamiento de espermatozoides (SST) en la unión útero vaginal (JUV) del oviducto de la gallina, que contribuyen a la descapacitación espermática para su almacenamiento mediante el metabolismo de ácidos grasos u otros lípidos por parte de los espermatozoides (Long & Conn, 2012; Sasanami, 2013); investigaciones recientes han demostrado un efecto no capacitador *in vitro* de las proteínas oviductales, pero no han descrito ningún parámetro característico del metabolismo espermático (Camarillo *et al.*, 2019). Durante la capacitación espermática se producen cambios bioquímicos y modificaciones en la fluidez de la membrana celular, además de cambios en el pH intercelular, aumento de la permeabilidad a los iones Ca^{2+} , modificación de los patrones de fosforilación de las proteínas y de la composición lipídica. La capacitación de los espermatozoides es un requisito previo para que se produzca la reacción acrosómica y alcancen su capacidad fecundante. En el tracto reproductivo de las aves se han descrito los SST, en el JUV, las secreciones celulares de estas estructuras pueden inducir la no capacitación de los espermatozoides para su almacenamiento (Sasanami, 2013; Camarillo *et al.*, 2019; González *et al.*, 2019).

Estos ácidos grasos, que pueden obtenerse en la dieta de las aves (Olubowale *et al.*, 2014; Ashraf *et al.*, 2020) contribuyen a mantener la viabilidad de los espermatozoides y a garantizar la fecundación de los ovocitos hasta siete días después de la cópula (Bakst, 2010).



Los estudios no han revelado diferencias en los espermatozoides y su morfometría a su paso por el tracto reproductivo del gallo pero, en cambio, existen amplias descripciones de las secreciones glandulares en el oviducto de la gallina, asociadas principalmente a la formación del óvulo (Zhong *et al.*, 2020). Sin embargo, los espermatozoides deben completar su tránsito por este tracto para alcanzar el lugar de fecundación (Álvarez *et al.*, 2017). Existen muy pocos estudios referentes a las condiciones del tracto reproductivo de la gallina en relación al almacenamiento, maduración y activación de los espermatozoides.

El fallo reproductivo puede asociarse hasta en un 50 % a los machos; se sabe que el estrés oxidativo determinado por un aumento de Malondialdehído (MDA) en el semen, puede asociarse a daño del axonema, producir alteraciones morfológicas en el mesenterio y disminución de la motilidad espermática (Kurkowska *et al.*, 2020); la glucólisis y la oxidación mitocondrial contribuyen a la producción de trifosfato de adenosina (ATP) a través de la fosforilación oxidativa para el mantenimiento de la motilidad flagelar en la cocción de los espermatozoides (Setiawan *et al.*, 2021) y también se ha demostrado que el efecto positivo del glutatión (GSH) protege a los espermatozoides del estrés oxidativo (Masoudi *et al.*, 2019).

Aunque la eficacia reproductiva del gallo es bien conocida debido a sus adecuados porcentajes de fertilidad (Nakamura, 2017), la implementación de la inseminación artificial en granjas de producción puede reducir los costes de producción al disminuir el número de gallos necesarios. Además, el semen podría ser transportado a diversas estaciones o localidades en condiciones de mayor bioseguridad que garanticen la conservación del germoplasma de las líneas germinales primarias de abuelos y bisabuelos (Nakamura, 2017). Hasta la fecha, la inseminación artificial ha utilizado dos medios de conservación seminal, denominados Beltsville y Lake Poultry Semen Extenders, que se desarrollaron hace más de 40 años principalmente para su uso con pavos. Los únicos trabajos posteriores realizados con estos dos métodos han tenido como objetivo modificar la concentración de sus componentes, reflejando así los modestos avances en nuestro conocimiento de la biología reproductiva de esta especie y la escasa utilización de ese conocimiento para el desarrollo biotecnológico (Asano & Tajima, 2017).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue determinar parámetros *in vitro* del efecto discapacitante de las proteínas oviductales de la gallina sobre el espermatozoides del gallo. Esta investigación contribuirá a desarrollar nuevos medios de conservación del semen que aumenten la viabilidad de los espermatozoides durante su manipulación y almacenamiento *in vitro*

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento

En semen fresco, en cada estado metabólico, se realizó evaluación básica y medición de Malondialdehído (MDA), glutatión reducido (GSH) para confirmar su función de



membrana y niveles de ATP para verificar actividad energética; con esto se evaluó la viabilidad espermática y parámetros de madurez y no capacitación espermática.

Uso de animales

El estudio cumplió a cabalidad con los requerimientos nutricionales de los animales ofreciéndoles alimento comercial con 17 % de proteína cruda, que suministra los nutrientes requeridos para la crianza de aves con fines zotécnicos; los animales fueron mantenidos con agua *ad libitum*. Se alojaron individualmente en jaulas de 90 X 90X 120 cm, con una altura de percha de 90 cm (Applegate & Angel, 2014). Se proporcionaron condiciones de alojamiento adecuadas durante todo el estudio. Los sujetos de estudio fueron cinco gallos de la raza Lohman. Para la obtención de fluidos del oviducto se utilizaron 10 gallinas en el segundo tercio de postura, alojadas individualmente en condiciones similares.

Obtención de semen

Los eyaculados se obtuvieron mediante masaje dorsoventral realizado tres veces por semana en cada gallo (Camarillo *et al.*, 2019). Los eyaculados se combinaron para formar un total de 25 pools de semen, depositando en el mismo vial el semen de los cinco gallos. El semen se recogió de la cloaca por aspiración utilizando una micropipeta SL10-1000 (RANIN™, USA). A continuación, cada reserva de semen se mezcló con un medio Lake que contenía 0.6 % de fructosa, 1.92 % de glutamato sódico, 0.08 % de acetato de magnesio, 0.51 % de acetato sódico y 0.128 % de citrato potásico, pH 7.2 y 330 mOms. Sólo los eyaculados que cumplen los criterios seminales normales: 5 % de motilidad, 90 % de espermatozoides vivos y < 5 % de espermatozoides anormales se utilizaron (Fattah *et al.*, 2017).

Recogida y cuantificación de la fracción proteica del líquido oviductal

Se evertió la cloaca para introducir una sonda de calibre 12 a una profundidad de 3 cm en el oviducto y depositar 3 ml de medio Lake en la unión uterovaginal (UVU), seguido de la recogida de aproximadamente 1.54 ml de líquido del oviducto para formar un pool. El líquido extraído de las 10 gallinas se mantuvo a 2 °C para su manipulación (Ito *et al.*, 2011). Se filtró a través de un colador celular de 70 µm y luego se centrifugó durante 30 minutos a 1500 x g. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso (Sedaghat *et al.*, 2021). La fracción proteica de la UVU se precipitó utilizando 4 volúmenes de acetona a 2°C durante 30 minutos, seguido de centrifugación a 14000 x g durante 10 minutos. El sedimento se recuperó evaporando el sobrenadante en nitrógeno líquido (Sedaghat *et al.*, 2021). Se utilizó la técnica de espectrofotometría para cuantificar la concentración de proteínas, a una longitud de onda de 595 nm (Ku *et al.*, 2013).

Para describir la fracción proteica mediante electroforesis unidimensional, se colocaron 20 µg de la proteína obtenida en un tampón de la muestra (Tris 0.5 M a pH 6.8, SDS 10



%, glicerol, 0.5 % de azul de bromofenol y 5 % de β -mercaptoetanol) y se mantuvo a 100 °C durante 3 min. La electroforesis requirió preparar un gel de separación al 10 % y un gel de compactación al 4 % con acrilamida/Bis al 30 % a 37, 5:1 (2.6 % C). La separación se realizó en una cámara de electroforesis a 200 voltios durante 45 min. La solución tampón del electrodo se preparó con Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS al 0.1% (p/v) hasta un pH de 8.3 (Sajjadi *et al.*, 2019).

Inducción de estados metabólicos en los espermatozoides

En cada condición metabólica se utilizaron alícuotas de 200×10^6 espermatozoides en 1 ml de medio Lake; el semen fresco se evaluó antes de que transcurrieran 10 min post-eyaculación (Camarillo *et al.*, 2019). Los espermatozoides en capacitación se indujeron incubando el semen 1:1 en medio Lake durante 40 min a 38 °C.

Para inducir la no capacitación, los espermatozoides se incubaron durante 40 min a 37.5°C, y después se diluyeron 1:1 en medio Lake suplementado con 200 $\mu\text{g/ml}$ de la fracción proteica de la UVU en condiciones de oscuridad (Camarillo *et al.*, 2019). La reacción acrosomal se determinó en espermatozoides coincubados con 20 μg de PVL para inducir la reacción acrosomal (Lemoine *et al.*, 2011; Camarillo *et al.*, 2019).

Evaluación básica del esperma

El porcentaje de espermatozoides con motilidad recta progresiva en 15 μl de semen se estimó mediante microscopía (OLYMPUS BX51) con un objetivo de 40X a 37,5°C. Además, se tiñeron 10 μL de semen con eosina-nigrosina (QCA, 996518, EE. UU.) y se analizaron 100 espermatozoides de cada muestra para evaluar la viabilidad y la morfología con un microscopio óptico (OLYMPUS BX51) (Jabbar *et al.*, 2015; Fischer *et al.*, 2015).

Parámetros metabólicos de los espermatozoides

Malondialdehído (MDA). Se cuantificó la concentración nMol de MDA/ml (Najafi *et al.*, 2021). En este caso, se añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 20 % a una alícuota de semen con 100×10^6 espermatozoides y se centrifugó durante 15 min $1500 \times g$. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67 % para incubarlo a 100 °C durante 10 minutos. En condiciones de pH bajo y temperatura alta, el MDA reacciona con el TBA para generar un aducto MDA-TBA que puede leerse en un espectrofotómetro a 532 nm, utilizando butanol como blanco.

Glutati3n reducido (GSH). Para determinar la concentración de GSH, se utilizó una reacción de fluorescencia y espectrofluorimetría (Najafi *et al.*, 2021). Alícuotas de 250 μl de semen eyaculado que contenían 200×10^6 se homogeneizaron en un v3rtex durante 3 min para lisar los espermatozoides. A continuaci3n, se a3nadi3ron 3.70 ml de tamp3n fosfato a pH 8, seguidos de 1 ml de 3cido metafosf3rico al 25 %. Se centrifug3 a 1500 x



g. durante 30 minutos a 4 °C para liberar el GSH. Esto permitió recuperar 0.5 ml de sobrenadante, que se ajustó con 4.5 ml de tampón fosfato a pH 8. A continuación, se recuperaron 100 µL de la mezcla anterior y se añadieron 1.8 mL de tampón fosfato a pH 8. Se mezcló todo en un vórtex. Se mezcló en un vórtex y se añadieron 100 µL de OPT al 0.1 % para homogeneizar y estabilizar la mezcla durante 15 min en condiciones de oscuridad. La determinación se realizó en un espectrofluorómetro a una tasa de emisión de 420 nm, excitación de 350 nm, y 5 SLIT durante 5 segundos.

Trifosfato de adenosina (ATP). Para determinar la concentración de ATP en los espermatozoides se utilizó el kit de ensayo de bioluminiscencia de adenosina 5'-trifosfato (ATP) (SIGMA Life Science), que determinó que la emisión luminosa era directamente proporcional a la cantidad de ATP presente (Nguyen *et al.*, 2016).. Este se cuantificó en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS utilizando la aplicación de concentración. Se lisó una alícuota de semen con 200×10^6 espermatozoides para recuperar 50 µl de la lisis, que se colocaron en una cubeta de espectrofotómetro con 50µl de reactivo del kit de ensayo de bioluminiscencia de ATP. El espectrofotómetro determinó la concentración de ATP en cada muestra y la comparó con la intensidad emitida por la solución estándar de 100 micromoles de ATP que contiene el kit.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron sometidos a la prueba de bondad y al ajuste de Jaque-Bera, para verificar la normalidad de los datos; para lo cual se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias entre las variables ($P < 0.05$). Se utilizó una prueba de Tukey para determinar las diferencias entre la media y los valores de las variables en los distintos estados metabólicos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático de libre acceso PAST (Hammer *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros básicos de evaluación. Los porcentajes de motilidad espermática (Tabla 1) fueron similares ($P > 0.05$) en el semen fresco y en los espermatozoides capacitados, con un 96.8 y un 91.5 %, respectivamente. Estos porcentajes fueron superiores ($P < 0.05$) a los determinados para los espermatozoides con reacción acrosómica (61 %) y los espermatozoides discapacitados (40 %). Los resultados de estos dos últimos fueron similares ($P > 0.05$).

En cuanto a los espermatozoides discapacitados y los que presentaban reacción acrosómica, aunque la motilidad era evidente y similar, era menor que en los otros



estados metabólicos. Sin embargo, los porcentajes de espermatozoides vivos demostraron viabilidad espermática en todas las condiciones evaluadas.

En ausencia de un ciclo estral característico de los mamíferos, que sincronice la cópula con la ovulación, la reproducción en aves depende del almacenamiento de espermatozoides en el oviducto de la hembra (Bakst, 2010) para asegurar que los espermatozoides con capacidad fecundante estarán disponibles cuando el ovocito esté presente para la fecundación en el infundíbulo. En presencia del almacenamiento de espermatozoides en los túbulos, los espermatozoides depositados en el aparato reproductor de la hembra pueden sobrevivir entre 2 y 15 semanas en aves domésticas como las gallinas y los pavos (Sasanami, 2013).

Los porcentajes de espermatozoides vivos (Tabla 1) fueron similares ($P>0.05$) entre el semen fresco (97.6%) y los espermatozoides capacitados (91.6%), y significativamente mayores ($P<0.05$) que en los espermatozoides con la reacción acrosomal (72.9%) y las muestras decapacitadas (64.4%). Las dos últimas condiciones mostraron porcentajes similares ($P>0.05$).

En general, los porcentajes de motilidad y espermatozoides vivos determinados en este estudio fueron elevados y similares en los espermatozoides eyaculados y capacitados. Este hallazgo coincide con lo reportado por otros autores (Restrepo *et al.*, 2016), quienes observaron una alta motilidad denominada hiperactividad en la capacitación espermática, característica de este estado metabólico. La hiperactivación espermática también se caracteriza por una motilidad intensa, no progresiva y con baja frecuencia de movimiento de la cola.

Tabla 1. Parámetros *in vitro* de evaluación básica espermática en los diferentes estados metabólicos

Espermatozoides	Estado metabólico del semen ($X\pm EE$) n=25			
	Fresco	Capacitado	Con reacción acrosómica	No capacitado
Motilidad %	96.8 \pm 0.4 ^a	91.5 \pm 2.4 ^a	61.0 \pm 8.8 ^b	40.0 \pm 6.5 ^b
vivos %	97.6 \pm 1.4 ^a	91.6 \pm 1.6 ^a	72.9 \pm 3.4 ^b	64.4 \pm 4.2 ^b

Literal diferente en superíndice entre columnas, indica diferencia estadística ($P<0.005$).

($X\pm EE$): Media y error estándar

Indicadores de estrés oxidativo. Los estudios han demostrado que la fluidez de la membrana puede alterarse mediante modificaciones de moléculas como el colesterol y los fosfolípidos, que están relacionadas con las proteínas implicadas en el reconocimiento gamético y la fusión de membranas. También se ha demostrado el papel de estas moléculas en el almacenamiento de espermatozoides en túbulos para el almacenamiento espermático en la UVU situada en el aparato reproductor de la gallina. Actualmente, se



entiende que esto sugiere su efecto como factores incapacitantes para mantener la viabilidad espermática *in vivo* (Sasanami, 2013; Matsuzaki & Sasanami, 2022).

La concentración de MDA (Tabla 2) en el semen fresco fue de 1.59 nmol/ml, significativamente mayor ($P < 0.05$) que en los espermatozoides capacitados (1.05 nmol/ml), los que presentaban la reacción acrosomal (1.07 nmol/ml) y los espermatozoides discapacitados (1.05 nmol/ml). Es importante señalar que las concentraciones determinadas para los tres últimos fueron similares ($P > 0.05$).

Las concentraciones de GSH (Tabla 2) en el semen fresco y en los espermatozoides capacitados fueron similares, con 72.6 y 62.04 nmol GSH/ml, respectivamente ($P > 0.05$). Esta concentración en los espermatozoides con reacción acrosómica fue de 99.09 nmol GSH/ml, similar ($P > 0.05$) a la de los espermatozoides discapacitados, de 86.07 nmol GSH/ml. Sin embargo, estos espermatozoides mantenían niveles de estrés oxidativo, MDA y GSH que demostraban la estabilidad de la membrana (Setiawan *et al.*, 2021).

Durante la capacitación y la reacción acrosomal se producen cambios en la membrana de los espermatozoides; nuestros estudios demostraron que las concentraciones de MDA y GSH mantienen la integridad de la membrana asociando su viabilidad con la concentración de ATP también determinada en espermatozoides capacitados y discapacitados.

En otro hallazgo significativo, los niveles de energía determinados por la concentración de ATP fueron similares en los espermatozoides capacitados y en aquellos con la reacción acrosomal, ilustrando el efecto discapacitante *in vitro* de la fracción proteica de las secreciones de la UVU.

Las concentraciones de ATP (Tabla 2) en el semen fresco, los espermatozoides capacitados, los espermatozoides con reacción acrosómica y los espermatozoides discapacitados fueron de 59.41, 69.9, 66.49 y 51.79 $\mu\text{mol ATP/ml}$, respectivamente. Estas concentraciones son estadísticamente similares ($P > 0.05$). En espermatozoides de gallo se ha demostrado la producción de ATP vía glucólisis (Dávila *et al.*, 2015), por lo que encontrar concentraciones similares de ATP en las diferentes condiciones metabólicas evaluadas demuestra la viabilidad espermática en nuestro estudio.

La viabilidad espermática *in vitro* de los espermatozoides no capacitados en estas condiciones de estudio se demostró al determinar que los niveles de energía requeridos por los espermatozoides durante el proceso de fecundación son similares, independientemente de su actividad o estado metabólico, capacitación, reacción acrosomal y/o no capacitación (Nguyen *et al.*, 2015). Además de mantener su viabilidad y los porcentajes de espermatozoides vivos y con motilidad, el estudio evidenció la



capacidad *in vitro* para la reacción acrosomal en presencia de PLV como inductor natural de dicha reacción en espermatozoides no capacitados. Esto demostró la viabilidad espermática, que se sabe que es un parámetro *in vitro* útil para predecir la capacidad fecundante *in vivo* de los espermatozoides (Lemoine *et al.*, 2011). Esto representa una oportunidad para rescatar líneas genéticas de interés zootécnico, con la implementación de técnicas de reproducción asistida en aviares (Romo *et al.*, 2022).

Tabla 2. Parámetros de estrés oxidativo en semen con diferentes estados metabólicos *in vitro*

	Estado metabólico del semen (X±EE)			
	Fresco	Capacitado	Con reacción acrosómica	No capacitado
Malondialdehído (MDA) nMol/ml	1.59±0.09 ^a	1.12±0.08 ^b	1.07±0.12 ^b	1.05±0.02 ^b
Glutación reducida (GSH) nMol/ml	72.6±7.7 ^{ac}	62.04±5.1 ^a	99.09±3.6 ^b	86.07±8.1 ^{bc}
Adenosín rifosfato (ATP) μMol/ml	59.41±8.9 ^a	69.9±7.3 ^a	66.49±8.7 ^a	51.79±5.0 ^a

Literales diferentes en superíndice entre columnas, indica diferencia estadística (P<0.005)

Cada media se determinó con los parámetros obtenidos de cinco pruebas realizadas (n=5)

(X±EE): Media y error estándar

Se ha reportado, que después del proceso de capacitación espermática, la motilidad disminuye debido a la energía limitada de los espermatozoides (Ferramosca, 2014). Por el contrario, nuestros estudios demostraron concentraciones similares de ATP en espermatozoides capacitados, discapacitados y con reacción acrosomal. Esto revela una evidente necesidad de desarrollar medios de conservación espermática que limiten o reduzcan el gasto energético metabólico de los espermatozoides. Las importantes conclusiones de este estudio demuestran una reducción de la motilidad en los espermatozoides en los que se indujo el estado metabólico de discapacitación.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran parámetros metabólicos en los espermatozoides que están asociados con la discapacitación espermática *in vitro* inducida por la fracción proteica del fluido de la UVU. Esta fracción proteica puede incluirse como ingrediente en los medios de preservación espermática *in vitro* para reducir el metabolismo y mantener la viabilidad de los espermatozoides.

Conflictos de intereses: Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses en relación con la publicación de este artículo.



Declaración de financiación: Este estudio no ha sido financiado por ninguna organización

Contribución de los autores:

CVC. Idea original del manuscrito y realización del mismo.

GBA. Supervisión y diseño de los experimentos.

QSJ. Propuestas metodológicas y su realización

HBJ. Concepción de la idea original del manuscrito e interpretación de los resultados.

PRJ. Análisis estadístico y revisión crítica del manuscrito.

LITERATURA CITADA

ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ M, Ntzouni M, Wright D, Khan KI, López-Béjar M, Martínez CA, Rodríguez-Martínez H. 2020. Chicken seminal fluid lacks CD9- and CD44-bearing extracellular vesicles. *Reprod Domest Anim.* 55(3):293-300. ISSN: 439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13617>

ASANO A, Tajima A. 2017. Development and Preservation of Avian Sperm. *Adv Exp Med Biol.* 1001:59-73. ISSN: 2214-8019. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_4

APPLEGATE TJ, Angel R. 2014. Nutrient requirements of poultry publication: History and need for an update. *J Appl Poult Res.* 23(3): 567-575. ISSN: 1056-6171. <https://doi.org/10.3382/japr.2014-00980>

ASHRAF S, Bhatti SA, Nawaz H, Khan MS. 2020. Assessment of dietary selenium sources in commercial male broiler breeders: effects on semen quality, antioxidant status and immune responses. *Pak Vet J.* 40(1): 13-18. ISSN 2074-7764.

http://www.pvj.com.pk/abstract/40_1/19-130.htm

BAKST M. 2010. Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *J Anim.* 89(5): 1323-1329. ISSN: 1525-3163. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3663>

CAMARILLO R, Jiménez I, Guzmán A, Rosales A, Rodríguez F, Pérez-Rivero JJ, Herrera JA. 2019. Oviductal proteins effect in rooster spermatoc cryopreservation. *CryoLetters.* 40(6): 352-356. ISSN: 0143-2044.

http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_40_6_2019.htm#352

DÁVILA PM, Martin M P, Tapia JA, Ortega F C, Balao C C, Peña FJ. 2015. Inhibition of Mitochondrial Complex I Leads to Decreased Motility and Membrane Integrity Related to Increased Hydrogen Peroxide and Reduced ATP Production, while the Inhibition of Glycolysis Has Less Impact on Sperm Motility. *PLoS One.* 10(9):e0138777. ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138777>



FATTAH A, Sharafi M, Masoudi R, Shaverdi A, Esmaeili V. 2017. L-carnitina is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology*. 74:13-18. ISSN: 1090-2392. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.011>

FERRAMOSCA A, Zara V. 2014. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int*. 2014:902953. ISSN: 2314-6141. <https://doi.org/10.1155/2014/902953>

FISCHER DH, Failing SK, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M. 2020. Viability assessment of spermatozoa in large falcons (*Falco spp.*) using various staining protocols. *Reprod Domestic Anim*. 55(10):1383-1392. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13785>

GONZÁLEZ-SANTOS, Jorge A, Ávalos-Rodríguez, Alejandro, Martínez-García, José A, Rosales-Torres, Ana M, Herrera-Barragán, José A. 2019. Sperm morphophysiology in different sections of the rooster reproductive tract. *Int J Morphol*, 37(3): 861-866. ISSN: 0717-9502. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000300861>

HAMMER Ø, Harper DAT and Ryan PD. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*. 4(1):1–9. ISSN: 1094-8074. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf

ITO T, Yoshizaki N, Tokumoto T, Ono H, Yoshimura T, Tsukada A, Kansaku N, Sasanami T. 2011. Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. *Endocrinology*. 152(10):3952–3962. ISSN: 1945-7170. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0237>

JABBAR A, Abbass W, Riaz A, Sattar A, Akram M. 2015. Effect of different concentrations of ascorbic acid on semen quality and hatchability of indigenous aseel chicken. *J Anim Plant Sci*. 25(5):1222-1226. ISSN: 1018-7081. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-25-05/03.pdf>

KU HK, Lim HM, Oh KH, Yang HJ, Jeong JS, Kim SK. 2013. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: comparison with two calculation models. *Anal Biochem*. 434(1):178-80. ISSN: 1096-0309. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.045>

KURKOWSKA W, Bogacz A, Janiszewska M, Gabryś E, Tiszler M, Bellanti F, Kasperczyk S, Machoń-Grecka A, Dobrakowski M, Kasperczyk A. 2020. Oxidative stress is associated with reduced sperm motility in normal semen. *Am J Mens Health*. 14(5):1-8. ISSN: 1557-9891. <https://doi.org/10.1177/1557988320939731>

LEMOINE MS, Mignon-Grasteau I, Grasseau M, Magistrini E, Bleisbois E. 2011. Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*. 75(1):122-130. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.017>



LONG J, Conn T. 2012. Use of phosphospatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24hours. *Poult Sci.* 91(8):1990-1996. ISSN: 1525-3171. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02028>

MASOUDI R, Sharafi M, Shahneh AZ, Khodaei-Motlagh M. 2019. Effects of reduced glutathione on the quality of rooster sperm during cryopreservation. *Theriogenology.* 1(128):149-155. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.016>

MATSUZAKI M, Sasanami T. 2022. Sperm Motility Regulation in Male and Female Bird Genital Tracts. *J Poult Sci.* 59(1):1-7. ISSN: 1346-7395. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0200105>

NAJAFI A, Daghigh KH, Hamishehkar H. 2021. Does alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carriers improve post-thawed sperm quality and ameliorate apoptosis-related genes of rooster sperm? *Poult Sci.* 100(1):357-365. ISSN: 1525-3171. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.007>

NAKAMURA Y. Avian Biotechnology. 2017. *Adv Exp Med Biol.* 1001:187-214. ISSN: 2214-8019. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_12

NGUYEN TMD, Seigneurin F, Froment P, Combarous Y, Blesbois E. 2015. The 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. *PLoS One.* 10(7):e0134420. ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134420>

NGUYEN QT, Wallner U, Schmicke M, Waberski D, Henning H. 2016. Energy metabolic state in hypothermically stored boar spermatozoa using a revised protocol for efficient ATP extraction. *Biol Open.* 5 (11):1743-1751. ISSN: 2046-6390. <https://doi.org/10.1242/bio.017954>

OLUBOWALE S, Greyling JPC, De Witt FH, Hugo A, Raito MB. 2014. Effects of dietary lipid sources on the semen quality of hy-line silver-brown cockerels. *J Anim Plant Sci.* 24(4):991-997. ISSN: 1018-7081. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-24-4/03.pdf>

RESTREPO G, Varela E, Usuga A. 2016. Evaluación de la calidad espermática epididimal en hipopótamos *Hippopotamus amphibius* (*Artiodactyla: hippopotamidae*) ubicados en el magdalena medio, Colombia. *Ac Zool Mex.* 32(2):158-167. ISSN: 2448-8445. <https://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v32n2/0065-1737-azm-32-02-00158.pdf>

ROMO S, López D, Ledesma N, Gutiérrez C, Quintana A, Rangel L. 2022. Comparación en la calidad de huevos obtenidos en un sistema de producción en corrales al aire libre y los producidos en un sistema de jaula. *Rev Mex Cien Pec.* 13(1):32-42. ISSN: 2448-6698. <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/5300/4696>



SAJJADI SH, Ahmadzadeh H, Goharshadi EK. 2019. Enhanced electrophoretic separation of proteins by tethered SiO₂ nanoparticles in an SDS-polyacrylamide gel network. *Analyst*. 145(2):415-423. ISSN: 1364-5528.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/an/c9an01759c>

SASANAMI TM. 2013. Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *J Reprod Dev*. 59(4):334-8. ISSN: 1348-4400. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-038>

SEDAGHAT B, Hajjaran H, Sadjjadi FS, Heidari S, Sadjjadi SM. 2021. Proteomic 1089-8646 through optimizing protein extraction. *BMC Res Notes*. 14(1):22. ISSN: 1756-0500. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05433-3>

SETIAWAN R, Priyadarshana C, Miyazaki H, Tajima A, Asano A. 2021. Functional difference of ATP-generating pathways in rooster sperm (*Gallus gallus domesticus*). *Anim Reprod Sci*. 233:106843. 233. ISSN: 1873-2232.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106843>

ZHONG TY, Ling L, Feng Z, Zhen-He Z, Maxwell H, Ning Y, Zhuo-Cheng H. 2020. The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (*Gallus gallus*) egg formation. *Genomics*. 112(1):243-251. ISSN: 1089-8646.

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.02.003>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>