



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA  
CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y  
SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de  
Médicos Veterinarios

**Autores:**

Chicaiza Quispe Alexander Javier

Tumbaco Quinatoa Robin Stif

**Tutor:**

Veloz Veloz Dina Maricela

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Febrero 2025**



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Chicaiza Quispe Alexander Javier, con cédula de ciudadanía No. 0503026973 y Tumbaco Quinatoa Robin Stif, con cédula de ciudadanía No. 0504365578, declaramos ser autores del presente Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**, siendo la Doctora Mg. Dina Maricela Veloz Veloz, Tutora del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 14 de febrero del 2025



Alexander Javier Chicaiza Quispe  
C.C: 0503026973  
**ESTUDIANTE**



Robin Stif Tumbaco Quinatoa  
C.C: 0504365578  
**ESTUDIANTE**

## CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CHICAIZA QUISPE ALEXANDER JAVIER**, identificado con cédula de ciudadanía **0503026973** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.** - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

Inicio de la carrera: Octubre 2020 - Marzo 2021

Finalización de la carrera: Octubre 2024 – Marzo 2025

Aprobación en Consejo Directivo: 12 de diciembre del 2024

Tutor: Dra. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA.** - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.



**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.


**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.** - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 14 días del mes de febrero del 2025.

  
Alexander Javier Chicalza Quispe  
**EL CEDENTE**

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.  
**LA CESIONARIA**

## CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **TUMBACO QUINATO ROBIN STIF**, identificado con cédula de ciudadanía **0504365578** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.** - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

Inicio de la carrera: Octubre 2020 – Marzo 2021

Finalización de la carrera: Octubre 2024 – Marzo 2025

Aprobación en Consejo Directivo: 12 de diciembre del 2024

Tutor: Dra. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA.** - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.





**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.** - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 14 días del mes de febrero del 2025.



Robin Stif Tumbaco Quinatoa  
**EL CEDENTE**

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.  
**LA CESIONARIA**

## **AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

**“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**, de Chicaiza Quispe Alexander Javier y Tumbaco Quinatoa Robin Stif, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 14 de febrero del 2025



Dra. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.

C.C: 1720299302

**DOCENTE TUTOR**

## AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, los postulantes: Chicaiza Quispe Alexander Javier y Tumbaco Quinatoa Robin Stif, con el título del Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 14 de febrero del 2025



Dr. Xavier Cristobal Quishpe Mendoza, Mg.  
C.C: 0501880132  
**LECTOR 1 (PRESIDENTE)**



Dr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz, Mtr.  
C.C: 1722547278  
**LECTOR 2 (MIEMBRO)**



Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso, Mg.  
C.C: 0502236623  
**LECTOR 3 (MIEMBRO)**

## **AGRADECIMIENTO**

*A mi señor, Jesús, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza, iluminándome cada día de mi vida para terminar este trabajo.*

*A la Universidad Técnica de Cotopaxi, especialmente a la carrera de Medicina Veterinaria por impartirme todos los conocimientos adquiridos durante esta etapa de mi vida.*

*Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres y hermanos por todos los consejos y apoyo incondicional que me brindaron durante todos estos años, también por darme un ejemplo de humildad, sacrificio y enseñarme el valor de las cosas.*

*A mis amistades de la carrera, con quienes compartí innumerables horas de estudio, desvelos, risas y aprendizajes. Su apoyo y camaradería hicieron que este camino fuera más llevadero y enriquecedor.*

*A mis amigos Joss, Alondra, Paola y Oscar quienes, a pesar de la distancia o las diferencias de camino, siempre han estado ahí con palabras de aliento, risas sinceras y momentos inolvidables.*

*A mi colega y amigo de tesis Robin Tumbaco, por la ayuda en este proyecto y por la amistad brindada.*

*Y, por último, a mi tutora y guía Dra. Dina Veloz por su ayuda, paciencia y consejos brindados para el desarrollo de este proyecto.*

***Alexander Javier Chicaiza Quispe***

### **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco ante todo a Dios, por brindarme la oportunidad mediante mis padres de culminar una etapa más en mi vida, por cuidarnos en el transcurso del proceso y nunca abandonarme. Agradezco todo conocimiento y experiencia adquirida mediante las personas que Dios ha colocado en el transcurso de mi vida.*

***Robin Stif Tumbaco Quinatoa***

## **DEDICATORIA**

*A mi padre Carlos y madre Amparo, quienes con su amor incondicional, esfuerzo y sabios consejos han sido mi mayor fuente de inspiración y fortaleza. Gracias por ser mi guía y apoyo en cada paso de este camino.*

*A mi hermano mayor Carlitos, por enseñarme con su ejemplo que la perseverancia y la determinación son claves para alcanzar nuestros sueños. Y a mi hermano menor Alexis, por su alegría y compañía, que han sido un respiro en los momentos más desafiantes.*

*Alexander Javier Chicaiza Quispe*

## **DEDICATORIA**

*Dedico este logro a mi familia espiritual (CENTI), por brindarme ese apoyo psicológico y emocional. Por ser mi lugar de meditación y liberación además de poder dialogar con los líderes a cargo sobre datos personales.*

*A mi familia, ya que sin el apoyo de ellos no podría haber logrado conllevar esta carga hasta su culminación quien me han motivado a nunca rendirme y mucho menos renunciar a la carrera que soñé desde niño.*

*A los médicos veterinarios que me dieron la oportunidad de aprender directamente en el campo, brindándome experiencias y conocimientos de gran valor de cómo será la vida de un veterinario fuera.*

***Robin Stif Tumbaco Quinatoa***

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TÍTULO: “EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA  
CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A  
LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”**

**Autores:**

Chicaiza Quispe Alexander Javier  
Tumbaco Quinatoa Robin Stif

## RESUMEN

Los avances en las Tecnologías de Reproducción Asistida (TRAs) aplicadas en gallos criollos no son consistentes. El objetivo de este estudio fue evaluar un crioprotector en la criopreservación de semen de gallos criollos, obtenidos mediante técnica de masaje abdominal. Se incluyeron en el estudio machos fértiles (n=5; edad: 6-8 meses). El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Se recolectaron 15 eyaculados de cinco gallos criollos, los cuales fueron diluidos con Lake-Ravie 84 y envasados en pajuelas de 0.50 ml. Las muestras se sometieron a una estabilización hasta alcanzar los 5 °C, posteriormente se congelaron en vapores de nitrógeno líquido hasta alcanzar los -196°C. Se descongeló 1 pajilla de cada colecta para su análisis, en la evaluación post congelación se evaluaron parámetros como la motilidad individual, movilidad progresiva, vigor espermático y morfología. Los análisis estadísticos de la investigación dentro del laboratorio mostraron una disminución significativa en la motilidad individual (de 91.67% a 58.33%) y la movilidad progresiva (de 91.67% a 53.33%) después de la congelación. El vigor espermático también se redujo de 4 a 3.33. Sin embargo, la morfología espermática no presentó cambios significativos, manteniéndose en un 90% de espermatozoides normales. Se realizó la inseminación artificial en gallinas criollas y se determinó el porcentaje de huevos fértiles tras la incubación la cual fue del 0%. La importancia de este estudio radica en la contribución al desarrollo de estrategias para la conservación de la diversidad genética aviar y el mejoramiento de técnicas reproductivas en la avicultura. Los datos obtenidos podrán servir como base para futuras investigaciones que busquen mejorar la tasa de fertilización en semen criopreservado y garantizar la sostenibilidad de las razas criollas en sistemas de producción avícola, promoviendo su conservación y aplicación en programas reproductivos eficientes.

**Palabras claves:** Gallos criollos, motilidad, movilidad, morfología espermática, criopreservación, fertilidad

### TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

**TITLE: "CRYOPROTECTANT EVALUATION IN THE CRYOPRESERVATION SEMEN OF CREOLE ROOSTERS AND THEIR RESPONSE TO ARTIFICIAL INSEMINATION ".**

**Authors:**

Chicaiza Quispe Alexander  
Tumbaco Quinatoa Robin Stif



## ABSTRACT

The advances in Assisted Reproductive Technologies (ARTs) applied in creole cocks are not consistent. So, the objective of this study was to evaluate a cryoprotectant in the cryopreservation semen in creole rosters. It was obtained by abdominal massage technique. The study included five fertile males from six to eight months. (n=5; age: 6-8 months). It took place in the Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources at Technical University of Cotopaxi. Fifteen ejaculations were collected from five creole rosters. It was diluted with LakeRavie 84 and packed in 0.50 ml straws. The samples were stabilized to 5 °C, then they were frozen in liquid nitrogen vapors to 196°C. The straw from each collection was thawed for analysis. In the post-freezing evaluation, parameters such as individual motility, progressive mobility, vigor and morphology sperm were evaluated. The statistical analysis of the research in the laboratory showed a significant decrease in individual motility from 91.67% to 58.33%. It also showed a progressive mobility from 91.67% to 53.33% after freezing. Sperm vigor was reduced from 4 to 3.33 as well. However, sperm morphology did not present significant changes, remaining 90% normal sperm. Artificial insemination was performed in creole hens and the percentage of fertile eggs was 0% after incubation. The importance of this study lies in the contribution to the development of strategies for the conservation of avian genetic diversity and the improvement of reproductive techniques in poultry farming. The data obtained can contribute as a basis for future research that aimed to improve the fertilization rate in cryopreserved semen and guarantee the sustainability of creole breeds in poultry production systems, promoting their conservation and application in efficient reproductive programs.

**Key words:** creole roosters, motility, mobility, morphology sperm, cryopreservation, fertility

## INDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR .....	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	vii
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN .....	viii
AGRADECIMIENTO .....	ix
DEDICATORIA .....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
INDICE DE CONTENIDOS .....	xv
INDICE DE TABLAS .....	xviii
INDICE DE FIGURAS .....	xix
1. INFORMACIÓN GENERAL .....	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO .....	2
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN: .....	3
5. OBJETIVOS: .....	4

6.	ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS .....	4
7.	FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA .....	5
7.1	Generalidades De La Reproducción Avícola .....	5
7.2	Sistema reproductivo del gallo .....	6
7.2.1	Testículos .....	6
7.2.2	Conductos deferentes .....	7
7.2.3	Órgano copulador .....	7
7.2.4	Desarrollo testicular .....	7
7.2.5	Características morfológicas espermáticas .....	8
7.2.6	Características fisiológicas del semen .....	9
7.2.7	Color del semen .....	9
7.2.8	Volumen de eyaculación: .....	10
7.2.9	PH del semen .....	10
7.2.10	Concentración del semen .....	10
7.2.11	Espermatogénesis .....	11
7.3	Sistema reproductivo de la gallina y síntesis del huevo .....	12
7.3.1	El ovario .....	12
7.3.2	Oviducto .....	12
7.4	Test de Host .....	14
7.5	Criopreservación .....	15
7.5.1	Principio de ósmosis .....	15
7.6	Diluyente Lake-Ravie 84 .....	16
7.7	Agentes Crioprotectores (ACP) .....	16
7.7.1	Crioprotectores penetrantes .....	17
7.7.2	Crioprotectores No-Penetrantes .....	18
7.8	Criolesiones Espermática y CPA .....	18
7.8.1	Cold shock .....	19

7.9	Aditivos funcionales del diluyente .....	19
7.9.1	Antioxidantes .....	20
7.9.2	Agentes modificadores de la membrana .....	20
7.9.3	Bloqueadores de hielo .....	20
7.10	Procedimientos para la recolección de semen .....	21
7.11	Fecundación natural .....	21
7.12	Inseminación artificial .....	22
7.13	Bases fisiológicas de la incubación .....	22
7.14	Propiedades de la cascara de huevo .....	23
7.15	Influencia de la presión atmosférica .....	24
8.	VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS .....	24
9.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	24
9.1	Ubicación .....	24
9.2	Materiales y método .....	25
9.2.1	Materiales físicos .....	25
9.2.2	Materiales químicos .....	26
9.2.3	Material biológico .....	26
9.3	Diseño experimental .....	26
9.4	Variables experimentales .....	27
9.4.1	Variables dependientes .....	27
9.4.2	Variables independientes .....	27
9.5	Identificación de las aves donantes .....	27
9.6	Gallos escogidos según su condición física y morfológica para la colección de semen	28
9.7	Preparación de donantes .....	30
9.8	Preparación de diluyente .....	30
9.9	Colecta de muestra.....	31
9.10	Transporte de muestra .....	31

9.11	Análisis macroscópico .....	31
9.12	Análisis microscópico .....	31
9.12.1	Motilidad individual .....	31
9.12.2	Movilidad progresiva .....	32
9.12.3	Vigor espermático .....	32
9.12.4	Prueba de integridad de membrana plasmática (HOST) .....	32
9.12.5	Concentración espermática .....	32
9.12.6	Morfología .....	33
9.13	Preparación de pajuelas .....	33
9.14	Método de criopreservación .....	34
9.15	Descongelamiento de semen de gallo e inseminación de gallinas .....	34
9.16	Recolecta huevos para su posterior incubación .....	34
10.	Análisis y discusión de los resultados .....	35
10.1	Motilidad individual .....	35
10.2	Movilidad progresiva .....	36
10.3	Vigor .....	37
10.4	Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática .....	38
10.5	Morfología .....	38
10.6	Porcentaje de huevos fértiles .....	40
10.7	Discusión .....	40
11.	IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS) ....	42
12.	PRESUPUESTO DEL PROYECTO .....	43
13.	CONCLUSIONES .....	44
14.	RECOMENDACIONES .....	44
15.	BIBLIOGRAFÍAS .....	45
16.	ANEXOS. ....	54

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b>	Actividades y resultados de la investigación en relación a los objetivos planteados. .	4
<b>Tabla 2.</b>	Composición del diluyente Lake-Ravie 84 .....	16
<b>Tabla 3.</b>	Concentración espermática de cada día de extracción de muestra de semen. ....	33
<b>Tabla 4.</b>	Evaluación de motilidad individual pre y post congelamiento.....	35
<b>Tabla 5.</b>	Evaluación de la movilidad progresiva pre y post congelamiento. ....	36
<b>Tabla 6.</b>	Evaluación de espermatozoides con morfología normal pre y post congelamiento.	38

<b>Tabla 7. Descripción de gastos .....</b>	<b>43</b>
---	-----------

**INDICE DE FIGURAS** **Figura 1:** Aparato reproductor masculino; **Error!** **Marcador** **no**  
**definido.**

<b>Figura 2:</b> Espermatozoide del gallo observado bajo microscopio .....	9
<b>Figura 3:</b> Aparato reproductor de la gallina .....	14
<b>Figura 4:</b> Representación de la ósmosis celular .....	16
<b>Figura 5:</b> Daños ocasionados durante el congelamiento y post descongelamiento .....	19
<b>Figura 6:</b> Mapa del cantón Salcedo .....	25
<b>Figura 7:</b> Gallo 1.....	28
<b>Figura 8:</b> Gallo 2.....	28
<b>Figura 9:</b> Gallo 3.....	29
<b>Figura 10:</b> Gallo 4.....	29
<b>Figura 11:</b> Gallo 5.....	30
<b>Figura 12:</b> Porcentaje de motilidad individual pre y post congelamiento .....	36
<b>Figura 13:</b> Porcentaje de motilidad individual pre y post congelamiento .....	37
<b>Figura 14:</b> Valores de vigor espermático pre y post congelamiento .....	37
<b>Figura 15:</b> Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron de manera favorable al test de host en el pre-congelamiento .....	38
<b>Figura 16:</b> Porcentaje de espermatozoides con morfología normal pre y post congelamiento. .....	39
<b>Figura 17:</b> Porcentaje de huevos fértiles.....	40

## **1. INFORMACIÓN GENERAL**

### **Título del Proyecto:**

“EVALUACIÓN DE UN CRIOPROTECTOR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS CRIOLLOS Y SU RESPUESTA A LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL”

**Fecha de inicio:** Septiembre 2024 **Fecha**

**de finalización:** Febrero 2025

### **Lugar de ejecución:**

Barrio-parroquia-cantón-provincia-zona 3 e institución

### **Facultad que auspicia**

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

### **Carrera que auspicia:**

Medicina Veterinaria

### **Proyecto de investigación vinculado:**

Recursos Zoogenéticos Locales, conservación y desarrollo sostenible

### **Equipo de Trabajo:**

**Estudiante 1:** Chicaiza Quispe Alexander Javier

**Estudiante 2:** Tumbaco Quinatoa Robin Stif **Docente**

**Tutor:** Dra. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.

### **Área de Conocimiento:**

Agricultura Subárea:

Veterinaria

### **Línea de investigación:**

Análisis, conservación y aprovechamiento racional de la biodiversidad, fauna y recursos naturales para el desarrollo sustentable y la prevención de desastres naturales.

### **Sub líneas de investigación de la Carrera:**

Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoogenéticos.

## **2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

La criopreservación del semen aviar es una herramienta fundamental para mantener la diversidad genética y el desarrollo de biotecnologías reproductivas en la avicultura. En el caso de los gallos criollos, la optimización de los protocolos de criopreservación es fundamental debido a su importancia en la preservación de razas locales con características genéticas adaptadas a diversas condiciones ambientales (1).

El uso de técnicas de criopreservación en semen aviar presenta desafíos significativos, como la reducción en la motilidad y viabilidad espermática tras la descongelación. Investigaciones previas han evidenciado que la fertilidad del semen criopreservado en aves es baja, lo que limita su aplicación en programas de reproducción asistida. Por ello, es fundamental evaluar la eficacia de diferentes crioprotectores para mejorar la viabilidad espermática post-congelación (1).

Este estudio busca determinar la efectividad de un crioprotector específico en la criopreservación de semen de gallos criollos, con el fin de mejorar la supervivencia espermática y la fertilidad post-inseminación artificial. Los resultados contribuirán al perfeccionamiento de los protocolos de conservación genética y reproducción asistida en avicultura, beneficiando tanto a investigadores como a productores avícolas. Además, el desarrollo de técnicas eficientes de criopreservación podría facilitar la implementación de bancos genéticos para la preservación de razas avícolas locales (2).

Este proyecto aportará información clave para mejorar la calidad del semen criopreservado, optimizar las tasas de fertilización y garantizar la conservación de la biodiversidad aviar. Asimismo, permitirá generar conocimiento aplicable a otras especies avícolas, ampliando el impacto de la investigación en la biotecnología reproductiva (2).

## **3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

### **Directos**

- Investigadores y Científicos
- Técnicos y Profesionales en Reproducción Asistida
- Productores y Criadores de Gallos Criollos



### **Indirectos**

- Instituciones Académicas y de Investigación
- Industria Avícola
- Consumidores de Productos Avícolas
- Conservacionistas y Organizaciones de Preservación de la Biodiversidad
- Estudiantes de Biotecnología y Veterinaria

El impacto de este proyecto es amplio y significativo, beneficiando tanto a actores directos como indirectos en la cadena de valor de la avicultura, desde la investigación, desarrollo hasta la elaboración y consumo final. La mejora en las técnicas de criopreservación y reproducción asistida contribuirá a la sostenibilidad, eficiencia y diversificación genética en el sector avícola.

### **4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:**

La producción avícola es un sector clave en la seguridad alimentaria global, ya que el consumo de carne y huevos de ave representa una de las primordiales, fuentes de proteína de origen animal. Sin embargo, la erosión genética de las razas criollas de aves debido a la introducción de líneas comerciales altamente especializadas ha reducido significativamente la diversidad genética, lo que limita la resiliencia de las poblaciones avícolas frente a enfermedades y cambios ambientales (3).

En América, la industria avícola se encuentra dominada por razas comerciales altamente productivas, lo que ha llevado a la reducción del uso de razas criollas en sistemas de producción. Ya que países como Brasil, México y Argentina, que son líderes en la exportación avícola, los programas de mejoramiento genético han favorecido la homogeneización de las líneas genéticas, desplazando a las variedades locales (4).

En Ecuador, la avicultura se ha desarrollado principalmente con líneas genéticas comerciales destinadas a la producción de carne y huevos, lo que ha generado una disminución en la cría de gallos y gallinas criollas. A pesar de su adaptabilidad y resistencia a condiciones adversas, la falta de programas de conservación genética pone en riesgo la permanencia de estas razas (5).

El mejoramiento genético en la industria avícola ha permitido el desarrollo de razas altamente productivas en términos de crecimiento y eficiencia alimenticia. Sin embargo, esta selección intensiva ha generado animales con menor resistencia a condiciones ambientales adversas, aumentando su susceptibilidad a enfermedades y cambios climáticos. Las razas criollas, en contraste, han desarrollado una mayor adaptabilidad a entornos rústicos con menor

disponibilidad de recursos, pero su reemplazo progresivo por líneas comerciales amenaza su conservación. En este contexto, la criopreservación de semen aviar se presenta como una herramienta clave para la preservación genética de estas poblaciones y su potencial uso en estrategias de reintroducción y mejora genética sostenible

## 5. OBJETIVOS:

### General

Evaluar un crioprotector en la criopreservación de semen de gallos criollos y su respuesta a la inseminación artificial.

### Específicos

1. Estandarizar un protocolo de colecta de semen de gallos criollos, a través de masajes abdominales con el fin de obtener muestras seminales de forma manual.
2. Valorar la viabilidad del semen de gallos criollos por medio de observación microscópica tras la criopreservación, para determinar el riesgo-beneficio de este método aplicado.
3. Determinar la tasa de fertilidad en huevos de gallinas criollas inseminadas con semen criopreservado mediante la colecta, incubación y ovoscopia, para verificar la efectividad de este método de inseminación.

## 6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

*Tabla 1. Actividades y resultados de la investigación en relación a los objetivos planteados.*

OBJETIVO 1	ACTIVIDAD	METODOLOGÍA	RESULTADOS
Estandarizar un protocolo de colecta de semen de gallos criollos, a través de masajes abdominales con el fin de obtener muestras seminales de forma manual.	Adiestramiento de los gallos criollos durante un mes para realizar la extracción del semen.	Masaje abdominal, y estimulaciones suaves, con golpes tenues en la espalda hasta llegar a la cola, haciendo que se produzca una erección del pene.	Total, de 15 eyaculados, obtenidos en tres sesiones de extracción de muestra seminal a los 5 gallos criollos.

<b>OBJETIVO 2</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>RESULTADOS</b>
Valorar la viabilidad del semen de gallos criollos por medio de observación microscópica tras la criopreservación, para determinar el riesgo/beneficio de este método aplicado.	Estabilización de las muestras en dos horas a una temperatura de 5 °C.  Congelación en nitrógeno líquido.	Descongelación de pajuelas a 5 °C por 3 minutos.	Datos sobre morbilidad individual (65%), movilidad progresiva (45%), vigor (3) y morfología (90%) post descongelamiento.
<b>OBJETIVO 3</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>RESULTADOS</b>
Determinar la tasa de fertilidad en huevos de gallinas criollas inseminadas con semen criopreservado, mediante la colecta, incubación y la ovoscopia, para verificar el provecho de este método de inseminación.	Recolección de huevos después de 3 días post inseminación durante una semana.	Uso de incubadoras controladas para el desarrollo de embriones.	Recopilación del número de huevos fértiles (0%) de 60 huevos incubados,

## **7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA**

### **7.1 Generalidades De La Reproducción Avícola**

Hace un tiempo atrás en los años 40, debido al gran incremento de habitantes, tiene inicio la actividad comercial, en la cual inicio con la introducción de aves específicas en su campo de producción, tanto en producción de huevos, carne y doble propósito. Sin embargo, al igual que la religión varias comunidades campesinas han optado por mantener a sus aves autóctonas, las

cuales satisfacen sus necesidades diarias y sobre todo garantizan su supervivencia dado a su gran resistencia a enfermedades y cambios climáticos. En la actualidad Ecuador ha acogido esta introducción de aves, pero se va perdiendo la diversidad de las gallinas criollas (6).

Dentro de la producción avícola doméstica se seleccionan a los ejemplares que puedan cubrir con eficiencia un mayor número de hembras, la problemática reside que en algunos casos no se logra que los reproductores puedan copular a más de diez hembras de forma satisfactoria, debido al desgaste físico que estos sufren con cada monta y que los machos tienden a cubrir con más frecuencia a hembras consideradas como su favoritas o de su grupo, haciendo que esto disminuya la fertilidad de los huevos ya que estos no son fertilizados en el lapso de tiempo necesario (7).

Un desencadenante de la baja fertilidad es también la baja producción y calidad espermática la cual se la relaciona a la edad, época del año, nutrición del animal, cantidad de luz solar, humedad y problemas físicos presentes en los reproductores. Por lo cual se han creado e implementado biotecnologías para el mejoramiento de la producción y reproducción; estas son la inseminación artificial de las gallinas y la criopresevación de semen (8).

## **7.2 Sistema reproductivo del gallo**

En las aves, el aparato reproductivo está conformado por tres secciones morfo funcionales, en los cuales se encuentran: los testículos, las vías deferentes y el órgano copulador (9).

### **7.2.1 Testículos**

Los testículos se ubican en la cavidad abdominal, cerca de los riñones, y están sujetos a la pared dorsal interna del abdomen mediante un ligamento de tejido conectivo llamado mesorquio. Estos órganos, de color amarillo y forma similar a un frejol, están compuestos por múltiples conductos. En ellos se producen los espermatozoides, y la eyaculación es el proceso reflejo mediante el cual los espermatozoides y el plasma seminal son expulsados fuera del tracto reproductivo (10).

En estos órganos se produce la espermatogénesis, el cual es una serie de cambios que sufren las células germinales desde la espermatogonia hasta que son espermatozoides aptos para la reproducción, proceso que ocurre en el epitelio seminífero. Estas transformaciones tienen estrecha relación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli y están bajo control de las hormonas gonadotropashipófisarias (11).

### **7.2.2 Conductos deferentes**

Los tubos seminíferos se terminan en la proximidad inmediata del cordón testicular, donde se conectan con los túbulos de la red testis, que a su vez se conecta a los conductos eferentes, que a su vez desemboca lateralmente en el canal del epidídimo. Este último se prolonga por el conducto deferente, el cual se encuentra muy replegado, donde se realiza la maduración y almacenamiento de los espermatozoides, que hablando de los mamíferos es lo que se denomina epidídimo (11).

### **7.2.3 Órgano copulador**

Los gallos no poseen pene, por lo que su sistema reproductivo incluye una pequeña protuberancia conocida como papila copulativa, que tiene una apariencia similar a este órgano. Esta estructura se encuentra ubicada en la pared posterior de la cloaca, debajo de las plumas de la cola. Durante la erección, los pliegues redondeados de la cloaca se hinchan, generando una ligera protuberancia hacia el exterior, la cual forma un pequeño canal a través del cual se libera el esperma. (12).

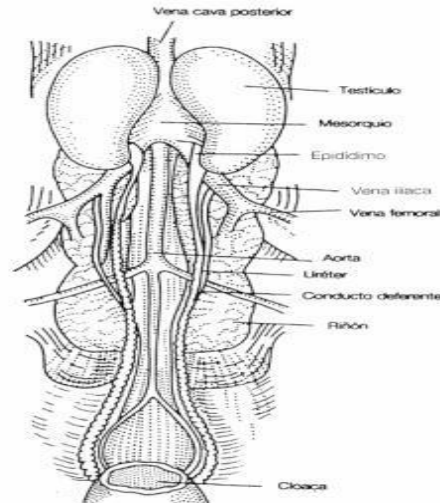
Es importante destacar que esta denominación se refiere al conjunto de pliegues linfáticos ubicados en la cloaca, el falo y los cuerpos vasculares asociados a la cloaca. Estos últimos son estructuras ovoides incrustadas en la pared de la cloaca, las cuales se llenan de linfa durante la erección. Dicha linfa se filtra hacia la cloaca a través de los pliegues linfáticos, generando un fluido transparente. Durante la erección, los pliegues redondeados de la cloaca se inflaman, creando una protuberancia hacia el exterior que forma un pequeño canal por donde se expulsa el esperma.

En el caso del gallo, el falo vestigial está bien desarrollado y presenta un canal de forma espiral, especialmente en las aves palmípedas. Durante la cópula, solo existe un contacto entre las cloacas del macho y la hembra. (11).

### **7.2.4 Desarrollo testicular**

El tamaño de los testículos aumenta con factores como la edad, el fotoperiodo y la actividad sexual. En los gallos, el desarrollo testicular máximo se alcanza alrededor de las 30 semanas de edad. Se ha observado que la mejor calidad del semen se obtiene a los 210 días de edad, en comparación con gallos más jóvenes, como aquellos de 175 días (13).

*Figura 1: Aparato reproductor masculino*



*Fuente:* <https://www.produccion->

[animal.com.ar/produccion\\_aves/produccion\\_avicola/10reproduccion\\_aviar.pdf](https://www.produccion-animales.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/10reproduccion_aviar.pdf)

### 7.2.5 Características morfológicas espermáticas

Al igual que en la mayoría de las especies, estos son de forma alargada, conformados por cabeza, cuerpo y cola. Con una longitud de 30-300  $\mu\text{m}$  (14).

El acrosoma, el cual está ubicado en la cabeza del espermatozoide contiene enzimas proteolíticas, principalmente hialuronidasa y acrosina que son requeridas durante la fertilización. El cuerpo tiene 4  $\mu\text{m}$  de largo y contiene mitocondrias (20 a 60 mitocondrias) y por último la cola que es la encargada de ayudar al desplazamiento de los espermatozoides (14).

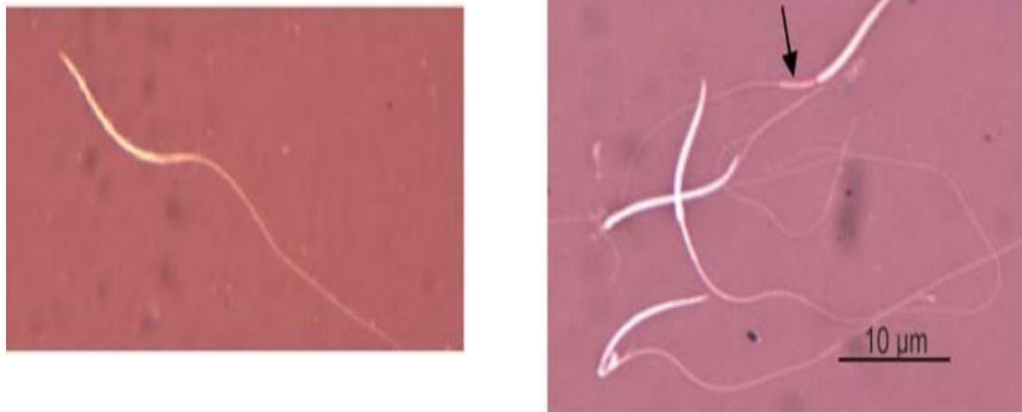
El espermatozoide es haploide, lo que quiere decir que se encuentra desprovisto de citoplasma, constituido por un núcleo transcripcional para reemplazar proteínas, un acrosoma que permite al espermatozoide interactuar y penetrar al ovocito realizando la fertilización de este (15).

Los espermatozoides de los pollos son más susceptibles al daño durante el proceso de congelación, esto dado a su relación superficie/volumen es relativamente menor y también a que su cola es más delgada en comparación a la de otras especies como la humana y la bovina. La cabeza del espermatozoide del gallo es ligeramente curva cilíndricamente, el tamaño de la cabeza influye en el volumen de agua transportada por la célula y la forma de la célula afecta a la relación de la membrana entre la superficie, lo cual se relaciona a su capacidad de adaptabilidad a los cambios osmóticos durante la congelación (16).

Los espermatozoides de las aves poseen pocos antioxidantes citoplasmáticos y las membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Estos componentes hacen que los espermatozoides sean más susceptibles al estrés oxidativo lo cual provoca una reducida motilidad, daño en el DNA y

baja fertilidad, mientras que el daño en la membrana plasmática del espermatozoide congelado se asocia con la separación del acrosoma, lo que a su vez también disminuye la fertilidad (17).

*Figura 2: Espermatozoide del gallo observado bajo microscopio*



*Fuente: <https://www.semanticscholar.org/paper/Biological-Features-of-the-Avian-MaleGamete-and-to-Blesbois/a8fafbdf9050563740113bee313ba48c232056d1>*

### **7.2.6 Características fisiológicas del semen**

En los mamíferos, el semen es más fluido debido a las secreciones de las glándulas de Cowper, las vesículas seminales y la próstata. Sin embargo, en las aves, estas glándulas están ausentes. En su lugar, los espermatozoides se encuentran suspendidos en un fluido producido por el vaso deferente (compuesto por el cuerpo blanco y la papila) (18).

Cuando este fluido transparente está presente en grandes cantidades, se observa un mayor porcentaje de espermatozoides muertos, ya que contiene más plasma, calcio, cloruros y una sustancia aglutinante. Además, el semen de las aves se caracteriza por poseer una alta concentración de ácido glutámico y una baja cantidad de fructosa. Para evitar que el exceso de fluido transparente afecte negativamente la cantidad de espermatozoides capaces de fertilizar, es recomendable recolectar el semen únicamente durante el primer masaje en el macho (19).

### **7.2.7 Color del semen**

En general el color del semen es un indicador de la densidad del eyaculado. El semen de los gallos puede variar desde una suspensión densa y opaca hasta una sustancia acuosa, esto producto de la gran variedad de glándulas ubicados en la cloaca y estas producen esta secreción (20).

El color del semen puede variar dependiendo de la edad del animal, su alimentación y su manejo, aunque por lo general es cremoso, lo que nos indica una alta concentración espermática.

Además, el color nos puede servir como indicativo de contaminantes en las muestras, como lo son heces, orina e incluso sangre, lo que le tornaría de un color marrón o verdoso (20).

#### **7.2.8 Volumen de eyaculación:**

El gallo produce entre 0,01-1 ml por eyaculado, considerando 0,6 ml el volumen promedio de eyaculación, aunque cabe recalcar que esto puede variar ya que diferentes gallos de la misma especie suelen producir distintos volúmenes de semen y en distintos momentos, además de que esto se ve alterado por factores externos como la dieta, el clima, la temporada y el manejo que se les dé.

El volumen promedio de eyaculado mediante la técnica de masaje abdominal es de 0,14-0,28 ml, sin embargo, se han registrado colectas de volúmenes de entre 0,37-0,73 ml. Teniendo en cuenta esto es importante tener en cuenta el volumen y la concentración espermática ya que con estos datos se determina el número total de espermatozoides presentes en cada eyaculado (20).

#### **7.2.9 PH del semen**

El Ph del semen puede variar ligeramente entre las diferentes razas y especies de aves, aunque el Ph óptimo se encuentra entre 7,0-7,4. La motilidad de los espermatozoides es mejor entre un Ph que se halle entre 7,0-7,4 siendo este ligeramente alcalino aumentando la capacidad de fertilización, en comparación con un Ph de 6,4 que no es adecuado para la conservación del semen, ya que este Ph causaría daños a la membrana plasmática (20).

Existen varios factores que pueden variar el Ph del semen, especialmente de las secreciones que se encuentren junto al eyaculado y además es probable que el Ph de este disminuya a medida que aumenta el tiempo entre la colecta, la medición y los en los tubos de recolección y la manipulación, hace que los espermatozoides descompongan la fructosa del semen en ácido láctico en condiciones anaeróbicas (20).

#### **7.2.10 Concentración del semen**

El semen de los gallos es altamente concentrado, teniendo una concentración entre 3000 a 6000 millones de espermatozoides por ml, aunque esto puede cambiar considerablemente en función de la estirpe, el individuo, estado fisiológico y las condiciones en las que realizan las colectas de semen (21) .

#### **7.2.11 Espermatogénesis**

La espermatogénesis se puede describir como el proceso mediante el cual las células germinales experimentan una serie de cambios, pasando de ser espermatogonias hasta convertirse en



espermatozoides completamente maduros. Este proceso tiene lugar en el epitelio seminífero, donde las células germinales interactúan de manera estrecha con las células somáticas del tejido, especialmente con las células de Sertoli. Además, está regulado por las hormonas gonadotropas secretadas por la hipófisis. (22).

El desarrollo tanto testicular como la espermatogénesis en las aves se llevan a cabo en dos etapas principales: **prepuberal** y **puberal**.

1. **Etapa prepuberal:** Durante esta fase, el evento más destacado es la proliferación activa de las células de Sertoli y las divisiones celulares en la línea germinal, que dan lugar a la formación de espermatozoides. En este periodo, se observa un aumento significativo en el peso de los testículos. Esta etapa tiene una duración aproximada de 8 a 10 semanas.
2. **Etapa púber:** En esta fase, intervienen el resto de las células de la línea germinal, y es posible identificar espermatozoides maduros. Esta etapa generalmente coincide con las 20 semanas de vida del gallo. Todos estos procesos llegan a estar regulados por hormonas, las cuales, a su vez, son controladas por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (23).

En las aves, así como en otros vertebrados, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), también conocida como hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), es producida por el hipotálamo y desempeña un papel fundamental en la regulación de la liberación de gonadotropinas, como la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo-estimulante (FSH) y la prolactina, desde la glándula pituitaria anterior. Estas gonadotropinas se unen a receptores específicos ubicados en las gónadas (ovarios y testículos), ejerciendo un impacto directo en su funcionamiento (24).

La GnRH cumple un rol fundamental en la regulación de diversos procesos reproductivos, como la madurez sexual, la tasa de ovulación, la producción de semen, la incubación, la foto refractariedad (respuesta a los cambios en la duración del día) y el envejecimiento reproductivo. Así, esta hormona es esencial para mantener y controlar la función reproductiva en las aves (25).

### 7.3 Sistema reproductivo de la gallina y síntesis del huevo

La reproducción tanto de las aves como de mamíferos se consideran distintas, tanto que si hablamos de su aparato reproductor y de su mecanismo regulador neuro-endocrino, el aparato

reproductor de la gallina está conformado por 2 secciones, el ovario y el oviducto que se separa en sus respectivos segmentos (26).

### 7.3.1 El ovario

Las gallinas se caracterizan principalmente por la ausencia o pérdida del ovario y oviducto derecho por lo cual presentan un oviducto izquierdo de mayor alargamiento. El ovario de la gallina tiene un peso aproximado de 35 gramos, el cual se halla localizada en la región inferior de la cavidad abdominal, aproximado al riñón. Su apariencia característica de "racimo de uvas" se le atribuye a la presencia de folículos en distintas etapas de desarrollo (27).

Aproximadamente 10 días previos de la ovulación, comienza la etapa de crecimiento espontáneo de la yema dentro del folículo ovárico, proceso conocido como vitelogénesis. Durante esta etapa, el folículo aumenta su peso desde 0,06 gramos hasta alcanzar unos 18 gramos. Este crecimiento se debe a la incorporación de capas concéntricas de vitelo (yema), cuya tonalidad cambia según el tipo y concentración de pigmentos presentes en la alimentación de la gallina. La ovulación ocurre una vez el folículo llega a su madurez y libera la yema desarrollada, la cual es receptada por el oviducto para continuar su proceso de formación del huevo (28).

### 7.3.2 Oviducto

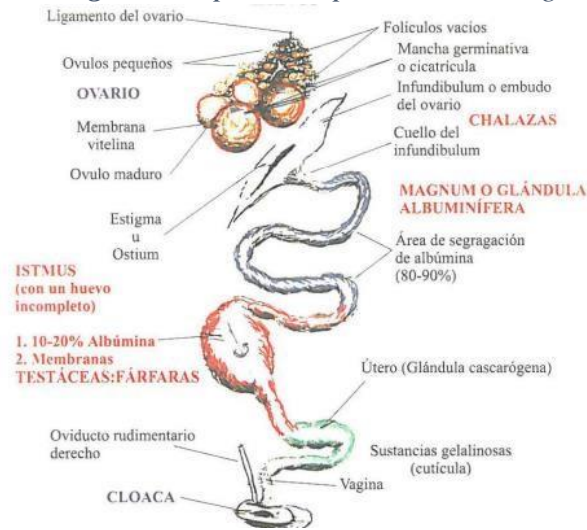
El oviducto es un tubo de alrededor de 60-70 cm de largo que conecta el ovario con la cloaca. Dentro del oviducto se distinguen cinco porciones: Infundíbulo, magno, istmo, útero o glándula cascarógena y cloaca (29).

1. **Infundíbulo:** Es la entrada del oviducto, es aquí donde se produce la fertilización del huevo. Desde el inicio del infundibulum, la superficie interna presenta arrugas que se disponen en forma de espirales a lo largo del oviducto. Estas arrugas hacen que el huevo inicie un movimiento de rotación sobre su eje, siempre en el mismo sentido. Este movimiento rotatorio provoca el arrollamiento o trenzado de las fibras de mucina que forman las chalazas, las cuales se originan a partir de las proteínas de la capa chalacífera (30).
2. **Magno:** A continuación, el huevo pasa al tramo largo del oviducto conocido como magnum o glándula albuminífera, que es la porción más extensa del oviducto y donde se forma la clara o albúmina del huevo. En esta zona, el huevo se mantiene alrededor de tres horas. Durante las cuales la clara es depositada alrededor de la yema. Sin embargo, en esta etapa, la clara se encuentra en forma de un concentrado proteico y, según algunos

autores, representa solo la mitad del albumen del huevo recién puesto, mientras que otros sugieren que en este tramo se completa entre el 80% y 90% del total de la clara. En el *mágnium*, las glándulas tubulares producen proteínas como la ovoalbúmina, la lisozima y la ovotransferrina, que forman la capa media de la albúmina gruesa. Por otro lado, las células epiteliales sintetizan otras proteínas, como la avidina y más ovoalbúmina, que se incorporan a las capas delgadas de la clara (31).

3. **Istmo:** Del *mágnium*, el huevo pasa al istmus o istmo, que es la parte más estrecha del oviducto. En esta zona, el huevo permanece aproximadamente tres horas, durante las cuales se secreta el 10% al 20% restante de la albúmina. Bajo la presión del descenso del huevo, las células tubulares se estiran, formando fibras en el lumen del oviducto. Estas fibras dan lugar a la formación de las membranas testáceas (también llamadas *fárfaras* o *corion*), que se sitúan alrededor de la albúmina y están en contacto directo con el interior de la cáscara, tapizándola. Por esta razón, también se las conoce como membranas de la cáscara. Además, en esta etapa, se completan los depósitos de calcio en la zona de transición entre el istmus y el útero, preparando el huevo para la formación de la cáscara en la siguiente fase del proceso (32).
4. **Útero:** La formación de la cáscara o *casarón* ocurre en el interior del útero o glándula *casarógena*, donde las glándulas tubulares depositan inicialmente cristales periféricos alrededor de cada núcleo mamilar. En esta etapa, también se forma la matriz principal e orgánica de la cáscara, los pigmentos y la cutícula. La formación de los cristales hacia el interior del huevo está fuertemente inhibida por las membranas *farfáreas*. Posteriormente, los conos de cristales comienzan a fusionarse a lo largo de sus ejes, formando la *empalizada*, que constituye la estructura principal de la cáscara. Este proceso se completa con el depósito continuo de calcio, y finalmente se añade la cutícula, que recubre la superficie externa del huevo (33).
5. **Vagina:** Su función principal es conectar el útero con la cloaca. Presenta una pared interna con pliegues longitudinales y carece de glándulas secretoras. En esta sección del oviducto se forma la cutícula, una capa que actúa como barrera para impedir el paso de bacterias.
6. **Cloaca:** Estructura compuesta de tres cámaras que se encuentran dentro del respiradero de la gallina. La cloaca al igual que en el macho aparece como un agrandamiento en forma de campana al final del recto (27)

**Figura 3:** Aparato reproductor de la gallina



**Fuente:** [https://encrypted-](https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcOByjCdwhbjEh1vRSn5v6Oc4HBPfZKbLjRb1SD3JjCqPk9wLEiW)

[tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcOByjCdwhbjEh1vRSn5v6Oc4HBPfZKbLjRb1SD3JjCqPk9wLEiW](https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcOByjCdwhbjEh1vRSn5v6Oc4HBPfZKbLjRb1SD3JjCqPk9wLEiW)

#### 7.4 Test de Host

La prueba de hinchazón hiposmótica (conocida como prueba HOS o HOST, por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la integridad funcional de las membranas plasmáticas de los espermatozoides, en distintas especies de animales. El fundamento de esta prueba radica en que solo los espermatozoides con una membrana celular intacta y funcional son capaces de mantener el equilibrio entre los compartimentos intracelular y extracelular, y de reaccionar adecuadamente a los cambios en el entorno (34).

La exposición a condiciones hiposmóticas provoca la entrada de líquido en la célula, lo que genera su hinchazón. Sin embargo, debido a la morfología única de los espermatozoides, esta hinchazón no se manifiesta como un aumento general del tamaño celular, sino como un enrollamiento de la cola del espermatozoide. Por esta razón, los espermatozoides que presentan este enrollamiento (clasificados como HOST positivos) se consideran como aquellos que tienen una membrana intacta y funcional. Este fenómeno es un indicador clave de la funcionalidad de la membrana plasmática en los espermatozoides (35).

#### 7.5 Criopreservación

La criobiología se enfoca en estudiar los efectos que tienen las bajas temperaturas sobre los sistemas celulares, ya que el tiempo es resultado de ciertas reacciones bioquímicas, y el frío tiene la capacidad de prolongar este tiempo biológico. Por su parte, la criopreservación busca mantener la viabilidad y el funcionamiento adecuado de las células cuando son sometidas a temperaturas bajas (36).

La reducción de la temperatura y la velocidad a la que ocurren los cambios osmóticos, tanto durante la congelación como en la descongelación, dificultan significativamente el movimiento de las moléculas a través de la membrana celular. Cuando la temperatura desciende de 25 °C a 10 °C, la actividad de las bombas dependientes de ATP disminuye, lo que hace que los procesos de difusión y ósmosis pasen a dominar durante los momentos de estrés osmótico. (37).

### **7.5.1 Principio de ósmosis**

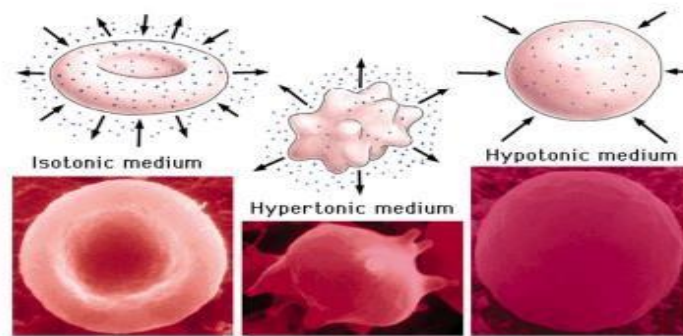
Se trata de la difusión pasiva a través de una membrana semipermeable, donde las partículas de soluto se mueven desde una solución con mayor concentración hacia una de menor concentración. En otras palabras, si una célula se sumerge en una solución salina más concentrada que su interior, el agua saldrá de la célula, lo que provocará que esta se encoja y reduzca su volumen. Como resultado, la concentración de sales en el interior de la célula aumentará, lo que hará que su punto de congelación disminuya. (38).

Durante la preparación para la conservación de células, el frío afecta primero la solución externa antes de llegar al interior celular, lo que provoca la formación de cristales de hielo en el medio extracelular mientras el interior de la célula aún no se ha congelado. A medida que se forma el hielo extracelular, el agua líquida en ese medio disminuye, lo que genera un desequilibrio en las concentraciones. Como resultado, el agua intracelular sale de la célula a través del proceso de ósmosis para equilibrar las concentraciones entre ambos medios.(39).

Al momento de salir el agua de la célula, la sal interna del interior se concentra, es aquí donde actúa el principio de descenso crioscópico, donde la temperatura en la que se forma el hielo es menor es más difícil que el agua residual interna de la célula forme cristales de hielo y estos dañen las estructuras internas de la célula. No obstante, cabe mencionar que evitar la formación de hielo intercelular no garantiza la supervivencia celular, ya que hay dos factores adicionales a considerar.

- Primero la disminución de agua intercelular y el aumento de sales por la osmosis hace que la concentración de sales intercelular llegue a ser en un momento tan alta que resulta tóxica para la célula.
- Segundo al salir tanta agua intercelular su volumen disminuye, provocando malformaciones estructurales de la célula llegando a causar daños irreversibles (40)

*Figura 4: Representación de la ósmosis celular*



*Fuente: <https://dinamicadelavidawilsonjimenez.blogspot.com/2013/03/osmosis.html>*

## 7.6 Diluyente Lake-Ravie 84

*Tabla 2. Composición del diluyente Lake-Ravie 84*

Composición (g/100mL)	Lake Ravie 84
Sodiumglutamate/g	1.92
Potassiumacetate/g	0.50
Glucose/g	0.80
Magnesiumacetate/g	0.08
Polyvinylpyrrolidone/g	0.30
H2O/mL	100
Osmolality/(mOsm/kg)	340
pH	7.0

## 7.7 Agentes Crioprotectores (ACP)

Los crioprotectores intracelulares cumplen la función de reemplazar el líquido dentro del espermatozoide por el crioprotector, lo que provoca una contracción de la célula. Este proceso ayuda a prevenir su ruptura, ya que evita la formación de cristales de hielo en el medio externo que podrían dañar la estructura celular (41).

En el proceso de crio preservación esta expone a las células a un estrés que resulta en daño celular que resulta en daño celular que compromete la función de los espermatozoides. Por lo cual se necesita la ayuda de agentes crio protectores para minimizar estas lesiones que se presentan por la crio preservación., pero cabe mencionar que al igual que otras sustancias, este si está en exceso resultan tóxicos para las células. Los agentes crioprotectores se clasifican en agentes permeables e impermeables (42).

Hace más de 50 años, cuando se descubrió de las propiedades crioprotectoras del glicerol, dio un gran avance a lo que conocemos actualmente como criobiología moderna y condujo al desarrollo de la criopreservación del semen para una gran gama de especies. Pese de que este avance se logró en la criopreservación de gallos, las tasas globales de fertilidad con semen avícola congelado/ descongelado son muy variables y no son lo bastante fiables para su uso en la producción comercial o la conservación de reservas genéticas (43).

### **7.7.1 Crioprotectores penetrantes**

Estas sustancias son compuestos de bajo peso molecular que pueden atravesar la membrana celular. Su función principal es deshidratar la célula, reemplazando el agua intracelular para evitar la formación de cristales de hielo en el interior y reducir el estrés osmótico. Entre los crioprotectores más utilizados se encuentran el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propanediol. (44).

#### **7.7.1.1 Glicerol**

El glicerol se utilizado ampliamente en la criopreservación de germoplasma, demostrando la capacidad del glicerol como un crioprotector intracelular, siendo capaz de mantener la motilidad congelada y descongelada del espermatozoides y mejorando su resistencia a la congelación. Durante la congelación el glicerol penetra en el espermatozoides, concentrando el agua intracelular para a su vez reducir la formación de cristales de hielo internos (45)

La concentración apropiada del glicerol que se puede emplear de forma segura y con mejores resultados sobre el espermatozoides es del 11%, aunque ha sido estudiado ampliamente con diferentes concentraciones para investigar el daño por congelación y descongelación, no se ha encontrado diferencias significativas entre usar el glicerol a concentraciones entre 7-15% (46)

Sin embargo, el glicerol tiene acción anticonceptiva, por lo cual puede reducir significativamente la fertilidad, por lo cual este crioprotector requiere ser eliminado después de la descongelación antes de la inseminación, lo cual se logra mediante una dilución y centrifugación sistémica realizada por pasos para reducir la concentración de glicerol (47).

#### **7.7.1.2 Dimetilsulfóxido**

El dimetilsulfóxido es un compuesto muy usado en la criopreservación el cual permite deshidratar células en el proceso, previniendo así la formación de cristales de hielo intracelular.

Su estructura química, que le confiere su capacidad como crioprotector penetrante, está compuesta por una molécula anfipática con un dominio polar y dos no polares. Esta

característica le permite ser soluble tanto en medios acuosos como orgánicos. Su función como crioprotector se basa en sus fuertes interacciones con el agua, lo que reduce el punto de congelación de la solución. Además, tiene la capacidad de atravesar la membrana celular, evitando la formación de cristales de hielo en el interior de la célula y previniendo una deshidratación severa. De esta manera, también contribuye a evitar la formación de cristales extracelulares. (48).

### **7.7.2 Crioprotectores No-Penetrantes**

Estas sustancias son compuestos de alto peso molecular que resultan más efectivos a altas velocidades de congelación, ya que actúan promoviendo una rápida deshidratación celular. Generalmente, se utilizan en combinación con crioprotectores penetrantes. La adición de estos agentes crioprotectores genera estrés osmótico en las células debido al aumento de la osmolaridad del medio. Durante el proceso de criopreservación, las células primero se deshidratan para equilibrar la fuerza osmótica causada por los agentes crioprotectores (ACP) y luego se rehidratan. Entre los crioprotectores más comunes se encuentran la polivinilpirrolidona, la sacarosa y la rafinosa. (44).

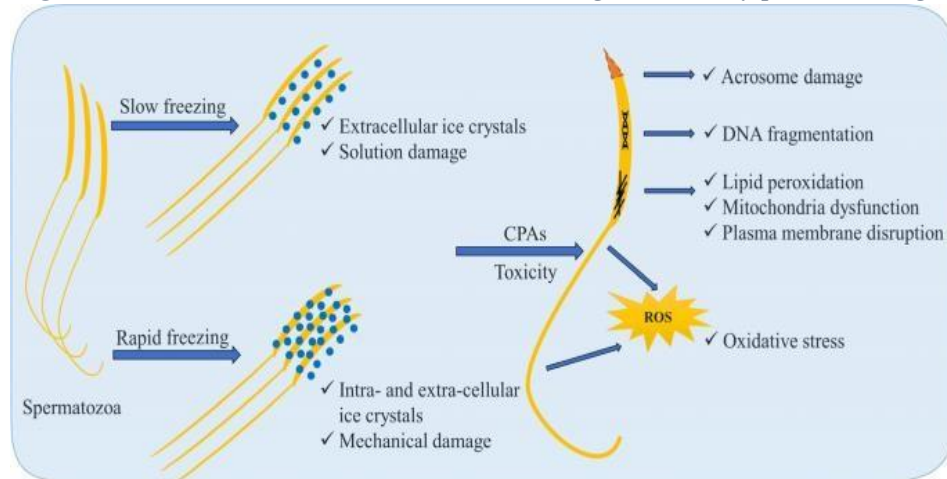
Los CPA extracelulares son los encargados de proteger a los espermatozoides imitando el efecto de los solutos intracelulares en el espacio extracelular para reducir la formación de cristales de hielo extracelulares. Se los puede usar junto con glicerol para evitar el exceso de CPA intracelulares y así evitar su toxicidad, aunque la yema de huevo es usado como el CPA extracelular más común, atribuido a sus lipoproteínas de baja densidad, fosfolípidos, ácido fosfático y vitamina E (49).

### **7.8 Criolesiones Espermiática y CPA**

Se debe de comprender los diferentes mecanismos de criolesiones que pueden ocasionar problemáticas durante el proceso de congelación y descongelación, esto para optimizar sus procesos en cada una de los pasos o fases. Los problemas que se pueden presentar en cada paso son: causar daño a la membrana celular, efectos de la solución, estrés oxidativo y reorganización de los lípidos y proteínas de las membranas. Y a su vez algunos CPA pueden llegar a ser más tóxicos que otros dependiendo de su concentración junto con el diluyente.



**Figura 5:** Daños ocasionados durante el congelamiento y post descongelamiento



**Fuente:** [https://www.researchgate.net/figure/Cryoinjury-mechanisms-involved-duringfreezing-thawing-process-of-poultry-semen\\_fig2\\_364286236](https://www.researchgate.net/figure/Cryoinjury-mechanisms-involved-duringfreezing-thawing-process-of-poultry-semen_fig2_364286236)

### 7.8.1 Cold shock

El daño celular causado por la sensibilidad a la velocidad de enfriamiento se debe a los efectos de transición en la fase lipídica de la membrana. Los ácidos grasos pueden presentarse en dos estados: uno rígido y ordenado, y otro flexible y desordenado. La temperatura a la que ocurre esta transición varía según la composición de los ácidos grasos presentes en la membrana.

Durante la transición de fase, no todos los fosfolípidos de la membrana cambian al mismo tiempo, lo que resulta en la coexistencia de dominios en estado fluido y dominios en estado gel. Estas alteraciones pueden provocar fallos en el empaquetamiento de los lípidos, generando daños en la membrana plasmática. Para evitar el choque térmico, se pueden emplear agentes crioprotectores, la presencia de ciertos fosfolípidos, una congelación lenta y un preacondicionamiento (estabilización), lo que ayuda a reducir las lesiones causadas por el cold shock. (50).

## 7.9 Aditivos funcionales del diluyente

El glicerol y el DMA como CPA intracelulares desempeñan un papel esencial en la prevención de los efectos nocivos de la criopreservación, pero cabe mencionar que no únicamente estos actúan, habiendo una serie de aditivos adicionales para que estos cumplan con su actividad como crioprotectores.

### 7.9.1 Antioxidantes

Las mitocondrias y la membrana celular del espermatozoide son los principales sitios sensibles al estrés oxidativo durante el proceso de la congelación- descongelación del espermatozoide. Esto debido a que el plasma espermático tiene un mecanismo de defensa antioxidante endógeno y el semen

incluye glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y antioxidantes naturales como vitaminas A, C y E. Pese a todos estos componentes que ayudan a evitar el estrés oxidativo en algunos casos son insuficientes para eliminar la producción excesiva de ROS (especies reactivas de oxígeno) (51).

Los contenidos de las unidades asociados al sistema de defensa antioxidante varían entre especies, siendo el pollo el que muestra niveles más bajo de actividad SOD (superóxido dismutasa) en el semen en comparación con otras especies, por lo cual se ha asumido que los antioxidantes externos y los compuestos eliminadores de radicales son una suplementación prometedora, ya que se ha demostrado que estos ayudan a la funcionalidad de la membrana, integridad del acrosoma y motilidad espermática (52).

### **7.9.2 Agentes modificadores de la membrana**

Además de los antioxidantes, también se han evaluado la efectividad de los agentes modificadores de la membrana. Tenemos la ciclodextrina cargada con colesterol, la cual aumenta la integridad de la membrana, además de ejercer un efecto crioprotector en el esperma de gallo y permite disminuir la concentración de glicerol (53).

### **7.9.3 Bloqueadores de hielo**

Los factores que afectan a la letalidad de los cristales intracelulares incluyen tamaño, la forma y la ubicación de los cristales, además de su mecanismo de crecimiento siendo este el objetivo potencial a controlar. Las proteínas anticongelantes (AFP) son capaces de unirse al hielo para inhibir la recristalización del hielo e interactuar con la membrana celular, por lo cual lo convierte en una molécula integral para su uso en protocolos de criopreservación (54).

Se ha informado que el AFP tipo III mejora la fertilidad del semen de gallo descongelado, aunque no se ha investigado otros inhibidores de la recristalización del hielo en aves de corral, el beneficio observado inspira más interés en el estudio de las aves de corral (55).

### **7.10 Procedimientos para la recolección de semen**

La recolección de semen es una de las prácticas más esenciales para la preservación genética, aumentar la producción y la reproducción de aves. Uno de los métodos más utilizados en la colecta de semen de gallos implica la realización de masajes en la parte dorsal del ave (56).

Con este método, el líquido espermático puede fluir lentamente por la cloaca y puede contaminarse por diversos materiales en la cloaca, ya que en estos se encuentran residuos de

orina y heces. Esto se puede evitar induciendo al ave a un ayuno de 4 a 12 horas, pero sin dejarlo sin agua más de 6 horas (57).

- Primero se debe colocar al gallo sujetándolo de las patas con una mano sobre las piernas del operario, anteriormente se le debe depilar al ave la zona de la cloaca para evitar contaminaciones.
- Se realiza una desinfección de la cloaca con suero fisiológico + antibiótico, una vez el área se encuentre limpia el manipulador procede a realizar masajes desde la parte más dorsal a caudal, realizando más presión al momento de llegar a la parte caudal cerca de la cloaca.
- Este movimiento se lo repite, mientras que un ayudante debe estar alerta para recolectar la muestra y evitar que este se contamine lo menos posible, ya que este puede salir de forma lenta o ser expulsado de forma brusca.
- La eyaculación del ave se lo puede coleccionar mediante jeringas de insulina sin embolo de caucho o colocando un tubo colector bajo la cloaca, pero se puede contaminar por la secreción conjunta de heces u orina (58).

### **7.11 Fecundación natural**

Durante la cópula, las paredes de los conductos bulbosos se contraen, expulsando el semen a través de la papila hacia la superficie del piso de la cloaca. El oviducto de la hembra se everta (se invierte hacia afuera), y el macho presiona la papila contra la extremidad evertida, depositando el semen en ella. Inmediatamente después, la hembra retrae el oviducto, dejando el semen en su interior. Los espermatozoides deben movilizarse por sí mismos para atravesar la unión útero-vaginal. Una vez superada esta barrera, son transportados por las secreciones y los movimientos del oviducto hasta llegar a su ubicación definitiva en los llamados "nidos espermáticos" (59).

Estos nidos son grupos de espermatozoides que se alojan en las glándulas parietales úterovaginales, donde permanecen vivos durante varios días. Gracias a ciertos inhibidores metabólicos, los espermatozoides son liberados de estas glándulas poco después de la ovulación, iniciando su recorrido hacia los óvulos para llevar a cabo la fecundación. Este proceso de fecundación ocurre en la primera parte del oviducto (infundíbulo) una vez que se secreta la albúmina alrededor de la yema (óvulo), se forma una barrera impenetrable para los espermatozoides. Por esta razón, los huevos puestos al día siguiente de la inseminación o de la monta natural rara vez son fértiles. Sin embargo, los huevos puestos el segundo día después de

la inseminación suelen ser fértiles. Debido a esto, la recolección de huevos para evaluar la fertilidad se realiza generalmente 48 horas después de la inseminación o monta (60).

### **7.12 Inseminación artificial**

La inseminación en gallinas puede realizarse, de manera experimental, en diferentes zonas del tracto reproductivo, como la vagina, el útero o la región albuminífera-magnum. Sin embargo, en la práctica, los espermatozoides suelen introducirse en la zona más cercana a la unión úterovaginal, ya que este es el área preferida para la conservación del líquido espermático. Cabe destacar que la ubicación exacta de la inseminación puede variar según la raza de las aves (61).

Existe divergencia respecto a la profundidad ideal para la introducción de los espermatozoides. Se sugieren profundidades de aproximadamente 7 cm garantiza mejores índices de fecundidad y supervivencia embrionaria, mientras que otros consideran que una profundidad menor, entre 2 y 3 cm, es más efectiva (62).

Durante la inseminación, es fundamental ejercer una presión controlada sobre el oviducto para distender la vagina y asegurar que los espermatozoides se depositen cerca de los nidos espermáticos. Esta técnica es crucial para lograr altos índices de fertilidad. Sin embargo, la presión debe interrumpirse una vez que se haya administrado la dosis necesaria de líquido espermático, ya que un exceso podría provocar la expulsión de espermatozoides (63).

Respecto al momento del día más adecuado para la fecundación artificial, es importante considerar que la actividad vaginal de las gallinas sigue un ciclo influenciado por factores como la presencia o ausencia de un huevo y las secreciones hormonales. Las horas más favorables para la inseminación suelen ser por la tarde, entre las 14:00 y las 19:00, aunque también puede realizarse por la mañana, dependiendo de las condiciones específicas de cada ave (64).

### **7.13 Bases fisiológicas de la incubación**

El éxito de la incubación de los huevos depende en mayor medida de la tasa de fertilidad de las aves que forman parte de una parvada, así como del equilibrio nutricional de los componentes internos del huevo. Además, la estructura física del cascarón juega un papel crucial, la cual puede cambiar debido a varios factores como la edad de las aves, su tipo de alimentación, su estado de salud y su linaje genético. Asimismo, otros elementos externos influyen directamente en el proceso de incubación, como la presión atmosférica, la altitud sobre el nivel del mar, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura, la humedad del entorno donde se realiza la incubación y el nivel tecnológico de las máquinas incubadoras utilizadas (65).

El crecimiento del embrión genera cambios simultáneos en todos los componentes internos del huevo, los cuales disminuyen en proporciones variables durante el proceso de incubación. La cáscara actúa como fuente de calcio, un mineral esencial para mantener el equilibrio electrolítico. Por su parte, el albumen, que aporta proteínas, se vuelve más líquido, liberando agua y electrolitos que son aprovechados por el embrión. La yema, por otro lado, proporciona la energía necesaria para cubrir las demandas fisiológicas de mantenimiento, y el agua se genera como resultado de la oxidación de los lípidos. Además, una parte de la energía derivada de la yema se utiliza para la síntesis de tejidos y el crecimiento del embrión (66).

#### **7.14 Propiedades de la cascara de huevo**

El oviducto alberga poblaciones celulares especializadas que intervienen en la biomineralización de la cáscara del huevo, un proceso que conduce a la formación de una biocerámica. Esta biocerámica surge de una interacción regulada entre componentes orgánicos e inorgánicos. Desde el punto de vista químico, está compuesta por un 1.6 % de agua, un 95.1 % de minerales (donde el 93.6 % corresponde a carbonato de calcio en forma de calcita, el 0.8 % a carbonato de magnesio y el 0.73 % a fosfato tricálcico) y un 3.3 % de materia seca. Este proceso asegura la formación de una cáscara resistente y funcional para el huevo (67).

La cáscara del huevo posee cientos de poros que desempeñan funciones vitales para el desarrollo del embrión. Estos poros permiten el intercambio de gases, facilitando la entrada de oxígeno y la eliminación de subproductos metabólicos, como el dióxido de carbono y el agua metabólica. El principal órgano respiratorio del embrión es la membrana corioalantoidea, una estructura altamente vascularizada que cubre por completo la membrana interna de la cáscara. Esta membrana se encarga de transportar el dióxido de carbono desde los tejidos embrionarios hasta los poros, para que sea expulsado del huevo, mientras que el oxígeno que ingresa a través de los poros es transferido al sistema circulatorio corioalantoideo y distribuido al embrión. A medida que el embrión crece, su demanda de oxígeno aumenta, por lo que es fundamental garantizar un suministro adecuado para asegurar su supervivencia y desarrollo óptimo (68).

#### **7.15 Influencia de la presión atmosférica**

El aire contiene aproximadamente un 21 % de oxígeno, pero a mayores altitudes (1500 msnm), la presión del aire disminuye, lo que significa que hay menos aire disponible. Al haber menos aire, hay menos moléculas que chocan entre sí, lo que permite que las moléculas restantes se muevan con mayor rapidez. Esto permite que los gases atraviesen los poros de la cáscara del huevo con mayor facilidad. Sin embargo, este fenómeno solo compensa parcialmente la menor disponibilidad de oxígeno en altitudes elevadas. Además, provoca que los huevos pierdan

dióxido de carbono y agua más rápidamente que a nivel del mar. Aunque la pérdida adicional de dióxido de carbono no parece tener un impacto significativo en el desarrollo del embrión. (69).

## **8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS**

**H1:** El semen criopreservado con Lake Ravie 84 como diluyente mantiene la capacidad fecundativa de los espermatozoides aceptables para su fertilidad en gallinas criollas mediante inseminación artificial.

**H0:** El semen criopreservado con Lake-Ravie-84 como diluyente no mantiene la capacidad fecundativa de los espermatozoides aceptables para su fertilidad en gallinas criollas mediante inseminación artificial.

## **9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **9.1 Ubicación**

El estudio se realizó en el cantón Salcedo, perteneciente a la provincia de Cotopaxi. Esta localidad se encuentra a una latitud de -1.03333 y una longitud de -78.6, con una altitud de 2.683 metros sobre el nivel del mar. Su superficie total abarca 48.400 hectáreas, lo que equivale a 484,00 km<sup>2</sup>. (70).

**Figura 6:** Mapa del cantón Salcedo



*Fuente:* [https://es.wikipedia.org/wiki/Cant%C3%B3n\\_Salcedo](https://es.wikipedia.org/wiki/Cant%C3%B3n_Salcedo)

La investigación se llevó a cabo en la ciudad de Latacunga, específicamente en la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi., que se encuentra ubicado en la panamericana sur E35 a 2.725 m.s.n.m (71), donde se evaluó el efecto del glicerol como crioprotector de semen de aves criollas, utilizando como diluyente la fórmula de Lake-Ravie-84.

## 9.2 Materiales y método

### 9.2.1 Materiales físicos

- 1 Platina térmica
- 1 Microscopio
- 1 Contador manual de células
- 1 Baño maría
- 1 Cámara de Neubauer
- 50 Porta y cubre objetos
- 5 Gradillas
- 20 Tubos falcón
- 50 Tubos Eppendorf
- 1 Nevera
- 30 Jeringas de insulina
- 1 Termo de nitrógeno
- 1 unidad de congelación
- Pipetas de 100 µg hasta 1000 µg
- 50 Puntas para pipetas
- 20 Pajillas de envase

- 2 Pinzas
- Papel
- 1 Libreta
- 2 Esfero
- 2 Marcadores
- 1 Computador
- 5 Jaulas
- 5 Comederos y bebederos para gallos
- 1 Tijera
- 10 Guantes

### **9.2.2 Materiales químicos**

- Diluyente
- Glicerol
- Nitrógeno

### **9.2.3 Material biológico**

- Eyaculado de gallos □ 5 Gallos criollos
- 50 Gallinas criollas

## **9.3 Diseño experimental**

Este estudio empleó un diseño completamente al azar (DCA), utilizando un total de 15 eyaculados de semen provenientes de cinco gallos criollos, recolectados en tres sesiones alternas durante una semana (tres eyaculados por gallo). En cada sesión, los eyaculados de los cinco gallos fueron combinados para formar un pool de semen. Posteriormente, cada pool fue pre-diluido en una proporción 1:1 con el diluyente Lake-Ravie 84, alcanzando una concentración de 400 millones de espermatozoides/ml. Las muestras de cada tratamiento fueron envasadas en pajuelas de 0.50 ml, debidamente identificadas y sometidas a congelación en vapores de nitrógeno líquido estático, con un total de 12 pajuelas congeladas.

## **9.4 Variables experimentales**

### **9.4.1 Variables dependientes**

Motilidad masal

Motilidad individual

Morfología

Test de HOST



Viabilidad espermática

Movilidad progresiva

Vigor

#### **9.4.2 Variables independientes**

Volumen de eyaculado

Color

Consistencia

Concentración

#### **9.5 Identificación de las aves donantes**

Se seleccionaron cinco gallos criollos de entre 7 y 8 meses de edad, los cuales fueron previamente entrenados durante aproximadamente un mes para la extracción de semen. La elección de los ejemplares se basó en la evaluación de su condición corporal, estado físico y salud general, asegurando que presentaran características aparentemente normales, incluyendo la integridad de sus órganos sexuales y accesorios.

9.6 Gallos escogidos según su condición física y morfológica para la colección de semen

*Figura 7: Gallo 1*



*Figura 8: Gallo 2*





*Figura 9: Gallo 3*



*Figura 10: Gallo 4*



*Figura 11: Gallo 5*



### **9.7 Preparación de donantes**

Previo a cualquier ensayo de colección de semen de gallos, estos estuvieron en ayunas de alimentos sólidos al menos 24 horas y un período de restricción hídrica de 12 horas, ya que, si no se vacían completamente antes de la recolección de la muestra, durante la estimulación de la cloaca, los gallos podrían expulsar heces y orina, lo que provocaría la contaminación del semen con heces y uratos, para ello primero limpiamos y desinfectamos la zona con antibiótico (gentamicina), para esto utilizamos algodón y frotamos suavemente alrededor de la cloaca, y con esto logramos quitar cualquier rastro de impurezas que puedan contaminar la muestra, así también debemos depilar toda la zona cloacal y abdominal.

### **9.8 Preparación de diluyente**

Se separó la yema de la clara del huevo. Misma que fue colocada sobre una toalla de cocina para su secado y facilitar la ruptura de su membrana, permitiendo así su extracción. Posteriormente, se añadió un 20% de yema de huevo al diluyente Lake-Ravie-84 (por ejemplo, 1 ml de yema por cada 5 ml de diluyente) en un tubo Falcon, asegurando una mezcla homogénea.

Para determinar la cantidad de diluyente que debía agregarse al pool seminal, se empleó la proporción de 6 ml de diluyente por cada 12 pajuelas. Con base en esta relación, se realizó un



cálculo proporcional mediante regla de tres para determinar el volumen exacto de diluyente a adicionar a la muestra seminal.

$$6 \text{ ml} \times \frac{4 \text{ pajuelas}}{12 \text{ pajuelas}} = 2 \text{ ml de diluyente aplicamos al pool.}$$

### **9.9 Colecta de muestra**

El semen se colectó por el método de masaje abdominal, para esto se sujetó al gallo de manera que se mueva lo menos posible mientras lo estimulamos suavemente y con golpes tenues en la espalda hasta llegar a la cola, haciendo que se produzca una erección del pene, en ese momento masajeamos y se aplicó una presión suave sobre la cloaca, estimulando las papilas externas de los conductos deferentes hasta inducir la eyaculación., y se recogió el semen con una jeringa de insulina.

### **9.10 Transporte de muestra**

Posteriormente a la colecta se realizó un pool de todos los eyaculados de los reproductores en un tubo eppendorf. Para el transporte se hizo una dilución de 1:1 con el diluyente Lake-Ravie 84, para colocarlo en un culer evitando que sea expuesto directamente a la luz solar y lo transportamos al laboratorio.

### **9.11 Análisis macroscópico**

El semen fue analizado en función de su volumen, color y consistencia. En cuanto al volumen, se registró las siguientes cantidades por gallo: 150 µL en la primera colecta, 140 µL en la segunda y 150 µL en la tercera. Respecto al color, se identificó dos tonalidades: blanco perlado y amarillento. En cuanto a la consistencia, se observó una textura cremosa en todas las colectas realizadas.

### **9.12 Análisis microscópico**

#### **9.12.1 Motilidad individual**

Se preparó una dilución 1:30 del semen con el diluyente Lake-Ravie-84. De esta solución, se tomaron 10 µL y se colocaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos, los cuales fueron previamente calentados a 37 °C. La muestra fue analizada en un microscopio utilizando un lente de 40x, y se determinó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva mediante el conteo de 100 espermatozoides.

#### **9.12.2 Movilidad progresiva**

Se depositó una gota de semen diluido sobre un portaobjetos que había sido previamente calentado a 37 °C, y luego se cubrió con un cubreobjetos. Luego, se evaluó bajo un microscopio

utilizando el lente de 40x. Donde se seleccionó varias áreas del campo visual y se cuantifico el porcentaje de espermatozoides que muestran un movimiento lineal y sostenido en relación con la cantidad total de espermatozoides móviles.

### **9.12.3 Vigor espermático**

Se colocó una gota de semen diluido entre un portaobjetos y un cubreobjetos, ambos previamente calentados a 37 °C, y luego se observó bajo un microscopio utilizando el lente de 40x. En el cual, se examinó el movimiento de los espermatozoides, clasificándolos según la intensidad y calidad de su desplazamiento. Considerando un alto vigor cuando la mayoría de los espermatozoides presentaron movimientos rápidos, lineales y enérgicos, mientras que un vigor bajo se lo asocio con movimientos lentos, erráticos o circulares.

### **9.12.4 Prueba de integridad de membrana plasmática (HOST)**

Se preparó una solución hiposmótica de (fructosa diluida en agua destilada a una concentración de 100 mOsm/L), de la cual se tomaron 200 µl y se incubaron en una estufa a 37 °C durante 30 min. Luego, se añadieron 20 µl de semen puro a la solución y se continuó la incubación a la misma temperatura durante 60 min. Transcurrido este tiempo, se tomaron 10 µl de la mezcla y se colocaron sobre un portaobjetos previamente calentado a 37 °C, cubriéndolos con un cubreobjetos. Después de 60 s, el portaobjetos se posicionó en la platina térmica del microscopio y se observó con lentes de 20x y 40x. Se contaron un total de 100 espermatozoides, determinándose el porcentaje de células que mostraron una reacción positiva al test.

### **9.12.5 Concentración espermática**

Se tomó una muestra de semen puro y se realizó una dilución 1:200 utilizando una solución de NaCl al 3.5% con formol. A partir de esta dilución, se extrajeron 10 µL, los cuales se colocaron en una cámara de Neubauer. Después de dejar reposar durante 5 minutos, se procedió al conteo de espermatozoides y al cálculo correspondiente utilizando la fórmula adecuada.

$$\text{Concentración espermática} = a \times b \times c \times d \times e$$

a: es el número de espermatozoides contados en 5

cuadros. b: es el total de cuadrantes de la cámara (n = 25).

c: es la dilución utilizada (200).

d: es la profundidad de la cámara de Neubauer (100). e: es 1000, un valor que permite expresar la concentración espermática en ml.

**Tabla 3.** Concentración espermática de cada día de extracción de muestra de semen.

Numero de pools	Concentración millones por ml
1	5250
2	4726
3	3829

### 9.12.6 Morfología

Se utilizó tinción con eosina-nigrosina. Para ello, se colocaron 2.5 µL de eosina y 5 µL de nigrosina sobre un portaobjetos, seguido de la adición de 5 µL de semen puro. La mezcla se homogenizó durante 10 s y luego se realizó un frotis. Después de 15 s, y una vez que el frotis estuvo completamente seco, se evaluaron los espermatozoides, clasificándolos en normales o anormales según las alteraciones observadas en la cabeza, la pieza media o la cola.

### 9.13 Preparación de pajuelas

Para la preparación de las pajuelas de necesitamos los siguientes datos:

- Concentración espermática
- Volumen de eyaculado (V)
- Motilidad individual (Mi)
- Normalidades (Mr)

Se aplico la siguiente fórmula para saber cuál es número de pajuelas que podemos hacer, según la cantidad de muestra de semen que obtuvimos en cada extracción.

$$C \times V \times Mi \times Mr$$

$$5000 \times 0,75 \times 90\% \times 90\% = 3075,5$$

El resultado se dividió para la cantidad de espermatozoides que deben ir en cada pajuela que en esta ocasión será de 400 millones de espermatozoides, para después multiplicar por 0,5ml que es la cantidad de que va en cada pajuela.

$$\frac{3075,5}{400} = 7,60 \times 0,5 = 4 \text{ Pajuleas}$$

#### **9.14 Método de criopreservación**

Se colocó el diluyente al pool con la muestra seminal, luego con la ayuda de una llenadora de pajuelas, se cargó cada pajuela con 0,5 ml de semen, para posteriormente sellarlas utilizando un sellador de pajillas.

Se equilibró la temperatura de las muestras colocándolas en un culer con hielo seco en su interior, manteniéndolas a 5 °C durante 2 horas. Tras este tiempo, las muestras fueron expuestas al vapor de nitrógeno líquido durante 15 minutos. Por último, las muestras se sumergieron completamente en nitrógeno líquido a -196 °C y se depositaron en el tanque de nitrógeno, donde se mantuvieron conservadas. para su posterior transporte al lugar de realización de la inseminación artificial en las gallinas.

#### **9.15 Descongelamiento de semen de gallo e inseminación de gallinas**

Se sumergieron las pajuelas en agua a 5°C durante 3 minutos, hasta que se descongelen completamente. Luego, se colocó el semen descongelado a un tubo Eppendorf y extrajimos 0,10 ml con una jeringa de insulina. Después, procedemos a limpiar y desinfectar la zona de la cloaca de la gallina utilizando un antibiótico (gentamicina). Para ello, se empleó un algodón y frotamos suavemente alrededor de la cloaca. Posteriormente, abrimos la cloaca y, con cuidado, introducimos la punta de la jeringa para llevar a cabo la inseminación artificial intravaginal en cada gallina criolla.

#### **9.16 Recolecta huevos para su posterior incubación**

Se recolecto 60 huevos tres días después de haber realizado la inseminación durante una semana, ya recogidos se los coloco en sus respectivas cubetas, para realizar su envío a la ciudad del PUYO, lugar en donde se realizó el proceso de incubación, esto debido a la baja presión atmosférica lo cual beneficia a la eclosión de los mismos.

## **10. Análisis y discusión de los resultados**

### **10.1 Motilidad individual**

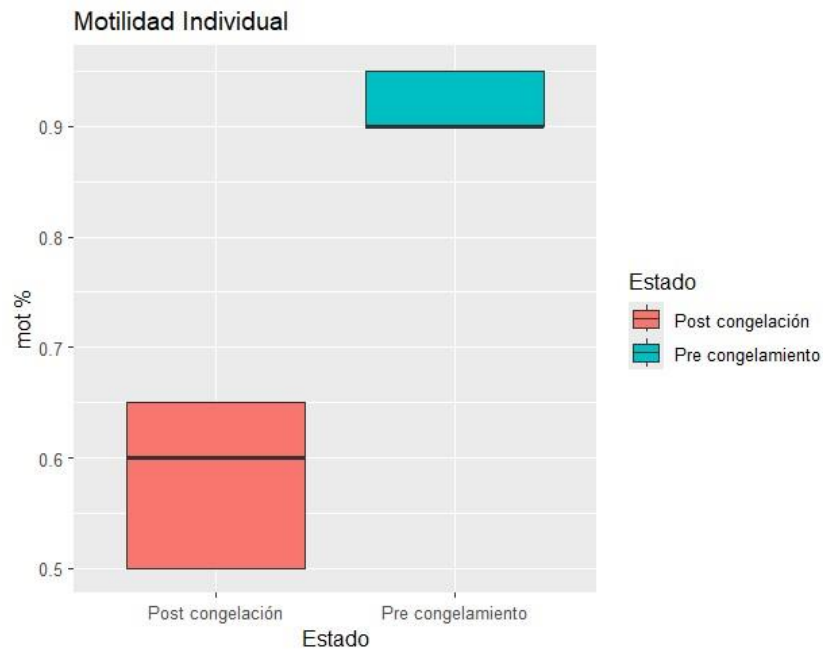
*Tabla 4. Evaluación de motilidad individual pre y post congelamiento.*



Estado	Media_ M..INDI VIDUA L	SD_M..I NDIVI DUAL	max_M. .INDIVI DUAL	min_M.. INDIVI DUAL	varianz a_M..IN DIVID UAL	error_es tandar_ M..INDI VIDUA L
Post congelac ión	0.58333 33	0.06454 972	0.65	0.5	0.00416 66667	0.01666 6667
Pre congela miento	0.91666 67	0.02439 750	0.95	0.9	0.00059 52381	0.00629 9408

Este resultado nos permitió realizar una comparación de la motilidad individual de los espermatozoides antes y después del proceso de congelación. La motilidad individual disminuyó significativamente después de la congelación, pasando de una media del 91.67% en el estado pre-congelación a un 58.33% en el estado post-congelación. La prueba t de Welch confirma que esta diferencia es estadísticamente significativa (p-valor = 3.309e-13), lo que indica que el proceso de congelación afectó negativamente, la capacidad de movimiento de los espermatozoides.

**Figura 12:** Porcentaje de motilidad individual pre y post congelamiento.



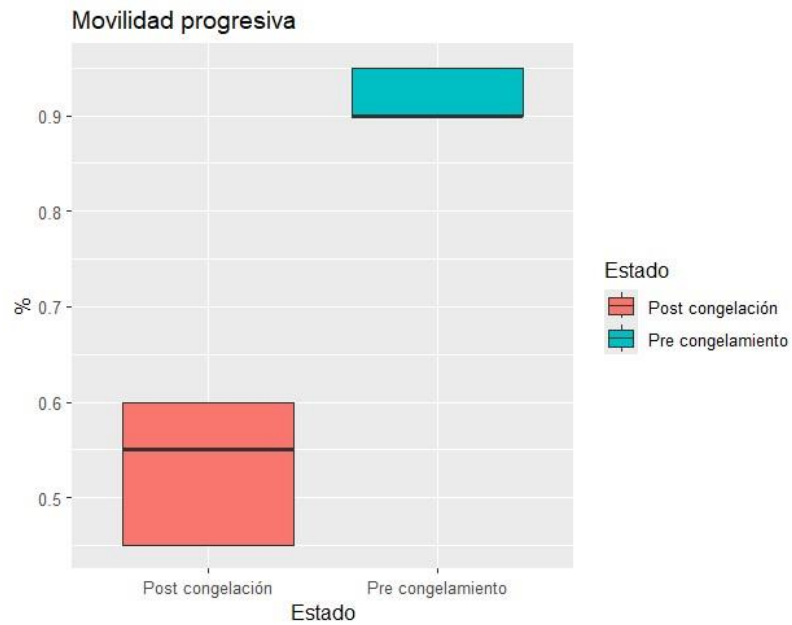
## 10.2 Movilidad progresiva

**Tabla 5.** Evaluación de la movilidad progresiva pre y post congelamiento.

Estado	Media_MOVILIDAD.PROGRESIVA	SD_MOVILIDAD.PROGRESIVA	max_MOVILIDAD.PROGRESIVA	min_MOVILIDAD.PROGRESIVA	varianza_MOVILIDAD.PROGRESIVA	error_estandar_MOVILIDAD.PROGRESIVA
Post congelación	0.533333 3	0.064549 72	0.60	0.45	0.004166 6667	0.016666 667
Pre congelamiento	0.916666 7	0.024397 50	0.95	0.90	0.000595 2381	0.006299 408

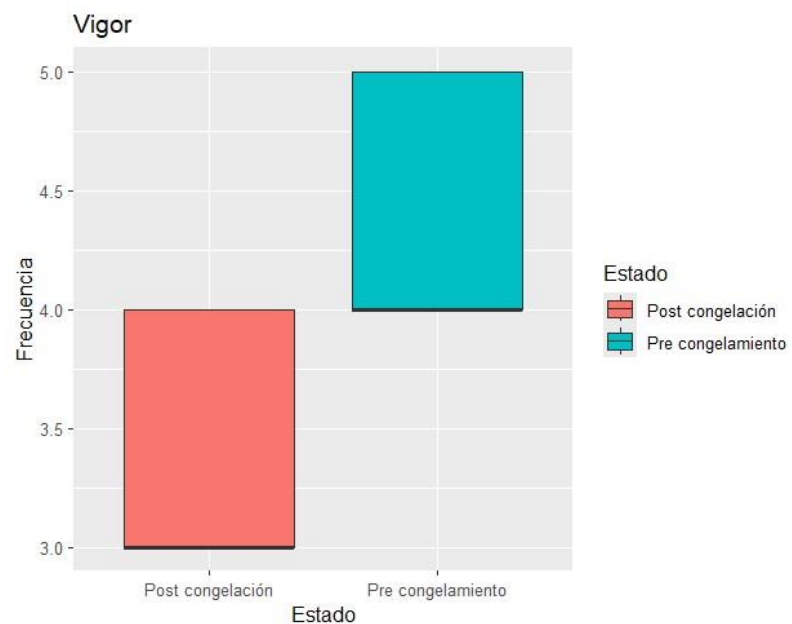
La movilidad progresiva, que se refiere a la capacidad de los espermatozoides para moverse en línea recta, también se vio afectada negativamente por la congelación. La media de movilidad progresiva disminuyó del 91.67% antes de la congelación al 53.33% después de la congelación. Al igual que con la motilidad individual, esta disminución fue estadísticamente significativa, lo que sugiere que la criopreservación reduce la suficiencia de los espermatozoides para moverse de manera efectiva.

**Figura 13:** Porcentaje de motilidad individual pre y post congelamiento.



### 10.3 Vigor

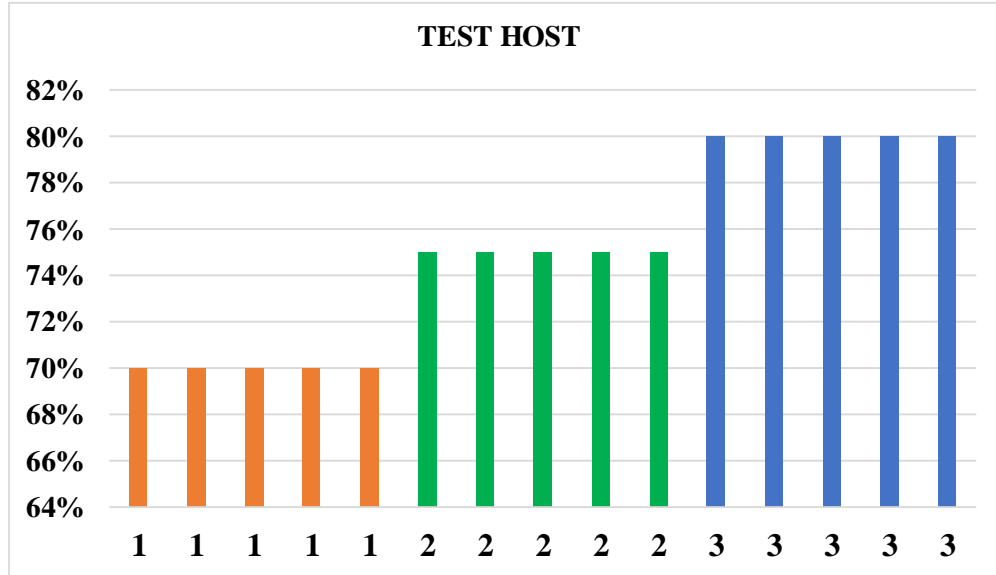
**Figura 14:** Valores de vigor espermático pre y post congelamiento.



Se logra apreciar una comparación entre el vigor espermático antes y después de la congelación. El vigor espermático, que se refiere a la intensidad del movimiento de los espermatozoides, también disminuyó significativamente luego de la congelación. La figura nos indicó una clara reducción en el vigor, pasando este de un valor de 4 pre-congelamiento a 3,33 post-congelación, lo que sugiere que los espermatozoides pierden energía y fuerza después del proceso de criopreservación.

### 10.4 Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática

*Figura 15: Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron de manera favorable al test de host en el pre-congelamiento.*



Se logro evidenciar en la primera valoración espermática del test de (HOST), un porcentaje del 70% el cual dentro de la literatura se encuentra en un rango aceptable, lo que nos dio a entender que la integridad, de la membrana plasmática de los espermatozoides de encuentran en su mayoría en un estado normal, presenciando valores mayores en las siguientes colectas, llegando a presenciar hasta del 80% de viabilidad espermática.

### 10.5 Morfología

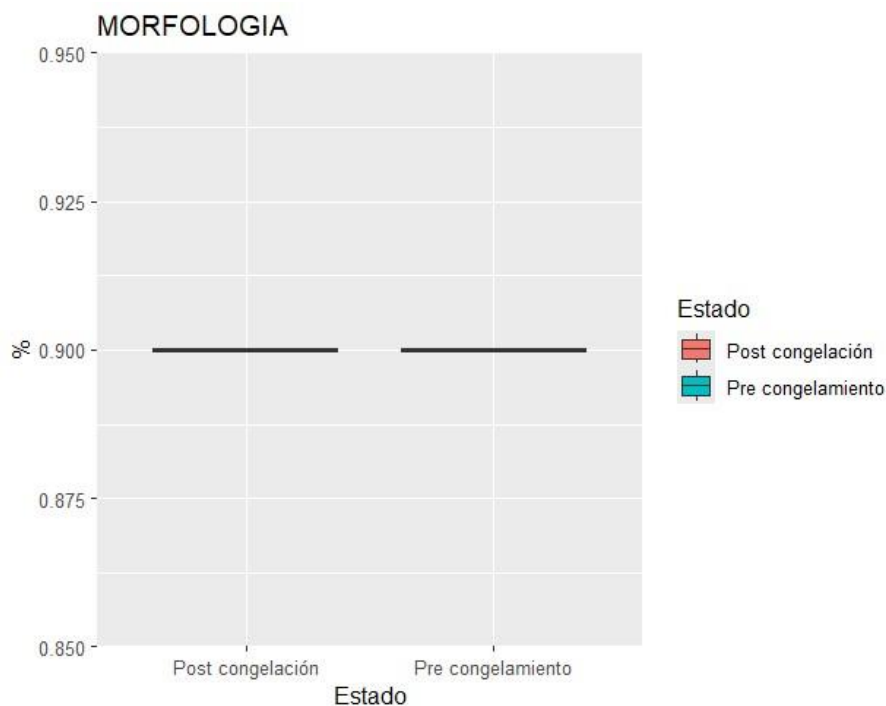
*Tabla 6. Evaluación de espermatozoides con morfología normal pre y post congelamiento.*

	Media_	SD_MO	max_M	min_M	varianz	error_es
	MORF	RFOLO	a_MOR	OGIA	ORFOL	tandar_ Estado
			OGIA	OGIA	OGIA	MORF
						OLOGI
						A IA A
Post congelac	0.9	0	0.9	0.9	0	ión

Estado	Media_MORFOLOGIA	SD_MORFOLOGIA	max_MORFOLOGIA	min_MORFOLOGIA	varianza_MORFOLOGIA	error_estandar_MORFOLOGIA
Pre congelamiento	0.9	0	0.9	0.9	0	0

La morfología espermática no mostró cambios significativos antes y después de la congelación. Tanto en el estado pre-congelación como post-congelación, la media de espermatozoides con morfología normal fue del 90%, con una desviación estándar de 0, lo que indica que no hubo variabilidad en los resultados. Esto sugiere que el proceso de criopreservación no afectó negativamente la integridad morfológica de los espermatozoides, lo cual es un resultado positivo para la viabilidad del semen congelado.

*Figura 16: Porcentaje de espermatozoides con morfología normal pre y post congelamiento.*



## 10.6 Porcentaje de huevos fértiles

*Figura 17: Porcentaje de huevos fértiles*



Se comprobó el porcentaje (%) de huevos fértiles al séptimo día de incubación, mediante uso de la técnica de ovoscopia, en el cual se apreció el 0% de los 60 huevos que se enviaron a incubar.

## 10.7 Discusión

En la presente investigación se observó que tanto la motilidad individual como movilidad progresiva disminuyeron considerablemente después de la congelación, pasando de un 91.67% a un 58.33% y de un 91.67% a un 53.33%, respectivamente. Esta reducción es atribuible al estrés osmótico y térmico que toleran los espermatozoides, durante el proceso de criopreservación, lo que afecta su capacidad de movimiento (72). Estudios similares han reportado que los espermatozoides aviares son particularmente sensibles a los cambios osmóticos debido a su relación superficie/volumen y a la delgadez de su cola, lo que los hace más susceptibles al daño durante la congelación (73).

Otros investigadores Yunhe (2023) y Moscoso (2022) Señalan que se observaron una disminución dentro de todos parámetros cinemáticos en el proceso de criopresevación. El procedimiento de congelación redujo viabilidad y supervivencia de los espermatozoides descongelados, y puede deberse a la interrupción de la integridad funcional del acrosoma, membrana plasmática, el ADN y las mitocondrias del espermatozoide durante la congelación (74) (75).

El vigor espermático también se vio afectado negativamente, disminuyendo de un valor de 4 en el estado pre-congelación a 3.33 post-congelación. Este resultado sugiere que los

espermatozoides pierden energía y fuerza después del proceso de criopreservación, lo que podría afectar su capacidad para fertilizar óvulos en condiciones naturales (76). La pérdida de vigor puede estar relacionada con la, deshidratación celular y la formación de cristales de hielo intracelulares, que dañan las estructuras internas de los espermatozoides (77).

En nuestra investigación el diluyente empleado fue el Lake Ravie 84 al igual que en otras investigaciones como la de O'Brien (2017) la cual se pudo realizar una hipótesis del número de huevos fecundados ya que en su investigación en los resultados con semen diluido y refrigerado a 5°C durante 24 horas obtuvo el resultado de 36.9% (17/46 huevos) de fertilidad, por lo cual se intuyó que los valores que obtendríamos serían menores, dado que en esta ocasión se los sometería a una crio preservación a -195°C (78). Por lo contrario, Moscoso (2022) emplea el mismo diluyente junto la adición de Glicerol a diferentes concentraciones las cuales van desde el 0-2-4-6-8-10 % en la cual se observa un mejor resultado en la crio preservación a la concentración de glicerol del 8 % (75).

La morfología espermática no mostró cambios significativos antes y después de la congelación, manteniéndose en un 90% de espermatozoides con morfología normal tanto en el estado precongelación como post-congelación. El resultado es consistente, con estudios previos que señalan que el glicerol, al ser un crioprotector intracelular, protege la integridad estructural de los espermatozoides durante la fase de congelación (79). Sin embargo, es importante destacar que la morfología normal no garantiza por sí sola la funcionalidad espermática, ya que otros parámetros como motilidad e integridad de la membrana plasmática también son cruciales para la fertilidad (80).

Estudios han demostrado que la profundidad de inserción del semen puede influir significativamente en la tasa de fertilización. Mientras que algunos investigadores como O'Brien (2017) recomiendan una profundidad de 7 cm para optimizar la viabilidad espermática y mejorar la tasa de eclosión (78), otros sugieren como Bramwell (2021) que una profundidad menor, entre 2 y 3 cm, puede reducir el estrés sobre el oviducto y minimizar la expulsión de semen post-inseminación. Además, el momento del día en que se realiza la inseminación juega un papel crucial, ya que las gallinas presentan variaciones hormonales que pueden influir en la receptividad del tracto reproductivo. Se ha reportado que la inseminación en horas de la tarde (entre 14:00 y 19:00) incrementa la tasa de retención espermática y mejora la probabilidad de fertilización (81).

El porcentaje de huevos fértiles fue del 0%, lo que indica que el semen criopreservado no fue capaz de fertilizar los óvulos de las gallinas criollas. El resultado, es consistente con estudios anteriores que reportan bajas tasas de fertilidad en semen aviar criopreservado, incluso cuando se utilizan crioprotectores como el glicerol (Rodríguez 2023) (82)(80). La acción anticonceptiva del glicerol, que reduce la fertilidad al interferir con la capacidad de los espermatozoides para fecundar, podría explicar este resultado (79). Además, la pérdida de motilidad y vigor observada en este estudio también contribuye a la baja fertilidad postcongelación.

Los resultados de este estudio destacan la necesidad de optimizar los protocolos de criopreservación para mejorar la viabilidad y fertilidad del semen aviar. Futuras investigaciones podrían explorar el uso de crioprotectores alternativos o combinaciones de crioprotectores, como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la ciclodextrina cargada con colesterol, que han demostrado mejorar la integridad de la membrana y reducir la toxicidad del glicerol (Mehdipour et al., 2020). Además, la adición de antioxidantes como la vitamina E y la superóxido dismutasa (SOD) podría ayudar a mitigar el estrés oxidativo durante la fase de congelación y descongelación (76).

## **11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)**

### **Impacto Técnico**

La investigación contribuye al desarrollo de protocolos avanzados en la criopreservación de semen aviar, enfocándose en el uso del diluyente Lake-Ravie-84. Esto mejora la comprensión sobre la viabilidad espermática post-congelación, proporcionando datos relevantes para optimizar las técnicas actuales de reproducción asistida en aves. Los resultados obtenidos pueden ser aplicados a futuras investigaciones en biotecnología reproductiva, estableciendo un precedente para el diseño de diluyentes específicos para especies avícolas criollas.

### **Impacto Social**

El proyecto tiene un efecto positivo en la preservación de los gallos criollos, que son un recurso genético valioso para las comunidades rurales. Al garantizar la continuidad y mejora genética de estas aves, se fortalece la seguridad alimentaria en zonas rurales, donde estas especies representan una fuente accesible de proteína animal. Además, fomenta el uso de tecnologías reproductivas entre pequeños y medianos productores, promoviendo la sostenibilidad económica y el empoderamiento de los criadores locales.



## Impacto Ambiental

La preservación genética de gallos criollos contribuye a la biodiversidad avícola y a la sostenibilidad del ecosistema agropecuario. Este enfoque reduce la dependencia de razas comerciales de alto impacto ambiental y promueve prácticas de manejo sostenibles. Al proteger recursos genéticos locales, se minimiza la erosión genética y se asegura la adaptabilidad de estas aves a diversos ecosistemas y condiciones climáticas.

## Impacto Económico

El desarrollo de métodos de criopreservación y reproducción asistida tiene el potencial de mejorar como es eficiencia productiva de los gallos criollos, aumentando la rentabilidad para los criadores. Los resultados del proyecto pueden incentivar la creación de bancos genéticos avícolas en Ecuador, generando nuevas oportunidades de negocio y promoviendo la exportación de germoplasma aviar. Asimismo, la implementación de estas tecnologías puede reducir costos operativos relacionados con la fertilidad y productividad de las aves.

## 12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

*Tabla 7. Descripción de gastos*

<b>GASTOS TESIS</b>			
<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>P.UNITARIO</b>	<b>VALOR</b>
Jaulas	1	30	30
Comida mezclada	1	12	12
Arroba de morochillo	5	5,5	27,5
Comederos y bebederos	5	0,44	2,2
Caja Porta objetos	4	3,5	14
Caja Cubre objetos	2	3,62	7,24
Tubos Eppendorf	1	17,4	17,4
Tubos falcón	1	17,4	17,4
Micropipetas	1	14,25	14,25
Envió primer diluyente	1	5,5	5,5
1 recarga nitrógeno	1	16,35	16,35
2 Recarga nitrógeno	1	14,6	14,6
3 Recarga nitrógeno	1	14,5	14,5
Gentamicina + Suero	1	9	9
3 huevos	3	0,15	0,45
40 ml de diluyente	1	300	300
Incubación	60	0,4	24
Transporte	1	20	20
Caja de jeringas de insulina	1	8,83	8,83

### 13. CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar un protocolo de colecta de semen en gallos criollos mediante la técnica de masaje abdominal, obteniendo un total de 15 eyaculados en tres sesiones. Este método permitió la obtención eficiente de muestras seminales con volúmenes y concentraciones adecuadas para su posterior análisis y criopreservación, sentando una base para futuras investigaciones en reproducción asistida en aves criollas.
- La criopreservación del semen de gallos criollos utilizando el diluyente Lake-Ravie 84 demostró ser efectivo para preservar la morfología espermática, motilidad individual, movilidad progresiva y vigor en la etapa post congelación, lo que nos indica que este criopreservante posee un óptimo porcentaje de utilización para la elaboración de pajuelas en este tipo de especie animal.
- La inseminación artificial con semen criopreservado no logró fertilizar los óvulos de las gallinas criollas, ya que al realizar la evaluación del porcentaje (%) de huevos fértiles mediante ovoscopia en el séptimo día de incubación se evidencio una tasa de fecundación del 0%. Este resultado puede atribuirse posiblemente a causas como: la aplicación de una técnica incorrecta al momento de inseminar a las mismas, mal manejo de descongelamiento de pajuelas y factores ambientales, lo que ocasiona una pérdida de viabilidad espermática.

### 14. RECOMENDACIONES

- Se recomienda probar diferentes diluyentes y crioprotectores, además del glicerol, para mejorar la viabilidad espermática tras la criopreservación. La adición de antioxidantes podría ayudar a reducir el estrés oxidativo y mejorar la integridad de las membranas espermáticas. También es fundamental optimizar la velocidad de enfriamiento y explorar técnicas como la vitrificación para reducir, la formación de cristales de hielo intracelulares.
- Se sugiere realizar estudios sobre diferentes técnicas de inseminación artificial en gallinas con el fin de reducir los efectos negativos que conllevan una mala práctica.

Además, se recomienda evaluar el nivel de estrés animal post inseminación para determinar su posible afectación en la funcionalidad espermática y así poder mejorar la tasa de fertilización.

- Es importante continuar con estudios in vivo para evaluar la capacidad fecundante del semen criopreservado en condiciones controladas. Se recomienda realizar pruebas con diferentes protocolos de inseminación, variando la concentración espermática y la frecuencia de inseminación, para mejorar la tasa de fertilidad y garantizar la viabilidad embrionaria.

## 15. BIBLIOGRAFÍAS

1. Sharafi M, Borghei-Rad SM, Hezavehei M, Shahverdi A, Benson JD. Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals (Basel)* [Internet]. el 1 de diciembre de 2022 [citado el 9 de febrero de 2025];12(23):3271. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9739224/>
2. Janosikova M, Petricakova K, Ptacek M, Savvulidi FG, Rychtarova J, Fulka J. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa. *Poult Sci* [Internet]. el 1 de febrero de 2022 [citado el 9 de febrero de 2025];102(2):102386. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9817176/>
3. FAO. THE SECOND REPORT ON THE STATE OF THE WORLD'S FAO COMMISSION ON GENETIC RESOURCES FOR FOOD AND AGRICULTURE ASSESSMENTS • 2015. 2015 [citado el 9 de febrero de 2025]; Disponible en: [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications)
4. Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, et al. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poult Sci* [Internet]. 2011 [citado el 9 de febrero de 2025];90(9):2047–53. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/51573986\\_Semen\\_cryopreservation\\_for\\_the\\_creation\\_of\\_a\\_Spanish\\_poultry\\_breeds\\_cryobank\\_Optimization\\_of\\_freezing\\_rate\\_and\\_equilibration\\_time](https://www.researchgate.net/publication/51573986_Semen_cryopreservation_for_the_creation_of_a_Spanish_poultry_breeds_cryobank_Optimization_of_freezing_rate_and_equilibration_time)
5. Samuel Rezende Paiva, Harvey D. Blackburn. Conservación de los recursos genéticos animales: la próxima década [Internet]. 2014 [citado el 9 de febrero de 2025]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/267865791\\_Conservation\\_of\\_Animal\\_Genetic\\_Resources\\_the\\_Next\\_Decade](https://www.researchgate.net/publication/267865791_Conservation_of_Animal_Genetic_Resources_the_Next_Decade)
6. Arlex Angarita Leiton, Fernando Castrillón Zapata. PRODUCCIÓN AGROECOLÓGICA DE gallinas criollas. 2020 [citado el 18 de enero de 2025]; Disponible en: [https://semillas.org.co/apc-aa-files/5d99b14191c59782eab3da99d8f95126/sin-prueba\\_compressed-1.pdf](https://semillas.org.co/apc-aa-files/5d99b14191c59782eab3da99d8f95126/sin-prueba_compressed-1.pdf)

7. Manuel Paredes A, Alcira Romero C, Magaly Torres R, Luis Vallejos F, José Mantilla G. Crecimiento y comportamiento reproductivo de la gallina criolla de huevos con cáscara verde de la provincia de Chota, Cajamarca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* [Internet]. 2019 [citado el 18 de enero de 2025];30(2):733–44. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172019000200022&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000200022&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
8. Rosalia Ordaz Contreras. MAESTRA EN CIENCIAS. 2021 [citado el 18 de enero de 2025]; Disponible en: [http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/4718/Ordaz\\_Contreras\\_R\\_MC\\_Ganaderia\\_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/4718/Ordaz_Contreras_R_MC_Ganaderia_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
9. Bull ML, Martins MRFB, Cesário MD, Padovani CR, Mendes AA. Estudio Anatómico del Sistema Reproductor del Gallo Doméstico (*Gallus domesticus*). *International Journal of Morphology* [Internet]. 2007 [citado el 29 de enero de 2025];25(4):709–16. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022007000400007&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022007000400007&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
10. Aparato reproductor del gallo y la gallina - Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de - Studocu [Internet]. [citado el 29 de enero de 2025]. Disponible en: <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-de-nuevoleon/zootecnia-general/aparato-reproductor-del-gallo-y-la-gallina/39956291>
11. Fernanda Peralta Raúl Miazzo M. BASES DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL: REPRODUCCIÓN AVIAR APARATO REPRODUCTOR GENERALIDADES. [citado el 18 de enero de 2025]; Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
12. Rodríguez Ortega L, Rodríguez Ortega A, Zúñiga Estrada EA, Ronquillo de Jesús E, Vargas Cornejo A, Pérez Anaya JA, et al. Gallo criollo El gallo criollo: una descripción de su aparato reproductor. *XAHNI Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No 6* [Internet]. el 5 de julio de 2024 [citado el 2 de febrero de 2025];2(3):15–8. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/382038979\\_El\\_gallo\\_criollo\\_una\\_descripcion\\_de\\_su\\_aparato\\_reproductor](https://www.researchgate.net/publication/382038979_El_gallo_criollo_una_descripcion_de_su_aparato_reproductor)
13. Du X, Qin F, Ameer FK, Zhu Q, Shu G, Li D, et al. Rearing system influences the testicular development, semen quality and spermatogenic cell apoptosis of layer roosters. *Poult Sci* [Internet]. el 1 de agosto de 2021 [citado el 2 de febrero de 2025];100(8):101158. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121001929>
14. Vargas Ibarra Ana Karen. SECRECIONES DE LA UNION ÚTERO VAGINAL Y SU EFECTO EN LOS PARÁMETROS DE CAPACITACIÓN Y DESCAPACITACIÓN ESPERMÁTICA IN VITRO DE *Gallus gallus* [Internet]. 2018 [citado el 18 de enero de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2089/1/181652.pdf>

15. Jorge Antonio Gonzáles Santos. MORFOSIOLOGÍA DE ESPERMATOZOIDES DE Gallus gallus EN EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO Y DE LA HEMBRA [Internet]. 2019 [citado el 18 de enero de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/1869/1/190747.pdf>
16. Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GMK, Ma T, Chen J. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanisms. Vol. 13, Agriculture (Switzerland). MDPI; 2023.
17. Feyzi S, Sharafi M, Rahimi S. Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. Poult Sci [Internet]. el 1 de julio de 2018 [citado el 18 de enero de 2025];97(7):2582–90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29584912/>
18. Somayya A, Lahoud C, Michael N. Características Bioquímicas del Plasma Seminal en Gallinas de Guinea. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias [Internet]. el 1 de septiembre de 2020 [citado el 2 de febrero de 2025];30(5):2748–52. Disponible en: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=IFME&sw=w&issn=07982259&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA634165289&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
19. Depeursinge A, Racoceanu D, Iavindrasana J, Cohen G, Platon A, Poletti PA, et al. Fusing Visual and Clinical Information for Lung Tissue Classification in HRCT Data. Artif Intell Med. 2010;ARTMED1118.
20. AN OVERVIEW ON POULTRY SEMEN [Internet]. 2019 [citado el 18 de enero de 2025]. Disponible en: <https://thepoultrypunch.com/2019/06/an-overview-onpoultry-semen/>
21. Salvador Jimenés Aguilar. EFECTO DE LA EDAD DEL GALLO SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN TESIS. 2013 [citado el 29 de enero de 2025]; Disponible en: [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/DGB\\_UMICH/1873/1/IIAF-M-2013-1156.pdf](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/DGB_UMICH/1873/1/IIAF-M-2013-1156.pdf)
22. (PDF) Spermatogenesis in birds [Internet]. 2015 [citado el 2 de febrero de 2025]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/14862278\\_Spermatogenesis\\_in\\_birds](https://www.researchgate.net/publication/14862278_Spermatogenesis_in_birds)
23. Adeldust H, Farzinpour A, Farshad A, Rostamzadeh J, Lopez-Bejar M. Increased sperm cell production in ageing roosters by an oral treatment with an aromatase inhibitor and a natural herbal extract designed for improving fertility. Reprod Domest Anim [Internet]. el 1 de octubre de 2017 [citado el 2 de febrero de 2025];52 Suppl 4:58–60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29052328/>
24. Pedro Horacio Juárez López. Manejo de Gallo Reproductor Lineal [Internet]. 2010 [citado el 2 de febrero de 2025]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3038/PEDRO%20HORACIO%20JUAREZ%20LOPEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

25. Ritchie M. Neuroanatomy and Physiology of the Avian Hypothalamic/Pituitary Axis: Clinical Aspects. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* [Internet]. el 1 de enero de 2014 [citado el 2 de febrero de 2025];17(1):13–22. Disponible en: <http://www.vetexotic.theclinics.com/article/S109491941300087X/fulltext>
26. Ricaurte Galindo SL. Importancia de un buen manejo de la reproducción en avicultura. 2006 [citado el 29 de enero de 2025]; Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617138013.pdf>
27. Vega P.; Sergio M, Lucero R. CENS SAN MARTIN-Tercer Año-Producción Animal. 2020 [citado el 18 de enero de 2025]; Disponible en: <https://educacion.sanjuan.edu.ar/mesj/LinkClick.aspx?fileticket=rJkjEFM5lQs%3D&tabi>
28. FORMACIÓN | Instituto de Estudios del Huevo [Internet]. [citado el 2 de febrero de 2025]. Disponible en: [https://www.institutohuevo.com/formacion\\_huevo/#](https://www.institutohuevo.com/formacion_huevo/#)
29. Partes de una gallina: todo sobre la anatomía de las gallinas [Internet]. [citado el 29 de enero de 2025]. Disponible en: <https://pazodevilane.com/cronicasgallinero/partes-gallina/>
30. Proceso fisiológico del huevo - Proceso fisiológico del huevo La formación del huevo es un proceso - Studocu [Internet]. [citado el 2 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.studocu.com/es-mx/document/instituto-tecnologicode-sonora/higiene-en-produccion-de-alimentos-de-origen-animal/procesofisiologico-del-huevo/14370367>
31. Corona Kisboa Jose Luís. Efecto del estrés calórico sobre la fisiología y calidad del huevo en gallinas ponedoras. 2013 [citado el 2 de febrero de 2025];1–15. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63628041009.pdf>
32. Fisiología aviar - Eduardo Angulo Asensio - Google Libros [Internet]. [citado el 2 de febrero de 2025]. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=8BbaffsUiu8C&oi=fnd&pg=PA5&dq=fisiologia+de+la+formacion+de+huevo+de+la+gallina&ots=GhwflVw53T&sig=N-ZrnPyO-7DZKDTzF9rNLJX\\_P-o#v=onepage&q=fisiologia%20de%20la%20formacion%20de%20huevo%20de%20la%20gallina&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=8BbaffsUiu8C&oi=fnd&pg=PA5&dq=fisiologia+de+la+formacion+de+huevo+de+la+gallina&ots=GhwflVw53T&sig=N-ZrnPyO-7DZKDTzF9rNLJX_P-o#v=onepage&q=fisiologia%20de%20la%20formacion%20de%20huevo%20de%20la%20gallina&f=false)
33. Manuel J, Grupo B, Avícola AN. ANATOMIA Y FISILOGIA DE LAS AVES. 2015 [citado el 29 de enero de 2025]; Disponible en: [https://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_aves/produccion\\_avicola/116ANATOMIAYFISIOLOGIA.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/produccion_avicola/116ANATOMIAYFISIOLOGIA.pdf)
34. Prochowska S, Nizański W, Fontbonne A. Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) for Feline Spermatozoa: The Simplified Procedure and the Aspect of Sperm Morphology. *Animals* [Internet]. el 1 de abril de 2022 [citado el 29 de enero de 2025];12(7):903. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8997045/>

35. San Vicente Mártir Valencia V, Soler Castillo R, Bueso Ródenas J, San Vicente Mártir V. Análisis de las alteraciones de la cáscara del huevo de gallina. 2017;
36. Luz Mabel Ávila-Portillo. Fundamentos de criopreservación. 2006 [citado el 29 de enero de 2025]; Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74342006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008)
37. Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de criopreservación. Rev Colomb Obstet Ginecol [Internet]. el 20 de diciembre de 2006 [citado el 18 de enero de 2025];57(4):291–300. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/311396616\\_Fundamentos\\_de\\_criopreservacion](https://www.researchgate.net/publication/311396616_Fundamentos_de_criopreservacion)
38. Lopez MJ, Hall CA. Physiology, Osmosis. StatPearls [Internet]. el 13 de marzo de 2023 [citado el 29 de enero de 2025]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557609/>
39. Jaiswal AN, Vagga A. Cryopreservation: A Review Article. Cureus [Internet]. el 16 de noviembre de 2022 [citado el 29 de enero de 2025];14(11):e31564. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9756256/>
40. Departamento Física Aplicada III | Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla 7. GENERALIDADES DE LA CRIOPRESERVACIÓN. En 2020 [citado el 18 de enero de 2025]. Disponible en: <https://biblus.us.es/bibing/proyectos/abreproy/12044/fichero/VOLUMEN+I%252F01+-+CAPITULO+I.pdf>
41. Michelle Sabrina Merchán Lojano. EFECTO DE LA JALEA REAL [Internet]. 2024 [citado el 18 de enero de 2025]. Disponible en: <https://dspace.ucacue.edu.ec/server/api/core/bitstreams/77042f4a-f2fe-4431-8d27-d524dd3e9209/content#:~:text=Los%20crioprotectores%20m%C3%A1s%20utilizados%20en,formaci%C3%B3n%20de%20cristales%20de%20hielo>
42. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. Anim Reprod Sci [Internet]. el 1 de junio de 2016 [citado el 18 de enero de 2025];169:2–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26936658/>
43. Long JA. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? Poult Sci [Internet]. el 1 de febrero de 2006 [citado el 18 de enero de 2025];85(2):232–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26936658/>
44. Luz Mabel Ávila-Portillo, María T. Reguero. Fundamentos de criopreservación. 2006 [citado el 18 de enero de 2025]; Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74342006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008)
45. MICHELLE SABRINA MERCHÁN LOJANO. EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL

TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO AUTORA: MICHELLE SABRINA MERCHÁN LOJANO DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO [Internet]. 2024 [citado el 29 de enero de 2025]. Disponible en: <https://dspace.ucacue.edu.ec/server/api/core/bitstreams/77042f4a-f2fe-4431-8d27-d524dd3e9209/content#:~:text=Los%20crioprotectores%20m%C3%A1s%20utilizados%20en,formaci%C3%B3n%20de%20cristales%20de%20hielo>

46. Piedra AM, León JR, Samaniego J, Garzón DA, Alvarado JC, Galarza DA. Criopreservación de espermatozoides de gallo de combate: efecto de diferentes concentraciones de glicerol. *Spermova* [Internet]. 2022 [citado el 29 de enero de 2025];12(1):21–6. Disponible en: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85145421348&origin=resultslist&sort=cpf&src=s&st1=Criopreservaci%3%b3n+de+espermatozoides+de+gallo+de+combate%3a+efecto+de+diferentes+concentraciones+de+glicerol&sid=9f811406742a8a22c3b4dd519a9dcf32&sot=b&sdt=b&sl=120&s=TITLE-ABS-KEY%28Criopreservaci%3%b3n+de+espermatozoides+de+gallo+de+combate%3a+efecto+de+diferentes+concentraciones+de+glicerol%29&relpos=0&citeCnt=0&searchTerm=>
47. Zong Y, Sun Y, Li Y, Mehaisen GMK, Yuan J, Ma H, et al. Effect of glycerol concentration, glycerol removal method, and straw type on the quality and fertility of frozen chicken semen. *Poult Sci* [Internet]. el 1 de junio de 2022 [citado el 18 de enero de 2025];101(6):101840. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257912200147X>
48. Elsa López Bardón. Utilidad del dimetilsulfóxido para la criopreservación de muestras de líquido sinovial. 2021 [citado el 18 de enero de 2025]; Disponible en: [https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/54720/TFG\\_Lopez\\_Bardon\\_Elsa.pdf](https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/54720/TFG_Lopez_Bardon_Elsa.pdf)
49. Strzezek J, Fraser L, Lecewicz M, Dziekonska A, Sáiz Cidoncha F. Aplicaciones bioquímicas y prácticas de un diluyente para la conservación líquida de semen de verraco a 5° y a 16 °C. *Avances en tecnología porcina*, ISSN 1697-2015, Vol 1, N° 11 (NOV), 2004, págs 51-66 [Internet]. 2004 [citado el 18 de enero de 2025];1(11):51–66. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4340087&info=resumen&idoma=SPA>
50. Ana Fernández, José Antonio Castilla. FUNDAMENTOS DE CRIOBIOLOGÍA ESPERMÁTICA PARA BANCOS DE SEMEN | Revista Asebir. 2009 [citado el 18 de enero de 2025]; Disponible en: <https://revista.asebir.com/fundamentos-decriobiologia-espermatologica-para-bancos-de-semen/>
51. Van Dam JTP, Van Der Heide D, Van Den Ingh TSGAM, Wensing T, Zwart D. The effect of the quality of roughage on the course of *Trypanosoma vivax* infection in West African Dwarf goats: II. Metabolic profile, packed cell volume, and pathology of disease. *Livest Prod Sci* [Internet]. el 1 de enero de 1998 [citado el 18 de enero de 2025];53(1):81–90. Disponible en:



<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301622697001279?via%3Dihub>

52. Partyka A, Nizański W, Bajzert J, Łukaszewicz E, Ochota M. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. *Cryobiology* [Internet]. el 1 de octubre de 2013 [citado el 18 de enero de 2025];67(2):132–6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001122401300165X?via%3Dihub>
53. Mehdipour M, Daghigh Kia H, Martínez-Pastor F. Poloxamer 188 exerts a cryoprotective effect on rooster sperm and allows decreasing glycerol concentration in the freezing extender. *Poult Sci* [Internet]. el 1 de noviembre de 2020 [citado el 18 de enero de 2025];99(11):6212–20. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579120305800?via%3Dihub>
54. Robles V, Valcarce DG, Riesco MF. The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos. *Biomolecules* 2019, Vol 9, Page 181 [Internet]. el 9 de mayo de 2019 [citado el 18 de enero de 2025];9(5):181. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/5/181/htm>
55. Mehdipour M, Daghigh-Kia H, Najafi A, Martínez-Pastor F. Type III antifreeze protein (AFP) improves the post-thaw quality and in vivo fertility of rooster spermatozoa. *Poult Sci* [Internet]. el 1 de agosto de 2021 [citado el 18 de enero de 2025];100(8):101291. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121003254?via%3Dihub>
56. Burrows WH, Quinn JP. A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl. *Poult Sci*. el 1 de julio de 2015;14(4):251–3.
57. Ángel Steven Bajaan Carbo. La inseminación artificial en aves: un enfoque biotecnológico. [Internet]. 2023 [citado el 18 de enero de 2025]. Disponible en: <https://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/14921/E-UTB-FACIAGING%20AGROP-000294.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
58. Burrows WH, Quinn JP. A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl. *Poult Sci* [Internet]. el 1 de julio de 1935 [citado el 18 de enero de 2025];14(4):251–3. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119559351?via%3Dihub>
59. Gallos Seductores. Todo lo que debes saber sobre la reproducción de la gallina - La Casa de Mi Gallina [Internet]. [citado el 3 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.lacasademigallina.com/blog/cuidado-de-aves-de-corral/galloseductores-todo-lo-que-debes-saber-sobre-el-apareamiento-y-reproduccion-delas-gallinas>
60. ENRIQUE BERGQVI sr AzoLAs. Inseminación Artificial en Aves. 1981 [citado el 3 de febrero de 2025]; Disponible en:

<https://biblioteca.inia.cl/server/api/core/bitstreams/cc10eb89-03e7-4cae-92680dde36f7d47a/content>

61. Giavarini I. Ventajas de la inseminación artificial aplicada a la avicultura. 1991 [citado el 3 de febrero de 2025]; Disponible en: [https://ddd.uab.cat/pub/selavi/selavi\\_a1992m4v34n4/selavi\\_a1992m4v34n4p246.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/selavi/selavi_a1992m4v34n4/selavi_a1992m4v34n4p246.pdf)
62. Inseminación artificial en gallinas - EcuRed [Internet]. [citado el 3 de febrero de 2025]. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Inseminaci%C3%B3n\\_artificial\\_en\\_gallinas](https://www.ecured.cu/Inseminaci%C3%B3n_artificial_en_gallinas)
63. PRINCIPLE & PRACTICES OF ARTIFICIAL INSEMINATION (AI) IN POULTRY FOR COMMERCIAL LAYER POULTRY BREEDING [Internet]. [citado el 3 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.pashudhanpraharee.com/principle-practices-of-artificialinsemination-ai-in-poultry-for-commercial-layer-poultry-breeding/>
64. Inseminación artificial en pavos y pollos - Avicultura - Manual de veterinaria de MSD [Internet]. [citado el 3 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.msdrvmanual.com/es/avicultura/inseminaci%C3%B3nartificial/inseminaci%C3%B3n-artificial-en-pavos-y-pollos>
65. Marco MMC, Estrada AJ. BASES FISIOLÓGICAS DE LA INCUBACIÓN EN LAS GALLINAS DOMÉSTICAS. 2018 [citado el 29 de enero de 2025];88. Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
66. Alkmim A, Filho O. Artificial Intelligence as a Source of Economic Success for Small Broiler Producers. Encontro Unificado de Computação do Piauí (ENUCOMPI) [Internet]. el 7 de junio de 2022 [citado el 29 de enero de 2025];31–8. Disponible en: <https://sol.sbc.org.br/index.php/enucompi/article/view/20467>
67. Hernandez D CGD. APLICACIÓN DEL TEST HIPOOSMÓTICO (HOST) EN LA. 2025.
68. Impacto de Las Variables en La Incubacion | PDF | Unidad de cuidado intensivo neonatal | Colombia [Internet]. [citado el 29 de enero de 2025]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/559371171/impacto-de-las-variables-en-laincubacion>
69. Steve. AviagenBrief ® Incubación de Huevos en Altura. 2013 [citado el 29 de enero de 2025]; Disponible en: [www.aviagen.com](http://www.aviagen.com)
70. Cantón Salcedo - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [citado el 29 de enero de 2025]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Cant%C3%B3n\\_Salcedo](https://es.wikipedia.org/wiki/Cant%C3%B3n_Salcedo)
71. CEYPSA Salache [Internet]. [citado el 29 de enero de 2025]. Disponible en: <http://www.utc.edu.ec/utc/salache>
72. AVILA-PORTILLO LM. Fundamentos de criopreservación. 2006 [citado el 29 de enero de 2025]; Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74342006000400008&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74342006000400008&script=sci_abstract&tlng=es)

73. Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GMK, Ma T, Chen J. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanisms. *Agriculture* 2023, Vol 13, Page 445 [Internet]. el 14 de febrero de 2023 [citado el 29 de enero de 2025];13(2):445. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/2/445/htm>
74. Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GMK, Ma T, Chen J. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanisms. *Agriculture* 2023, Vol 13, Page 445 [Internet]. el 14 de febrero de 2023 [citado el 3 de febrero de 2025];13(2):445. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/2/445/htm>
75. Andrés L. Moscoso, Manuel E. Maldonado, Juan. C Alvarado, Daniel E. Argudo, Jorge X. Samaniego. Caracterización cinemática de espermatozoides criopreservados de tres biotipos de gallos criollos ecuatorianos. G. Balint, Antala B, Carty C, Mabieme JMA, Amar IB, Kaplanova A, editores. *Uniwersytet śląski* [Internet]. el 15 de enero de 2022 [citado el 3 de febrero de 2025];7(1):111–3. Disponible en: [https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs\\_files/article/view/3057/1719](https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs_files/article/view/3057/1719)
76. Partyka A, Nizański W, Bajzert J, Łukaszewicz E, Ochota M. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. *Cryobiology* [Internet]. octubre de 2013 [citado el 29 de enero de 2025];67(2):132–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23770516/>
77. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* [Internet]. el 1 de junio de 2016 [citado el 29 de enero de 2025];169:2–5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432016300343>
78. O'Brien. Inseminación artificial en gallinas autóctonas [Internet]. 2017 [citado el 3 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20210336536>
79. Zong Y, Sun Y, Li Y, Mehaisen GMK, Yuan J, Ma H, et al. Effect of glycerol concentration, glycerol removal method, and straw type on the quality and fertility of frozen chicken semen. *Poult Sci* [Internet]. el 1 de junio de 2022 [citado el 29 de enero de 2025];101(6). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35413595/>
80. Long JA. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poult Sci* [Internet]. 2006 [citado el 29 de enero de 2025];85(2):232–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16523619/>
81. Inseminación artificial en pavos y pollos - Avicultura - Manual de veterinaria de MSD [Internet]. [citado el 11 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.msdevetmanual.com/es/avicultura/inseminaci%C3%B3nartificial/inseminaci%C3%B3n-artificial-en-pavos-y-pollos>
82. Salazar Rodríguez A, Antonio J, Barragán H, Ávalos Rodríguez A. CAPACIDAD FERTILIZANTE DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE GALLO . 2023 [citado el 3 de febrero de 2025]; Disponible en:

<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/retrieve/dcb6292c-df68-4452-9e5afb5bf118f8c7/251675.pdf>