



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DEL PORCENTAJE DE GLICEROL  
EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN  
EN AVES DE COMBATE**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**AUTOR: JAIME MARCELO REINOSO LEÓN**

**DIRECTOR: Dr. ANDRÉS LEONARDO MOSCOSO PIEDRA**

**CUENCA - ECUADOR**

**2021**

*No me gradué en los  
50 años de La Cato!*



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DEL PORCENTAJE DE GLICEROL  
EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN  
EN AVES DE COMBATE**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**AUTOR: JAIME MARCELO REINOSO LEÓN**

**DIRECTOR: Dr. ANDRÉS LEONARDO MOSCOSO PIEDRA**

**CUENCA - ECUADOR**

**2021**

*Yo me gradué en los  
50 años de La Cato!*

## I. DECLARACIÓN

Yo, Jaime Marcelo Reinoso León, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.



---

Jaime Marcelo Reinoso León

## II. CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Jaime Marcelo Reinoso León, bajo mi supervisión.



---

Dr. Andrés Moscoso Piedra Msc

DIRECTOR

### **III. DEDICATORIA**

A mis padres, Lauro y Cristina, a mi hijo Lucas y mi esposa Catalina, sobre todo a mi madre que, aunque no esté a mi lado siempre la llevo en mi corazón y seguro estaría orgullosa de esta meta lograda.

A mis hermanos Nelly, Ramiro, Marco y Lauro; que siempre estuvieron a mi lado desde siempre, ayudándome y apoyándome.

## **IV. AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por haberme permitido cumplir con esta meta, a la Universidad Católica de Cuenca por ser la formadora de mis conocimientos, a mis profesores y personas que me ayudaron en el desarrollo de esta tesis, en especial al Dr. Andrés Moscoso Piedra, Dr. Andrés Galarza Lucero, Dr. Daniel Argudo y al Dr. Juan Alvarado.

## V. ÍNDICE DE CONTENIDO

### Tabla de contenido

I. DECLARACIÓN .....	i
II. CERTIFICACIÓN DEL TUTOR .....	ii
III. DEDICATORIA.....	iii
IV. AGRADECIMIENTOS .....	iv
V. ÍNDICE DE CONTENIDO .....	v
VI. LISTA DE FIGURAS .....	viii
VII. LISTA DE CUADROS .....	ix
VIII. LISTA DE ANEXOS .....	x
IX. RESUMEN.....	1
X. ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1.....	3
1.1. Introducción .....	3
1.2. Planteamiento del problema .....	5
1.3. Antecedentes.....	6
1.4. Objetivos.....	8
1.4.1. Objetivo General.....	8
1.4.2. Objetivos Específicos .....	8
1.5. Hipótesis.....	9
1.6. Justificación .....	10
CAPITULO 2. Revisión de Literatura .....	11
2.1. Generalidades de la Reproducción Avícola.....	11
2.2. Clasificación Taxonómica de la Gallina Criolla .....	11

2.3. Cronología de la congelación de semen .....	12
2.4. Metabolismo de los espermatozoides .....	13
2.5. Sistema reproductivo y genética de aves de combate .....	14
A. Características del Semen de Gallo .....	15
B. Morfología espermática del gallo .....	15
2.6. La criopreservación.....	16
2.7. Fundamentos de la criopreservación .....	17
2.8. Agentes crioprotectores .....	18
2.8.1. Crioprotectores no permeables.....	18
2.8.2. Crioprotectores permeables.....	18
2.9. Métodos de colección de semen.....	19
2.9.1. Masaje abdominal: .....	19
2.9.2. Electro eyaculador: .....	19
CAPITULO 3.....	20
3.1. Metodología .....	20
3.2. Materiales y método .....	20
3.2.1 Materiales físicos.....	17
3.2.2.Materiales químicos .....	21
3.2.3 Materiales biológico .....	21
3.3. Tratamientos .....	21
3.4. Diseño experimental .....	22
3.5. Variables experimentales .....	22
3.5.1. Variables dependientes .....	22
3.5.2. Variables Independientes.....	23
3.6. Identificación de las aves donantes .....	23



3.7. Gallos escogidos según su condición física y morfológica para la colección de semen .....	24
3.8. Preparación de los donantes .....	27
3.9. Colecta de muestra.....	27
3.10. Descongelación de diluyente .....	27
3.11. Análisis macroscópico .....	28
3.12. Análisis microscópico .....	28
3.13. Concentración espermática .....	28
3.14. Identificación de pajuelas .....	29
3.15. Cálculo de dilución de la muestra .....	29
3.16. Método de criopreservación.....	30
3.17. Congelación de semen de gallo.....	31
3.18. Descongelación de semen de gallo .....	31
3.19. Prueba de integridad de membrana plasmática.....	31
3.20. Análisis estadísticos .....	32
CAPITULO 4. Resultados .....	33
4.1. Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática.....	38
CAPITULO 5.....	40
5.1. DISCUSIÓN .....	40
5.2. CONCLUSIONES .....	44
5.3. RECOMENDACIONES .....	44
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	61
XII. ANEXOS.....	67

## VI. LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Gallo 1 .....	24
Fig 2. Gallo 2 .....	24
Fig 3. Gallo 3 .....	25
Fig 4. Gallo 4 .....	25
Fig 5. Gallo 5 .....	26
Fig 6. Gallo 6 .....	26
Fig 7. Porcentaje de motilidad .....	27
Fig 8. Valores de velocidades espermáticas .....	36
Fig 9. Porcentajes de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB).....	37
Fig 10. Valores de amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) .....	38
Fig 11. Integridad de la membrana plasmática .....	38
Fig 12. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con la prueba de integridad de membrana plasmática (host).....	39

## VII. LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Taxonomía de la gallina criolla.....	12
Cuadro 2. El volumen de eyaculación en ml y la concentración espermática en el gallo (Feyzi & Sharafi, 2018).....	15

## VIII. LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de semen por masaje abdominal.....	67
Anexo 2. Cálculo de concentración espermática .....	67
Anexo 3. Preparación de diluyente lake-ravie-84 .....	68
Anexo 4. Mezcla de diluyente fracción 1 y fracción 2 .....	68
Anexo 5. Empajillado de pajuelas.....	69
Anexo 6. Congelación de pajuelas .....	69
Anexo 7. Almacenamiento de pajuelas .....	70
Anexo 8. Descongelación de pajuelas .....	70
Anexo 9. Análisis de variables de sistema casa.....	71
Anexo 10. Análisis de microscopia de fluorescencia con yoduro de propidio .....	71

## IX. RESUMEN

Las optimizaciones de la criopreservación de espermatozoides de gallo van direccionados al uso eficiente de agentes crioprotectores (ACP) para incrementar la criosupervivencia. El glicerol (Gly), es el mejor ACP usado en especies aviares, sin embargo, su concentración puede influir en la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación. El presente estudio evaluó el efecto de diferentes concentraciones de Gly adicionado (v/v) diluyente Lake-Ravie sobre la criosupervivencia espermática del gallo de combate. Para este propósito, seis gallos de combate españoles fueron utilizados para obtener un total de 42 eyaculados obtenidos por masaje dorsal (7 sesiones/ semana). Se conformaron 7 agrupaciones de semen (pools) de 6 eyaculados cada uno. Cada pool pre-diluido (1:1) con Lake-Ravie fue dividido en 6 alícuotas que fueron diluidas finalmente con 0 (control), 2 (Gly-2), 4 (Gly-4), 6 (Gly-6), 8 (Gly-8), y 10% (Gly-10) de glicerol respectivamente, y congeladas en vapores de nitrógeno líquido estático. La cinética e integridad de la membrana plasmática (IMP) fueron evaluadas antes y después de la congelación de cada tratamiento usando el sistema computarizado CASA (SCA®) y la prueba de fluorescencia simple (yoduro de propidio), respectivamente. Los resultados demostraron que solo las motilidades totales (MT) y progresiva (MP) fueron afectadas ( $P < 0,001$ ) por el proceso de criopreservación. El grupo Gly-8 produjo valores más altos de MT ( $P < 0,01$ ) en comparación con el control, Gly-2, Gly-4 y Gly-6; y una MP mayor ( $P < 0,05$ ) comparada con el control. El índice de rectitud (STR) fue superior ( $P < 0,05$ ) después de congelar con Gly-2 y Gly-6 comparados con el control, mientras que la oscilación (WOB) fue superior ( $P < 0,05$ ) con Gly-6 y Gly-8 comparadas con el control. Así mismo, valores más altos de batida de flagelo (BCF) fueron obtenidos ( $P < 0,05$ ) con los grupos Gly-6, Gly-8 y Gly-10 en comparación con su control. Finalmente, la IMP (viabilidad) fue superior con Gly-8 comparada con Gly-2 ( $P < 0,05$ ) y control ( $P < 0,01$ ), independientemente de la funcionalidad de la membrana plasmática (HOST+). En conclusión, la adición de glicerol al 8% al medio de congelación produce una mejor respuesta cinética e integridad de la membrana plasmática de espermatozoides de gallo de combate criopreservados.

Palabras claves: Gallos de pelea, semen, glicerol, congelación, Lake-Ravie.

## X. ABSTRACT

Optimization of rooster sperm cryopreservation is aimed at the efficient use of cryoprotective agents (CPA) to increase cryosurvival. Glycerol (Gly) is the most efficient CPA used in avian species, however, its concentration can influence post-thaw sperm motility and viability. The present study evaluated the effect of different concentrations of Gly added (v/v) Lake-Ravie extender on the sperm cryosurvival of the fighting rooster. For this purpose, six Spanish fighting cocks were used to obtain a total of 36 ejaculates obtained by dorsal massage (6 sessions/week). Six semen groups (pools) of 6 ejaculates each were formed. Each pool pre-diluted (1: 1) with Lake-Ravie was divided into 6 aliquots that were finally diluted with 0 (control), 2 (Gly-2), 4 (Gly-4), 6 (Gly-6), 8 (Gly-8), and 10% (Gly-10) glycerol respectively, and frozen in static liquid nitrogen vapors. The kinetics and plasma membrane integrity (PMI) were evaluated before and after freezing of each treatment using the computerized CASA system (SCA) and the simple fluorescence test (propidium iodide), respectively. The results showed that only total (TM) and progressive (PM) motility were affected ( $P < 0.001$ ) by the cryopreservation process. The Gly-8 group yielded higher MT ( $P < 0.01$ ) than control, Gly-2, Gly-4 and Gly-6 groups; and a higher MP ( $P < 0.05$ ) than the control group. The straightness (STR) was higher ( $P < 0.05$ ) after freezing with Gly-2 and Gly-6 compared to the control, while the oscillation (WOB) was higher ( $P < 0.05$ ) with Gly -6 and Gly-8 compared to control. Likewise, higher values ( $P < 0.05$ ) of beat-cross frequency (BCF) were obtained with the Gly-6, Gly-8 and Gly-10 groups than control group. Finally, PMI value (viability) was higher with Gly-8 compared to Gly-2 ( $P < 0.05$ ) and control ( $P < 0.01$ ), irrespective of plasma membrane functionality (HOST+). In conclusion, the addition of 8% glycerol to the freezing medium yielded a better kinetic response and plasma membrane integrity of cryopreserved fighting rooster sperm.

**Keywords:** Fighting rooster, semen, glycerol, freezing, Lake-Ravie

## CAPÍTULO 1

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Durante la criopreservación de semen de gallo existen periodos críticos en la supervivencia de la célula, sobre todo en la fase inicial del congelamiento y en la etapa en la que se retorna a condiciones fisiológicas normales, que pueden incidir en la viabilidad del esperma congelado (Avila-Madero & López, 2006). En la industria avícola en especial la de gallos de combate se ha desarrollado y utilizado crio protectores a base de glicerol con diferentes porcentajes de concentración que actúa como protector, salvaguardándolo de lesiones que se producen al momento de someter a congelación, esto debido a que por su bajo peso molecular puede atravesar las membranas celulares y proteger el material genético y los organelos en su interior (Fernández, y otros, 2009). El glicerol funciona como agente deshidratante evitando que se formen cristales de agua en el proceso de congelación y descongelación reduciendo en lo posible los daños en los espermatozoides sin embargo al ser el glicerol una sustancia química podría resultar tóxico en concentraciones no indicadas produciendo en el caso del semen de gallo la disminución de la motilidad y fecundación (Svoradová, Kuželová, Vašíček, Baláži, & Hanusová, 2018).

Mediante la criobiología, una rama de la biología, se ha conseguido detener la degeneración celular y sus procesos biológicos, manteniendo a los espermatozoides en un estado de animación suspendida a temperaturas muy bajas (Moreno & Galarza, 2019). Para garantizar la integridad de dichos espermatozoides se puede utilizar crioprotectores como el glicerol cuyas propiedades fueron descubiertas en 1949 por los científicos (Polge, Smit, & Parkes, 1949) durante la congelación de esperma de humano y pavo, donde las muestras fueron conservadas en un refrigerador, siendo las muestras que fueron conservadas con glicerol, las que mejor se conservaron y toleraron las bajas temperaturas, a pesar de que en dicho estudio el glicerol no era el objeto de estudio sino solo un componente fijador histológico, por tal motivo el glicerol está siendo utilizado como crioprotector ya que cumple con la función de desplazar o extraer el agua del citoplasma y así evitar la formación de cristales intracelulares (Boiso, 2001).

Por tal motivo este estudio es importante, pues va encaminada a buscar la concentración ideal de crioprotector de semen de gallo utilizando como base el glicerol a diferentes concentraciones: 2, 5, 8 y 10% (Baixin, Xiaohu, & Haifeng, 2019). Con lo cual se realiza una evaluación en un score de 0 a 5 de los espermatozoides inmóviles, espermatozoides móviles no progresivos y progresivos, así como las características espermáticas de velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad promedio de trayectoria (VAP) por medio del sistema de análisis computarizado de imagen (CASA, *Computer-Assisted Sperm Analysis*) acoplado a un microscopio y equipado con una platina térmica (Bernal et al., 2015).

Debido a que en los últimos años se ha evidenciado un incremento importante en la criopreservación de semen de aves de combate por el alto costo que pueden llegar a tener estos ejemplares, resulta imperante obtener y conservar los genes de los mejores gallos, que hayan demostrado cualidades excepcionales al momento de la lidia, así también se podría suponer un ahorro económico (comida, espacio, mano de obra) y una garantía en el mantenimiento de variabilidad del esperma y más importante aun permitiría la comercialización, importación y exportación de material genético (Medina, Velasco, & Cruz, 2006).



## 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para la crioconservación de material genético se requiere entender e implementar adecuadamente los protocolos a seguir debido a que aún no se tiene los diluyentes ideales para todas las especies, por lo tanto se debe conocer ciertas características de la célula que pueden incidir en la viabilidad del espermatozoides congelado, ya que existen periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación; en la fase inicial de congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas. (Avila, Madero, & Lopez, 2006)

Para facilitar la criopreservación de semen de gallos de combate se han desarrollado ciertos crioprotectores, como el glicerol, que es un crioprotector permeable de bajo peso molecular, lo que permite atravesar la membrana celular, de esta manera protege a la célula de lesiones producidas al momento de someterles a procesos de congelación. Sin embargo, se pueden presentar efectos contrarios que pueden resultar perjudiciales o dañinos al ser usados en altas concentraciones de glicerol, como es: la toxicidad (debido a que son sustancias químicas que no se encuentran en el interior de la célula, lo que en si está produciendo un envenenamiento celular), aumento en la osmolaridad y cambios en la permeabilidad, siendo el caso de los gallos que produce una disminución en la motilidad, lo que hace que disminuya la posibilidad de fecundación (Fernández et al., 2009). Por lo que se debería ensayar el uso del glicerol con una amplia gama de dosis y diferentes diluyentes hasta encontrar el método de crioconservación más eficaz

### 1.3. ANTECEDENTES

En un estudio realizado en Changsha (China), se examinó diferentes concentraciones de glicerol (Gly) y protocolos de congelación para mejorar la viabilidad espermática del gallo, dando como resultado que la fertilidad más alta se dio en los grupos con menor concentración 4 y 6% respectivamente y la fertilidad más baja de dio donde se aplicaron concentraciones entre 8 y 11%. La razón se podría explicar debido a que la presión osmótica ambiental del esperma cambiado cuando se añadió o eliminó glicerol durante un corto período de tiempo. (Baixin, Xiaohu, & Haifeng, 2019)

En la ciudad de Alberca, Murcia-España se criopreservaron el semen de 6 gallos que se clasificaron como donantes de la raza murciana entre 1,5 a 2 años de edad, luego de esta valorización en semen fresco y descongelado se observó una variación en la motilidad de  $3,57 \pm 0,14$  en semen congelado frente al valor de  $4,04 \pm 0,11$  del semen fresco, y un porcentaje de células vivas de  $62,73 \pm 5,66\%$  para el semen descongelado siendo significativamente menor comparado con el  $82,63 \pm 3,21\%$  del semen fresco; otros de los porcentajes de mayor importancia se refiere a la integridad de la membrana celular del espermatozoide, en la que se obtuvo un  $31,50 \pm 3,50\%$  en el material descongelado resulto sin ningún tipo de daño frente al valor  $87,33 \pm 3,21\%$  de semen fresco. Por lo que según esta investigación la disminución de viabilidad espermática se deprime en 56 puntos porcentuales. (Duchi, Almela, Peinado, & Remacha, 2009)

En abril del 2006 se realizó un estudio en Bogotá Colombia, sobre la Importancia de un buen manejo de la reproducción en la industria avícola, en la que se muestra una tasa de fertilidad de 92-99% usando como diluyente la clara de huevo y leche en un semen almacenado por 24 horas, en esta publicación se pueden observar disminución de motilidad y fecundación por la excesiva disolución de espermatozoides, por lo que podemos decir que se recomienda una dilución de  $\frac{1}{2}$  y  $\frac{1}{3}$  para asegurar un proceso eficaz y el manejo de semen hasta las 24 a 48 horas con una oxigenación buena durante su almacenamiento. La fecundación con esta

técnica puede variar dependiendo de factores como: la calidad del semen fresco, oxigenación durante el almacenamiento, velocidad de enfriamiento ( $1^{\circ}$ /minuto), entre otros (Galindo, 2006).

En base a lo expuesto anteriormente planteó los siguientes objetivos:

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del glicerol en diferentes porcentajes de concentración en la criopreservación de semen de gallo de combate.

### **1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el efecto del glicerol sobre las características de valoración espermática antes y después de la congelación.
- Establecer la concentración óptima de glicerol que garantice la viabilidad espermática.

## **1.5. HIPÓTESIS**

El uso de glicerol como crioprotector a una concentración del 8% en semen de gallos de combate, constituye una alternativa que permitirá la mejor conservación de semen de gallo de combate frente a la no utilización de crioprotectores.

## 1.6. JUSTIFICACIÓN

En la criopreservación de material genético de aves se ha venido utilizando diferentes crioprotectores, uno de ellos es el glicerol, que ayuda a proteger la integridad estructural de la célula espermática de los procesos de congelación y descongelación, para esto debemos encontrar la concentración idónea de glicerol, que según investigaciones realizadas puede ser entre el 5 y el 10%, esto en combinación con diluyentes que permitan mejorar su viabilidad y funcionalidad, como es el caso del diluyente Lake-Ravie, que ha mostrado niveles superiores en motilidad progresiva post-descongelamiento, ya que por su bajo peso molecular puede atravesar la membrana plasmática evitando los efectos nocivos causada por la congelación lenta (Baixin, Xiaohu, & Haifeng, 2019).

Es por eso que la congelación espermática de aves tanto domesticas como silvestres, nos permite preservar y mantener los genes de aves que en algunos casos se encuentran en peligro de extinción o resultan de interés investigativo, siendo los bancos de esperma la mejor alternativa para lograr este propósito, científicos y técnicos de los departamentos de Reproducción Animal y de Mejora Genética del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) en sus estudios han manifestado que ciertas aves son más vulnerables a las enfermedades, como las gripes aviares emergentes en estos últimos años y los cambios climáticos, lo que hace apremiante el desarrollar estas estrategias que garanticen la preservación de estas aves (Tapia, 2017).

## **CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. GENERALIDADES DE LA REPRODUCCIÓN AVÍCOLA**

En la avicultura doméstica se busca ejemplares que puedan lograr cubrir con eficiencia una gran cantidad de hembras, sin embargo en casos especiales no se logra que los reproductores puedan copular a más de diez hembras de forma satisfactoria, debido a la poca frecuencia con las que se dan las cópulas y que los machos tienden a cubrir con más frecuencia a ciertas hembras que consideran como sus favoritas, haciendo que los huevos que se produzcan sean infértiles en las aves que no son copuladas en el lapso de tiempo necesario (Paredes, Romero, Torres, & Vallejos, 2019).

Otra de las causas que afectan el normal proceso reproductivo es la incompatibilidad física entre hembras y machos como el peso y la estatura, impidiendo el proceso normal de la cópula y fecundación, otro factor causante son también las altas temperaturas, debido a que el estrés calórico disminuya la producción espermática (Bustos & Torres, 2012).

Una desencadenante también de la baja producción en cantidad y calidad espermática se da debido a la edad, época del año, cantidad de luz, humedad, nutrición animal y problemas físicos, por lo que es inconcebible pensar en mantener una producción avícola sin el uso de nuevas tecnologías e invenciones que faciliten el mejoramiento de la producción; estas innovaciones son la inseminación artificial in vivo de las gallinas con semen fresco y semen congelado mezclado con su diluyente y su crioprotector (Miguel, Asenjo, Ciria, & Francesch, 2006)

### **2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA GALLINA CRIOLLA**

El científico británico Charles Darwin en su teoría del Origen de las Especies indica que todas las aves domésticas descienden de un solo ancestro común el Gallus Gallus, siendo la gallina doméstica el ave más común en el mundo. (Montes, De la Ossa, & Hernandez, 2019), su taxonomía se encuentra descrita en el siguiente cuadro.

Cuadro 1: Taxonomía de la gallina criolla

REINO	ANIMAL
Tipo	Cordado
Subtipo	Vertebrado
Clase	Ave
Subclase	Neornites
Superorden	Neonatos
Orden	Gallinacea
Suborden	Galli
Familia	Phasianidae
Genero	Gallus
Especie	Gallus Domesticus

### 2.3. CRONOLOGÍA DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN

A lo largo de la historia se han desarrollado estudios sobre la preservación de material celular y biológico sometiéndolos a temperaturas criogénicas con el objetivo de preservar y minimizar daños en las membranas celulares, estos estudios se documentaron por primera vez en 1683 por Sir Robert Boyle en su monografía "New Experiments and Observations Touching Cold", en la cual relata el efecto de la congelación en los seres vivos (Vara & Gil-Loyzaga, 2013). Para 1776 se realizó el primer reporte en la crioconservación de semen humano, asno y rana que fue realizado por Spallanzani por medio de enfriamiento en nieve por 30 minutos, volviéndose inertes pero con la capacidad de volver a ser reactivados, demostrando que la disminución de la temperatura puede ser utilizada para minimizar la actividad metabólica y ampliar la vida espermática (Ramónez, 2013)

El desarrollo de la criopreservación en aves se inició con la inseminación artificial en pavos a mediados del siglo pasado, donde se preservó material seminal con el objetivo de conservar rasgos autóctonos de gallinas y de algunas aves silvestres mediante la técnica "ultracooling" que permitía mantener los espermatozoides viables a menos 45° centígrados durante aproximadamente 24 horas (Villaverde, 2017).



Desde el descubrimiento del glicerol (Polge, Smit, & Parkes, 1949), como elemento crioprotector, la crioconservación de semen de animales de todas las especies, ha evolucionado constantemente, y a pesar que el mantenimiento de los espermatozoides por medio de la criopreservación está garantizada durante prolongados periodos de tiempo, también estos pueden sufrir daños irreparables a la membrana plasmática por la formación de cristales de hielo, o por la despolarización de la membrana como resultado del intercambio iónico, dando como resultado la activación y capacitación espermática de forma espontánea (Ramirez-Melano, Medina, & Cruz-Casallas, 2010)

## **2.4. METABOLISMO DE LOS ESPERMATOZOIDES**

La motilidad de los espermatozoides es desencadenada debido a reservas energéticas intracelulares, que son activadas mediante la fosforilación oxidativa que trabaja principalmente en la producción de ATP y la regulación del metabolismo esencialmente de las proteínas mitocondriales relacionadas con el ciclo TAC (Kommisrud, y otros, 2020), además las mitocondrias tienen una función primaria en el metabolismo celular, lo que supone que de esta dependerá la vida útil del espermatozoide, ya que los espermatozoides son muy activas luego de la eyaculación por lo que sus demandas metabólicas en el estudio de proteómicos de esperma, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, otra de las fuentes de energía metabólica de los espermatozoides es suministrada a través de diferentes proteínas de la membrana que transportan activamente glucosa dependientes de sodio y hexosas, a través de la bicapa lipídica, existen 13 proteínas de la familia de los GLUT que facilitan el transporte de azúcares y participan en funciones específicas como la movilidad y la capacidad de fertilizar (Martín-Cano et al., 2020)

Los espermatozoides cuando se encuentran en condiciones anaeróbicas tienen la capacidad de degradar monosacáridos como las glucosas, fructosas, ácido láctico y siendo la principal azúcar dentro del espermatozoide la fructosa esta permite alimentar al espermatozoide en condiciones anaeróbicas (Chan & Morgan, 2020)

Existe también una correlación entre la adenosina trifosfato (ATP) y adenosina difosfato (ADP) que es determinante en la viabilidad y movilidad espermática, ya que la hidrólisis de ATP a ADP transfiere energía a los espermatozoides, luego esto será

determinante debido a que la motilidad es el principio más importante en el momento de la fertilidad (Hofmann, Lehmer, & Gürster, 1992) . También se ha logrado determinar que durante el método de criopreservación como el post descongelación a temperaturas fisiológicas afecta el nivel de ATP en las células espermáticas en su función motílica y la viabilidad (Alm-Kristiansen, Sanderholen, Bai, & Waterhouse, 2018)

## **2.5. SISTEMA REPRODUCTIVO Y GENÉTICA DE AVES DE COMBATE**

Las aves alcanzan su madurez sexual y reproductiva a partir de los 6 meses de edad aproximadamente (Paredes, Romero, Torres, & Vallejos, 2019) y cuenta con tres órganos morfológicos funcionales: testículos, vías deferentes y órganos copulador; el pene desde el punto de vista anatómico se encuentra atrofiado, solamente se la pueden ver como pliegues redondeados de la cloaca, los testículos se encuentran ubicados dentro de la cavidad abdominal entre los riñones y los pulmones y carecen de órganos accesorios como otros animales como la próstata, vesículas seminales y uréteres. (Alvarez, Perez, De la Cruz, & Quincosa, 2009)

La capacidad de las aves reproductoras para transmitir sus cualidades genéticas a sus descendientes se llama heredabilidad y en la que se basan los genetistas mediante la cruce entre razas y variedades diferentes para desarrollar un ave superior (Juarez-Caratachea, Barocio-Uruea, García-Valladares, & Gutiérrez-Vázquez, 2016); la espermatogénesis se realiza en los testículos en epitelio seminífero donde las células germinales sufren transformaciones hasta lograr desarrollarse y convertirse en espermatozoides todo esto bajo el control hipotalámico, siendo la hormona folículo estimulante (FSH) la que regula la actividad testicular y la hormona luteinizante (LH) que estimula el desarrollo y crecimiento de la células de Leydig para la secreción de andrógenos, específicamente la testosterona. Los tubos seminíferos se conectan con la red de testis que a su vez comunica con los conductos eferentes que desembocan en el canal de epidídimo, mismo que se conecta con el conducto deferente terminando en el saco seminal donde se almacena el esperma y desemboca en la cloaca donde se encuentra su pene. (Alvarez et al., 2009).

## A. Características del Semen de Gallo

Según la especie y estirpe puede variar considerablemente tanto en el volumen del eyaculado como en la concentración total de espermatozoides presentes y depende principalmente de su estado fisiológico y método de recolección, siendo el volumen promedio de semen por eyaculación entre 0.5 hasta 1 ml (Tene, 2014)

El color del semen varía desde blanco hasta un color gris (siendo el gris indicador que existe poca concentración espermática). La motilidad se estima en valores subjetivos de acuerdo a la escala de 1 a 10, donde los valores bajos son indicadores de poca motilidad, en consecuencia posee baja fertilidad, contrario a los que tienen alta motilidad. (Palomino, 2016)

La fertilidad luego del descongelamiento en el semen de gallo es potencialmente bajo y no deseable debido a la baja movilidad y viabilidad y están relacionados a daños en la criopreservación, alterando su función mecánica, bioquímica y ultraestructural afectando negativamente la calidad espermática (Feyzi & Sharafi, 2018).

*Cuadro 2. El volumen de eyaculación en ml y la concentración espermática en el gallo (Feyzi & Sharafi, 2018).*

Volumen Eyaculado (ml)	Contenido en espermatozoides del semen (x 10 <sup>4</sup> /ml)	Duración de la fertilidad espermática en el tracto genital femenino	Especie
0.2-0.8	1-4	12	Gallo estirpe ligera
0.3-1.5	3-10	12	Gallo estirpe pesada

En todas las aves en general los espermatozoides tienen una forma alargada, la cabeza posee una longitud de 12 a 13  $\mu\text{m}$ , el acrosoma de 2  $\mu\text{m}$  de largo, donde se encuentran enzimas proteicas que son indispensables para la fertilización, en el cuerpo posee mitocondrias y el resto pertenece a la cola con una longitud de 100  $\mu\text{m}$  (Villaverde S. , 2017). El núcleo se encuentra en la cabeza espermática y los

cromosomas están altamente condensados durante la espermatogénesis. El espermatozoide se encuentra rodeado del citoplasma que está constituido por moléculas lipídicas, fosfolípidos y proteínas integrales. Los fosfolípidos de la membrana están organizados en forma bilaminar asimétrica, lo cual significa que la composición de lípidos y proteínas de las dos monocapas difieren una de la otra. (Palomino et al., 2016)

La calidad de motilidad espermática de semen descongelado se evalúa de manera subjetiva en un score de 0 a 5 utilizando el sistema de análisis computarizado de imagen (CASA Computer Aided Semen Analysis) acoplado a un microscopio y equipado con una platina térmica. Para el análisis mediante Sistema Casa se utilizarán muestras de semen diluidas en 1: 10 a 1: 40 (v / v), según se requiriera, en Lake-Ravie-84. Se registró los espermatozoides inmóviles, espermatozoides móviles no progresivos y espermatozoides móviles progresivos, así como las características espermáticas de velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad promedio de trayectoria (VAP). (Bernal et al., 2015)

La membrana espermática es una estructura heterogénea y dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, y permite al espermatozoide adapte su metabolismo al medioambiente, para la evaluación morfológica; la valoración de la integridad estructural se debe realizar una tinción eosina-nigrosina de semen fresco y descongelado, y para la valoración de funcionalidad de la membrana se utiliza el test HOST y ORT, tanto para semen fresco como congelado. (Rubio, Quintero, & Gonzalez, 2009)

## **2.6. LA CRIOPRESERVACIÓN**

Los procedimientos de criopreservación se orientan a tratar minimizar los daños celulares que se producen durante la congelación y descongelación celular (Cabrera & Fernandez, 2006). El semen congelado que se utiliza en la inseminación artificial es intervenido para interrumpir su actividad metabólica y alarga su vida útil, pero este puede verse afectado en términos de fertilidad, por lo que cuando se utiliza congelado, su fertilidad es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Rodríguez-Almeida, Ávila, Anchondo, & Sánchez-Ramirez, 2008).

## 2.7. FUNDAMENTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN

Preservar los gametos de animales genéticamente superiores es el fin principal de la criopreservación espermática, para ello es importante entender y aplicar adecuadamente los protocolos y técnicas de congelación (Buranaamnuay, 2017). Se debe también dominar el estudio de la morfología y las características físicas y químicas de los espermatozoides, debido a que podrían verse afectadas las diferentes variables como: permeabilidad celular, volumen osmótico, estado de la célula y especie a congelar (Dai et al., 2018), ya que al someterle a bajas temperaturas resultarían afectadas tanto en su difusión y osmosis a través de las paredes celulares; encontrar el protocolo apropiado nos podrá garantizar la viabilidad y funcionalidad celular (Avila-Portillo et al., 2006).

Para la evaluación macroscópica de los espermatozoides se deben tomar ciertas cuantificaciones como volumen, color, aspecto, densidad y pH, un examen microscópico complementario donde se evalúa la motilidad individual, concentración espermática, morfología espermática así como una comparación entre espermatozoides vivos y los muertos (Escobedo, 2016). Para obtener un rango aceptable de confiabilidad de los resultados obtenidos se deben por lo menos de tomar 3 muestras consecutivas y separadas de cada ave, y a pesar de eso no se garantiza al 100 por ciento la fertilidad (Love, 2016)

Para este propósito se han desarrollado múltiples diluyentes que han influido en la congelación exitosa de semen y la viabilidad espermática, siendo utilizado en diferentes protocolos como es el, I.N.I.A, LAKE 71, LAKE RAVE 84, siendo el más utilizado el diluyente LAKE RAVE 84, debido a que ha sido el que mejor se ha desempeñado en combinación con el glicerol como crioprotector en la criopreservación de semen de gallos de combate (Donoghue & Wishart, 2000). El glicerol fue descubierto como crioprotector en un estudio realizado por (Polge, Smit, & Parkes, 1949), desde ese momento se han desarrollado significativos avances en la criobiología espermática y ha permitido cambios trascendentales en la industria pecuaria, el semen congelado es usado mundialmente como una herramienta esencial en los programas de mejoramiento animal (Svoradová, Kuželová, Vašíček, Baláži, & Hanusová, 2018).

Cuando se compara la capacidad crioprotectores de diferentes compuestos en relación a su toxicidad hacia los espermatozoides de ave, se deben considerar ciertas variables como: porcentaje de concentración de crioprotector, temperatura en la que se realiza el equilibrio, tiempo de equilibrio, rapidez de congelación, técnica de congelación y proceso post descongelación, debido a que rara vez estos tratamientos se repiten en los estudios por lo que los resultados serán variables. (Donoghue & Wishart, 2000).

Las primeras especies en las que se empezó a criopreservar semen con relativo éxito fue en los pollos en 1949 usando glicerol como crioprotector, convirtiéndose luego en el principal y más utilizado para preservar el espermatozoides de todas las especies de ganado doméstico (Tarvis, 2013), sin embargo en el caso de las gallos se han observado efectos anticonceptivos si es inseminado vía intravaginal, debido a que los espermatozoides reducen su motilidad disminuyendo hasta casi ser insignificante su fertilización, excepto cuando la inseminación se hace por vía intrauterina (Donoghue & Wishart, 2000).

Químicamente se ha logrado diferenciar tres tipos de crioprotectores, los alcoholes, azúcares y el dimetilsulfóxido, y pueden clasificarse por su permeabilidad celular en agentes penetrantes y no penetrantes, con el objetivo de proteger y evitar afecciones celulares en sus membranas, como también reducir un efecto nocivo en su viabilidad en el momento de la fecundación post crioconservación (Lazo-Javalera, y otros, 2017)

## **2.8. AGENTES CRIOPROTECTORES**

### **2.8.1 CRIOPROTECTORES NO PERMEABLES**

Estos son agentes crioprotectantes que se caracterizan por tener un peso molecular alto, originando que la célula sufra una deshidratación acelerada cuando se le utiliza incorporados con otros agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, dextrosa, glucosa y polietilenglicol (Rivero, 2012).

### **2.8.2 CRIOPROTECTORES PERMEABLES**

A diferencia de los no permeables estos poseen bajo peso molecular, por lo que tienen la facultad de penetrar dentro de la célula, es decir penetra el agente

crioprotector y sale el agua logrando así deshidratarlo, impidiendo la formación de cristales de hielo en el interior de la célula y bloqueando también el estrés osmótico. Entre los más utilizados están: 1-2 propanodiol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y glicerol (Rivero, 2012) .

## **2.9 MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN**

Para la colección de semen de gallos se deben escoger aves que hayan sido previamente acondicionados al manejo físico para esta actividad, para asegurarnos de obtener muestras de calidad y libres de residuos fecales y uratos (Frediani, y otros, 2018), entre las técnicas utilizadas son la electro eyaculación y el masaje abdominal que puede ser realizadas con éxito en todas las especies de aves (Kucera, 2018)

### **2.9.1 MASAJE ABDOMINAL:**

Este es un método más utilizado y menos traumático, que consiste en sujetar firmemente al gallo mientras se va acariciando suavemente la espalda hasta llegar a la cola, con golpes suaves y rápidos; haciendo que se produzca una erección del pene del gallo, en ese momento el manipulador debe masajear y apretar suavemente la cloaca, a través de las papilas externas de los conductos deferentes hasta que se produzca una eyaculación y se recoja el semen en un envase (Donoghue & Wishart, 2000).

### **2.9.2 ELECTRO EYACULADOR:**

Previo a este método y debido a que resulta incómodo y doloroso para las aves, se debe realizar un protocolo anestésico a base de ketamina, xilazina y midazolam. La sonda eyaculadora del electro eyaculador debe tener una entrada de corriente de 110v y un transformador de 110v a 9v de 1 A que convierte la corriente continua en corriente alterna, elaborado en alambre de cobre para los electrodos, se colocaron tres electrodos: dos positivos y uno negativo. Para la estimulación de la cloaca se colocaron los electrodos en dirección dorsal aplicando pulsos de 2 segundos de duración y dejando descansar un segundo hasta lograr que los gallos eyaculen e inmediatamente evaluar volumen, apariencia, limpieza y motilidad (Álvarez-Gallardo, Urban-Duarte, Castellanos-Rodriguez, Padillas-Ramirez, & Velazquez-Roque, 2016)

## **CAPITULO 3**

### **3.1. METODOLOGÍA**

El estudio se realizó en la ciudad de Cuenca, en la Facultad de ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, que se encuentra ubicado en la panamericana norte km 1.5 a 2.560 m.s.n.m., donde se evaluó el efecto del glicerol como crioprotector de semen de aves de combate, para ello se realizaron cinco tratamientos con diferentes porcentajes de glicerol, un testigo y siete repeticiones, utilizando como diluyente la fórmula de Lake-Ravie-84.

### **3.2. MATERIALES Y MÉTODO**

#### **3.2.1 MATERIALES FÍSICOS**

- 1 Platina térmica
- 1 Microscopio
- 1 Contador manual de células
- 1 Baño maría
- 1 Cámara de Neubauer
- 200 Porta y cubre objetos
- 5 Gradillas
- 500 Tubos falcón
- 500 Tubos eppendorf
- 1 Nevera
- 100 Jeringas de insulina
- 1 Termo de nitrógeno
- 1 Pipetas de 10ug hasta 50ug
- 1 Pipetas de 100ug hasta 1000ug
- 500 Puntas para pipetas
- 300 Pajillas de envase
- 3 Pinzas
- 1 Tijeras
- 1 Overol
- 100 Guantes



- 100 Papel
- 1 Caja de polietileno de 31 cm; Ancho: 31 cm; y altura: 30,3 cm. profundidad
- 1 Libreta
- 2 Esfero
- 2 Marcadores
- 1 Computador
- 5 Jaulas
- 5 Comederos y bebederos para gallos
- 5 Maletas para transporte de gallos

### **3.2.2 MATERIALES QUÍMICOS**

- Diluyente lake ravie 84
- Glicerol
- Agua destilada
- Nitrógeno
- Alcohol polivinilico
- Fructosa
- Citrato de sodio
- Agua ultra purificada

### **3.2.3 MATERIALES BIOLÓGICO**

- Eyaculado de gallos
- Gallos de combate

## **3.3 TRATAMIENTOS**

Seis tratamientos, equivalente a diferentes concentraciones de glicerol (Gly) adicionados al diluyente Lake-Ravie (v/v), fueron conformados en esta investigación: 0 % (control), 2 % (Gly-2), 4 % (Gly-4), 6 % (Gly-6), 8 % (Gly-8) y 10% (Gly-10). Estos tratamientos fueron obtenidos conformados en siete sesiones de colecta y congelación de semen de gallo.

### 3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Esta investigación utilizó un diseño completamente al azar (DCA) que incluyó un total de 42 eyaculados de semen de seis gallos de combate recolectados en siete sesiones de colecta (7 eyaculados / gallo). Cada sesión de colecta fue realizada una vez por semana y en cada una se mezclaron los 6 eyaculados de cada gallo para conformar 1 agrupación de semen (pool) por sesión. Cada pool fue inicialmente pre-diluido (1:1) con el diluyente Lake-Ravie y luego dividido en 6 alícuotas para diluir finalmente con cada tratamiento: Gly-0, Gly-2, Gly-4, Gly-6, Gly-8 y Gly-10, respectivamente, a una concentración de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Las muestras espermáticas de cada tratamiento fueron cargadas en pajuelas de 0,25 mL, identificadas y congeladas en vapores de nitrógeno líquido estático. Se congelaron un total de 168 pajuelas: 4 pajuelas / tratamiento (6) / sesión (7). Las características cinéticas e integridad de la membrana plasmática (equivalente a viabilidad) fueron evaluadas usando el sistema CASA y la prueba de fluorescencia simple con yoduro de propidio (IP), respectivamente, en las muestras frescas recién recolectadas y congeladas descongeladas.

### 3.5 VARIABLES EXPERIMENTALES

#### 3.5.1 VARIABLES DEPENDIENTES

MT (%): motilidad total

MP (%): motilidad progresiva

VCL ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad curvilínea

VAP ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad promedio

VSL ( $\mu\text{m/s}$ ): velocidad rectilínea

STR (%): índice de rectitud

LIN (%): índice de linealidad

WOB (%): índice de oscilación

ALH ( $\mu\text{m}$ ): amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

BCF (Hz): frecuencia de batida de flagelo

IMP (%): integridad de la membrana plasmática (viabilidad)

### **3.5.2 VARIABLES INDEPENDIENTES**

Concentración de Glicerol (0, 2, 4, 6, 8, y 10%)

## **3.6 IDENTIFICACIÓN DE LAS AVES DONANTES**

Se escogieron 6 gallos de combate que tenían entre 8 y 10 meses de edad, que fueron previamente adiestrados para la extracción del semen, su adiestramiento se lo realizó durante un mes aproximadamente, estos gallos fueron escogidos observando su condición corporal, física y de salud que parecían aparentemente normal, así como sus órganos sexuales y accesorios. También fueron aclimatados a su nuevo ambiente ya que las aves provenían de una zona subtropical a 1200 msnm con una temperatura aproximada de 27°C, dicha climatización se hizo con el objetivo de evitar cualquier deterioro de la salud que influiría negativamente en la producción y concentración espermática.

### 3.7 GALLOS ESCOGIDOS SEGÚN SU CONDICIÓN FÍSICA Y MORFOLÓGICA PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN

*Fig 1. Gallo1*



*Fig 2. Gallo 2*





*Fig 3. Gallo 3*



*Fig 4. Gallo 4*





*Fig 5. Gallo 5*



*Fig 6. Gallo 6*



### **3.8 PREPARACIÓN DE LOS DONANTES**

Previo a cualquier ensayo de colección de semen de gallos, estos debían estar en ayunas de alimentos sólidos al menos 24 horas y 12 horas de agua, debido a que, al no estar vaciados por completo al momento del ordeño en la estimulación de la cloaca, los gallos pudieran evacuar heces y orina, contaminando las muestras de semen con dichas heces y uratos, para ello primero se limpió y desinfectó la zona con antibiótico, utilizando algodón y frotando suavemente alrededor de la cloaca se logró quitar cualquier rastro de impurezas que podrían haber contaminado la muestra, así también realizamos la depilación de toda la zona cloacal y abdominal.

### **3.9 COLECTA DE MUESTRA**

El semen fue colectado por el método de masaje abdominal, para esto se sujetó al gallo de manera que se mueva lo menos posible mientras se va acariciando de forma suave y con golpes tenues en la espalada hasta llegar a la cola, haciendo que se produzca una erección del pene del gallo, en ese momento se masajeo y apretó suavemente la cloaca, a través de las papilas externas de los conductos deferentes hasta que se produzca una eyaculación, y se recoja el semen con una jeringa de insulina y luego se colocó en un tubo eppendorf sin que sea expuesta de forma directa a la luz del sol, posterior a la obtención del semen de los 6 gallos se hace un pool hasta llegar a una cantidad de 600 uL y es diluido a una concentración 1:1 con el diluyente Lake-Ravie 84 para luego ser incubado a 5° C durante 30 minutos hasta transportar al laboratorio. Cabe recordar que cada gallo eyacula alrededor de 100 uL por cada eyaculada dando en total 600 uL de muestras de semen de los 6 gallos, aproximadamente.

### **3.10 DESCONGELACIÓN DE DILUYENTE**

Debemos tener en consideración también que previo a la colecta de semen se mantuvo un estricto protocolo de descongelamiento del diluyente lake-ravie-84, el mismo que estaba congelado en un tubo Falcon a una temperatura de menos 20°C y al momento que se lo utilizó, lo calentamos en baño maría a 37°C durante 10 minutos o hasta que se descongele por completo, para luego mantenerlo a temperatura ambiente.

### **3.11 ANÁLISIS MACROSCÓPICO**

El semen fue analizado en torno a su volumen, color y consistencia.

### **3.12 ANÁLISIS MICROSCÓPICO**

En el laboratorio se analiza la motilidad, score, integridad de membranas y concentración espermática, para ello se toman 10 ul de la concentración 1:1 del semen más diluyente lake-ravie-84 y se coloca en un portaobjetos que debe estar en una platina térmica que debe estar calentada a 37°C y posteriormente se procede a observar las variables antes mencionadas con un microscopio de campo claro y a 40 X de magnificación.

### **3.13 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA**

Luego de la obtención de las muestras de semen de los 6 gallos que en total se recogieron 600ul y a los que se le añadió 600ul de diluyente lake-ravie-84 para obtener una concentración de 1:1 dando un total de 1200ul, de los cuales y con la utilización de una pipeta de 5ul a 50ul se recogieron 5ul y los contaminamos con 1000ul de agua más alcohol para producir la muerte voluntaria de los espermatozoides, y así obtener una dilución 1:200, se debe agitar fuertemente para que la mezcla sea homogénea, luego se toma 10ul de esa mezcla con una pipeta y la colocamos en la cámara de Neubauer, en donde procedemos a contar los espermatozoides con la ayuda de un microscopio y el contador manual de células, para ellos debemos contar 5 cuadros en total, los cuatro de los extremos y uno del medio, siempre contando de izquierda a derecha en zigzag hasta llegar a la parte inferior de cada cuadro.



Tabla 1. concentración de los 7 pools de los 6 gallos

Numero de pools	de	Concentración millones por ml
1		5600
2		4080
3		4560
4		6060
5		3400
6		4180
7		4300

### 3.14 IDENTIFICACIÓN DE PAJUELAS

Para la identificación de cada lote de pajuelas se registró el número de pool con la concentración de glicerol y la fecha que se realizó la congelación.

### 3.15 CÁLCULO DE DILUCIÓN DE LA MUESTRA

La dilución se hizo en dos fracciones diferentes: fracción 1 y fracción 2.

Fracción 1 (sin gly): Para encontrar la dilución ideal para la fracción 1, en nuestro estudio se hizo calculando: {concentración inicial (CI) por el volumen inicial (VI) = concentración final (CF) por volumen final (VF)}.

$$CI \times VI = CF \times VF$$

$$\text{Despejando } VI = CF \times VF / CI$$

CI: concentración espermática

VI: ?

CF: concentración deseada

VF: 1 ml

Luego del cálculo y de haber realizado la dilución de la fracción 1 que en total deben dar un volumen de 1000ul, se debe llevar las muestras a refrigeración (5°C) durante 30 minutos.

Fracción 2: Con doble glicerol (según sea el tratamiento) hasta llegar al volumen final de 1000ul, como se observa en el siguiente cuadro.

*Tabla 2. Combinación diluyente más glicerol*

Diluyente Lake-Ravie-84	glicerol
960ul	40ul
920ul	80ul
880ul	120ul
840ul	160ul
800ul	200ul
1000ul	Sin glicerol

### **3.16 MÉTODO DE CRIOPRESERVACIÓN**

Se mezcló la fracción 1 con la fracción 2, hasta llegar a los 2000ul, con cada uno de los porcentajes de glicerol de la fracción 1 (0, 2, 4, 6, 8, 10%) y la concentración espermática de la fracción 2, luego de realizada esta mezcla se dejó reposar a 5°C durante 10 minutos.

Después de 10 minutos de haber equilibrado las muestras, procedimos a cargar las pajuelas en pajillas de 0,25 ml, absorbiendo con la boca de un extremo de la pajilla directo desde el tubo eppendorf donde se almacenan las muestras hasta llenar totalmente la pajilla mencionada, este procedimiento se realizó de forma que sea lo más rápida posible (las pajuelas también tienen que estar frías), luego procedemos a sellar con alcohol de polivinilo y lo ponemos a congelar.

### **3.17 CONGELACIÓN DE SEMEN DE GALLO**

La congelación se hicieron en dos pasos:

Paso 1: de 5°C a -35°C a 7°C/ minuto

Paso 2: de -35°C a -140°C a 60°C/minuto

Esto se logró utilizando una caja de polietileno, donde se ubicó 1 repisa con 2 rampas, la primera a 17 cm del nivel de la superficie del NL<sub>2</sub> durante 4 minutos; y luego se bajó a la segunda rampa que está a 1 cm de la superficie de NL<sub>2</sub> durante 1 minuto; y finalmente se sumergió en NL<sub>2</sub>.

### **3.18 DESCONGELACIÓN DE SEMEN DE GALLO**

Para la descongelación de las pajuelas, tomamos lotes de 5 pajillas y se sumergieron en agua enfriada a 5°C y durante 3 minutos hasta que se descongelaron totalmente.

Luego todas las muestras fueron analizadas por el sistema CASA, arrojando los resultados concluyentes de la investigación.

### **3.19 PRUEBA DE INTEGRIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA**

El procedimiento para realizar la técnica de HOST consistió en hacer una solución de 0.1mg de fructosa, 0,05mg de citrato de sodio y lo mezclamos con 10 ml de agua bidestilada de peso osmolar 55 mOsm/l (miliosmoles/litro), posterior se tomó 100ul de esta mezcla (HOST) y combinamos 20ul de semen que fue previamente descongelado en agua enfriada a 5°C durante 3 minutos y almacenamos durante 45 minutos en un baño maría a 37°C, seguido a este procedimiento extrajimos 10ul y lo colocamos en un portaobjetos para observar en el microscopio la funcionalidad de la membrana espermática en cuatro campos diferentes, hasta completar 100 o más espermatozoides, esta técnica se realizó con cada una de las concentraciones de glicerol. El test de la resistencia hiposmótica–HOST nos ayuda a determinar la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide, además de predecir la viabilidad del mismo, con la cual podemos observar que aquellos

espermatozoides con membrana plasmática íntegra y que se encontraban con vida, presentan una deformación que da un aspecto enrollado de la cola del espermatozoide.

### **3.20 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en excel, y posteriormente analizados estadísticamente en un software STATISTICA versión 11.0. Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro-Wilk para determinar la distribución normal. Los datos porcentuales y numéricos que no presentaron una distribución normal ( $P < 0,05$ ), fueron transformados al Arcoseno y Log-10 respectivamente, antes de los análisis estadísticos. Un ANOVA de una vía bajo un modelo lineal general (GLM) y la prueba PosHoc de Tukey fueron usados para determinar el efecto de las concentraciones crecientes de glicerol (0 al 10%). Además, el valor del semen fresco fue incluido en la comparación múltiple para evidenciar el efecto significativo de la criopreservación en los distintos parámetros cinéticos.

## **CAPITULO 4.**

### **4.1 RESULTADOS**

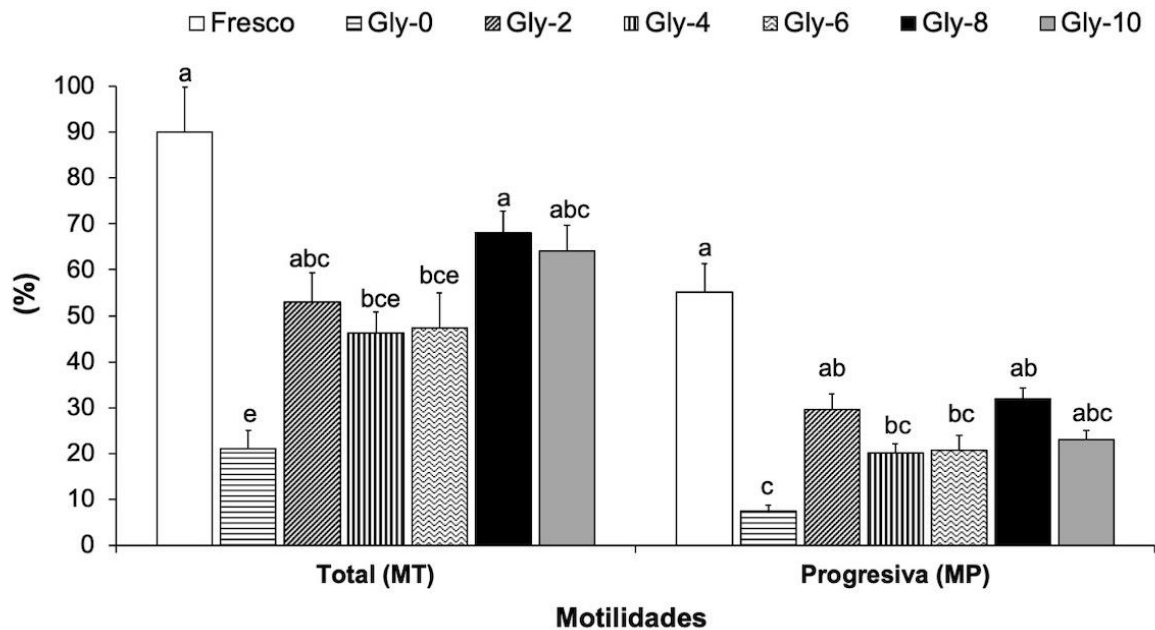
Los valores promedios  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de los diferentes parámetros cinéticos evaluados en el sistema CASA se muestran en la Tabla 1. Las diferencias significativas y comparación múltiple de las motilidades (MT y MP), velocidades (VCL, VAP y VSL), parámetros de relación (STR, LIN y WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) se muestran en la figuras 1 a 4.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de espermatozoides de gallo de combate frescos y criopreservados usando el diluyente Lake-Ravie y la adición de concentraciones crecientes de glicerol (v/v).

Parámetros	Pre-congelación		Post-descongelación				
	Fresco	Control (Gly-0)	Tratamientos con Glicerol (v/v)				
			(Gly-2) 2%	(Gly-4) 4%	(Gly-6) 6%	(Gly-8) 8%	(Gly-10) 10%
MT (%)***	90,0 ± 15,97a	21,1 ± 6,81e	53,1 ± 4,82abc	46,2 ± 4,32bce	47,3 ± 5,32bce	68,1 ± 4,61a	64,0 ± 5,05abc
MP (%)**	55,3 ± 10,72a	7,4 ± 4,57 c	29,5 ± 3,23ab	20,1 ± 3,23bc	20,7 ± 3,57bc	32,0 ± 3,10ab	23,0 ± 3,39abc
VCL (µm/s)NS	75,0 ± 11,36	58,4 ± 4,84	62,3 ± 3,43	57,0 ± 3,43	57,7 ± 3,79	63,3 ± 3,28	52,3 ± 3,59
VAP (µm/s)NS	61,3 ± 10,93	40,7 ± 4,66	50,8 ± 3,30	45,5 ± 3,30	48,2 ± 3,64	51,0 ± 3,16	40,2 ± 3,46
VSL (µm/s)NS	53,2 ± 10,14	35,2 ± 4,33	43,4 ± 3,06	39,0 ± 3,06	42,3 ± 3,38	44,8 ± 2,93	33,9 ± 3,21
STR (%)**	80,7 ± 6,36ab	71,3 ± 2,71b	78,1 ± 1,92a	76,2 ± 1,92ab	77,0 ± 2,12a	76,1 ± 1,84ab	73,3 ± 2,01ab
LIN (%)	64,6 ± 6,68	54,9 ± 2,85	60,6 ± 2,01	59,2 ± 2,01	61,5 ± 2,23	61,7 ± 1,93	58,3 ± 2,11
WOB (%)*	77,4 ± 4,83ab	67,2 ± 2,06b	73,8 ± 1,45ab	73,5 ± 1,45ab	74,9 ± 1,61a	74,9 ± 1,39a	73,0 ± 1,53a
ALH (µm)	2,3 ± 0,29	2,3 ± 0,12	2,1 ± 0,09	1,9 ± 0,09	1,9 ± 0,10	2,1 ± 0,08	2,0 ± 0,09
BCF (Hz)*	7,8 ± 4,31ab	5,4 ± 1,84b	6,9 ± 1,30ab	6,5 ± 1,30ab	6,7 ± 1,44a	7,1 ± 1,24a	9,9 ± 1,36a

MT, motilidad total; MP, motilidad progresiva; VCL, velocidad con trayectoria curvilínea; VAP velocidad promedio; VSL, velocidad con trayectoria rectilínea; STR, índice de rectitud; LIN, índice de linealidad; WOB, índice de oscilación; ALH, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; y BCF, frecuencia de batida de flagelo. Asteriscos (\* P<0,05; \*\* P<0,001; \*\*\* P<0,0001) y letras diferentes (a-b P < 0,05; a-c P < 0,01; a-e P < 0,001; ab-c P < 0,05) en cada fila y en cada parámetro difieren estadísticamente

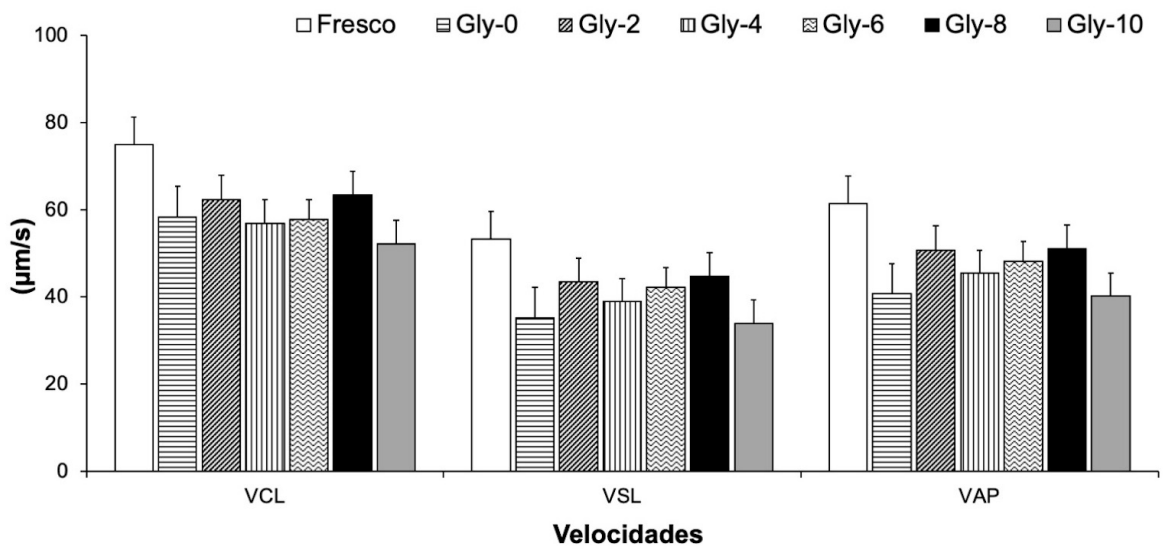
En general, una reducción ( $P < 0,001$ ) significativa de los porcentajes de motilidad total (MT) y progresiva (MP) fueron evidenciados después de la descongelación en las muestras espermáticas congeladas sin glicerol (control) y con el 4% (Gly-4) y 6% (Gly-6). Asimismo, las muestras espermáticas congeladas con el 8% de glicerol (Gly-8) mostró porcentajes más altos de MT que aquellas muestras congeladas sin glicerol (control,  $P < 0,001$ ), y con 4 y 6 % de glicerol ( $P > 0,05$ ). Con la misma tendencia, el porcentaje de MP fue superior ( $P < 0,05$ ) después de congelar las muestras espermáticas con el 2% (Gly-2) y 8% (Gly-8) de glicerol en comparación con las muestras congeladas sin glicerol (control) (Fig. 1)



**Figura 1.** Porcentajes de motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides de gallo de combate frescos diluidos y congelados con concentraciones crecientes de glicerol (0 a 10%, v/v) adicionado al diluyente Lake-Ravie. a – e Letras diferentes en cada motilidad muestra diferencias significativas, a-bc  $P < 0,05$ ; ab-c  $P < 0,05$ ; a-e  $P < 0,001$ .

Con respecto a las velocidades, no se evidenciaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) ente el semen fresco y las diferentes concentraciones de glicerol. Esto quiere decir, que las velocidades con trayectoria curvilínea (VCL), rectilínea (VSL) y promedio (VAP), no fue afectada por los efectos de la criopreservación y mantuvieron sus valores después de la descongelación. Por lo tanto, esto constituye un factor muy importante al momento de la fertilización de ovocitos dentro del oviducto de la gallina (Fig. 2).

Fig 7. Valores de velocidades espermáticas

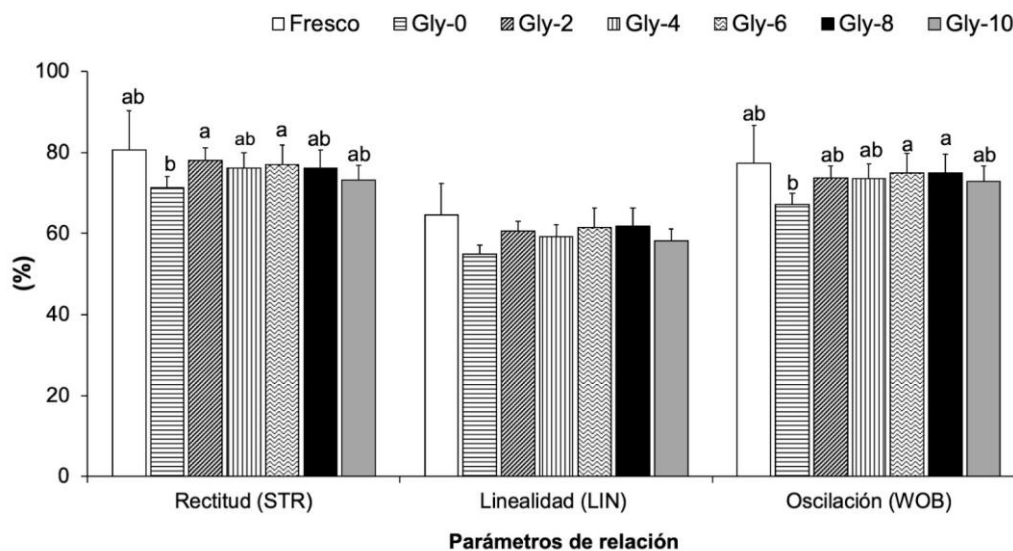


**Figura 2.** Valores de velocidades curvilínea, rectilínea y promedio de espermatozoides de gallo de combate frescos diluidos y congelados con concentraciones crecientes de glicerol (0 a 10%, v/v) adicionado al diluyente Lake-Ravie.

Los parámetros de relación, que son obtenidos automáticamente por el sistema CASA luego del análisis de las tres velocidades, mostraron diferencias significativas en la rectitud (STR) y Oscilación (WOB). Los espermatozoides congelados con el 2% (Gly-2) y 6% (Gly-6) mostraron porcentajes significativamente más altos ( $P < 0,05$ ) de rectitud (STR) aquellos espermatozoides congelados sin glicerol (control). Con el mismo efecto, las muestras congeladas con el 6% (Gly-6) y 8% (Gly-8) de glicerol mostraron valores superiores ( $P < 0,05$ ) de tambaleo (WOB) en comparación con el grupo control (Fig. 3)



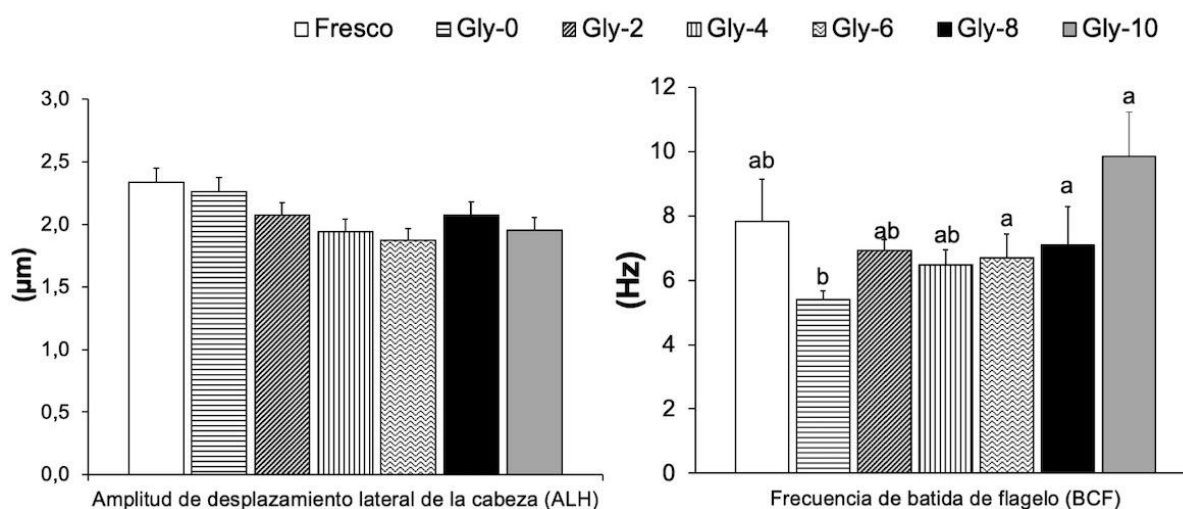
Fig 8. Porcentajes de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB)



**Figura 3.** Porcentajes de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de gallo de combate frescos diluidos y congelados con concentraciones crecientes de glicerol (0 a 10%, v/v) adicionado al diluyente Lake-Ravie. a - b Letras diferentes en cada motilidad muestra diferencias significativas, a-b  $P < 0,05$ .

Finalmente, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza no se vio afectada ( $P < 0,05$ ) por el proceso de la criopreservación en ningunos de los tratamientos que incluyeron glicerol, incluso el control. Este resultado sugiere que los espermatozoides congelados y descongelados con diferentes dosis de glicerol tienen la misma amplitud para desplazarse por un campo microscópico y seguir una trayectoria progresiva que los espermatozoides de los eyaculados frescos y diluidos con Lake-Ravie. Además, las muestras espermáticas congeladas con concentraciones entre 6 y 10% de glicerol (Gly-6, Gly-8 y Gly-10) mostraron valores una frecuencia de batida de flagelo significativamente superior ( $P < 0,05$ ) que aquellas muestras congeladas sin glicerol (control) (Fig. 4)

Fig 9. Valores de amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF)

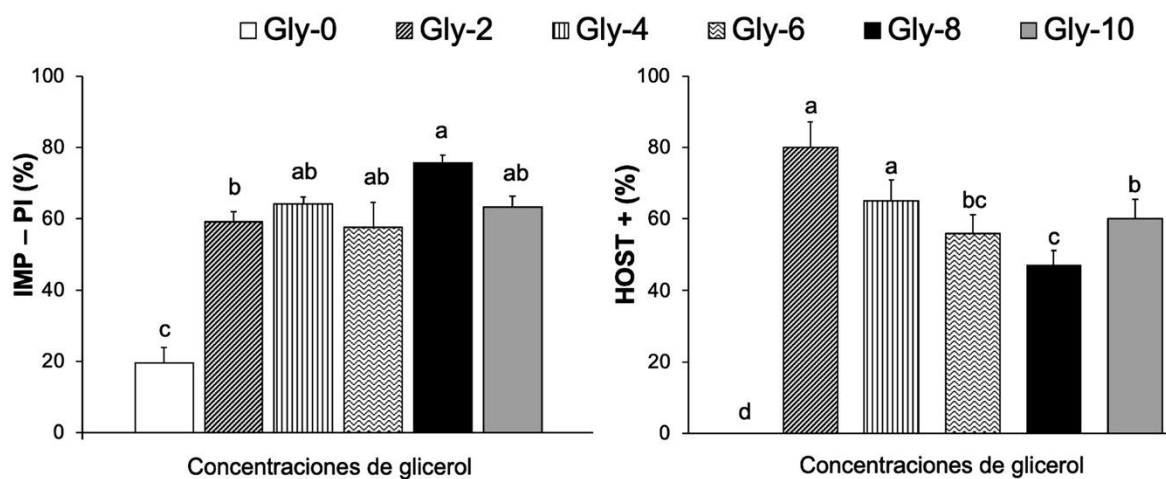


**Figura 4.** Valores de amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de gallo de combate frescos-diluidos y congelados con concentraciones crecientes de glicerol (0 a 10%, v/v) adicionado al diluyente Lake-Ravie. a - b Letras diferentes en cada motilidad muestra diferencias significativas, a-b  $P < 0,05$ .

## 4.2 INTEGRIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El efecto crioprotector del glicerol se evidenció en todas las concentraciones al mostrar porcentajes de integridad de la membrana plasmática (equivalente a viabilidad) más altos en comparación con el grupo control (sin glicerol). Las muestras espermáticas criopreservadas con el 8% de glicerol (Gly-8) mostró ser más efectivo en la criopreservación de espermatozoides de gallos de combate al producir un mayor ( $P < 0,05$ ) porcentaje de integridad de la membrana plasmática comparado con las muestras criopreservadas sin glicerol y con el control al 2% (Gly-2) (Figura 5).

Por otro lado, la funcionalidad de la membrana plasmática medida por la prueba de HOST (+) demostró que el los tratamientos con dosis bajas de glicerol (Gly-2 y Gly-4) produjeron mayores ( $P < 0,05$ ) resultados que el resto de tratamientos incluyendo el control. Resultados controversiales a la IMP, el grupo Gly-8 produjo menores ( $P < 0,05$ ) porcentajes de HOST+ comparado con los otros tratamientos de glicerol (Figura 5).



**Figura 5.** Integridad (IMP, %) y funcionalidad (HOST+) de la membrana plasmática de espermatozoides de gallo de combate criopreservados con concentraciones crecientes de glicerol (0 a 10%, v/v) adicionado al diluyente Lake-Ravie. a - d Letras diferentes en cada motilidad muestra diferencias significativas, a - b - c - d,  $P < 0,05$ ; a - c,  $P < 0,01$ ; a - d,  $P < 0,001$ .

## CAPITULO 5

### 5.1. DISCUSIÓN

Los presentes resultados muestran que, en comparación con los espermatozoides frescos, los espermatozoides congelados y descongelados con dosis altas de glicerol, 8 % (Gly-8) y 10% (Gly-10) no sufrieron reducciones de calidad en términos de motilidad y cinética espermática. De hecho, la adición del 8% de glicerol (v/v) al diluyente Lake-Ravie y congelado en pajuelas de 0,25 ml sometidas a vapores de Nitrógeno Líquido (NL<sub>2</sub>) estático con dos rampas de congelamiento, produjo mejores resultados de criosupervivencia celular basado en una mejor cinética (ej. MT y MP) e integridad de la membrana plasmática (ej. viabilidad), independientemente de la funcionalidad de la membrana plasmática (HOST). A diferencia de estos resultados, (Abouelezz et al., 2015); (Hammerstedt & Graham, 1992); (Bleisboys & Brillard, 2007); (Mphaphathi et al., 2012) usaron concentraciones altas de glicerol (ej. 8 % a 11%, v/v) de glicerol, la viabilidad y motilidad sufrieron una reducción significativa de sus valores (aproximadamente, se redujeron un 40 a 50% de sus valores iniciales), dicho resultado se explicaría principalmente debido a que la variedad de aves utilizadas fue diferente a la de nuestra investigación y muy importante también considerar que las condiciones tanto ambientales como alimenticias donde se encuentran nuestras aves es diferente, pudiendo interferir de manera directa en los resultados de las investigaciones entre sí.

Cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación (Watson, 1995). Estos efectos deletéreos provocan daños irreversibles en la estructura de los espermatozoides de aves (ej. gallo) que incluyen, principalmente, daños a nivel de la membrana plasmática (ej. rotura de la membrana, desnaturalización y desplazamiento de las proteínas de membrana), membrana mitocondrial y acrosoma (reacción acrosómica) (Blesbois, 2007). Una respuesta a estos efectos se basa en el incremento del estrés oxidativo debido a una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) por ello los espermatozoides de gallos se hacen vulnerables al ataque de radicales libres (ej. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y OH<sup>-</sup>) debido a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentes en la membrana plasmática (Fujihara & Howarth, 1978); (Parks & Lynch, 1992); (Aitken, 1995); (Partyka, Lukaszewicz, & Nizanski, 2012). En

consecuencia, los ROS se combinan fácilmente con los PUFA, lo que conduce a la producción de una peroxidación lipídica (LPO) (Surai et al., 1998); (Ansari et al., 2019). Finalmente esto provoca una disminución de la motilidad, viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides de gallo (Blesbois, 2007) lo que produce en una fertilidad reducida en su aplicación en campo después de una Inseminación Artificial.

La mayoría de estos efectos perjudiciales pueden ser evitados si se adiciona los Agentes Crioprotectores (A.C.P.) en óptima concentración a los medios de congelación. El glicerol es un ACP penetrante que ayuda específicamente al espermatozoide de gallo a controlar la formación de cristales de hielo intracelular (letales) y las velocidades de movimiento del agua a través de las membranas plasmática durante el congelamiento y el descongelamiento (Levin & Miller, 1981); (Woelders et al., 2006). Además, el glicerol ayuda a mantener el contenido de ATP celular y la retención de las macromoléculas superficiales esenciales para evitar el daño y degeneración estructural (Hammerstedt & Graham, 1992). En cuanto al semen de gallo, el glicerol es el crioprotector más utilizado (Blesbois, 2007): (Santiago-Moreno et al., 2011), en concentraciones que siempre superan el 8% (v/v). De hecho, los protocolos actuales utilizan una concentración de glicerol del 11% como se ha sido previamente demostrado por (Blesbois et al., 2008); (Long, et al., 2010); (Moce, et al., 2010) y (Purdy et al., 2009). Algunos autores observaron que los resultados mejoraron en una raza de gallos en peligro de extinción cuando la concentración de glicerol se redujo al 8% y eliminando el glicerol al momento de la I.A. (Blanch, et al., 2012). Otros autores reportaron que los espermatozoides de gallos de la raza "Gallina Valenciana de Chulilla" mostraron valores altos para los parámetros de calidad (cinéticos e integridad de membranas espermáticas) cuando fueron criopreservados con el 11% de glicerol (v/v) (Blanch, et al., 2012) (Tomás et al., 2013); (Blanch, et al., 2012) pero su capacidad fertilizante muy baja (<5%). No obstante, se ha demostrado que si la concentración de glicerol se reduce al 8% (Lake, Ravie, & McAdam, 1981) la capacidad fertilizante aumenta (Tomás et al., 2013).

Los resultados de la presente investigación son consistentes a estos resultados demostrando que las concentraciones altas de glicerol al 8 % (Gly-8) y 10 % (Gly10) produjeron una mejor cinética como la MT y ALH (batida del flagelo) que dosis más bajas o sin glicerol (control). De hecho, con el 8 % de glicerol se obtuvo una mejor crio

supervivencia celular basada en una mayor integridad de la membrana plasmática comparado con los otros grupos de menor concentración.

Por otro lado, los factores “raza” e individuo (macho) pueden influir para que las respuestas a la criopreservación no sean las mismas que en razas ya definidas (Blesbois, et al., 2007). Nosotros especulamos que esto podría ser el caso de los gallos de combate debido a varias características que le hacen una raza no definida, como previamente ya se ha demostrado en otras razas de gallos con respecto a la calidad del semen, respuesta a la congelación - descongelación de espermatozoides y la capacidad fecundante (Long, 2006). Además, otros autores consideran que las concentraciones más bajas de glicerol (<8%) mejoran la calidad y la capacidad de fertilización del esperma criopreservado de gallo (Blanch, et al., 2014). Hasta donde se sabe, un reporte realizado por (Phillips, et al., 1996) usó concentraciones bajas de glicerol 3 y 4 % para congelar semen de gallo (con la adición de metilcelulosa) y obtuvieron una tasa de fecundación muy baja. Un estudio previo realizado por Blanc et al. (2014) usaron concentraciones de 4, 6, 7 y 8% de glicerol adicionados al diluyente Lake-Ravie para la preservación de la raza “Gallina Valenciana de Chulilla” y los resultados sugieren que una concentración del 4% de glicerol produce una calidad más baja, independientemente de la fertilidad. Otros estudio sugiere que la adición del glicerol en bajas concentraciones es capaz de sintetizar y metabolizar el glicerol para convertirlo en una fuente de energía extra de espermatozoides (Mohri & Masaki, 1976).

En base a esta evidencia, en el presente estudio se podría especular que las muestras congeladas con glicerol al 2% pudieron mejorar las características cinéticas. Los resultados sugieren que la adición de glicerol al 2 % al diluyente Lake-Ravie produjo resultados deseables (no tan distantes de las concentraciones altas: 8 y 10% de glicerol) en la criopreservación. De hecho, Gly-2 presentó las mismas motilidades, velocidades, y parámetros de relación – progresividad que las dosis altas, incluso con una ventaja en los porcentajes de Índice de rectitud (STR) comparado con el grupo control (lo que no fue evidenciado en los grupos Gly-8 y Gly-10). Desafortunadamente, el efecto crioprotector del glicerol al 2% no fue suficiente para proteger la integridad de la membrana plasmática durante el proceso de congelación y descongelación causando más degeneración y muerte celular en comparación con dosis al 8%.

Finalmente, estos resultados aportan con una información inicial importante para la criopreservación de espermatozoide de gallos de combate dado que su factor raza y sus condiciones de manejo (alta competencia y temperamento) pueden constituirse como un hándicap al momento de emprender programas de cruzamiento y mejora genética de esta raza de gallos usando material criopreservado.

## 5.2 CONCLUSIONES

Esta investigación concluye que la criopreservación de espermatozoides de gallo de combate recogido mediante la técnica de masaje dorsal, diluido con Lake-Ravie suplementado con el 8% de glicerol (v/v), congelado en pajuelas de 0,25 ml usando dos rampas de congelamiento en vapores de nitrógeno líquido estático y descongelando las muestras a 4°C, produjo mejores resultados de criosupervivencia celular basado en una mejor cinética e integridad de la membrana plasmática (viabilidad).

El diluyente lake-ravie-84 utilizado en la investigación en combinación con las dosis más altas de glicerol, fueron las mezclas con los mejores resultados a la hora de criopreservar el semen de gallo, ya que los parámetros obtenidos mostraron que se mantuvieron las cualidades de todas las variables analizadas.

El glicerol a pesar de lo tóxico que puede ser para los espermatozoides al momento de la inseminación artificial, y su recomendación de extraerlo al momento de la descongelación para realizar el análisis en el sistema CASA, en esta investigación se pudo percibir que en combinación con el diluyente lake-ravie-84, su fusión fue tan eficiente, que no es necesario dicha extracción, debido a que se mantienen todos los parámetros y variables sin ninguna alteración observable.

## 5.3 RECOMENDACIONES

En el momento de la extracción del semen es necesario depilar, limpiar y desinfectar alrededor de la zona cloacal y abdominal para evitar la contaminación de las muestras con heces y uratos, sin embargo estos procesos no son los únicos ni los más importantes, debemos también desparasitar las aves por lo menos dos semanas antes de realizarla práctica de extracción de semen, y así evitamos que en las muestras se contaminen con heces y uratos que están muchas veces infestados de parásitos o sus huevos.



Los resultados obtenidos en otras investigaciones en cuanto a motilidad y rectilinidad utilizando otros diluyentes y otros crioprotectores en concentraciones similares a nuestra investigación, arrojaron resultados parecidos, siendo importante probar utilizando nuevas concentraciones tanto de diluyente como de crioprotector.

Para estas investigaciones es mejor elegir gallos que durante el adiestramiento sean capaces de eyacular como mínimo de 100ul, ya que los volúmenes menores a esa cantidad dificultan el cálculo de las diluciones, haciendo necesario más extracciones a más gallos.

Es necesario aclimatar a los gallos a las condiciones a las cuales se va a realizar el experimento por lo menos con un mes de anticipación ya que los cambios bruscos de temperatura pueden afectar tanto la cantidad como en calidad espermática o incluso producir enfermedades que afecten físicamente a las aves.

A pesar de los resultados satisfactorios que se obtuvieron, creo importante probar nuevos diluyentes en combinación con el crio protector a base de glicerol, o lo inverso, nuevos crio protectores con el diluyente lake-ravie-84, esto debido a la dificultad que existe para conseguir estos reactivos dentro de nuestro país.

Ciertamente los congeladores artesanales de semen hechos de poliestireno son efectivos para este propósito, pero tienen la particularidad que evaporan el nitrógeno líquido con mucha rapidez, haciendo que el presupuesto para esta operación se eleve considerablemente, por lo que creo que se deben probar con otro tipo de congeladores y evitar desperdicio de nitrógeno y a su vez de dinero.

Para este tipo de investigaciones se sugiere emplear gallos lo más jóvenes posible, para tener la certeza que lograremos colectar los volúmenes y concentraciones de semen que haga viable la investigación, debido a que se ha demostrado que las aves mientras mayor edad tienen va disminuyendo la concentración espermática y el volumen eyaculado.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abouelezz, F. M., & Toledano-Díaz. (2015). Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawt chicken sperm variables. *Reproduction in domestic animals*, 50(1), 135-141.
- Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction fertility and development*, 7(4), 695-668.
- Alm-Kristiansen, A., Sanderholen, F., Bai, G., & Waterhouse, E. &. (2018). Relationship between post-thaw adenosine triphosphate content, motility and viability in cryopreserved bovine semen applying two different preservation methods. *Reproduction in domestic animals*, 58(6), 1448-1455. doi:10.1111 / rda.13285
- Alvarez, A., Perez, H., De la Cruz, T., & Quincosa, J. (2009). *Fisiología animal aplicada*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Álvarez-Gallardo, H., Urban-Duarte, D., Castellanos-Rodríguez, J., Padillas-Ramirez, F., & Velazquez-Roque, A. &-S. (2016). La electroeyaculación en aves uan alternativa para la conservación ex-situ in vitro. *Revista mexicana de agrosistemas*, 3(2), 126-128.
- Ansari, M. S.-M. (2019). Effect of cryopreservation on lipid peroxidation, antioxidant potential, chromatin integrity and mitochondrial activity of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Biopreservation and biobanking*, 17(4), 288-295.
- Avila-Portillo, L., Madero, J., Lopez, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Lozano, J. &. (2006). Fundamentos de la criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300.
- Baixin, W., Xiaohu, Y., & Haifeng, Y. (2019). Improving the quality of rooster semen frozen in straws by screening the glycerol concentration and freezing rate. *British Poultry Science*, 61(2), 7-12. doi:doi:10.1080/00071668.2019.1686126
- Barragan, J. A. (2005). *Criopreservación y evaluación fisiológicas y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves*. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Bernal, V., Castaño, C., Estes, M., Toledano-Díaz, A., Dominguez-González, M., Gil, M., Campo, J. & Santiago-Moreno, J. (2015). Criopreservación de semen de pardo e indio de león en su área de origen del valle del Curueño. *Departamento de mejora genética*, 1(1), 1-7.
- Blanch, E. T. (2014). Development of methods for cryopreservation of rooster sperm from the endangered breed using low glycerol concentration. *Theoricoenology*, 81(9), 1174-1180.
- Blanch, E., Tomas, C., Casares, L., Gomez, E., Sansano, S., & Gimenez, I. (2012). Effect of glycerol level on quality and fertilizing ability of cryopreserved rooster sperm . *Reprod Domest Anim*, 47-121.
- Bleisboys, & Brillard. (2007). Especific features of invivo and invitro sperm storage in birds. *Animal*, 1, 1472-1481.
- Blesbois, E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63(2), 213-222.

- Blesbois, E. (2008). Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*, 69(61), 252.
- Blesbois, E., Seigneurin, F., Grasseau, L., Limouzin, C., Besnard, J., & Gourichon, D. (2007). Semen cryopreservation for ex-situ management of genetic diversity in chicken. *Poult Sci*, 87(64), 555.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Revista iberoamericana de fertilidad*, 18(4), 20-22.
- Buranaamnuay, K. (2017). Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A review. *Elsevier*, 183, 56-65. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.06.002
- Bustos, E., & Torres, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1266-1270. doi:http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000400004
- Cabrera, P., & Fernandez, A. (2006). Criopreservación De Embriones: Una Herramienta Básica en la Reproducción Asistida. *Revista de la facultad de ciencias veterinarias*, 47(2), 59-70.
- Caratachea, J. S. (2018). EFFECT OF THE AGE ON SEMEN QUALITY OF RHODE ISLAND RED ROOSTERS. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal*, 11, 11-18.
- Chan, J., & Morgan, P. (2020). Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment. 11(1).
- Dai, C., Zhang, Z., Huang, J., Wang, X., Ru, C., Pu, H., Xie, S., Zhang, J., Moskovtsev, S., Librach, C., Jarvi, K. & Sun, Y. (2018). Automated noni-invasive measurement of single sperm's motility and morphology. *IEEE Transactions on medical imaging*, 37(10), 2257-2265. doi:10.1109/TMI.2018.2840827
- Donoghue, A., & Wishart, G. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Production Science*, 62(1-3), 213-232.
- Duchi, N. L. (2009). *Criopreservación de semen de gallo: Una alternativa para la recuperación y conservación de sallow de raza murciana*. La Alberca, Murcia. España.
- Duchi, N., Almela, L., Peinado, B., & Remacha, A. (2009). Crioconservación de semen de gallo una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza murciana. (I. M. alimentario, Ed.) *Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)*, 6(3), 1-5.
- Escobedo, H. (2016). *Principales características seminales en vacunos de carne del cip chuquibambilla*. Tesis de grado, Universidad nacional del altiplano, Puno.
- Fernandez, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz, R., Zamora, S., Roldán, M., Rabelo, B., Ramírez, J, Albero, Y., Yoldi, A. & Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de sangre. *Asebir*, 14(1), 17-24.
- Feyzi, S., & Sharafi, M. &. (2018). Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. *Poultry Science*, 97(7), 2582-2590. doi:10.3382/ps/pey067

- Frediani, M., Guida, F., Salgado, P., Gonçalves, D., Blank, M., Novaes, A., & Pereira, J. (2018). Semen collection by slectro-stimulation in a variety of bird orders. *Theriogenology*, *125*(1), 140-151. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.10.023
- Fujihara, N., & Howarth, J. (1978). Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. *Poultry science*, *57*(6), 1766-1768.
- Hammerstedt, R., & Graham, J. (1992). Cryopreservation of popultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, *29*(1), 26-38.
- Herrera, J. (2005). *Crioconservación y evaluación fisiológicas y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves*. Tesis de doctorado, Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa.
- Hofmann, R., Lehmer, A., & Gürster, E. &. (1992). Adenosine Triphosphate and Adenosine Diphosphate in Human Semen: Correlation with Sperm Count and Motility. . *Urologia Internationalis*, *48*(4), 391-394. doi:10.1159/000282361
- Juarez-Caratachea, A., Barocio-Uruea, J., García-Valladares, A., & Gutiérrez-Vázquez, E. &.-R. (2016). Effect of phenotype (plumage colour) on egg weight and live weight of backyard hen. *Med vet* , *48*(1), 99-106.
- Kommissrud, E., Myromslien, F., Stenseth, E., Zeremichael, T., Hofman, N., & Grevle, I. &. (2020). Viability, motility, ATP content and fertilizing potential of sperm from Atlantic salmon (*salmo salar* l.) in milt stored before cryopreservation. *Elsiever*, *151*, 58-65. doi:DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.008>
- Kucera, A. &. (2018). Avian semen collection by cloacal massage and liolation of DNA from sperm. *Journal of visualized experiments*, *132*(1), 1-5. doi:10.3791/55324
- Lake, P., Ravie, O., & McAdam, J. (1981). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: applicationto breeding programmers. *Br poult Sci* , 71-78.
- Lazo-Javalera, M., Astorga-Cienfuegos, K., Tiznado-Hernandez, M., Vargas-Arispuro, I., Martinez-Téllez, M., Islas-Ozuna, M. H.-O., & Martinez-Montero, M. &.-D. (2017). Effect of cryoprotectants on the morphology and electrolyte leakage on axillary buds of cryopreserved grapevine cv. `Flame Seedless`. *Investigación y ciencia*, *25*(72), 1-10.
- Levin, R., & Miller, T. (1981). An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: isolated cells. *Cryobiology*, *18*(1), 32-48.
- Long, J. (2006). Avian sperm cryopreservation: what are the biological challenges. *Poult Sci*, *85*(6), 232.
- Long, J., Bongalhardo, C., Pelaéz, J., Saxena, S., Settar, P., & O'Sullivan, P. F. (2010). Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science*, *89*, 966–973. doi:doi: 10.3382/ps.2009-00227
- Love, C. (2016). Modern techniques for semen evaluation. *Veterinary Clinics of North America*, *32*(3). doi:10.1016/j.cveq.2016.07.006.
- Martín-Cano, F., Gaitskell-Phillips, G., Ortiz-Rodriguez, J., Silva-Rodriguez, A., Román, A., Rojo-Dominguez, P., Alonso-Rodriguez, E; Tapia, A; Gil, M; Ortega-Ferrusola, C. & Peña, F. (2020). Proteomic profiling of stallion spermatozoa suggests changes in

sperm metabolism and compromised redox regulation after cryopreservation. *Elsevier*, 221(103765), 2-6. doi:10.1016/j.jprot.2020.103765.

- Masindi, M. M. (2016). The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(2), 132-139.
- Medina, V., Velasco, Y., & Cruz, P. (2006). Genetic resource banks and their role in biodiversity conservation. *Orinoquia*, 10(1), 71-76.
- Miguel, J., Asenjo, B., Ciria, J., & Francesch, A. (2006). Parámetros genéticos y respuesta a la selección en una población de gallinas de raza Castellana. *Arch Zootec*, 55(209), 85-92.
- Moce, E., Grasseau, L., & Blesbois, E. (2010). Cryoprotectan and freezing process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Anim reprod Sci*, 359(16), 122.
- Mohri, H., & Masaki, K. (1976). Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil*. doi:<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0140179>.
- Montes, D., De la Ossa, J., & Hernandez, D. (2019). Caracterización morfológica de la gallina criolla de traspatio de subregión Sabana departamento de Sucre Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 2(24), 7218-7224.
- Moreno, J., & Galarza, D. (2019). Criocopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres. *Revista ecuatoriana de ciencia animal*, 3(2), 18-38.
- Mphaphathi, M., Luceba, D., Sutherland, B., & Nedanbale. (2012). Comparison of slow freezing and vitrification methods for Venda cockerel's spermatozoa. *Open J Anim sci*, 2, 204-210.
- Palomino, Y. (2016). *Criopreservación del semen de gallo de pelea con y sin descenso gradual de temperatura*. Abancay, Perú: Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.
- Paredes, M., Romero, A., Torres, M., & Vallejos, L. &. (2019). Crecimiento y comportamiento reproductivo de la gallina criolla de huevos con cáscara verde de la provincia de Chota, Cajamarca. *Inv vet Perú*, 30(2), 733-744. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16070>
- Parks, & Lynch, D. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 99, 255-266.
- Partyka, A., Lukaszewicz, E., & Nizanski, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77(8), 1497-1504.
- Phillips, J., Bramwell, R., & Graham, J. (1996). Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. *Poult Sci*, 75(23), 915.
- Polge, C., Smit, A., & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(25), 666-666. doi:<https://doi.org/10.1038/164666a0>

- Purdy, P., Song, Y., Silversides, F., & Blackburn, H. (s.f.). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regenerations of breed or lineor both. *Poult Sci*, 2184, 88-91.
- Rakha, A., Ansari, M., Akhter, S., Zafar, Z., Naseer, A., Hussain, L., Blesbois, E. & Santiago-Moreno. (2018). Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). *Theriogenology*, 122, 61-67.
- Ramirez-Melano, J., Medina, V., & Cruz-Casallas, P. (11 de 8 de 2010). Fish cryopreservation spermatozoa, an approach siluriformes. *Orinoquia*, 14(1), 59-71.
- Ramónez, J. (2013). *Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino*. Tesis de maestría, Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Ricaurte, S. (2006). Importancia de un buen manejo de la reproducción en avicultura. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(4), 10-15.
- Rivero, J. (2012). *Modelado matemático e implementación práctica de sistema de vitrificación ultra-rápida mediante radiación laser*. Tesis de pregrado, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Rodríguez-Almeida, F., Ávila, C., Anchondo, A., & Sánchez-Ramírez, B. &. (2008). Sperm capacitation induced by conservation of diluted, refrigerated or frozen ram semen. *Agrociencia*, 42(1), 399-406.
- Rubio, J., Quintero, A., & Gonzalez, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toro. *Revista científica Maracaibo*, 19(4), 382-389.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M., López-Sebastián, C., & Prieto, T. C. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science*, 90, 2047-2053. doi:doi: 10.3382/ps.2011-01355
- Surai, P. F., Blesbois, I., & al, G. e. (1998). Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avain semen. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B*, 120, 527-533.
- Svoradová, A., Kuželová, L., Vašíček, J., Baláži, A., & Hanusová, E. &. (2018). In vitro effect of various cryoprotectants on the semen quality of endangered Oravka chicken. *Zygote*, 26(1), 1-7. doi:https://doi.org/10.1017/S0967199417000685
- Tapia, C. (6 de 3 de 2017). Congelan semen del gallo del Curueño para proteger la raza. *Diario de León*. Obtenido de <https://www.diariodeleon.es/articulo/sociedad/congelan-semen-gallo-curueno-proteger-raza/201703060400001666689.html>
- Tarvis, K. (2013). *New methods for cryopresering rooster spermatozoa*. Tesis de maestría, Colorado State University, Colorado.
- Terreros, M., Huanca, W., Arriaga, I., & Ampuero, A. (2015). Effect of three cryoprotectans on the cryopreservation of epididymal. *Rev Inv Vet Perú*, 23(6), 420-426.

- Tomás, C., Blanch, E., Casares, L., Gómez, E., Sansane, S., & Giménez, I. (2013). Efecto de la concentración de glicerol y de la tasa de dilución sobre la calidad in vitro y la capacidad fecundante del semen criopreservado de gallos de raza gallina valenciana de chulilla. *Jornadas sobre Producción Animal, 1*, 425-427.
- Valencia, N., Betancourth, L., Muñoz, J., & Valencia, A. &. (1990). Origen, desarrollo y descripción de los tipos de gallina criolla existentes en varios municipios del valle del Cauca. *Acta agronómica, 40*(1-2), 187-196. Obtenido de Fundación Charles Darwin: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=5091#references>
- Vara, E., & Gil-Loyzaga, P. (2013). Criopreservación de células y tejidos. En P. Gil-Loyzaga, *Cultivo de células animales y humanas aplicada en medicina degenerativa* (págs. 103-110). Madrid, España: Visión libros.
- Villaverde, S. (2017). *Obtención, almacenamiento y morfometría de espermatozoides aviares: aplicación de la caracterización y criopreservación de espermatozoides de especies silvestres*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Watson, P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development, 7*(4), 871-891.
- Woelders H, Z. C. (2006). Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poult Sci, 85*, 216-222.



## XII. ANEXOS

*Anexo 1. Extracción de semen por masaje abdominal*

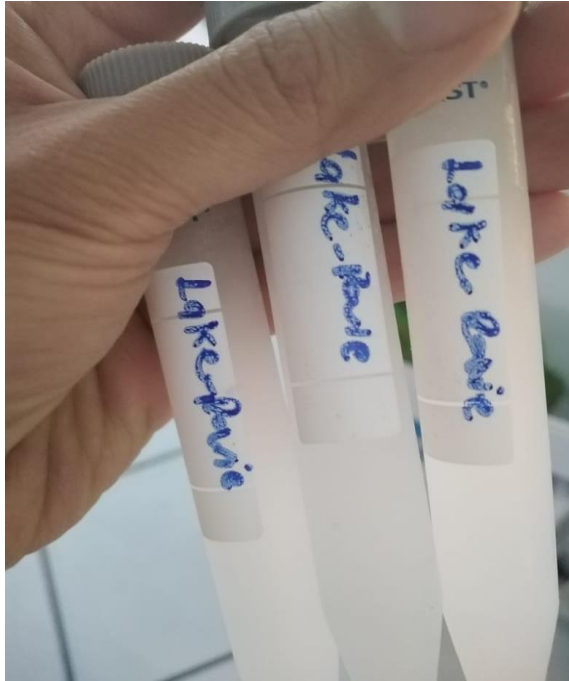


*Anexo 2. Cálculo de concentración espermática*





*Anexo 3. Preparación de diluyente lake-ravie-84*



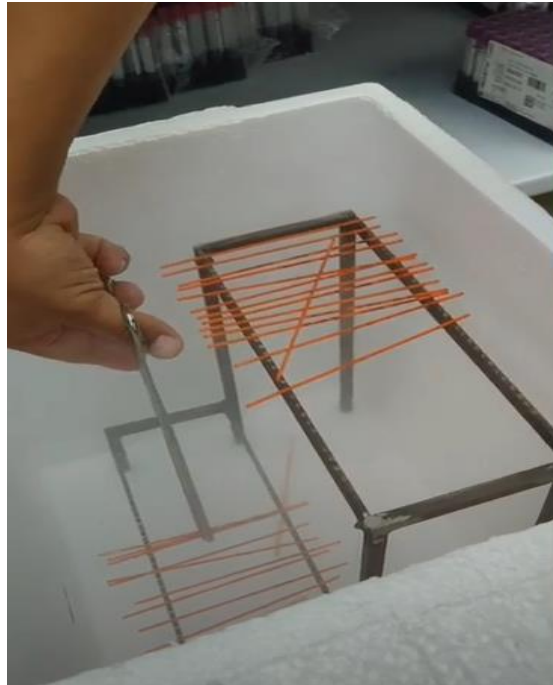
*Anexo 4. Mezcla de diluyente fracción 1 y fracción 2*



*Anexo 5. Empajillado de pajuelas*



*Anexo 6. Congelación de pajuelas*



*Anexo 7. Almacenamiento de pajuelas*



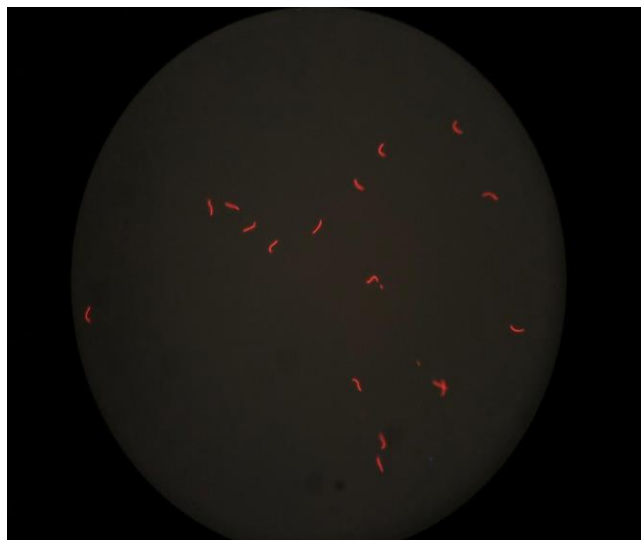
*Anexo 8. Descongelación de pajuelas*



*Anexo 9. Análisis de variables de sistema casa*



*Anexo 10. Análisis de microscopia de fluorescencia con yoduro de propidio*



## **Autorización de publicación en el repositorio institucional**

**Jaime Marcelo Reinoso León** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105520498**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“EFECTO DEL PORCENTAJE DE GLICEROL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN AVES DE COMBATE”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 15 de mayo de 2021



F:

Jaime Marcelo Reinoso León

C.I. 0105520498

## Declaración de Autoría y Responsabilidad

**Jaime Marcelo Reinoso León** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105520498** Declaro ser el autor de la obra: **“EFECTO DEL PORCENTAJE DE GLICEROL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN AVES DE COMBATE”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 15 de mayo de 2021



F:

Jaime Marcelo Reinoso León

C.I. 0105520498

