



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN  
ESPERMÁTICA EN LÍNEAS DE GALLOS CRIOLLOS  
CON GLICEROL AL 8%, COMO ALTERNATIVA PARA  
EL MEJORAMIENTO GENÉTICO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

**AUTOR: OSCAR FERNANDO VÁSQUEZ PAREDES**

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

**CUENCA - ECUADOR**

**2021**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA.**

**“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN  
ESPERMÁTICA EN LÍNEAS DE GALLOS CRIOLLOS  
CON GLICEROL AL 8%, COMO ALTERNATIVA PARA  
EL MEJORAMIENTO GENÉTICO”**

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

**AUTOR: OSCAR FERNANDO VÁSQUEZ PAREDES**

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

**CUENCA – ECUADOR**

**2021**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**

## I. DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

**Oscar Fernando Vásquez Paredes** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0302691977**. Declaro ser el autor de la obra: **“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA EN LÍNEAS DE GALLOS CRIOLLOS CON GLICEROL AL 8%, COMO ALTERNATIVA PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO”**, 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, 22 de octubre de 2021



Oscar Fernando Vásquez Paredes

**C.I. 0302691977**

## II. CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por **OSCAR FERNANDO VÁSQUEZ PAREDES**, bajo mi supervisión.

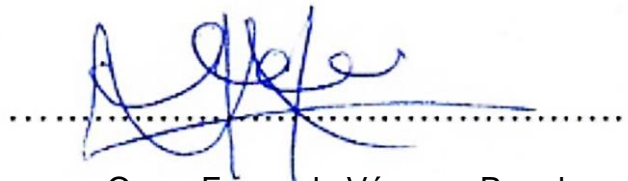


DR. ANDRÉS LEONARDO MOSCOSO PIEDRA MCS.

DIRECTOR

### III. AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis padres Julio y Esperanza por el cariño, amor y apoyo que me supieron ofrecer, en el transcurso de este tiempo para cumplir una meta más en mi vida



Oscar Fernando Vásquez Paredes

#### IV. DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado a mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio que me han sabido brindar en todo este tiempo

  
.....  
Oscar Fernando Vásquez Paredes

## V. ÍNDICE GENERAL

I. DECLARACIÓN .....	¡Error! Marcador no definido.
II. CERTIFICACIÓN .....	III
III. AGRADECIMIENTO .....	IV
IV. DEDICATORIA.....	V
V. ÍNDICE GENERAL.....	VI
VI. ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
VII. ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
VIII. ÍNDICE DE ANEXOS .....	X
IX. Resumen .....	XI
X. Abstract.....	XII
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
Introducción.....	1
Planteamiento del problema .....	3
Hipótesis.....	4
Antecedentes .....	5
Objetivos .....	6
Objetivo general .....	6
Objetivos específicos.....	6
Justificación .....	7
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>8</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
2.1 Producción de gallos locales .....	8
2.2 Selección de líneas productivas .....	8
2.3 Líneas de gallos criollos locales (Guaricos, Barbones y Cubanos) 9	
2.3.1 Gallo Guarico .....	9
2.3.2 Gallo Barbones .....	10
2.3.3 Gallos Cubanos.....	11
2.4 Cualidades productivas de gallo criollo.....	11
2.5 Manejo del gallo criollo .....	12
2.6 Variables de reproducción que afectan la calidad espermática....	12
2.7 Factores que afectan la calidad espermática.....	13
2.7.1 Factores ambientales .....	13
2.7.2 Factores fisiológicos (edad) .....	13

2.7.3	Factor alimentación .....	13
2.7.4	Factor genético .....	14
2.8	Métodos de recolección de semen de aves .....	14
2.8.1	Masaje dorso – abdominal .....	15
2.9	Crioconservación espermática.....	15
2.9.1	Protocolos estándar de crioconservación en aves.....	15
2.9.2	Técnicas de crioconservación en aves.....	16
2.9.3	Crioconservantes .....	16
2.9.4	Glicerol.....	17
2.9.5	Coadyuvantes .....	18
2.10	Características de congelación de semen .....	18
2.10.1	Características pre – congelamiento .....	18
2.10.2	Características de congelación .....	18
2.11	Métodos de evaluación espermática.....	19
2.11.1	Motilidad masal .....	19
2.11.2	Motilidad progresiva individual .....	19
2.11.3	Vitalidad espermática .....	20
2.11.4	Viabilidad espermática .....	20
<b>CAPITULO 3.....</b>		<b>22</b>
<b>3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>		<b>22</b>
3.1	Ubicación de la zona del estudio .....	22
3.2	Área de estudio .....	22
3.3	Universo de estudio .....	22
3.4	Materiales.....	23
3.4.1	Materiales biológicos.....	23
3.4.2	Materiales físicos .....	23
3.4.3	Químicos.....	23
3.5	Alojamiento y alimentación .....	24
3.6	Procedimiento.....	24
3.6.1	Procedimiento del semen en el laboratorio.....	24
3.6.2	Congelación de las muestras .....	25
3.6.3	Descongelación del semen .....	25
3.7	Características microscópicas .....	25
3.7.1	Motilidad masal .....	25
3.7.2	Motilidad individual progresiva .....	26

---

3.7.3	Determinación de la vitalidad espermática .....	26
3.7.4	Vitalidad espermática .....	27
3.8	Variables .....	27
3.8.1	Variables dependientes .....	27
3.8.2	Variables independientes .....	27
3.9	Diseño experimental .....	28
<b>CAPITULO 4</b>	.....	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	.....	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 5</b>	.....	<b>32</b>
<b>5.1 DISCUSIÓN</b>	.....	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 6</b>	.....	<b>34</b>
<b>6.1 CONCLUSIONES</b>	.....	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 7</b>	.....	<b>35</b>
<b>7.1 RECOMENDACIONES</b>	.....	<b>35</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	<b>36</b>
<b>XII. ANEXOS</b>	.....	<b>41</b>

## VI. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N°. 1</b> Requerimientos nutricionales de gallos criollos de acuerdo a la etapa de vida. ....	14
<b>Cuadro N°. 2</b> Características nutricionales de los balanceados de la marca comercial WAYNE. ....	24
<b>Cuadro N°. 3</b> Escala de evaluación de la motilidad masal de los espermatozoides .....	25
<b>Cuadro N°. 4</b> Escala de evaluación de la motilidad individual progresiva de los espermatozoides .....	26
<b>Cuadro N°. 5</b> Diseño experimental.....	28
<b>Cuadro N°. 6</b> Motilidad masal pre y post congelamiento .....	29
<b>Cuadro N°. 7</b> Motilidad Progresiva pre y post – congelamiento .....	29
<b>Cuadro N°. 8</b> Vitalidad pre y post – congelamiento .....	30
<b>Cuadro N°. 9</b> Funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) pre y post – congelamiento.....	30
<b>Cuadro N°. 10</b> Análisis ADEVA entre biotipos para motilidad masal, motilidad progresiva, vitalidad y viabilidad espermática.....	31

## VII. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°. 1</b> Gallo criollo Guarico, de tonalidad mexicana. ....	10
<b>Figura N°. 2</b> Gallo criollo Barbona, de coloración amarillenta. ....	11
<b>Figura N°. 3</b> Gallo criollo Cubano de coloración negra.....	11
<b>Figura N°. 4</b> Figura N°. 1 Ubicación de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias .....	22

---

## VIII. ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N°. 1</b> Materiales de laboratorio .....	41
<b>Anexo N°. 2</b> Incubación de las muestras .....	41
<b>Anexo N°. 3</b> Proceso de crioconservación .....	41
<b>Anexo N°. 4</b> Observación de las muestras .....	42
<b>Anexo N°. 5</b> Método eosina – nigrosina .....	42
<b>Anexo N°. 6</b> Prueba de funcionalidad de la membrana espermática HOST .....	43
<b>Anexo N°. 8</b> Informe de originalidad turnitin .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Anexo N°. 9</b> Dedicatoria de autoría y responsabilidad .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Anexo N°. 10</b> Autorización de publicación en el repositorio institucional .....	50

## IX. Resumen

La crioconservación de semen de gallo criollo representa una técnica de reproducción como una alternativa para que los recursos genéticos reduzcan el riesgo a extinguirse, manteniendo congelado el esperma y conservando su viabilidad. Se evaluó la calidad espermática del semen de gallos criollos crioconservado con glicerol al 8%, recolectado mediante masaje dorso abdominal, diluido con Lake-Ravie para ser congelado en pajuelas de 0,25 ml utilizando dos rampas de nitrógeno líquido y descongelando a 5 °C. La presente investigación se realizó en los laboratorios de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Católica de Cuenca. El método estadístico empleado fue Diseño de bloques completamente al azar utilizando 3 tratamientos con 5 repeticiones, para lo cual se empelaron 9 gallos de peso y edad homogénea pertenecientes a tres biotipos: cubanos, barbónes y guaricos, en un periodo de 3 semanas. Al evaluar la motilidad masal e individual progresiva en semen fresco y post descongelamiento se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) a favor del biotipo cubano. En lo que se elude al método de HOST, obtuvimos diferencias estadísticas en la evaluación del semen fresco y descongelado ( $p \leq 0,05$ ), para la prueba de vitalidad espermática se empleó la técnica de eosina – nigrosa, obteniendo valores estadísticamente diferentes en la etapa de descongelación y no significativos en la evaluación de semen fresco. La aplicación de glicerol al 8% es una técnica suficiente para conservar el semen de aves de corral y el protocolo óptimo para ellos es el adiestramiento previo en las líneas de gallos.

**Palabras Clave:** *Calidad seminal, motilidad masal, pajuelas, viabilidad espermática*

## X. Abstract

Cryopreservation of creole rooster semen represents a reproductive technique as an alternative for genetic resources to reduce the risk of extinction, keeping the sperm frozen and preserving its viability. The sperm quality of creole rooster semen was evaluated with cryopreserved 8% glycerol, collected by dorsal abdominal massage, diluted with Lake-Ravie to be frozen in 0.25 ml straws using two liquid nitrogen ramps and thawed at 5 °C. The present investigation was carried out in the laboratories of the Academic Unit of Agricultural Sciences of the Catholic University of Cuenca. The statistical method used was a completely randomized block design using 3 treatments with 5 replicates, for which 9 roosters of homogeneous weight and age belonging to three biotypes: Cuban, bearded, and guaricos, were used for 3 weeks. When evaluating the progressive mass and individual motility in fresh and post-thawed semen, significant statistical differences were obtained ( $p \leq 0.05$ ) in favor of the Cuban biotype. Regarding the HOST method, we obtained statistical differences in the evaluation of fresh and thawed semen ( $p \leq 0.05$ ), for the sperm vitality test we used the eosin - nigrosa technique, obtaining statistically different values in the thawing stage and not significant in the evaluation of fresh semen. The application of 8% glycerol is a sufficient technique to preserve poultry semen and the optimal protocol for them is the previous training in the rooster lines.

**Keywords:** *seminal quality, mass motility, straws, sperm viability.*

## CAPÍTULO 1

### Introducción

La avicultura en el Ecuador ha sido considerada una actividad muy dinámica en el sector agropecuario en estas últimas tres décadas. Los avances tecnológicos de reproducción aportaron para mejorar la eficiencia genética y al desarrollo de bancos de germoplasma, con el fin de cubrir la demanda genética cuando presente situaciones necesarias (Moreno & Lucero, 2019).

La crioconservación se fundamenta en mantener la viabilidad y funcionalidad a nivel celular a bajas temperaturas, el cual involucra la suspensión del semen en diluyentes con técnicas de crio protección para su manejo a futuro (Zambrano, 2020). La criopreservación ex situ de espermatozoides presenta un gran interés desde el punto de vista de conservación de especies y razas amenazadas, como a su vez, en programas de mejora genética en razas reproductivas (Vargas , 2016).

Existen múltiples factores que favorecen una congelación exitosa del semen avícola, entre ellos destacan el ambiente, diluyentes, crioprotectores, la concentración espermática, motilidad masal y progresiva, vitalidad, viabilidad, técnica de congelación y descongelación. Una alternativa de crioprotector es el glicerol de apariencia líquida, viscosa, sin coloración con capacidad de absorber la humedad del ambiente que actúa como agente deshidratante y permite que los cristales de agua actúen en procesos de congelación y descongelación evitando posibles daños de la membrana celular espermática (Toalombo, 2020).

En la congelación del semen de gallos se utiliza frecuentemente la técnica del glicerol, ya que es un excelente crio protector, no obstante, se considera que, al momento de realizar la inseminación en la hembra, este crioprotector no debe exceder del 1% por su efecto anticonceptivo. Las dosis recomendadas en protocolos para una excelente crioconservación son del 11%, con una tasa de dilución al 1:4. Sin embargo estudios antiguos menciona que en los protocolos aplicaban concentraciones del 8% con una tasa de dilución del 1:8 (Tomás, et al., 2013).

La inseminación artificial se ha desarrollado en gran escala en países de Europa y Norte América (Tene, 2014). Esta innovación reproductiva asistida emplea diluyentes que preservan la capacidad fecundante de los espermatozoides y repercute en ganancias económicas (Toalombo, 2020). En la actualidad se está practicando la inseminación artificial (IA) en aves, ya que proporciona un alto porcentaje en niveles productivos, permite un mejor control sanitario en la producción de huevos y por ende el mejoramiento de la calidad del pollo para optimizar su explotación.

Es por ello que en este estudio se aplicará la técnica de crioconservación como una herramienta que incremente la productividad de las razas criollas a la vez que se previene la pérdida de estas especies, por lo tanto, el objetivo general es la evaluación de la crioconservación espermática en distintas líneas de gallos criollos con glicerol al 8%, como una alternativa para la conservación y mejoramiento genético en aves de corral.

## Planteamiento del problema

Los métodos de conservación del material genético tienen un objetivo en común, que es el aumento del porcentaje de fertilidad, debido a que existe la presencia de una baja fertilidad en la reproducción de gallos, en especial las razas criollas siendo del 8% al 12% y por lo tanto una incubabilidad negativa. Es por ello que actualmente existe gran interés tanto poblacional como científico en estudios sobre el desarrollo de nuevas técnicas de reproducción asistida, que contribuyen en la preservación de las especies autóctonas que se encuentran bajo amenaza de peligro de extinción (Cajo & Ulcuango, 2020).

En el Ecuador existe la pérdida de razas autóctonas por problemas reproductivos que se encuentran relacionados con la infertilidad de los gallos reproductores; a pesar de eso no existe la cantidad suficiente de información que ayude a la evaluación básica del semen de gallos criollos debido al poco interés que la población e investigadores presentan sobre las anomalías espermáticas que se observan a nivel microscópico (Cajo & Ulcuango, 2020). Debido a esta problemática surge la necesidad de evaluar la calidad del semen crioconservado en glicerol al 8%, como una alternativa en la conservación, para el mejoramiento genético y por ende el aumento de la eficiencia reproductiva de gallos criollos.

El rendimiento de la etapa reproductiva en las aves se encuentra influenciado directamente por la nutrición y el manejo de esta. Es de gran importancia la realización de acciones complementarias que permitan obtener óptimos resultados, Okoro et al., (2016), indican que los principales inconvenientes en la reproducción es la baja fertilidad con una tasa del 30% aproximadamente.

La crioconservación del espermatozoos de aves es una técnica aplicada para mantener el material biológico de estas especies y su perduración en el tiempo. De este modo se previene la pérdida de biodiversidad y se almacena el material genético, es por ello que se necesita evaluar e investigar estos métodos y procedimientos ya que, así se podrán perfeccionar sin afectar la calidad del espermatozoos.

## Hipótesis

**H0:** No existen diferencias significativas en la crioconservación espermática pre y post congelamiento entre las diferentes líneas de gallos criollos, lo que permitirá estandarizar el proceso como una alternativa para el mejoramiento genético.

**H1:** Si existen diferencias significativas en la viabilidad espermática pre y post congelamiento entre las diferentes líneas de gallos criollos, lo que permitirá estandarizar el proceso.

## Antecedentes

En la medicina veterinaria las técnicas de reproducción asistida en aves domésticas, han presentado avances positivos en la conservación de especies locales. Los recursos genéticos provenientes de las razas autóctonas son de gran valoración e importancia en cuanto a la seguridad alimentaria para presentes y futuras generaciones, siendo de prioridad el sector avícola (Paniagua, Ortiz, & Aguilar, 2011).

Las técnicas de reproducción asistida junto con los métodos de criopreservación, se han convertido en gran potencial para la cría y producción de aves, ya que facilitan de forma favorable los métodos de selección, predicción y mejoramiento de razas, que permiten la selección de especies reproductoras (Castaño, et al., 2017).

En la industria avícola de líneas productoras de huevos y carne, donde se emplean técnicas de reproducción asistida y la crioconservación de semen, se ha obtenido ventajas productivas; como un alto porcentaje de fertilidad en huevos para incubar, con características sanitarias propicias para la producción y mejoramiento de pollitos (Tadelle et al., 2013).

La crioconservación del material genético contribuye con la preservación de razas autóctonas, la reducción de machos, la cruce de diferentes líneas o especies sin la necesidad de realizar alguna conducta de apareamiento, obteniendo así beneficios económicos (Villaverde, 2017).

Es por esto que para combatir con la pérdida de diversidad genética de aves domésticas, se han promovido varios parámetros para el análisis de muestras seminales como; volumen de eyaculado, concentración espermática, motilidad masal y progresiva, y otras pruebas como la como el HOST que nos permite evaluar la funcionalidad de la membrana espermática (Villaverde, 2017).

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la crioconservación espermática de diferentes líneas de gallos criollos con glicerol al 8%, como una alternativa para la conservación y mejoramiento en aves de corral.

### **Objetivos específicos**

- Definir la variabilidad pre – criopreservación del espermatozoide en diferentes líneas de gallos criollos (Guaricos, Barbones y Cubanos).
- Analizar la variabilidad espermática del material genético de los gallos criollos utilizando diferentes técnicas.
- Establecer un protocolo de crioconservación del espermatozoide de gallos criollos como una alternativa para la conservación y mejoramiento genético de las aves de corral en el Ecuador.

## Justificación

La presente investigación considero en evaluar de la crioconservación espermática de diferentes líneas de gallos criollos (Guaricos, Barbones y Cubanos) con glicerol al 8%, como una alternativa para la conservación y mejoramiento genético en aves de corral, debido a que el sector avícola ha implementado nuevas biotecnologías con la finalidad de mantener la viabilidad espermática durante un ciclo de congelación descongelación y almacenamiento indefinido, con el propósito de obtener resultados positivos en los porcentajes de fertilidad (Blanch, et al., 2011).

La avicultura en el Ecuador ha contribuido principalmente en la seguridad alimentaria del sector rural, y a su vez colabora con el económico y científico (Villacís, Escudero, Cueva, & Luzuriaga, 2016), este último sector ha estado presionado debido a la alta demanda y estándares de calidad que induce a utilizar especies altamente productivas desplazando a otras y provocando la pérdida de las mismas.

La crioconservación es considerada una alternativa de conservación ex situ que mediante la utilización de la inseminación artificial reduce el número de machos ejemplares y aumenta el porcentaje de incubabilidad de huevos fértiles. La conservación del material genético de los gallos criollos tiene grandes expectativas en el campo de mejoramiento genético, que ayudara a la construcción de bancos de germoplasma y la conservación de los animales en riesgo o peligro de extinción (Duchi, Ramón, & Remacha, 2008).

Las diferentes metodologías emplean glicerol para crioconservar el semen de aves, siendo un efecto la reducción de sales, pero evitando la acumulación de electrolitos durante el congelamiento, sin destruir la membrana de las células (Tene, 2014). Esta técnica tiene grandes beneficios que requieren ser evaluados es por ello que en las razas criollas se aplicará para conservar el material genético y evitar la extinción de estas líneas de gallos.

## CAPÍTULO 2

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Producción de gallos locales

Las aves locales provienen de un ave salvaje de la jungla asiática, los tipos de gallinas locales han sido desarrollados por la calidad de los huevos y la carne. Sin embargo, las aves se explotan para la crianza a nivel familiar, la carne presenta una consistencia y sabor fuerte que suele ser consumida que les permite camuflarse de los predadores (Enríquez, 2015).

Los costos de producción son mínimos, en comparación de la avicultura industrial ya que gran parte de su alimentación es mediante el pastoreo de los patios. La productividad económica de gallinas criollas o locales están en menor proporción en el mercado que las razas y cruzas de la avicultura industrial (Gustavo Villacís et al., 2016).

Existen muchas razas locales de gallos criollos adaptados al entorno, este provienen de varias líneas y subespecies antecesoras. La clasificación Taxonómica identifica a la subespecie del gallo criollo, como *Gallus gallus domesticus*, sin embargo, todas provienen de una especie el faisán silvestre: el gallo bankiva (*Gallus gallus*) que se puede observar hasta la fecha en muchos países asiáticos (Enríquez, 2015).

Rivas et al., (2016), menciona que existen 13 familias entre gallos y gallinas criollas descritas, donde 9 de estas se producen en el sur de Ecuador, gran parte de estas especies presentan similitud con relación peso, tamaño y coloración de plumaje.

#### 2.2 Selección de líneas productivas

Las gallinas y gallos criollos se pueden clasificar según su interés para el productor, la clasificación según Valencia, (2009) se puede asociar según el tamaño y finalidad de la especie que son:

##### 2.2.1 Gallinas y gallos pequeños:

Considerados como especies de lujo, con peso no superior al kilo y cumplen funciones principalmente de ornamentación.

### **2.2.2 Gallinas y gallos pequeños con habilidad de pelea:**

Conocidos como aves finas. Son aves pequeñas que pesan entre 750 a 1.500 gramos, se consideran protectoras maternas y protectores de las crías.

### **2.2.3 Gallinas y gallos grandes:**

Son especies robustas que pueden pesar hasta 5 kilos, son especies comunes de gallinas y de distinta coloración, se utilizan principalmente para la producción de carne y huevos.

### **2.2.4 Gallos y gallinas medianos:**

Apodadas también cruzadas, crucetas o mestizas, de frecuencia medianas, pero varían según el tamaño del cruce de gallinas tipo vastas con las de tipo finas; su peso aproximado es de 3 kilos.

## **2.3 Líneas de gallos criollos locales (Guaricos, Barbones y Cubanos)**

Las gallinas son producto de la evolución entre aves silvestres locales y de gallinas provenientes de Asia. Están asociados a sistemas de producción campesina para obtener productos como carne y huevos. Al ser gallinas dóciles de domesticar y su capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales de la localidad (Angarita & Castrillón, 2020).

Paredes et al., (2019), expone que los gallos en su gran mayoría presentan crestas y barbillas grandes de coloración oscura, el peso oscila entre 3 a 5 libras, sin embargo, abundan las especies de coloración rojiza con negro y blancos con amarillo e incluso con algunas especies tienen pigmentaciones en las patas de color verde.

### **2.3.1 Gallo Guarico**

El gallo Guarico presenta un plumaje muy variado, en cuanto a su tonalidad el más común es el negro, aunque puede presentar coloraciones de amarillo, colorado cenizo, mexicana y blanco. La principal característica de la especie es la ausencia de plumas en la zona del cuello (Sanmartín, 2014). En la cresta tiene el distintivo de tipo Sierra y en menores proporciones se ha encontrado con variedades tipo Roseta. Se ha demostrado que la cresta en esta especie presenta un dimorfismo sexual por su posición a mayor altura (Torres, 2017).

La tonalidad de la piel en su totalidad es blanco, combinado con los picos de color amarillo o verde. En el aparte inferior los tarsos pueden tener una gran gama de colores amarillo, verde y negro (Sanmartin, 2014). El peso aproximado de la raza macho es de 3,5 kg (Torres, 2017).



*Figura N°. 2 Gallo criollo Guarico, de tonalidad mexicana.*

**Fuente:** (Sanmartin, 2014).

### **2.3.2 Gallo Barbones**

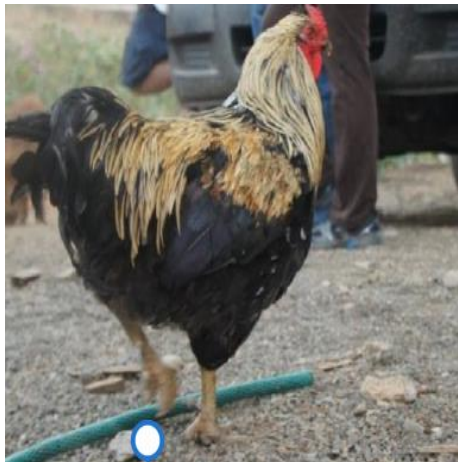
El gallo Barbón posee una coloración variada siendo las más comunes los amarillos, coloradas y negras (Sanmartin, 2014). La principal característica de la especie es la prolongación de las plumas en los lados del rostro, por debajo del pico y alrededor de las orejuelas (Villacís et al., 2016). Esta línea presenta una pigmentación blanca con varias tonalidades como amarillo, verde y negro en el pico con cresta tipo sierra en su mayoría aunque pueden poseer cresta tipo Roseta (Sanmartin, 2014).



*Figura N°. 3 Gallo criollo Barbona, de coloración amarillenta.*

### **2.3.3 Gallos Cubanos**

De plumaje variado, aunque predomina la tonalidad negra, colorado, blanco y amarillo. Esta especie presenta una distribución normal de la pluma, con crestas tipo Sierra, Nuez, Roseta y Guisante (Sanmartin, 2014). Esta especie según el autor (Villacís et al., 2016), menciona que no posee ninguna de las características peculiares de la especie y tiene un gran parecido a la gallina de ibérica.



*Figura N°. 4 Gallo criollo Cubano de coloración negra.*

**Fuente:** (Sanmartin, 2014).

## **2.4 Cualidades productivas de gallo criollo**

El sistema de producción de aves criollos se considera de forma tradicional extensiva a pequeña escala o de traspatio, donde se caracteriza por

tener una baja inversión en infraestructura y realizan combinaciones de varios sistemas de producción e incluso conviven con otras especies como cerdos, borregos, cabras y otras aves (Garza, Salas, & Escobar, 2014).

La producción de gallos criollos se considera el uso de tecnologías rudimentarias y simples, de bajos rendimientos en comparativa con sistemas intensivos de producción avícola (Angarita & Castrillón, 2020).

## **2.5 Manejo del gallo criollo**

El manejo para la crianza de los gallos criollos por lo general no es adecuado en grandes instalaciones e intensivas sino estudios han reportado que las familias campesinas optan por la cría libre, aunque en ocasiones utilizan gallineros o usan con árboles para evitar el exceso factores climatológicos como son el frío, humedad y calor (Garza, Salas, & Escobar, 2014).

En cambio, los comederos frecuentemente se vierte la comida al suelo sin importar la contaminación, suciedad o características de las aves (Sanmartin, 2014); sin embargo, los bebederos son realizados con materiales reciclados, aunque en ocasiones se ha evidenciado que las aves se suministran de acequias o de aguas domiciliarias, para los nidales se usan cartones o cajas apiladas en distintas zonas de la casa para uso eventual (Trujillo, 2019).

## **2.6 Variables de reproducción que afectan la calidad espermática**

Existen varios factores que influyen en la calidad espermática, entre los más importantes están (Cajo & Ulcuango, 2020):

- La alimentación, salud, edad y la luz del macho.
- La sobrepoblación de machos en una parvada.
- La edad fisiológica de los machos.
- La cantidad de agua suministrada.
- Agua caliente o muy fría.
- Foto estimulación inadecuada.

## **2.7 Factores que afectan la calidad espermática**

### **2.7.1 Factores ambientales**

Los factores ambientales que afectan la calidad de espermatozoides en gallos es la luminosidad, especialmente el desarrollo testicular en la etapa juvenil (Jiménez, 2013). Las épocas de lluvia y humedad alta elevan la tasa de mortalidad en pollos bebe, como las temperaturas altas que provocan el desarrollo de bacterias, virus y hongos que influye a la mortalidad de los gallos sin importar la edad de la especie (Sanmartin, 2014).

### **2.7.2 Factores fisiológicos (edad)**

Los machos y hembras alcanzan su madurez sexual a partir de las 24 semanas, encontrándose en condiciones óptimas para la reproducción. Sin embargo, entre las 26 a 28 semanas de edad puede realizarse la condición de fertilidad, aunque a medida que aumenta la edad fisiológica declina la frecuencia de apareamiento (Sanmartin, 2014).

En las 40 semanas de madurez algunas especies de gallos comienzan a perder la capacidad de reproducción sexual, ya que comienzan a tener problemas de exceso de peso o pododermatitis. En algunas ocasiones al observar este problema se combina las aves de apareamiento con jóvenes para mantener la alta fertilidad de la especie (Jiménez, 2013).

### **2.7.3 Factor alimentación**

Como cualquier especie los gallos y gallinas requieren de una demanda alimenticia suficiente rica en compuestos balanceados y en períodos constantes para obtener la madurez reproductiva. Una dieta idónea debe contener entre 60 a 70% de carbohidratos y grasas; 20 a 25% en proteínas; 5 a 10% en minerales y de 5 a 10% en vitaminas para obtener una fertilidad en las semanas propias de la especie (Angarita & Castrillón, 2020).

La base de alimentación de los gallos criollos comprende alimentación proveniente del campo, el cual consiste en alimentos como el maíz, desperdicios de cocina y alfalfa. El déficit de lisina puede ocasionar retraso en la madurez sexual que puede tener secuelas en problemas de producción y reproducción de las especies (Salas, Sánchez, Rodríguez, Aparicio, & Correa, 2009).

Los requerimientos nutricionales según la etapa de desarrollo de gallos criollos son (Cristóbal Villanueva et al., 2015):

*Cuadro N°. 1 Requerimientos nutricionales de gallos criollos de acuerdo a la etapa de vida.*

<b>Fase de desarrollo</b>	<b>% Proteína</b>	<b>% Carbohidratos</b>	<b>% Fibra</b>	<b>% Minerales*</b>	<b>Vitaminas</b>
Pollito (0-1 meses)	12 – 18	70 – 90			A
Pollito (2-3 meses)	20 – 23	60 – 80			C
Pollones (4-6 meses)	15 – 20	65 – 70	6 – 7	5 – 10	E
Adultas (> 7 meses)	18 – 22	65 – 70			D
					K

**Fuente:** (Villanueva et al., 2015).

#### **2.7.4 Factor genético**

La mayoría de las gallinas y gallos criollos presentan una postura baja, tienen una diversidad en cuanto tamaño, tipo, color y conformaciones, hay una gran variabilidad genética dictan diferentes tipos de cresta, copetes, barbonas, cuello desnudo, sin cola, patas emplumadas, enanas y entre otras (Torres, 2017; Cajo & Ulcuango, 2020).

#### **2.8 Métodos de recolección de semen de aves**

Existen varias metodologías en cuanto a la recolección en semen aviar, sin embargo, la técnica más empleada es en la recolección del semen mediante un masaje en la región dorso – abdominal con ordeño de cloaca que puede ser usada para aves de tipo gallos, pavos, faisanes, aves rapaces, y aves de tamaños inferiores (Cajo & Ulcuango, 2020).

Para otros tipos de aves como los patos y rapaces se suele aplicar la técnica de vaginas artificiales, considerando esta metodología funcional si se posee una hembra estimuladora (Duchi et al., 2009).

### **2.8.1 Masaje dorso – abdominal**

Se realiza mediante un masaje en la zona dorso – abdominal del macho en la zona de la espalda y acariciando en la cola, inmovilizando hasta ejecutar el masaje de dos o tres pasadas con la mano (Peters, et al., 2008). En el momento de levantar la cola, se observa la cloaca y un pene en semi versión, luego se aplica una ligera presión con los dedos hasta alcanzar la expulsión del semen. Se recomienda el almacenamiento del semen en su estado más puro, evitando impurezas y restos de orinas, heces o sangre (Cajo & Ulcuango, 2020).

### **2.9 Crioconservación espermática**

La crioconservación se conceptualiza como la congelación del material genético en forma de espermatozoides y ovocitos a través de un proceso en el cual las células sexuales transfieren su material genético a nuevas generaciones (Villaverde, 2017). La crioconservación espermática se puede realizar mediante el almacenamiento en soluciones líquidas añadidas con soluciones amortiguadores a temperaturas bajas de almacenamiento (5°C aproximadamente), que puede ser usado para la técnica de inseminación artificial o almacenado de forma indefinida con nitrógeno líquido (Zambrano, 2020).

La conservación espermática y la crioconservación son herramientas que permite la reproducción asistida con bajos riesgos; sin embargo, al aplicar estas herramientas se ha demostrado que pueden transmitir ciertas enfermedades a las hembras fecundantes (Duchi et al., (2009).

#### **2.9.1 Protocolos estándar de crioconservación en aves**

Los protocolos de crioconservación espermática se han desarrollado desde hace siglos atrás con el fin de mantener razas puras y almacenarlas en bancos de germoplasma. La preparación de los espermatozoides para la criopreservación requiere la adición de diluyentes apropiados que sean capaces de soportar el proceso de congelación y descongelación (Herrera, 2005).

Se ha demostrado que los espermatozoides de aves a bajas temperaturas tienen un efecto citotóxico el cual infiere en la técnica empleada y por ende afecta al momento de realizar la fertilización, afectando la cinética enzimática (Herrera, 2005). Aunque se ha demostrado que los espermatozoides

de los gallos con el diluyente etilenglicol permiten descongelar a 41°C conservando las características del metabolismo espermático (Villaverde, 2017).

Dependiendo de la técnica empleada la calidad espermática se verá afectada en la fecundación de la hembra (Villaverde, 2017).

### **2.9.2 Técnicas de crioconservación en aves**

Las técnicas de crioconservación se dividen en dos grupos de agentes crioprotectores, los permeables como el glicerol, dimetilsulfóxido y dimetilacetamina y aquellos que actúan desde la parte exterior de la célula como la glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa (Villaverde, 2017). El objetivo de los crioprotectores consiste en proteger la membrana plasmática de los espermatozoides en la etapa de descongelación debido a la formación de cristales intra y extracelular que afectan la estructura plasmática (Herrera, 2005).

Los métodos de crioconservación pueden ser de curva de enfriamiento y descongelamiento lenta con congelación rápida, congelación lenta con descongelación lenta, congelación ultra rápida y vitrificación (Zambrano, 2020).

### **2.9.3 Crioconservantes**

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles en agua, que tienen la capacidad de alterar las propiedades fisicoquímicas de las disoluciones acuosas encontradas en la materia viva, cuya función es ocasionar una deshidratación dinámica de las células y amortiguar el impacto de la elevada concentración de solutos intracelulares a crioconservar, aunque todo dependerá del tipo de crioprotector utilizado (Moreno & Galarza, 2019).

La crioconservación del esperma es uno de los problemas más dificultosos a hora de realizar la inseminación artificial ya que la fertilidad depende de la metodología aplicada para el almacenamiento del esperma por períodos largos (Salvador Jiménez, 2013).

Para lograr una conservación exitosa debemos colocar el esperma en un tubo pequeño estéril y recubrir con una capa de aceite de parafina con la misma temperatura de semen y cerrar herméticamente (Peters, et al., 2008)

El agente crioprotector utilizado en esta investigación fue el glicerol al 8% adicionando (v/v) diluyente Lake – Ravie.

#### **2.9.4 Glicerol**

El glicerol es un crio protector más usado para la criopreservación del esperma del gallo presenta una baja toxicidad y es el más eficaz para la aplicación en líneas de fertilidad. Otra característica del glicerol es la fácil eliminación mediante sistemas convencionales como la dilución gradúa y centrifugación (Tomás, et al., 2013; Abouelezz, et al., 2015). El glicerol, también actúa como un agente anticonceptivo y se ve relacionado con daños en el tracto reproductivo de la hembra, disminuyendo la movilidad y viabilidad espermática (Herrera, 2005).

Montes Vergara et al., (2019), describieron al glicerol como un agente crioprotector, por su efecto que ejerce a nivel extracelular, cuya función es aumentar el volumen del medio extracelular, produciendo la disminución de los electrolitos y así reduciendo la cantidad de agua intracelular para la congelación.

##### **2.9.4.1 Concentración**

Las concentraciones más usadas en protocolos actuales son del 11% con tasa de dilución 1:4, sin embargo, los protocolos antiguos recomiendan la utilización de concentración al 8% con tasa de dilución 1:8 (Tomás, et al., 2013), aunque en nuevos estudios se ha utilizado tasa de diluciones inferiores al 8%, 7%, 6% y 4% con tasa de dilución 1:4 (Blanch, et al., 2014; Abouelezz, et al., 2015). En el estudio de Long (2006), mencionan la máxima concentración es hasta en un 15% (v/v), considerando que a partir del 10% (v/v) los espermatozoides se ven afectados significativamente la motilidad después de la descongelación, reduciendo del 30% al 60% después del ciclo de congelación-descongelación.

##### **2.9.4.2 Efecto**

Blanch, et al. (2014), afirma que las concentraciones al 11 % de glicerol presentan una tasa de fertilidad inferior al 2%, mientras que con concentraciones al 8% mejoró en un 25% a 59% la fertilidad de huevos aplicados

criopreservación. Esto se debe a que el semen en su etapa de descongelamiento baja su nivel de fertilidad comparando con semen fresco y/o refrigerado (Duchi et al., (2008); (Tomás, et al., 2013).

### **2.9.5 Coadyuvantes**

Los coadyuvantes más utilizados en aves es la solución de 1% de cloruro de sodio que requieren ser introducidos después de 30 a 45 minutos recolectados el semen, estos amortiguadores permiten el almacenamiento del semen hasta 24 horas sin ocasionar efectos en la fertilidad. Otros coadyuvantes para aves se emplea el glutamato de sodio, antibióticos al glicerol para mejorar la concentración en la etapa de congelación y descongelación; como la albúmina sérica bovina que contribuye en mantener una lata movilidad espermática del semen conservado a 7°C por 24 horas (Blanch, et al., 2014; Zambrano, 2020).

## **2.10 Características de congelación de semen**

### **2.10.1 Características pre – congelamiento**

En la etapa de enfriamiento los espermatozoides comienzan a reducir su metabolismo, en donde el semen es enfriado con una velocidad de -0,2 – 0,4 °C/minuto, hasta alcanzar los 5°C. Terminada la etapa de enfriado se recomienda mantener entre 1.5 a 2 horas para el proceso de equilibrio y adaptación (Zambrano, 2020). Con esto el glicerol ingresará en las células espermáticas proporcionando una equidad entre las concentraciones intra y extracelular de los componentes activos (Villaverde, 2017).

### **2.10.2 Características de congelación**

El congelamiento espermático se realiza con vapores de nitrógeno líquido de forma manual o automatizada. En la técnica manual existe unos separadores llamados pajuelas que descienden temperaturas de 10 a 100 °C/minuto, mientras que la congelación automatizada se realiza mediante un biocongelador asistido por ordenador que se ajusta a la rampa previamente fijada (Zambrano, 2020).

Las pajuelas se congelan en superficies de hielo seco o en polímeros que conserven temperaturas de -80 a -95°C que permanecerán entre 2-3 minutos para transferir al nitrógeno líquido (Abouelezz, et al., 2015).

## **2.11 Métodos de evaluación espermática**

Según Jiménez, (2013), cita que la obtención de buenos resultados en una inseminación artificial (IA), está en función de 5 parámetros que pueden ser medibles en laboratorio; estos son: el color, el volumen, la motilidad, la concentración y anomalías espermáticas.

En otro estudio realizado por Gutiérrez et al., (2007), comentan que en un análisis de semen se tiene que observar el volumen eyaculado (en ml), la concentración espermática, los espermatozoides por eyaculación, la motilidad espermática (%), peso corporal, morfología normal, técnica de recogida, el % de dilución, el % de espermatozoides vivos y muertos.

### **2.11.1 Motilidad masal**

Se define motilidad al porcentaje de células que presentan la capacidad de movilizarse por sí mismas; en muestras de semen fresco los espermatozoides realizan movimientos rápidos y cambian de dirección constantemente, (Jiménez, 2013). Dichos espermatozoides o células se pueden observar mediante la ayuda de un microscopio en aumento a 40X (Peters, et al., 2008).

La motilidad masal de los espermatozoides se considerada para evaluar la fertilidad y competitividad de los espermatozoides del gallo, donde valores superiores al 75% indican que es motilidad progresiva y disminuye los problemas de baja fertilidad (Tene, 2014). El calcio aporta mayor disponibilidad para la motilidad del espermatozoide (González, 2019).

### **2.11.2 Motilidad progresiva individual**

La motilidad progresiva se valora mediante movimientos rectilíneos progresivos de los espermatozoides, para su evaluación se debe colocar una gota de semen diluido en el portaobjetos 3 ul, visualizando la muestra en el microscopio con el objetivo de 40 X, para su valoración utilizamos una escala de 5 a 0, en donde 5 (100%), representa espermatozoides con movimientos progresivos rápidos y 0 (0%), pertenece a los espermatozoides inmóviles o muertos (Agüero, 2012).

### **2.11.3 Vitalidad espermática**

Se define como el porcentaje de espermatozoides vivos y/o muertos, eyaculados en un muestreo de calidad espermática. Estas se encuentran directamente asociadas con la edad (una especie joven genera un alto nivel de especies vivas) y la calidad del semen del ave (Inyawilert, et al., 2019).

Santiago et al., (2011), comentan que la tasa de mortalidad se ve afectado significativamente en la concentración de diución, ya que afecta directamente en el conteó de células muertas.

Para la evaluación de la vitalidad espermática se puede emplear la tinción de eosina – nigrosina, la cual permite la cuantificación de los espermatozoides viables, así como los espermatozoides muertos e imperfectos. Estas tinciones no poseen la capacidad de traspasar la membrana plasmática de células vivas sucediendo todo lo contrario con las células muertas, los espermatozoides viables conservaran una coloración blanca sobre la base azul que aporta la nigrosina, y en el caso de la eosina esta es absorbida por los espermatozoides muertos adquiriendo una coloración rosa (González, 2019).

Este parámetro está relacionado con la técnica que se utiliza para la medición, ya que la más utilizada es el conteo de espermatozoides que no se tiñen con eosina nigrosina, que en varios casos se identifican anomalías al no colorarse, pero se establece que pueden estar vivos (Juárez et al., 2018). Es así que, la técnica aplicada puede determinar la vitalidad o muerte de espermatozoides conforme la interpretación y reactivos aplicados (Vásquez, 2014)

En lo que concierne a vitalidad está demostrado que realizar conteos al azar puede elevar este indicador por lo que es de gran importancia; sin la correcta técnica la vitalidad espermática del semen no se refleja con el número ya que el tiempo de vida hace que este parámetro reduzca el espacio temporal para realizar el conteo (Łukaszewicz et al., 2020).

### **2.11.4 Viabilidad espermática**

La prueba hipo osmótica conocida como HOST (hypo – osmotic swelling test), es una prueba seminal que tiene como objetivo evaluar la vitalidad funcional de la membrana plasmática, ocasionando un desequilibrio osmótico

entre el medio extracelular e intracelular, debido a esta condición la célula trata de equilibrarse difundiendo agua al compartimiento intracelular, el método de Host posibilita predecir el porcentaje de la capacidad fecundante del espermatozoide, la lectura de la muestra se realiza con el lente de 40 X, observándose cambios morfológicos en los flagelos como el enrollamiento de la cola y la dilatación por el aumento del volumen debido a la circulación de agua en la región intracelular, en los espermatozoides inertes la prueba de Host no ocasionara ningún efecto, debido a que esta solución hipotónica no ingresara al interior del espermatozoide (Rubio et al., 2009).

## CAPITULO 3

### 3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1 Ubicación de la zona del estudio

El presente estudio se realizó en los laboratorios de fitopatología de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, ubicada en la provincia del Azuay, Cantón Cuenca, parroquia Machángara a una altitud de 2.550 m.s.n.m. con una temperatura anual de 12°, en la Panamericana Norte km 2 ½ *Figura N°. 5*.



*Figura N°. 5 Ubicación de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias*

**Fuente:** (Google Mapas, 2020).

#### 3.2 Área de estudio

Sector urbano en la provincia del Azuay en la parroquia Machángara, en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca.

#### 3.3 Universo de estudio

El presente estudio que evaluó la calidad seminal, la criopreservación a base de glicerol al 8% de 9 gallos criollos de diferentes biotipos (Guaricos, Cubanos y Barbones), con edad de entre 6 a 12 meses y un peso promedio de 2,5 kg, con un período de adiestramiento de 30 días para posteriormente realizar la extracción y valoración seminal. Los gallos seleccionados para la investigación

se seleccionaron por su calidad rústica, su excelente adaptación al entorno y su alto valor nutricional.

### **3.4 Materiales**

#### **3.4.1 Materiales biológicos**

- 9 gallos criollos
- Balanceado WAYNE
- Agua
- Personal
- Agua bidestilada

#### **3.4.2 Materiales físicos**

- Pipetas de 10 y 20  $\mu$ l
- Jaula de madera con malla de 150 cm x 150 cm.
- Bebederos plásticos
- Comederos plásticos
- Tubos falcon 15 ml
- Baño maría
- Microscopio
- Placas portaobjetos y cubreobjetos
- Guantes de látex
- Jeringas de insulina
- Gradillas de plástico
- Refrigerador
- Marcador permanente
- Pajuelas de 0,25 ml
- Mandil
- Mascarillas
- Cuaderno de apuntes
- Refrigeradora
- Termo de nitrógeno

#### **3.4.3 Químicos**

- Nitrógeno líquido

- Glicerol
- Suero fisiológico
- Diluyente Lake – Ravie
- Alcohol polivinílico
- Host
- Eosina/nigrosina

### 3.5 Alojamiento y alimentación

Los gallos se alojaron en jaulas cúbicas de 50x50x45 en cubos de madera con malla individualmente para cada especie, con una alimentación a base de granos de origen natural de maíz, trigo y un producto comercial (WAYNE) a voluntad con los siguientes valores nutricionales:

*Cuadro N°. 2 Características nutricionales de los balanceados de la marca comercial WAYNE.*

Composición declarada	% Mínimo	% Máximo
Proteína cruda	18.00	21.00
Grasa cruda	4.00	8.00
Fibra cruda		4.00
Humedad		13.00
Cenizas		10.00

Fuente: Etiqueta de balanceados WAYNE.

### 3.6 Procedimiento

#### 3.6.1 Procedimiento del semen en el laboratorio

A partir de la obtención del semen aviar, se realizó una disolución 1:1 con el diluyente Lake-Ravie, para enfriar la muestra hasta los 5°C a razón de 1°C/minuto en los laboratorios de fitopatología de la Universidad Católica de Cuenca. Posteriormente se tomó una muestra para analizar la motilidad masal, motilidad progresiva individual, vitalidad espermática y funcionalidad de la membrana espermática.

Las muestras diluidas se llevaron a una concentración de  $1200 \times 10^6$  cel/mL, para ser añadido Glicerol al 8%, manteniendo en temperatura de equilibrio a 5°C por 10 minutos. Las muestras son cargadas en las pajuelas (debidamente rotuladas) de 0,25 mL para ser selladas con alcohol polivinílico.

Seguidamente se colocaron las muestras en una gradilla en la zona alta por 4 minutos, para ser descendido de piso a razón de 1 minuto y finalmente se coloca el nitrógeno líquido, para ser transportadas las muestras al termo.

### 3.6.2 Congelación de las muestras

La congelación de la muestra se realizó en una caja de poliestireno (de 31x31x30.3 cm), mediante la colocación de rampas, siendo la primera a 17 cm de la superficie del nitrógeno líquido por cuatro minutos. Posteriormente se baja a la segunda rampa a 1 cm de la superficie durante 1 minuto y finalmente se sumerge en nitrógeno líquido (se coloca una caja de 3,4 litros que equivale a una altura de 4 cm del piso).

### 3.6.3 Descongelación del semen

Las pajuelas para descongelar se sumergieron en agua destilada a temperatura de 5°C, por 3 minutos para realizar el análisis de la evaluación del semen.

## 3.7 Características microscópicas

### 3.7.1 Motilidad masal

La determinación de la motilidad masal, se realizó mediante la obtención de 3 µl de semen antes y después de la congelación y se colocó en un portaobjetos para ser observado en un microscopio con aumento a 40X. La evaluación se realizó mediante una escala de 0 a 5 con los siguientes parámetros:

*Cuadro N°. 3 Escala de evaluación de la motilidad masal de los espermatozoides*

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas densas de movimientos muy rápidos.
4	Buena	Ondas y remolinos vigorosos, pero no muy rápidos.

3	Regular	Ondas de movimiento lento.
2	Pobre	No aparecen ondas, pero se ven movimientos espermáticos.
1	Muy pobre	Muy pocos movimientos.
0	Muertos	Sin movimientos.

Fuente: (Cajo & Ulcuango, 2020).

### 3.7.2 Motilidad individual progresiva

Para la evaluación de la motilidad individual progresiva debemos tomar una muestra de 3 µl semen antes y después de la congelación, el semen se diluyo 1:1 con Lake – Ravie y colocamos en un portaobjetos, la muestra se observará al microscopio con un objetivo de 40 X. Su valoración fue de manera subjetiva y utilizando la siguiente tabla con una escala de 0 – 5 es decir (0% – 100%);

Cuadro N°. 4 Escala de evaluación de la motilidad individual progresiva de los espermatozoides

Valor	Porcentaje	Clase	Descripción
5	100%	Muy buena	Con movimiento progresivo rectilíneo muy rápido.
4	80%	Buena	Con movimiento progresivo rápido.
3	60%	Regular	Con movimiento progresivo lento y ondulatorio.
2	40%	Pobre	Movimientos anormales, en ocasiones progresivo.
1	20%	Muy pobre	Girando entre sí, sin movimiento progresivo.
0	0%	Muertos	Inmóviles o muertos.

Fuente: (Cajo & Ulcuango, 2020)

### 3.7.3 Determinación de la vitalidad espermática

La determinación de la vitalidad espermática se realizó mediante el método de Host, que consta en analizar la funcionalidad de la membrana plasmática que determina el daño provocado de la membrana y la evaluación integral de acrosoma por tinción. Además, permite percibir subjetivamente la capacidad fecundante del espermatozoide, mediante el cambio presentado en la cola del espermatozoide por hinchazón y permite comparar los espermatozoides vivos y muertos.

- **Elaboración y evaluación de la prueba de Host**

Para la elaboración de la prueba de Host se empleó 1 mg de fructosa y 0,5 mg de citrato de potasio en 10 mL de agua BID estilada; mientras que para la evaluación de la vitalidad espermática de la membrana citoplasmática se realizó con 10  $\mu$ l de la prueba de Host con 10  $\mu$ l de semen, para ser incubado la mezcla a baño maría por 45 – 60 minutos. Posteriormente se extrajo 20  $\mu$ l de la muestra y se colocó en un portaobjetos por 5 minutos para el conteo de espermatozoides positivos y negativos en el microscopio con aumento 40X en 2 o más campos del portaobjetos.

#### **3.7.4 Vitalidad espermática**

La preparación de la tinción de eosina nigrosina se realizó con la solución de nigrosina al 10% y eosina al 2% en 100 ml de cloruro de sodio al 0,9%. Se diluyó completamente hasta que no se encuentre grumos para filtrar. Se mezcló 0.3  $\mu$ l de semen con 0.3  $\mu$ l de la tinción eosina para ser colocado en un portaobjetos. Una vez secado la muestra se procede al conteo de espermatozoides vivos y muertos, donde los espermatozoides vivos presentan una tonalidad blanca sin la coloración de la tinción eosina nigrosina y los espermatozoides muertos presentan una coloración rosada.

El porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se realizó un conteo de varios campos hasta la obtención de 100 células.

### **3.8 Variables**

#### **3.8.1 Variables dependientes**

- Motilidad masal: escala
- Motilidad progresiva individual: %
- Vitalidad espermática: %
- Viabilidad (funcionalidad de la membrana HOST): %

#### **3.8.2 Variables independientes**

- Biotipos de gallos: guarico, cubano, barbón.

### 3.9 Diseño experimental

Se aplicará el modelo estadístico de diseño completamente al azar (DBA), agrupando los animales por líneas, contando con cinco repeticiones por cada línea, cada repetición cuenta con 45 tomas.

*Cuadro N°. 5 Diseño experimental*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sig.
Tratamientos (gallos)	9-1	
Repeticiones	5	
Total	45-1	
Error	36	

**Fuente:** Elaborado por el autor

## CAPITULO 4

### 4. RESULTADOS

*Cuadro N°. 6 Motilidad masal pre y post congelamiento*

	Pre - congelamiento			Post - congelamiento			Significancia Individual
	n	Medias	D.E.	n	Medias	D.E.	
<b>Barbones</b>	3	4,00	0,71	3	2,33	0,58	0,014
<b>Cubanos</b>	3	5,00	0,00	3	3,67	0,58	0,015
<b>Guaricos</b>	3	4,00	0,00	3	1,67	0,58	0,001
Sig. Pre y Post				0,001			

La comparación general de la motilidad masal antes y después de la congelación representada en el *Cuadro N°. 6* expresa diferencias significativas entre los momentos ( $p=0,001$ ). Al realizar el análisis individual entre los biotipos todos presentaron diferencias antes y después del procedimiento ( $p<0,05$ ). La motilidad basal baja significativamente después del congelamiento obteniendo valores inferiores a la mitad de los originales.

*Cuadro N°. 7 Motilidad Progresiva pre y post – congelamiento*

	Pre -congelamiento			Post - congelamiento			Significancia Individual
	n	Medias	D.E.	n	Medias	D.E.	
<b>Barbones</b>	3	3,00	0,71	3	2,00	0,58	0,140
<b>Cubanos</b>	3	4,00	0,00	3	2,00	0,58	0,032
<b>Guaricos</b>	3	3,00	0,00	3	1,33	0,58	0,001
Sig. Pre y Post				0,001			

La comparación general de la motilidad progresiva antes y después de la congelación representada en el *Cuadro N°. 7*, expresa diferencias significativas entre los momentos ( $p=0,001$ ). Al hacer el análisis individual entre los biotipos cubanos y Guaricos presentaron diferencias antes y después del procedimiento ( $p<0,05$ ). La motilidad basal baja significativamente después del congelamiento obteniendo valores inferiores a la mitad de los originales. En cuanto a los biotipos barbones la motilidad progresiva no presenta diferencias significativas ( $p=0,140$ ).

*Cuadro N°. 8 Vitalidad pre y post – congelamiento*

	Pre - congelamiento			Post - congelamiento			Significancia Individual
	n	Medias	D.E.	n	Medias	D.E.	
Barbones	3	91%	2%	3	40%	2%	0,001
Cubanos	3	92%	2%	3	42%	2%	0,001
Guaricos	3	88%	4%	3	23%	4%	0,001
<b>Sig. Pre y Post</b>	0,001						

La comparación general de la vitalidad espermática (tinción Eosina - Nigrosina) antes y después de la congelación representada en el *Cuadro N°. 8*, expresa diferencias significativas entre los momentos ( $p=0,001$ ). Al realizar el análisis individual entre los biotipos todos presentaron diferencias antes y después del procedimiento ( $p<0,001$ ). La vitalidad espermática disminuye significativamente después del congelamiento obteniendo valores inferiores a la mitad de los originales. Estos valores son altamente significativos.

*Cuadro N°. 9 Funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) pre y post – congelamiento*

	Pre - congelamiento			Post - congelamiento			Significancia Individual
	n	Medias	D.E.	n	Medias	D.E.	
<b>Barbones</b>	3	74%	9%	3	37%	3%	0,001
<b>Cubanos</b>	3	75%	8%	3	38%	1%	0,001
<b>Guaricos</b>	3	72%	9%	3	19%	4%	0,001
Sig. Pre y Post	0,001						

La comparación general de la funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) antes y después de la congelación representada en el *Cuadro N°. 9*, expresa diferencias significativas entre los momentos ( $p=0,001$ ). Al hacer el análisis individual entre los biotipos todos presentaron diferencias antes y después del procedimiento ( $p<0,001$ ). La viabilidad espermática disminuye significativamente después del congelamiento obteniendo valores inferiores a la mitad de los originales. Estos valores son altamente significativos.

*Cuadro N°. 10 Análisis ADEVA entre biotipos para motilidad masal, motilidad progresiva, vitalidad y viabilidad espermática.*

<b>Biotipo</b>	<b>Momento</b>	<b>Masal</b>	<b>Progresividad</b>	<b>Vitalidad</b>	<b>Funcionalidad</b>
<b>Barbones</b>	Pre	4(+/-0,71) <sup>a</sup>	3(+/-0,71) <sup>ab</sup>	91%(+/-2%) <sup>a</sup>	74%(+/-9%) <sup>a</sup>
	Post	2,33(+/-0,58) <sup>xy</sup>	2(+/-0) <sup>x</sup>	40%(+/-2%) <sup>x</sup>	37%(+/-3%) <sup>x</sup>
<b>Cubanos</b>	Pre	5(+/-0,00) <sup>a</sup>	4(+/-0) <sup>b</sup>	92%(+/-2%) <sup>a</sup>	75%(+/-8%) <sup>a</sup>
	Post	3,67(+/-0,58) <sup>x</sup>	2(+/-0,58) <sup>x</sup>	42%(+/-2%) <sup>x</sup>	38%(+/-1%) <sup>x</sup>
<b>Guaricos</b>	Pre	4(+/-0,00) <sup>b</sup>	3(+/-0,58) <sup>b</sup>	88%(+/-4%) <sup>a</sup>	72%(+/-9%) <sup>a</sup>
	Post	1,67(+/-0,58) <sup>y</sup>	1,33(+/-0,58) <sup>y</sup>	23%(+/-4%) <sup>y</sup>	19%(+/-4%) <sup>y</sup>
<b>p=</b>	Pre	0,03	0,001	0,203	0,885
<b>p=</b>	Post	0,001	0,007	0,001	0,004

\*a,b,c diferencias pre congelamiento; \*\* x,y,z diferencias post congelamiento

Al analizar los biotipos y su calidad seminal pre congelamiento se observa diferencias estadísticas ( $p \leq 0,05$ ) entre motilidad masal y progresiva a favor de los biotipos cubanos y Barbones para ambos casos, siendo los biotipos cubanos estadísticamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) a los Guaricos. Estos valores se reflejan en el *Cuadro N°. 10*. El mismo análisis realizado post – congelamiento refleja la misma tendencia, siendo los Guaricos inferiores ( $p \leq 0,05$ ) para las mismas variables.

El análisis de varianza individual de los biotipos pre – congelamiento no se observa diferencias estadísticas ( $p \geq 0,05$ ) entre vitalidad espermática. En lo que se refiere a la funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) existen diferencias ( $p \leq 0,05$ ) a favor de los biotipos cubanos y barbones sobre los guaricos en la etapa de descongelación.

## CAPÍTULO 5

### 5.1 DISCUSIÓN

En datos preliminares de valoración de calidad del semen pre – congelamiento y post – congelamiento de gallos criollos con glicerol al 8%, demuestran que, el proceso de congelación y descongelación afecta la motilidad masal y progresiva individual observándose los valores de 4 (+/-0,71) frente al valor de 2,33 (+/-0,58) para la motilidad masal, y 3(+/-0,71) frente al valor de 2(+/-0) de motilidad individual progresiva, considerándose que, la especie cubana en valores descritos pre – congelamiento y post – congelamiento obtuvieron un mayor resultado frente a los biotipos barbones y guaricos, esto podría deberse a los cambios bruscos de temperatura, sumisión a tensiones osmóticas y tóxicas debido a la exposición de las concentraciones de los crioprotectores ya que reduce la vida útil del espermatozoide (Barbas & Mascarenhas, 2009). Un estudio realizado en la provincia de Chimborazo por Tene, (2014), con semen fresco obtuvieron valores superiores a los nuestros en la variable motilidad masal con un 4,73% , esto puede deberse al empleo de bioestimulantes en la dieta de las aves durante el periodo de estudio. Los resultados de motilidad progresiva que corresponden a nuestra investigación con glicerol al 8%, el biotipo cubano obtuvo un valor de 5 y 4 para las especies guaricos, barbones en la escala que fue considerada por el movimiento de las ondas de la cola. A disimilitud de estos resultados (Duchi et al., 2009) y (Tomas et al., 2013), utilizaron concentraciones de glicerol del 8 % al 10,83%, y Lake – Ravie como diluyente, obteniendo valores de motilidad masal del  $60,3\% \pm 2,2\%$ , y motilidad progresiva del 48,6% en semen fresco con una dilución de Lake – Ravie en proporción 1:1, dichos resultados se podrían elucidar debido al empleo de distintas líneas de aves, los factores ambientales y nutricionales al que fueron sometidas las aves, logrando interferir de manera indudable en los resultados finales. Como conclusión estos autores aclaran que estos datos pueden ser eficientes para la crioconservación, pero se deberán acrecentar los efectos de congelación y descongelación para lograr una mayor eficiencia.

En la cuantificación de vitalidad espermática por el método de Eosina Nigrosina y la valoración de la funcionalidad de la membrana plasmática

mediante el método de HOST, se observa claramente que la especie cubana predomina sobre los biotipos barbón y guarico en los parámetros de calidad espermática en semen fresco y descongelado. En la prueba de funcionalidad de la membrana plasmática después de haber realizado la incubación en un medio hiposmótico (HOST), obtuvimos valores superiores al 70% en semen fresco en los 3 biotipos de gallos criollos en estudio, pero la funcionalidad de la membrana plasmática en semen descongelado se redujo al 30% esto podría asumirse a la variabilidad de temperatura, y a la exposición a crioprotectores ya que estos disminuyen la vida útil de los espermatozoides (Barbas & Mascarenhas, 2009), la investigación realizada por (Jiménez, 2013), determinó que la viabilidad espermática aparentemente no disminuye conforme la edad aumenta de los gallos, debido a que los espermatozoides que continúan viables conservan su capacidad fecundante (Sánchez & Zamora, 2016), otro factor que puede interferir es el conteo, ya que los espermatozoides son enumerados al azar lo que puede elevar el porcentaje de este indicador espermático (Rubio et al., 2009). Cajo & Ulcuango, (2020), evaluaron la vitalidad espermática, en donde los valores obtenidos son inferiores a la cantidad de espermatozoide muertos en nuestro estudio con un 8 % en la etapa de pre – congelación, nuestros valores difieren con el estudio realizado , debido a que obtuvimos un 10 % de espermatozoides muertos en semen fresco, la mortalidad espermática se da por los siguientes factores como temperatura, edad, estado fisiológico y método de recolección de semen (Jiménez, 2013), explica que el método de recolección de semen, aumenta la mortalidad hasta en un 20%. Otro factor es la temperatura ya que el aumento de esta afecta la espermatogénesis, debido a la ubicación de los testículos, el biotipo de gallos y el fotoperiodo. La frecuencia de recolección de semen y los daños técnicos que se pueden causar durante el manejo de las muestras en el laboratorio interfieren en la vitalidad de los espermatozoides (Rubio et al., 2009). Pudiendo ser este uno de los factores determinantes en la variabilidad de resultados.

Los presentes resultados muestran que los espermatozoides al realizar los protocolos de congelación y descongelación de semen crio conservado con el glicerol al 8%, sufrieron efectos significativos en cuanto a la calidad y cinética espermática (vitalidad, viabilidad).

---

## CAPÍTULO 6

### 6.1 CONCLUSIONES

La evaluación de la crioconservación espermática de las tres líneas de gallos criollos reflejó que la aplicación de glicerol al 8%, es una técnica suficiente para conservar el semen de aves de corral con base en la viabilidad espermática.

La variabilidad de las 3 líneas de gallos criollos pre – crioconservados de la presente investigación indica que la mejor calidad (5 = muy buena) corresponde para el gallo criollo Cubano con características de semen blanco lechoso, además que su motilidad masal, se calificó con un valor de 4, por los movimientos superiores de los espermias, por lo tanto, esta línea de gallo alberga una mejor respuesta al adiestramiento previo a la criopreservación.

El análisis de la variabilidad espermática relaciona las siguientes variables: el volumen y concentración de semen no presentan diferencias significativas en cuanto al biotopo, la concentración espermática incrementa en función al tiempo lo que induce a una mejor calidad de material genético, el método de Eosina Nigrosina fue la técnica que no consiguió valores significativos relevantes y el método Host obtuvo rangos de importancia para las líneas de gallos probando ser una técnica de respuesta para las variables estudiadas.

Se establece que el método de criopreservación como alternativa para la conservación es el método de HOST, ya que evalúa significativamente antes y después del procedimiento de crioconservación permitiendo ser una estrategia óptima para incrementar la productividad en gallos criollos por su alta capacidad de segregar los espermias vivos y/o muertos, en lo que concierne al mejoramiento genético esta técnica permite mantener en buen estado la membrana de las células lo que es un indicador para preservar el semen y poder utilizarlo para la reproducción asistida.

## CAPÍTULO 7

### 7.1 RECOMENDACIONES

El previo adiestramiento del masaje torso-abdominal a los gallos es un factor fundamental para poder obtener una excelente eyaculación y obtener volúmenes mínimos a 100 $\mu$ l.

Es recomendado reducir en lo posible los cambios bruscos de temperatura ya que, ocasionan estrés al gallo y por ende afectan a la cantidad y calidad espermática, por lo tanto, puede transmitirse enfermedades que afecten el muestreo.

Se recomienda usar otros diluyentes como crioprotectores para comparar la efectividad como el diluyente Lake – Ravie, esto debido a la dificultad que existe para conseguir estos reactivos dentro de nuestro país.

Para este tipo de investigaciones se sugiere emplear gallos lo más jóvenes posible, para tener la certeza que lograremos coleccionar 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., Castaño, C., Toledano, A., Estesó, M. C., López, A., Campo, J. L., & Santiago, J. (2015). Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in domestic Animals*, 135-141. Retrieved from doi: 10.1111/rda.12464
- Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7((4)), 659-668.
- Angarita, A., & Castrillón, F. (2020). *Producción agroecológica de gallinas criollas*. Bogotá D.C., Colombia: Corporación Universitaria Minuto de Dios. Retrieved from <https://repository.uniminuto.edu/handle/10656/10871>
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Akhter, S., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (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.
- Balogun, A. S., Narang, R., Cheema, R. S., Kumar, A., Singh, N., & Vijaysingh, M. (2020). Comparison of conventional and automated freezing methods on PB2 rooster semen cryopreserved with glycelo and dimethylsulfoxide tris coconut-water extender. *Bulletin of the National Research Centre*, 1-8.
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopresertvation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 10, 49-62.
- Barreda, J. L. (2017). *Efecto de la suplementación alimenticia en la fertilidad de alpacas machos y hembras por inseminación artificial*. Puno, Perú: Universidad Nacional del Altiplano.
- Blanch, E., Tomás, C., Casares, L., Gómez, E. A., Sansano, S., Giménez, I., & Mocé, E. (2014). Development of methods for cryopreservation of rooster sper from the endangered breed "Gallina Valenciana de Chulilla" using low glycerol concetrations. *Theriogenology*, 1174-1180.
- Blanch, E., Tomás, C., Sansano, S., Gómez, E. A., Casares, L., Giménez, I., & Mocé, E. (2011). Calidad in vitro del semen crioconsvrado de gallos de a raza gallina valenciana de Chulilla. Resultados preliminares. *XIV Jornadas sobre Producción Animal*, 407-409.
- Blanch, J. M. (2014). Calidad de vida laboral en hospitales y universidades mercantilizados. *Papeles del psicólogo*, 35((1)), 40-47.
- Blesbois, E., & Brillard, J. P. (2007). Specific feactures of in vitro and in vitro sperm storage in birds. *Animal*, 1((10)), 1472-1481.
- Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F., Mignon-Grasteau, S., Saint Jalme, M., & Mialon-Richard, M. M. (2008). Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*, 69((2)), 252-261.
- Cajo, W. B., & Ulcuango, J. E. (2020). *Evaluación de la calidad seminal de tres fenotipos de gallos criollos bajo un sistema de alimentación de maíz y pastoreo en el CIPCA*. Puyo, Ecuador: Universidad Estatal Amazónica. Obtenido de <https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/609>
- Castaño, C., Romo, S., Toledano, A., Gil, M. G., Estesó, M. C., López, A., & Santiago, J. (2017). Influencia racial y del plasma seminal en la criopreservación de semen de gallos. *XVII Jornadas sobre Producción Animal*, 411-413. Retrieved from [https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2017/comunicaciones/2017\\_Rep\\_23.pdf](https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2017/comunicaciones/2017_Rep_23.pdf)

- Duchi, N. D., Ramón, B. P., & Remacha, A. P. (2008). Criopreservación de semen de gallo: Una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza murciana. *In VII Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). Bullas, Murcia*, 1-5. Obtenido de [https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae\\_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPREDSERVACION.pdf](https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPREDSERVACION.pdf)
- Duchi, N., Almela, L., Peinado, B., & Poto, A. (2009). Extracción y valoración de la calidad de semen del palomo deportivo murciano (Columba Livia). *Archivos de Zootecnia*, Vol. 58(Num. 1), 537-540. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49515040015>
- Enríquez, M. R. (2015). *Evaluación de dos sistemas de alimentación de tres tipos de alimentos en aves de traspatio Caupichi III, Pichincha 2015*. Quito, Ecuador: Universidad central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6538>
- Fujihara, N., & Howarth, J. B. (1978). Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. *Poultry science*, 57(6), 1766-1768.
- Garza, R. P., Salas, M. P., & Escobar, M. A. (2014). Gallinas criollas y guajolotes nativos de México; características y sistemas de producción. *Instituto de Estudios Indígenas, Universidad Autónoma de Chiapas*. Obtenido de <https://biblat.unam.mx/hevila/Agroproductividad/2015/vol8/no4/5.pdf>
- Getachew, t. (2016). A review Article of Artificial insemination in Poultry. *Wold's Veterinary Journal*, 6(1), 42-51. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/312274825\\_A\\_Review\\_Article\\_of\\_Artificial\\_Insemination\\_in\\_Poultry](https://www.researchgate.net/publication/312274825_A_Review_Article_of_Artificial_Insemination_in_Poultry)
- González, O. A. (2019). *Comparación de dos técnicas de obtención de eyaculado en Gallus gallus domesticus*. Ciudad Juárez, Chihuahua: Universidad Autónoma de Ciudad Juarez. Obtenido de <http://erecursos.uacj.mx/handle/20.500.11961/5634>
- González. (2019). *Comparación de dos técnicas de obtención de eyacuado en Gallus Gallus domesticu*. (Tesis masteral), Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez, Júparez, Mexico.
- González, J. A., Ávalos, A., Martínez, J. A., Rosales, A. M., & Herrera, J. A. (2019). Sperm Morphophysiology in Different Sections of the Rooster Reproductive Tract. *International Journal of Morphology*, 37(3), 861-866.
- Hammerstedt, R. H., & Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*(1), 26-38.
- Herrera, J. A. (2005). *Criopreservación y evaluación fisiológica y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves*. México DF: Universidad Autónoma Metropolitana. Obtenido de <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=12026&docs=UAMI12026.PDF>
- Inyawilert, W., Rungruangsak, J., Chanthi, S., Liao, Y., Phinyo, M., Tang, P. C., & Nfor, O. N. (2019). Age-related difference changes semen quiality and eminal plasma protein patterns of Thai native rooster. *International of Agricultural Technology*, 15(2), 287-296.
- Jiménez, S. (2013). *Efecto de la edad del gallo sobre la calidad del semen*. Tarimbaro, Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolár. Obtenido de [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB\\_UMICH/1873](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1873)
- Juárez, C., Jiménez, A., Gutiérrez, E., & Segura, J. (2018). Effect of the age on semen quality of rhode island red roosters. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal*, 11-18.

- Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/240380958\\_Effect\\_of\\_age\\_on\\_semen\\_quality\\_in\\_naked\\_neck\\_and\\_dwarf\\_chicken\\_under\\_tropical\\_climatic\\_conditions](https://www.researchgate.net/publication/240380958_Effect_of_age_on_semen_quality_in_naked_neck_and_dwarf_chicken_under_tropical_climatic_conditions)
- Lake, P. E., Ravie, O., & McAdam, J. (1981). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *British Poultry Science*, 22((1)), 71-77.
- Long, J. A. (2006). Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science*, 85, 232-236.
- Long, J. A. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges?. *Poultry science*, 85(2), 232-236.
- López, F. (2007). *Influencia de la edad de los progenitores sobre la calidad espermática y tasa de fertilidad en aves Rhode Island Red*. Morella, Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de HI.
- Martínez, E. (2016). *Caracterización morfológica de la gallina de campo de la región interandina del Ecuador*. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Obtenido de <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/7167>
- Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., & Graham, J. K. (2010). Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 57-66.
- Moreno, J. S., & Lucero, D. A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 18-38. Obtenido de <http://revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/116/111>
- Mphaphathi, M. L., Luseba, D., Sutherland, B., & Nedambale, T. (2012). Comparison of slow freezing and vitrification methods for Venda cockerel's spermatozoa. 2((3)).
- Mphaphathi, M. L., Seshoka, M. M., Luseba, D., Sutherland, B., & Nedambale, T. L. (2016). The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(2), 132-139.
- Nguyen, T., Duittoz, A., Praud, C., Combarous, Y., & Blesbois, E. (2016). History og artificial insemination in poultry, its components and significance. *Worlds Pult. Sci. Assoc*, 1902-1920.
- Okoro, V., Nwokeocha, A., Ijezie, C., Mbajjorgu, C., & Mbajjorgu, E. (2016). Effect of varying dietary supplemental inclusion levels of onion and garlic on semen quality characteristics of Hubbard White breeder broiler cocks aged 35-41 weeks old. *Indian Journal of Animal Research*, 922-929.
- Paniagua, C. G., Ortiz, S. M., & Aguilar, M. (2011). Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México. *Hidribiológica*, Vol. 21(Num. 3), 415-429. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972011000300014](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972011000300014)
- Parks, J. E., & Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29((2)), 255-266.
- Partyka, A., Lukaszewicz, E., & Niżański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77((8)), 1497-1504.
- Peters, S. O., Shoyebo, O. D., Illori, B. M., Ozoje, M. O., Ikeobi, C. O., & Adebambo, O. A. (2008). Semen Quiality Trails of Seven of Chikens Raises in the Humid Tropics. *International*

- Journal of Poultry Science* 7, 7((10)), 949-953. Retrieved from <https://scialert.net/abstract/?doi=ijps.2008.949.953>
- Purdy, P. H., Song, Y., Silversides, F. G., & Blackburn, H. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry science*, 88((10)), 2184-2191.
- Salas, M. J., Sánchez, M. R., Rodríguez, J. C., Aparicio, Y. V., & Correa, J. S. (2009). Indicadores productivos de gallinas criollas en un sistema de producción avícola alternativo en Oaxaca México. *Archivos de Zootecnia*, 309-317. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/495/49521504.pdf>
- Sanmartin, L. (2014). *Diagnostico de los sistemas de crianza y caracterización morfológica de la gallina criolla (Gallus domesticus) en el cantón Zapotillo provincia de Loja*. Loja, Ecuador: Universidad de Loja. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/12120>
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M. A., López-Sebastián, A., Prieto, M. T., & Campo, J. L. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry science*, 90((9)), 2047-2053.
- Surai, P. E., & Speake, B. K. (1998). Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *The journal of nutritional biochemistry*, 9((11)), 645-651.
- Tarif, A. M., Bhuiyan, M. M., Ferdousy, R. N., Juyena, N. S., & Mollah, M. B. (2013). Evaluation of semen quality among four chicken lines. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 6((5)), 07-13.
- Tene, J. R. (2014). *Utilización de bioestimulantes en la producción de semen de gallos e inseminación artificial en gallinas criollas*. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3806>
- Toalombo, P. A. (2020). *Caracterización morfológica, productiva y genética de la gallina criolla del Ecuador*. Córdoba, Argentina: Universidad de Córdoba. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=265106>
- Tomás, C., Blanch, E., Casares, L., Gómez, E. A., Sansano, S., Giménez, I., & Mocé, E. (2013). Efecto de la concentración de glicerol y de la tasa de dilución sobre la calidad In Vitro y la capacidad fecundante del semen crioconservado de gallos de raza gallina valenciana de Chulilla. *XV Jornadas sobre Producción Animal*, 425-427. Retrieved from [https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013\\_Rep\\_37.pdf](https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013_Rep_37.pdf)
- Torres, Y. (2017). *Caracterización fenotípica y morfológica de una población autóctona de la gallina criolla (Gallus domesticus L.) cantón Pichincha provincia de Manabí*. Quevedo, Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Obtenido de <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/2031>
- Trujillo, O. V. (2019). *Caracterización de la crianza de gallinas criollas (Gallus gallus) en unidades familiares del distrito Mariano dámaso Beraun*. Tingo María, Perú: Universidad Nacional Agraria de la Selva. Obtenido de <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1509>
- Ubah, S., Muhammad, S., Obudu, C., & Ogunbodede, M. (2017). Semen quality of cockerel breeders *Gallus domesticus* in two climates in Nigeria. *Biomedical Science*, 21-27.
- Vargas, O. N. (2016). *Avicultura*. Machala, Ecuador: Universidad Técnica de Machala. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6846>

- Villacís, G., Escudero, G., Cueva, F., & Luzuriaga, A. (2016). Características morfométricas de las gallinas criollas de comunidades rurales del sur del Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, Vol. 27(Num. 2), 218-224. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11639>
- Villaverde, S. (2017). *Obtención, almacenamiento y morfología de espermatozoides aviares: aplicación para la caracterización y criopreservación de espermatozoides de especies silvestres*. Madrid, España: Universidad Computense de Madrid. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=127967>
- Viquez, L., Barquero, V., Soler, C., Roldan, E., & Valverde, A. (2020). Kinematic sub-populations in bull spermatozoa: A comparison of classical and bayesian approaches. *Biology*, 138.
- Woelders, H., Zuidberg, C. A., & Hiemstra, S. J. (2006). Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poultry science*, 85((2)), 216-222.
- Zambrano, C. A. (2020). *Valoración de tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos de riña*. Riobamba, Ecuador: Escuela Politécnica de Chimborazo. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/14229>

## XII. ANEXOS

### *Anexo N°. 1 Materiales de laboratorio*



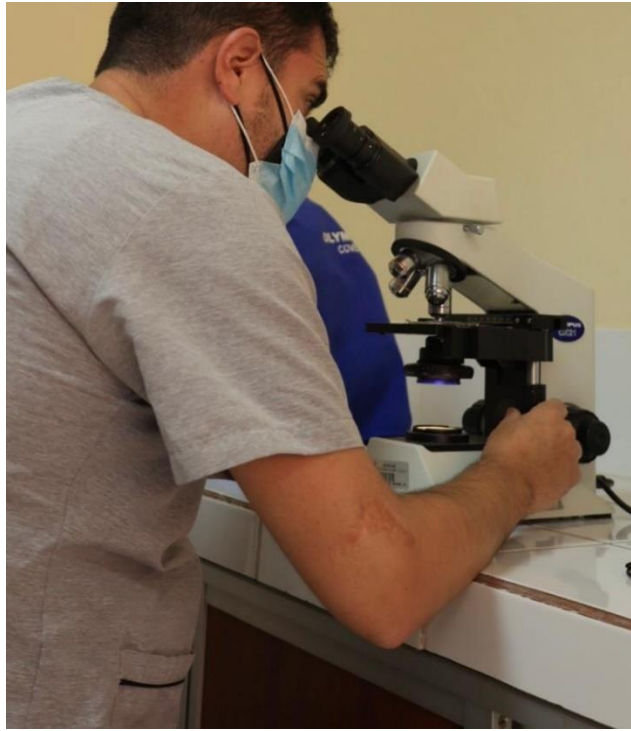
### *Anexo N°. 2 Incubación de las muestras*



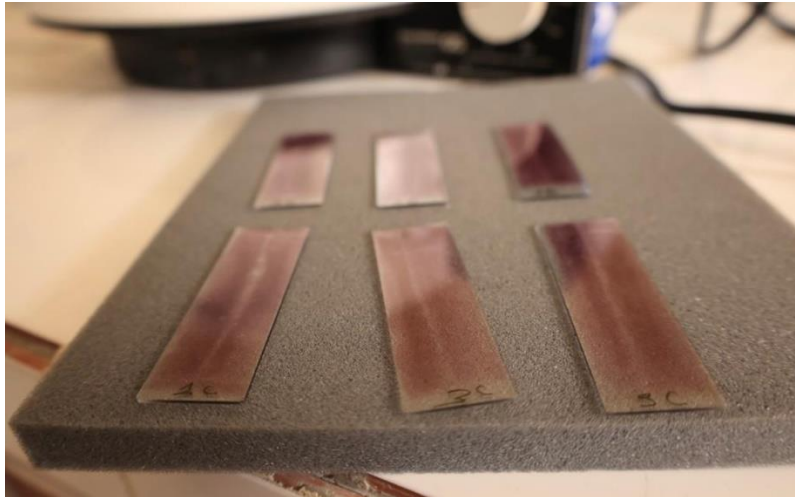
### *Anexo N°. 3 Proceso de crioconservación*

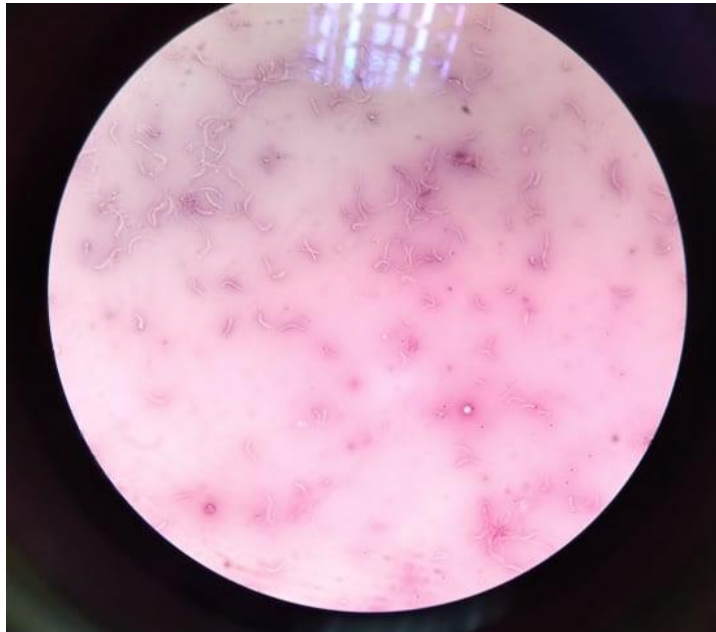


*Anexo N°. 4 Observación de las muestras*

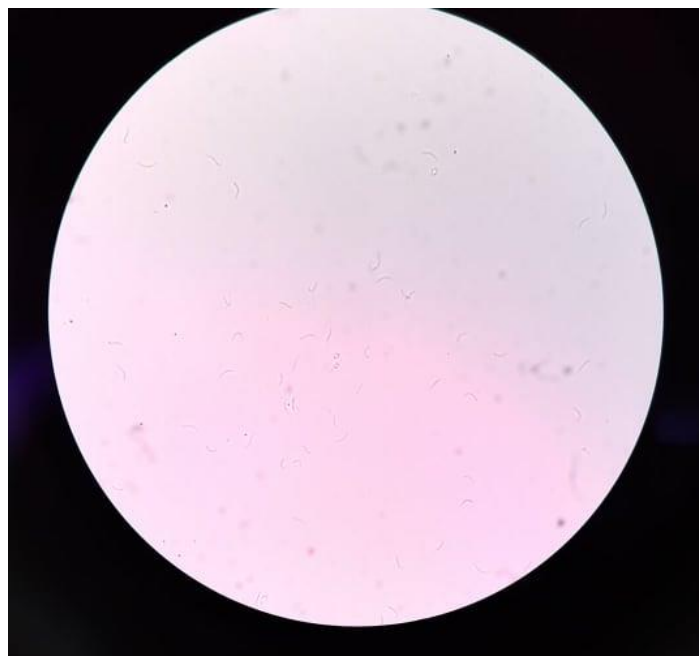


*Anexo N°. 5 Método eosina – nigrosina*






Anexo N°. 6 Prueba de funcionalidad de la membrana espermática HOST



*Anexo N°. 7 . Autorización de publicación en el repositorio institucional*

 <b>Universidad Católica de Cuenca</b>	<b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	CÓDIGO: F – DB – 30 VERSIÓN: 01 FECHA: 2021-04-15 Página 1 de 1
---	--	--

**Oscar Fernando Vásquez Paredes** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0302691977**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “ **EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA EN LÍNEAS DE GALLOS CRIOLLOS CON GLICEROL AL 8%, COMO ALTERNATIVA PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO**”, 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 este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 22 de octubre de 2021



Oscar Fernando Vásquez Paredes

**C.I. 0302691977**

