



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 FERTILIDAD DE GALLINAS
CRIOLLAS INSEMINADAS CON ESPERMA DE GALLO
CRIOPRESERVADO CON 8% DE GLICEROL**

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICA
VETERINARIA**

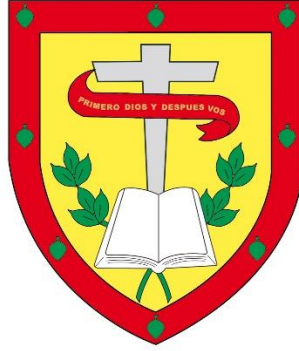
AUTOR: ALEXANDRA FABIANA NOVILLO CORONADO

DIRECTOR: Dr. ANDRÉS MOSCOSO PIEDRA MSC.

CUENCA – ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD DE GALLINAS CRIOLLAS
INSEMINADAS CON ESPERMA DE GALLO CRIOPRESERVADO CON 8%
DE GLICEROL**

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICINA
VETERINARIA**

AUTOR: ALEXANDRA FABIANA NOVILLO CORONADO

DIRECTOR: Dr. ANDRÉS MOSCOSO PIEDRA MSC.

CUENCA – ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

I. DECLARACIÓN

Alexandra Fabiana Novillo Coronado portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0302200266**. Declaro ser el autor de la obra: “**Evaluación de la fertilidad de gallinas criollas inseminadas con espermatozoides de gallo criopreservado con 8% de glicerol**”, 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 abril de 2021**



F:

Alexandra Fabiana Novillo Coronado

C.I. 0302200266

II. CERTIFICACIÓN

Por medio Certifico del presente, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Alexandra Fabiana Novillo Coronado, bajo mi supervisión.



Dr. Andrés Moscoso Piedra Msc

DIRECTOR

III. DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón mi trabajo de grado a mis padres, Julia Coronado y Fabia-n Novillo, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad y que me han apoyado incondicionalmente en el transcurso de mi carrera.

A mis amadas hijas Camila León y Zoé Tenezaca por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día y poder darles un futuro mejor, a mi novio Cristian Tenezaca que ha estado a mi lado ayudándome, brindándome su cariño y apoyándome.

IV. AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis al Dr. Andrés Moscoso Piedra por compartirme sus conocimientos y apoyarme en el desarrollo de este proyecto, a la Universidad Católica de Cuenca por abrirme las puertas y poderme formar como una profesional. A mis profesores y personas que me ayudaron como el Dr. Andrés Galarza Lucero y al Ing. Manuel Maldonado.

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.....	vii
V. LISTA DE CUADROS.....	vii
VI. LISTA DE ANEXOS.....	viii
I. RESUMEN.....	1
I. ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1.....	3
1.1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.3. ANTECEDENTES.....	5
1.4. OBJETIVOS.....	6
1.4.1. OBJETIVO GENERAL.....	6
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
1.5. HIPÓTESIS.....	7
1.6. JUSTIFICACIÓN.....	8
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
2.1. Reproducción aviar.....	9
2.2. Generalidades de la gallina criolla.....	10
2.3. Semen aviar.....	11

2.4. Evaluación de la calidad del semen	12
2.5. Duración del almacenamiento de esperma	13
2.6. Criopreservación	13
2.8 Diluyentes	14
2.1. Inseminación artificial	15
2.2. Periodo fértil.....	16
2.8 Incubación	17
2.10 Temperatura.....	18
CAPITULO 3	19
3.1. METODOLOGÍA.....	19
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.2.2 Materiales químicos.....	20
3.2.3 Materiales biológicos	21
3.3 TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	21
3.4 ESTADISTICA	23
3.5 Identificación de las gallinas criollas	23
3.6 Preparación y recolección de la muestra de los donantes	24
3.7 Proceso para la dilución de la muestra.....	24
3.8 Cálculo de la muestra.....	25
3.9 Criopreservación	26
3.10 Congelación de la muestra.....	26
3.11 Descongelación de las muestras para la IA.....	26
3.12 Preparación de las gallinas para la IA.....	28
3.13 Proceso de la inseminación artificial	28
3.5 Recolección de los huevos	29
3.6 Porcentaje de incubabilidad	29

CAPITULO 4.	30
4.1 RESULTADOS	30
4.2 Parámetros de recolección de huevos	31
4.3 Desempeño de fertilidad	33
4.3 Desempeño de eclosión	36
CAPITULO 5	39
5.1. DISCUSIÓN.....	39
5.2 CONCLUSIONES.....	40
5.3 RECOMENDACIONES.....	41
II. BIBLIOGRAFÍA.....	43
III. ANEXOS.....	47

VI. LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Parametros de recoleccion de huevos T0. Fresco.....	32
Fig 2. Parametros de recoleccion de huevos T. Criopreservado	32
Fig 3. Desempeño de fertilidad	35
Fig 4. Desempeño de eclosión	38

V. LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Taxonomía de la gallina criolla.....	10
Cuadro 2. Esquema del experimento para la IA.	21
Cuadro 3. Cantidad de spz para cada gallina.	25
Cuadro 4. Cantidad de diluyente para eliminar el Gly.....	26
Cuadro 5. Parametros de recoleccion de huevos en la IA del semen fresco.....	29
Cuadro 6. Parametros de recoleccion de huevos en la IA del semen congelado	30
Cuadro 7. Fertilidad e incubabilidad de los huevos	31
Cuadro 8. Peso total de los pollos de cada uno de los tratamientos	34

VI. LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Selección de las gallinas	55
Anexo 2. División de las gallinas	55
Anexo 3. Extracción del semen	56
Anexo 4. Evaluación del semen.....	56
Anexo 5. Elección de las pajuelas	57
Anexo 6. Descongelación de las pajuelas.....	57
Anexo 7. Descongelación del diluyente Lake-Ravie 84	58
Anexo 8. Eliminación del glicerol	58
Anexo 9. Centrifuga de las muestras	59
Anexo 10. Extracción del glicerol sobrante	59
Anexo 11. Inseminación artificial.....	60
Anexo 12. Programación de la incubadora	61
Anexo 13. Colocación de los huevos	62
Anexo 13. Ovoscopia 18 días	63
Anexo 13. Muerte embrionaria	64
Anexo 13. peso de pollitos	65

I. Resumen

La inseminación artificial (IA) ha sido comprobada como la técnica de mejoramiento genético que permite lograr a partir de esperma crioconservado, mejores resultados que el apareamiento natural. En el caso de las aves para lograr buenos resultados en la criopreservación espermática se requiere de un diluyente y un crioprotector que facilite su manejo y almacenamiento. El estudio comparó la fertilidad del semen fresco frente al semen crio conservado con glicerol al 8%, para lo cual se inseminaron durante 4 días seguidos un total de 20 gallinas criollas de 7 meses de edad con 200 millones de espermatozoides de gallos finos de pelea. Para el estudio de fertilidad se evaluó a los huevos puestos en los 15 días posteriores a la inseminación, mediante un examen al trasluz en los días 7, 14 y 18, donde se obtuvo 8 huevos/gallina y una fertilidad de 87,18% para el semen fresco frente a 6 huevos/gallina y una fertilidad de 79,41% para el crio conservado, siendo los valores de inseminación con semen fresco superiores ($P < 0,05$) comparada con el crio conservado. El peso de eclosión de las crías de semen fresco fue aritméticamente superior (45,1g) frente a las de semen crioconservado (43,6g). En conclusión, la IA con la adición de glicerol al 8% es una alternativa para la criopreservación y almacenamiento de espermatozoides es útil para formar un banco de semen, mejorar o preservar la especie aviar.

Palabras clave: *Gallinas criollas, fertilidad, inseminación artificial, criopreservación.*

I. Abstract

Artificial insemination (AI) has been proven as the genetic improvement technique that allows achieving better results from cryopreserved sperm than natural mating. In the case of poultry, good results in sperm cryopreservation require a diluent and a cryoprotectant to facilitate handling and storage. The study compared the fertility of fresh semen versus cryopreserved semen with 8% glycerol, for which a total of 20 Creole hens of 7 months of age were inseminated for 4 consecutive days with 200 million spermatozoa from fine fighting cocks. For the fertility study, the eggs laid 15 days after insemination were evaluated by candling on days 7, 14 and 18, where 8 eggs/hen and a fertility of 87.18% were obtained for the fresh semen compared to 6 eggs/hen and a fertility of 79.41% for the preserved cryo, being the insemination values with fresh semen superior ($P < 0.05$) compared to the preserved cryo. The hatching weight of offspring from fresh semen was arithmetically higher (45.1g) compared to those from cryopreserved semen (43.6g). In conclusion, AI with the addition of 8% glycerol is an alternative for cryopreservation and storage of spermatozoa is useful for forming a semen bank, improving or preserving the avian species.

Keywords: *Creole hens, fertility, artificial insemination, cryopreservation*

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

El uso de las tecnologías de la inseminación (IA) en explotación avícola ha permitido la rápida propagación del material genético, desde un porcentaje pequeño de machos superiores a un porcentaje mayor de hembras. La IA puede lograr una excelente fertilidad en las aves de corral en comparación con la monta natural. La aplicación exitosa de esta técnica requiere semen de buena calidad, el cual se debe de inseminar cerca de los túbulos de almacenamiento de esperma en la hembra para lograr una fertilidad óptima (Mohan et al, 2018).

En la industria de la cría y producción de aves de corral, la tecnología de IA se emplea ampliamente para lograr una mayor eficiencia reproductiva. En una bandada de reproductores el uso de un solo macho es responsable de fertilizar a decenas de hembras, la fertilidad del macho es uno de los primeros factores limitantes para lograr el mayor porcentaje de incubación posible (Estienne et al, 2020).

Para la conservación del semen de una especie de ave particular es específico mantener la calidad del semen en el congelado y descongelado, además un extensor adecuado es crucial para la capacidad de fertilidad de los espermatozoides después de la descongelación. Un extensor ideal debería ser capaz proporcionar energía para el metabolismo de los espermatozoides, mantener el pH, la osmolalidad y debería ser capaz de mantener la viabilidad y funcionalidad de las células como es el caso del diluyente Lakeravie (Thananurak et al, 2020).

En los últimos 15 años se han realizado varios estudios para mejorar los métodos de conservación del potencial reproductivo del esperma de aves después de la congelación-descongelación. Se sabe que la criopreservación es muy estresante para los espermatozoides que comparten una función muy específica como es la de fertilización. Durante el proceso de criopreservación del semen de aves de corral incluidos los procedimientos de enfriamiento y descongelación los choques osmóticos y térmicos pueden causar daño en la estructura y el metabolismo de las células (Thelie et al, 2019). Es por ende que se definirán las mejores condiciones de congelación para evitar daños celulares y preservar la capacidad de fertilización

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aumento constante de la población mundial y la creciente demanda relacionada de productos de origen animal, incluidas las aves de corral, requieren el desarrollo de soluciones modernas para aumentar la eficiencia de la producción y reducir sus costos. En el caso de la reproducción de las aves de corral, la inseminación artificial (IA) permite disminuir el número de machos en el lote. El semen destinado a la inseminación artificial debe ser de muy buena calidad entre otros de origen genético (Lukaszewic, et al, 2020).

La inseminación artificial en las aves de corral es más beneficiosa en comparación con el apareamiento natural ya que aumentan la proporción de apareamiento, normalmente un gallo puede aparearse con seis a diez gallinas sin embargo con la IA podría multiplicarse por cuatro (Purdy et al, 2009). En los machos mayores se tiene un desempeño sobresaliente utilizado durante algunas generaciones mientras que en el apareamiento natural su vida útil es limitada, aun si el gallo tuviese una lesión se puede usar para la inseminación (Moreno & Blesbois, 2020). En las aves muchas veces existe una especie de discriminación de color ya que algunas aves de corral no se aparean con un macho de otro color a menos que hayan sido criados juntos (Asmarawati et al, 2019).

En algunas razas de pollos autóctonos se encuentran con frecuencia gallos con defectos de reproducción, afectando la baja fertilidad en las gallinas y algunas de ellas la extinción de la raza. (Moreno & Blesbois, 2020). La motilidad de los espermatozoides contribuye en gran medida a una fertilización exitosa, alrededor del 8 al 12% de los gallos reproductores son diagnosticados con baja motilidad espermática. A pesar de esto durante mucho tiempo el potencial de reproducción de los criaderos de pollos indígenas machos no ha recibido tanta atención como el potencial de reproducción de las hembras, cuya eficiencia reproductiva tiene un efecto de beneficio económico más directo y aparente (Thananurak et a, 2020). En algunas practicas la IA en la parvada parental se utiliza la combinación de semen congelado de múltiples razas de gallos lo que puede ignorar aún más la variación individual en la calidad del semen y la capacidad de fertilidad (Sol et al, 2019).

1.3. ANTECEDENTES

En el Ecuador la avicultura es una actividad de suma importancia por el aporte de la economía familiar y por ser un significativo recurso zoogenético del país durante los últimos 30 años. El estudio de la gallina criolla favorece a la subsistencia de los recursos genéticos avícolas, la sustitución de las razas autóctonas por las razas comerciales establece una amenaza real a los recursos genéticos avícolas mundiales (Villacís et al, 2018).

La Inseminación Artificial (IA) y la crío preservación del semen ha revolucionado el campo de la cría de animales, tanto en los países desarrollados como en desarrollo, al mejorar el potencial genético del ganado y las aves de corral minimizan los costos de gestión y mantienen el servicio de machos genéticamente superiores incluso después de su muerte (Asmarawati et al, 2019).

La primera IA exitosa es para Spallanzani y Bonnet en 1784 quienes lo hicieron en un canino que resulto en el nacimiento de tres cachorros después de 62 días de gestación, esta técnica se utilizó con éxito por primera vez en ave hace casi un siglo cuando Ivanov en 1907 produjo huevos de gallina fértiles utilizando semen recuperado de los conductos deferentes del gallo. Sin embargo, el crecimiento fenomenal de la IA en las aves, comenzó en 1935 cuando investigadores de los Estados Unidos aprendieron técnicas para obtener semen de aves macho. Quinn y Burrows fueron los dos pioneros que informaron por primera vez sobre la técnica actual de inseminación intravaginal, los avances recientes en ciencia y tecnología, la IA está desempeñando un papel importante en la mejora de la producción avícola en muchos países (Dhama et al, 2014).

En los últimos años la producción de aves de calidad criados a partir de algunas razas autóctonas se ha expandido debido a las necesidades del mercado, con el fin de crear bancos de criopreservación de semen para resguardar las características propias de cada raza (Thananurak et a, 2020). En 1975 el Instituto Nacional de investigación, tecnología agraria y alimentaria (INIA), creo un programa de conservación in vivo para preservar la raza española (Moreno et al, 2011). Actualmente existen solo 4 bancos de semen de gallos en el mundo (Sol et al, 2019).

En base a lo expuesto anteriormente planteó los siguientes objetivos

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la fertilidad en gallinas criollas inseminadas con espermatozoides de gallo de pelea, criopreservados con 8% de glicerol.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar las características cinéticas de los espermatozoides de gallos antes (fresco) y la criopreservación.
- Cuantificar la fecundidad de huevos y nacimiento de polluelos en gallinas criollas inseminadas artificialmente con espermatozoides de gallo criopreservados al 8% de glicerol en comparación de espermatozoides frescos.
- Relacionar la fertilidad de las gallinas con el semen fresco en relación con el semen de gallo congelado/descongelado después de la inseminación Artificial.

1.5. HIPÓTESIS

Hi: El porcentaje de fertilidad en gallinas criollas utilizando semen descongelado con glicerol al 8% como crioprotector serán estadísticamente similar a los resultados por inseminación artificial con semen fresco.

1.6. JUSTIFICACIÓN

La infertilidad es uno de los principales problemas en la cría de aves con aproximadamente el 30% de los problemas relacionados con los machos, la producción exitosa de aves depende de la fertilidad y el rendimiento reproductivo del gallo, que está determinada en gran medida por la calidad del semen que producen (Uzochukwu et al, 2019). Las tecnologías de reproducción asistida como la inseminación artificial y la criopreservación de semen juegan un papel muy importante en la preservación y transfusión de genes valiosos a las generaciones futuras, ayudando a conservar y propagar especies en peligro de extinción que no se reproducen en cautiverio (Eslami et al, 2016). La IA es una de las técnicas más eficaces y ampliamente utilizadas para la mejora genética de los animales de granja, garantizar la prevención de enfermedades, altas tasas de fertilidad y por razones económicas. Sin embargo, el éxito de la criopreservación del semen depende directamente de la técnica para congelar y los criopreservantes que se utilicen (Feyisa et al, 2018).

En la criopreservación los espermatozoides de gallos típicamente sobreviven muy bien a la motilidad evaluada inmediatamente después de la descongelación, el crioprotector que se usa típicamente es el glicerol el cual causa menos toxicidad y ayuda a preservar la estructural de las células espermáticas, pero se debe eliminar antes de la inseminación intravaginal porque es anticonceptivo (Purdy et al, 2009).

Actualmente un programa de conservación de razas autoctonas como el proyecto RZ-2009-CO2 del INIA, a logrado disminuir amenazas de índole sanitario como es el caso de la gripe aviar, a pesar de ellos la criopreservación de semen a nivel internacional es muy escasa debido a un estricto criterio de la selección de gallos donantes, a las pocas investigaciones que se han realizado para garantizar la fertilidad en las gallinas y a los crioprotectores que se han utilizado (Moreno et al, 2011). Es importante desarrollar un sistema eficiente de conservación del semen para mantener la capacidad fertilizante del semen almacenado, es necesario diluir los espermatozoides para limitar el gasto excesivo con el fin de retener posteriormente el metabolismo y la capacidad de fusión de gametos como es el caso del diluyente Lake-Ravie 84, el cual ha presentado niveles superiores en motilidad progresiva post-descongelamiento (Eslami et al, 2016).

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1. REPRODUCCIÓN AVIAR

La mejora en los sistemas se ha visto acompañada por un incremento en el rendimiento de las aves, ya que los genetistas han tomado los mejores rasgos de las diversas razas puras para producir el híbrido que lleva dominando el mercado los últimos 30 años. Las aves representan una clase animal con un proceso reproductivo muy determinado, son especies ovíparas con gónadas internas y gametogénesis realizadas a una temperatura corporal elevada de 40-42 °C. comparten un sistema muy complejo de fertilización interna que implica el almacenamiento de espermatozoides en túbulos de almacenamiento de espermatozoides específicos del tracto femenino y la fertilización poliespérmica del gran ovocito *telolecithe*. El macho es el sexo homogamético que suele producir en una espermatogénesis rápida, un elevado número de espermatozoides en muy pequeños volúmenes de semen y la maduración post-gonádica de los espermatozoides a menudo no parece tan clara (Moreno & Blesbois, 2020).

Una de las características más notables de la reproducción aviar es la capacidad de almacenar espermatozoides a temperatura corporal es decir a 41 °C durante periodos prolongados de tiempo en túbulos de almacenamiento de esperma (SST) que son principalmente ubicados en la unión útero-vagina (UVJ). Sin embargo, el mecanismo subyacente al almacenamiento de espermatozoides en el SST es en gran parte desconocido porque estos eventos están completamente ocultos debajo del musculo liso opaco y grueso del tracto reproductivo femenino. Antes de estar en la SST los espermatozoides evacuados se seleccionan en la vagina porque solo del 1 al 2% de los espermatozoides inseminados entran en la SST, probablemente debido a la eyección de los espermatozoides atares de la defecación femenina. La vagina se considera una barrera importante para los espermatozoides en términos de fertilización exitosa (Matsuzaki et al, 2021).

Para la conservación y mejora genética de una especie, el número efectivo de reproductores forman un factor limitante en todo programa de conservación, como las gallinas en las que el apareamiento el número de machos es menor que el de

hembras, aumentarlo significa un mayor gasto económico. Para ello se deriva el interés en la congelación del semen para disponer de un banco de material genético en conservación y reducir la población de gallos, a la vez evitar pérdidas accidentales de excelentes reproductores, un ahorro económico y una garantía para el mantenimiento de variabilidad genética (Fontgibell & Francesch, 1998).

2.2. GENERALIDADES DE LA GALLINA CRIOLLA

Más de 80% de las familias rurales de los países en desarrollo, mantienen gallinas en las huertas de sus casas en las que se destacan las estirpes criollas, conservadas por campesinos, tanto por la necesidad de generar ingresos, obtener productos proteicos de alto valor biológico o por simple tradición cultural (Tovar et al, 2015).

Las gallinas criollas comprenden una gran variedad de biotipos de diferentes colores de las plumas y rasgos morfológicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el territorio nacional. Están presumiblemente adaptadas a las condiciones locales, como resultado de la selección natural por casi 500 años, el conocimiento del comportamiento productivo de estas aves podría conducir a la caracterización y mejorar la genética de las gallinas criollas (Segura et al , 2007).

La taxonomía de la gallina criolla se encuentra descrita en el siguiente cuadro.

Cuadro 1: Taxonomía de la gallina criolla

REINO	ANIMAL
Tipo:	Cordado
Subtipo:	Vertebrado
Clase:	Aves
Subclase:	<i>Neornites</i>
Superorden:	<i>Neognatos</i>
Orden:	<i>Gallinacea</i>
Suborden:	<i>Galli</i>
Familia:	<i>Phasianidae</i>

Genero: *Gallus*

Especie *Domesticus*

2.3. SEMEN AVIAR

La fertilidad masculina depende del funcionamiento óptico de todos los procesos necesarios para que los espermatozoides fertilicen el ovocito. La capacidad fertilizante de los spz depende del correcto desarrollo y maduración de las células espermáticas, incluidas la adquisición de motilidad, integridad estructural, viabilidad y su capacidad para penetrar en el ovocito (Vitorin, et al, 2021). En comparación con otras especies, los espermatozoides aviares se hacen más susceptibles al crio daño celular, lo que disminuye drásticamente su capacidad fertilizante ya que posee una forma fusiforme con muy bajos contenidos citoplasmáticos y un flagelo muy largo que los hacen altamente susceptibles a crio lesiones durante la congelación o descongelación, comprometiendo la fluidez y la permeabilidad de las membranas, el metabolismo de los espermatozoides, la motilidad, la integridad del ADN y la capacidad de fertilización (Bernal et al, 2020).

El potencial de fertilidad de los espermatozoides descongelados no es deseable debido a la baja movilidad y viabilidad de los espermatozoides de gallos después de la congelación-descongelación (Dhama et al, 2014). Este obstáculo está relacionado principalmente con varios daños causados durante la crio preservación como las alteraciones mecánicas, bioquímicas y ultraestructurales de los espermatozoides que afectan negativamente la calidad de los espermatozoides y el potencial de fertilidad del semen congelado (Feyzi et al, 2018).

2.3.1. Biología del semen

Los espermatozoides de aves son células delgadas y largas con una cabeza que contiene un genoma altamente condensado en el núcleo, un pequeño acrosoma que contiene una serie de enzimas necesarias para la fertilización y *perforatorium vestigial*. Una lámina mitocondrial que rodea a los centriolos proximales y distales que se

prolongan en un flagelo largo para garantizar que la motilidad de los espermatozoides siga esta cabeza (Vitorino et al, 2021). El número de mitocondrias es extremadamente variable según la especie, una mediana de 30 en pollos y pavos y hasta 1000 en algunas codornices.

El semen de las aves suele tener una concentración de esperma excepcionalmente alta con relativamente poco plasma seminal. Los componentes del plasma seminal de gallo se derivan de los conductos eferentes proximales, el epidídimo y el conducto deferente, incluida una dilatación terminal (*receptáculo del conducto deferente*) que ingresa a la cloaca través de un conducto eyaculatorio denominado conducto deferente de la papila. Las aves muestran una duración media de espermatogénesis de 13 días en el pollo, seguido de 1 día de tránsito de espermatozoides en los conductos extra testiculares, el tiempo de supervivencia de los espermatozoides en los conductos deferentes es mayor o menor a 7 días (Moreno & Blesbois, 2020).

2.3.2. Evaluación de la calidad del semen

La selección de machos para la reproducción es de gran importancia para una explotación avícola y es de carácter obligatorio monitorear los rasgos de la calidad del semen de una manera rutinaria para evaluar su capacidad reproductiva (Vitorino et al, 2021). La evaluación de los rasgos de la capacidad y calidad del semen de fertilización se puede realizar utilizando diferentes opciones, como el análisis del porcentaje de espermatozoides vivos, muertos y la evaluación morfológica. Las técnicas de tinción estándar utilizadas para la evaluación de la calidad del semen y los espermatozoides suelen ser inapropiadas para el reconocimiento de anomalías en las estructuras morfológicas de los espermatozoides (Tesfay et al, 2020).

La mala calidad del semen puede aumentar el costo de tener gallos púberes adicionales para garantizar que haya suficientes criadores masculinos calificados para la IA (Sol et al, 2019).

2.3.3. Duración del almacenamiento de esperma

La duración del almacenamiento del esperma es una característica biológica interesante que se observa en muchas aves hembras. En las gallinas, los túbulos de almacenamiento de esperma que se dispersan en los pliegues mucosos de la unión útero vaginal en el oviducto son el sitio principal para el almacenamiento de esperma. Después de la IA, los espermatozoides viajan desde la vagina y entran a los túbulos de almacenamiento de esperma en donde aparecerán como paquetes empaquetados con la cabeza dirigida hacia el extremo tubular ciego y se mantendrán hasta semanas (Moreno & Blesbois, 2020). Los espermatozoides contienen ADN muy compacto con transcripción inactivada, la regulación de la función de los espermatozoides depende en gran medida de su entorno extracelular (Yang et al, 2020).

2.3.4. Criopreservación

La criopreservación de semen es una técnica eficaz e importante que se utiliza para mantener la variabilidad genética de las poblaciones de aves, especialmente en el caso de poblaciones en riesgo y especies de gran importancia (Mehaisen et al, 2020). Es el método principal de almacenamiento de células reproductoras para la gestión ex situ de la diversidad genética de las aves. La razón principal es que este método no es invasivo y permite almacenar una gran cantidad de células reproductivas sin afectar la salud de los donantes. Los avances recientes en la tecnología de crioconservación para el semen de aves de corral han dado lugar a la aparición de los criobancos, que ahora se están desarrollando en un número creciente de países (Seigneurin et al , 2013).

Durante la criopreservación se han informado algunos cambios desfavorables con respecto a los espermatozoides de aves de corral como el aumento de la peroxidación lipídica, daño estructural a las mitocondrias y al regios acrosómica, cambios en la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática, cantidades marcadas de desnaturalización y los daños del ADN a la cromatina (Moreno & Blesbois, 2020). La adición de antioxidantes como la vitamina E, selenio, cisteína, superóxido dismutasa, L-carnitina, taurina y ácido hialurónico a los diluyentes de congelación contrarresta

estos efectos negativos durante la criopreservación del semen de gallo (Mehaisen et al, 2020)

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 (Rodríguez et al, 2008). La eficacia de un método de congelación suele estimar en términos de variables de espermatozoides congelados/descongelados, como la integridad de la motilidad y la membrana plasmática, sin embargo, las pruebas de fertilidad deben reflejar una tasa de éxito en el proceso de criopreservación son indispensables (Abouelezz et al, 2015).

2.3.5. Diluyentes

Cada diluyente tiene sus propios constituyentes y composición con límites precisos de propiedades físicas que cambian en una secuencia específica con cambios menores en la temperatura y depende de interacciones entre solutos o soluto a solvente, actualmente se utilizan muchos diluyentes para el almacenamiento del semen congelado en aves de corral. Varios estudios han comparado la eficiencia de varios extensores sobre la fertilidad, la evidencia indica que no existen diluyentes específicos para el semen de gallo que resulten en calidades óptimas del semen y tasas de fertilidad (Thananurak et al, 2020).

La determinación de un medio para la dilución de espermatozoides de gallo con el objetivo de criopreservación debe basarse en mantener el equilibrio osmótico y el equilibrio del sistema de enzimas espermáticas (Moreno & Blesbois, 2020). La composición determinará el contenido fisiológico necesario para mantener la actividad vital de los espermatozoides incluido el nivel del pH normal y un indicador de osmolaridad del medio, incluido la función de crioprotectora simultánea (Stanishevskaya et al, 2021).

2.4. GLICEROL COMO CRIOPROTECTOR

El glicerol es uno de los crioprotectores más utilizado para la criopreservación del esperma del gallo porque reduce el daño mecánico durante el proceso de congelación (Abouelezz et al, 2015). A pesar de su alto peso molecular y viscosidad pueden ser citotóxicos, el glicerol puede dañar las células durante el proceso de criopreservación, lo que resulta en una menor fertilidad (Mehdipour et al, 2020). Para prevenir los daños inducidos por la congelación celular se ha usado el glicerol que es el más adecuado para congelar el esperma del gallo; sin embargo, las concentraciones de glicerol se deben reducir por debajo del 1% antes de la inseminación artificial debido a su reconocido efecto anticonceptivo en el oviducto de las gallinas (Mosca et al, 2019).

Un método común de eliminación de glicerol implica la dilución gradual con un medio sin glicerol, centrifugación y resuspensión de los espermatozoides (Kulkarni & Long, 2004). Estos métodos requieren mucho tiempo y disminuyen la fertilidad de los espermatozoides debido al daño osmótico y físico con el procesamiento (Purdy et al, 2009).

2.5. Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) de los animales de granja es muy común en las practicas actuales de crías de animales y en los programas de aves de corral. Se practica especialmente para la cría de caballos, ganado lechero, cerdos, vida silvestre cautiva y aves de corral para obtener y propagar características de un macho a varias progenies (Dhama et al, 2014). Los agricultores han adaptado esta práctica para frenar una fuerte disminución de la fertilidad después de las 45 semanas de edad (Shaheen, et al, 2020).

La IA es la transferencia manual del semen a la vagina de la hembra que consta en la recolección del semen y después se procede a inseminar, en las aves de corral es más beneficiosa en comparación con el apareamiento natural ya que aumentan la proporción de apareamiento, normalmente un gallo puede aparearse con seis a diez gallinas sin embargo con la IA podría multiplicarse por cuatro (Abouelezz et al, 2015). En los machos mayores se tiene un desempeño sobresaliente utilizado durante

algunas generaciones mientras que en el apareamiento natural su vida útil es limitada (Asmarawati et al, 2019).

En el caso de usar la IA, la intervención humana aumenta la complejidad del proceso reproductivo al agregar factores externos como la recolección, procesamiento y almacenamiento de semen, exposición a factores ambientales como temperatura, humedad, polvo, etc (Mosca et al, 2019). Se ha demostrado que algunos de estos componentes genéticos y algunos rasgos relacionados con la calidad del espermatozoide se ha demostrado ser predictivos de la fertilidad masculina y se estima que tiene una mayor heredabilidad que las mediciones directas del desempeño reproductivo (Wolc et al, 2019).

2.6. Periodo fértil

El periodo fértil es un cierto tiempo en el que las gallinas pueden producir huevos fértiles después de ser inseminadas o copuladas, los espermatozoides ingresan al tracto reproductivo de la hembra después del apareamiento natural o artificial, la cual ingresara a los túbulos de almacenamiento del espermatozoide en la unión útero vaginal y se liberara para la fertilización durante el periodo fértil (Mosca et al, 2019). Los espermatozoides pueden sobrevivir durante varios días hasta dentro de unas pocas semanas en los túbulos seminíferos. Algunos investigadores han descubierto que el espermatozoide del gallo puede vivir en el tracto reproductor femenino durante varias semanas, pero la fertilidad de los huevos disminuirá después de algunas semanas (Asmarawati et al, 2019).

Este periodo de fertilidad sostenida se identifica generalmente con la duración de la fertilidad (DF), Los DF largos o cortos se identifican como la frecuencia de la IA porque cualquier reducción en esta frecuencia sin pérdidas de fertilidad reduce directamente el costo de producción de huevos para incubar, por lo que reduce el número de machos reproductores y los costos laborales asociados a la IA (Gu et al, 2019).

2.7. INCUBACIÓN

El periodo de incubación es muy significativo en el ciclo de vida de los pollos y el medio de incubación tiene un resultado perpetuo en la salud y el bienestar de las crías a lo largo de su vida. (Geng et al, 2021) Comienza con el ingreso de huevos fértiles y continua con la posterior transformación biológica en pollitos de 1 día, durante este proceso la incubadora proporciona condiciones óptimas de temperatura, humedad relativa (HR), ventilación y volteo, que favorecen el desarrollo embrionario desde la oviposición hasta la eclosión (Gu et al, 2019).

Los factores previos a la incubación como las condiciones de almacenamiento y la duración, afectan la calidad del huevo (Melo et al, 2021). Sin embargo para proporcionar un entorno de incubación óptimo influye la luz, es un factor ambiental exógeno para controlar muchos de los procesos fisiológicos y de comportamiento. La estimulación de la luz durante la incubación podría afectar la actividad *miogénica* al modular el metabolismo energético e interactuar con las hormonas involucradas en el control del crecimiento (Li et al, 2021).

2.7.1. Almacenamiento de los huevos

El almacenamiento de los huevos para la incubación, ha sido analizada durante los últimos 100 años, al almacenar los huevos en un periodo de tiempo mayor a los 7 días se asocia con una menor incubabilidad y calidad de los pollitos, así como retrasos en el tiempo de eclosión (Melo et al, 2021). Se ha confirmado que varias intervenciones compensan el efecto del almacenamiento prolongado sobre la incubabilidad y la calidad de los pollitos. Una de las opciones que se utilizan para el volteo de los huevos es girarlos por lo menos 4 veces al día para mejorar la incubabilidad (Ozlu et al, 2021).

Los criaderos comerciales requieren de un periodo de varios días de almacenamiento de huevos para obtener una gran cantidad de pollitos que nacen simultáneamente. Emplean algunas prácticas de manejo durante el almacenamiento para reducir los efectos negativos que el almacenamiento tiene sobre el rendimiento de la incubación, como almacenar los huevos con la punta fina hacia abajo, dar vuelta

a los huevos durante el almacenamiento e incubación previa al almacenamiento (Melo et al, 2021).

2.7.2. Temperatura

El periodo de incubación es de gran importancia en el ciclo de vida de los pollos y el entorno de incubación, tiene un efecto duradero en la salud y el bienestar de los pollos a largo de su vida (Li et al, 2021). Estudios recientes han demostrado que la luz de incubación puede afectar la incubabilidad, mejorar el crecimiento embrionario y acortar el tiempo de incubación (Gen et al, 2021).

La temperatura ideal de incubación es de 37.5°C, una transferencia repentina de temperatura de almacenamiento baja alrededor de 15 a 16°C a una temperatura de incubación alta alrededor de 38°C da como resultado la condensación de agua en la superficie de la cascara, que a su vez obstruye los poros y obstaculiza el intercambio de gases esto (Ozlu et al, 2021). Esto sucede porque el aire caliente que contiene una cierta cantidad de humedad se enfría rápidamente alrededor de los huevos más fríos, como el aire frío contiene menos agua que el aire caliente, la humedad relativa aumentara hasta que el aire se sature, después de lo cual se produce la condensación en la superficie fría del huevo. Esto se debe a la temperatura de la cascara que los huevos comenzaran a sudar para una HR del 55% ya en 26.7°C (Damaziak et al, 2021).

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El estudio se realizó en la ciudad de Cuenca, en la Facultad de ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, que se encuentra situada en la panamericana norte km 1.5, una altitud de 2.550 m.s.n.m. El clima andino de 15°C en promedio y la humedad relativa de 77%.

3.2. MATERIALES

3.2.1 Materiales físicos

- 1 microscopio
- 1 cámara de neubauer
- 1 baño maría
- 1 platina térmica
- 1 cámara de neubauer
- 1 centrifuga
- 20 porta y cubre objetos
- 1 gradilla
- 500 tubos falcón con tapa 15 ml
- 500 tubos ependor 1,5 ml
- 100 puntas amarillas 10-200 UL
- 100 puntas azules 100-200 UL
- 30 catéter mariposa
- 50 jeringas de insulina
- 100 pajuelas
- 1 Cooler
- 1 termo de nitrógeno
- 1 pipeta de 10ug hasta 50ug
- 1 pipeta de 100ug hasta 1000ug
- 1 pinza

- 1 vaso de precipitación
- 1 tijera
- 1 termómetro
- 1 funda de algodón
- 1 filipina
- 1 mandil
- 20 gorras quirúrgicas
- 50 guantes
- 1 libreta
- 1 cámara de fotos
- 1 esfero
- 4 marcadores
- 1 linterna
- 1 laptop
- 20 jaulas
- 20 comederos y bebederos para gallinas
- 1 incubadora
- 1 balanza digital
- 1 caballete

3.2.2 Materiales químicos

- Cloruro de sodio 9%
- Gentamicina
- Solución salina
- Diluyente lake ravie 84
- Alcohol polivinílico
- Nitrógeno

3.2.3 Materiales biológicos

- Eyaculado de gallos
- Huevos fértiles de las gallinas criollas
- Gallinas Criollas

3.3 Metodología

En esta investigación se utilizó un diseño DCA obteniendo un total de 40 IA de 10 gallinas criollas en cuatro sesiones (4 IA/ gallina). Cada IA se realizó 2 veces por semana con un lapso de 3-4 días, se dividió en 2 grupos (10 gallinas/ semen fresco) - (10 gallinas/ semen criopreservado). Se realizó un esquema del experimento el cual se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 2: Esquema del experimento para la IA

Tratamiento	Semen fresco	Semen con glicerol al 8%
Aves/ tratamientos	10	10
No. De IA	4	4
Frecuencia de la IA	Cada 3-4 días	Cada 3-4 días
Dosis de la IA	200x10 ⁶ spz	200x10 ⁶ spz

La eyaculación de los 6 gallos se obtuvo por masajes dorso-abdominal en un tubo eppendorf y se adicionó el diluyente Lake-Ravie 84, después de agregar respectivamente el glicerol ya preparado al 8%, se transfirió el semen a pajuelas de 0,25 ml, las cuales se sellaron con alcohol polivinilico y se colocó en la unidad de congelación biológica con diferentes niveles de congelación controladas para sumergirlas en nitrógeno líquido hasta alcanzar una congelación de 7°C y ser transferidas al termo. Para los parámetros seminales se analizó la 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.

La eliminación de glicerol de las pajuelas se extrajo descongelando el diluyente Lake-Ravie 84 a baño maría durante 3 minutos, en un vaso de precipitación de vidrio

con agua a una temperatura de 4 °C se descongeló un total 10 pajuelas, las cuales se cortaron y se transfirieron a un tubo falcón dentro de un cooler con hielo seco.

Cada dosis IA: 200×10^6 /dosis (800×10^6 spz/ml), se necesitó $200 \times 10^6 \times 10$: 4000spz (800×10^6 /ml), usando 1 pajuela c/d x gallina (IA). El semen se diluyó progresivamente 6 veces cada 2 minutos con el Lake-Ravie con agitaciones suaves hasta obtener una dilución final de (1:4) = 8800 μ l. El glicerol se eliminó en una centrifuga a una velocidad de 1900 r.p.m durante 10 minutos.

La IA intravaginal se realizó a 10 gallinas criollas con el semen descongelado y a 10 gallinas criollas con semen fresco, se realizó una limpieza usando cloruro de sodio al 0.9% y gentamicina. Para inseminar se le administro 0.30 ml del semen usando jeringuillas de insulina y catéter mariposa, se introdujo 2 a 3 cm dentro de la vagina. Al introducir los espermatozoides fue preciso ejercer una cierta presión sobre el oviducto, así la vagina se encontró bien distendida y se depositó a lado de los nidos espermáticos.

La recolección de los huevos se realizó diariamente durante 15 días. Las tasas fértiles se determinaron examinando los huevos a trasluz los días 7, 14 y 18 para observar el desarrollo embrionario y poder descartar la mortalidad embrionaria temprana. Los parámetros de rendimiento incluido la producción y peso de los huevos por día de las gallinas se registraron diariamente de los 2 tratamientos para ser ubicados en la incubadora automática ya programada a una temperatura de 30°C y una humedad de 60% durante 21 días. Al eclosionar los huevos, los pollos permanecieron 24 horas dentro de la incubadora para establecer la temperatura corporal y no provocarles un choque térmico, se calificó visiblemente el físico de los pollos y se pesó.

3.4 ESTADISTICA

- Se describió los resultados cualitativos de los huevos recolectados de las 20 gallinas.
- Se utilizó estadística descriptiva y las diferencias se determinaron por una prueba de χ^2
- Por último se hizo un ANOVA entre Tratamientos

A. *Diseño Experimental*

- Se utilizó un DCA.
- Fueron dos Tratamientos: T0. Testigo (Semen Fresco) y T1. IA (Semen Criopreservado)
- Cada gallina se realizó una repetición: 10

Se midió:

- Número de huevos por puesta
- Fecundidad (porcentaje %)
- Nacimientos vivos

3.5. PROCEDIMIENTO

3.5.1. Identificación de las gallinas criollas

Se escogieron 20 gallinas criollas de 7 meses de edad de una misma granja avícola situada en la ciudad de Ambato, se observó su condición corporal, físico y que se encontraran bien de salud, se aclimataron a un nuevo ambiente durante dos semanas para reducir el estrés por el cambio de altitud y latitud que se encontraban anteriormente, se mantuvo el mismo ámbito nutricional con el balanceado de postura 120gr/gallina/día, se dividió y registro a cada gallina en la jaula para tener un control diario de los huevos. En el transcurso de la primera semana se realizó una desparasitación con el objetivo de evitar algún deterioro en su salud el cual afectaría negativamente a la producción de huevos.

3.5.2.Preparación y recolección de la muestra de los donantes

La recolección del semen de los gallos se realizó después de 24 horas en ayuna de alimento sólido y 12 horas sin haber ingerido agua, para evitar cualquier contaminación de heces u orina en las muestras tanto para la IA de semen fresco como para la criopreservación. Se implemento una adecuada limpieza y desinfección de la cloaca usando cloruro de sodio 9% y gentamicina, retirando cualquier rastro de impureza que pudieran contaminar la muestra al momento de la extracción, a cada uno de los gallos se rasuro la zona cloacal para visualizar mejor la eyaculación del semen y evitar algún tipo de contaminación.

El semen se recolectó con la técnica de masaje abdominal, se posiciono el gallo en posición supino ventral sobre un soporte y en seguida se realizó el masaje dorsal con proyección hacia la rabadilla y cola, con el dedo pulgar e índice se masajeo la cloaca hasta proyectar la salida de los cuerpos fállicos consiguiendo así la expulsión del semen, se absorbió con una jeringuilla de insulina para colocarlo en un tubo eppendorf, después de recolectar el semen de todos los gallos se realizó un pool hasta obtener a una cantidad de 600µl y se administró el diluyente Lake-Ravie 84.

3.5.3.Proceso para la dilución de la muestra

De 6 muestras de eyaculado se obtuvo un total de 600 µl y se aumentó 600 µl del diluyente lake-ravie-84, se colocó 10 µl de la muestra en un porta objetos, sobre una platina térmica a una temperatura de 37°C, después se colocó en un microscopio para visualizar con un lente de 40X y analizar la concentración espermática, motilidad, integridad de las membranas y el score.

El total de la muestra tomada fue 1200 µl, se absorbió 5 µl con una pipeta para mezclarlo con 1000 µl de agua más 200 µl de alcohol y causar la muerte prudencial de los espermatozoides, obteniendo 1:200. Se absorbió 10 µl de la mezcla con una pipeta para analizarlo en la cámara de Neubauer y realizar el conteo manual de los espermatozoides de los 5 cuadros, mediante la fórmula siguiente se determinó la concentración espermática:

$$\text{Concentración de spz} = \frac{\text{Número de células} \times 10000}{\text{Numero de cuadros} \times \text{Dilución}}$$

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de espermatozoides de cada pool:

Cuadro 3. concentración de los pools de los gallos

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

3.5.4.Cálculo de la muestra

Para la dilución se realizó en 2 fragmentos:

Fragmento 1 (sin glicerol): Se calculo: {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

Después de realizar el cálculo correspondiente se obtiene un volumen de 1000 μ l, las muestras se transportan a refrigeración a una temperatura de 5°C en un lapso de 30 minutos.

Fragmento 2 (con glicerol): se combina el glicerol más el diluyente Lake-Ravie 84

Cuadro 4. Combinación del glicerol más el diluyente Lake-Ravie 84

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

3.5.5. Criopreservación

Se combino el fragmento 1-2 hasta obtener 2000 μ l con el 8% Glicerol, se dejó reposar durante 10 minutos a una temperatura de 5°C. Se coloco el semen en pajillas de 0,25 ml ya refrigeradas, absorbiendo un extremo de la pajilla con la boca directamente del tubo eppendorf y se selló con el alcohol de polivinilo.

3.5.6. Congelación de la muestra

Se realiza 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

Se utilizó una caja de polietileno con 2 rampas y NL₂, las pajuelas se colocaron en la primera repisa durante 4 minutos y en la segunda repisa durante 1 minuto para ser sumergidas todas las pajuelas a su vez en el NL₂.

3.5.7. Descongelación de las muestras para la IA

Se descongeló el diluyente Lake-Ravie 84 a baño maría durante 3 minutos, se usó un vaso de precipitación de vidrio con agua a una temperatura de 4 °C para descongelar un total 10 pajuelas, de las cuales se cortaron y se transfirieron a un tubo falcón que se encontraba en un cooler con hielo seco.

Para eliminar el Glicerol al 8% se realizó 3 cálculos para la obtención total de la dilución del semen criopreservado para las 10 gallinas a inseminar, adicionando el diluyente Lake-Ravie 84.

Cuadro 5. Cálculo de espermatozoides para la inseminación artificial

Total	10 gallinas
Dosis IA	200 x10 ⁶ spz/ml
Necesitamos	400 millones de spz

Cuadro 6. Dosis de cada pajuela

Cada pajuela contiene	0,25ml
1 pajuela	220 µl (Volumen)
10 pajuelas	1.1 ml

Cuadro 7. Cantidad de diluyente para eliminar el glicerol

Pajuelas		Lake-Ravie
1	1: 0,07	154 μ L
2	1: 0,18	396 μ L
3	1: 0,33	726 μ L
4	1: 0,60	1320 μ L
5	1: 1,24	2728 μ L
6	1: 1,58	3476 μ L

En la *tabla 3* se observa la dilución que se realizó cada 2 minutos que fue administrada con una pipeta en la muestra del tubo falcón. Una vez ejecutado el proceso se colocó en una centrifuga ya programada a 1900 r.p.m durante 10 minutos. Los espermatozoides se por su peso se encontraban en la parte inferior del tubo falcón, con ayuda de una pipeta se absorbió el sobrante del Glicerol dejando únicamente los espermatozoides y se añadió 3ml del diluyente Lake-Ravie 84.

3.5.8.Preparación de las gallinas para la IA

Para la inseminación artificial se realizó antes de las 10am para minimizar el daño de la muestra por las radiaciones solares. El lugar adecuado para evitar estos daños es en un lugar que tenga poca iluminación. Antes de la IA a cada gallina se le depilo la zona cloacal y se realizó una limpieza adecuada usando 200 ml de cloruro de sodio 0.9% y 4 ml de gentamicina, para evitar la contaminación de la muestra.

3.5.9.Proceso de la inseminación artificial

La IA intravaginal se realizó a 10 gallinas criollas con el semen anteriormente descongelado y a 10 gallinas criollas con semen fresco, el cual se realizó la limpieza de cada una de ellas. Para la IA artificial se le administro 0.30 ml de semen usando unas jeringuillas de insulina y un catéter mariposa, que se introduce a una profundidad de 2 a 3 cm en el órgano reproductivo. Al momento de la introducción de los

espermatozoides fue preciso ejercer una cierta presión sobre el oviducto, así la vagina se hallará bien distendida y se deposita a lado de los nidos espermáticos.

3.5.10. Recolección de los huevos

Se recolecto los huevos diariamente durante 15 días, para evitar la contaminación con heces u orina de las gallinas, evitando así la propagación de bacterias al encontrarse en la incubadora automática. Antes del inicio de incubación se identificó con un marcador a cada huevo con el número de tratamiento y el numero de la gallina. Se programó a una temperatura de 30°C y una humedad de 60% durante 21 días, el cual se examinó diariamente a trasluz los huevos para ver el desarrollo embrionario y descartar la mortalidad embrionaria temprana.

3.5.11. Porcentaje de incubabilidad

Se recolectaron huevos de cada tratamiento y se colocó en la incubadora, en los primeros 7 días el embrión ya presentaba movimientos voluntarios. por tal razón se determinaron viables para la eclosión, originando un pollo en condiciones estables. Para su valoración, se utilizó la siguiente formula:

$$Fertilidad (\%) = \frac{\text{Número de pollos por nacer}}{\text{Número de huevos fértiles}} \times 100$$

Después de 2 días de nacimiento de los pollitos, se rompieron los huevos que no eclosionaron, para visualizar los embriones muertos e identificar en que día dejaron de desarrollarse.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS

Las diferencias significativas de los parámetros de las características cinéticas de los espermatozoides frescos y criopreservados en 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 el cuadro 8.

Cuadro 8. Características cinéticas de los espermatozoides de gallos antes (fresco) y criopreservados.

Parámetros cinéticos	TRATAMIENTOS	
	Pre-congelación	Post- descongela- ción
	Fresco	Glicerol 8%
MT (%)	90,0 ± 15,97	68,1 ± 4,61
MP (%)	55,3 ± 10,72	32,0 ± 3,10
VCL (µm/s)NS	75,0 ± 11,36	63,3 ± 3,28
VAP (µm/s)NS	61,3 ± 10,93	51,0 ± 3,16
VSL (µm/s)NS	53,2 ± 10,14	44,8 ± 2,93
STR (%)	80,7 ± 6,36	76,1 ± 1,84
LIN (%)	64,6 ± 6,68	61,7 ± 1,93
WOB (%)	77,4 ± 4,83	74,9 ± 1,39
ALH (µm)	2,3 ± 0,29	2,1 ± 0,08
BCF (Hz)	7,8 ± 4,31	7,1 ± 1,24

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. Una reducción significativa de los porcentajes de MT y MP, fueron evidenciados después de la descongela- ción con el glicerol al 8%, con respecto a la velocidad no hay diferencias significativas.

Existe una disminución ($P < 0,001$) significativa de los parámetros cinéticos (MT, MP) del semen fresco en comparación con las muestras espermáticas criopreservadas con glicerol al 8%. El cual pudo haber afectado al resultado de la fertilidad al momento de realizar la IA.

4.2 PARÁMETROS DE RECOLECCIÓN DE HUEVOS

El número de huevos registrados durante los 15 días que duro la investigación fue 78 huevos del tratamiento T0. Fresco y 68 huevos del tratamiento T1. Criopreservado, dando un total de 146 huevos. El número de aves que se albergaron para cada tratamiento fue de 10 gallinas, en las 4 sesiones de IA que se realizó se registró un promedio de 8 huevos/gallina T0. Fresco y 6 huevo/gallina T1. Criopreservado cómo se indica en el cuadro 9.

Cuadro 9. Parámetros de los huevos recolectados de los tratamientos T0. Fresco y T1. Criopreservado.

		Estadísticos Descriptivos	
		T0 Fresco	T1 Criopreservado
N	Válido	10	10
	Perdidos	1	1
Media		7,80	6,80
Error estándar de la media		,249	,416
Mediana		8,00	6,00
Moda		7,00	6,00
Desv. Desviación		,79	1,31
Varianza		,62	1,73
Rango		2,00	4,00
Mínimo		7,00	5,00
Máximo		9,00	9,00
Suma		78,00	68,00

T0. Fresco; T1. Criopreservado. Total, de los huevos recolectados durante 15 días fue de 146. Fueron 78 huevos (T0. Fresco) y un promedio de 7-8 huevos por gallina. 68 huevos (T1. Criopreservado) y un promedio de 6-7 huevos por gallina, sin observación a tras luz.

La producción de huevos acumulados en las 2 semanas fue bajo debido a la disminución de postura que sufrieron las gallinas, durante el periodo de IA. Estos resultados no evidencian aun el parámetro de fertilidad de los 2 tratamientos, pero nos indican el promedio de huevos total que se registró en el periodo de los 15 días de recolección, como se indican en la Fig. 1.

PRODUCCIÓN DE HUEVOS

■ T0. Fresco ■ T1. Criopreservado ■ Margen diferencial

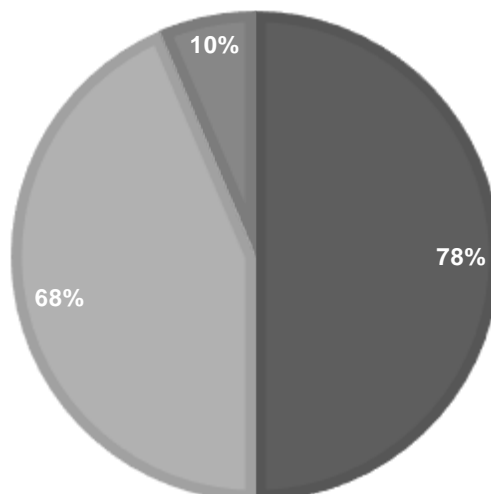


Figura 1.

Se ilustran los resultados de la producción del T0. Fresco y T1 en los 15 días habiendo una diferencia total de 10 huevos. Pero no definirá la comparación de fertilidad.

4.3 DESEMPEÑO DE FERTILIDAD

4.3.1. T0

La incubabilidad del tratamiento T0. Fresco se observa en la (Fig. 2) y refleja el número de huevos recolectados durante el proceso de la investigación vistos a trasluz los días 7, 14 y 18. El porcentaje infertilidad fue el 10%, y el de fertilidad del 87.17%.

Incubabilidad del tratamiento T0. Fresco

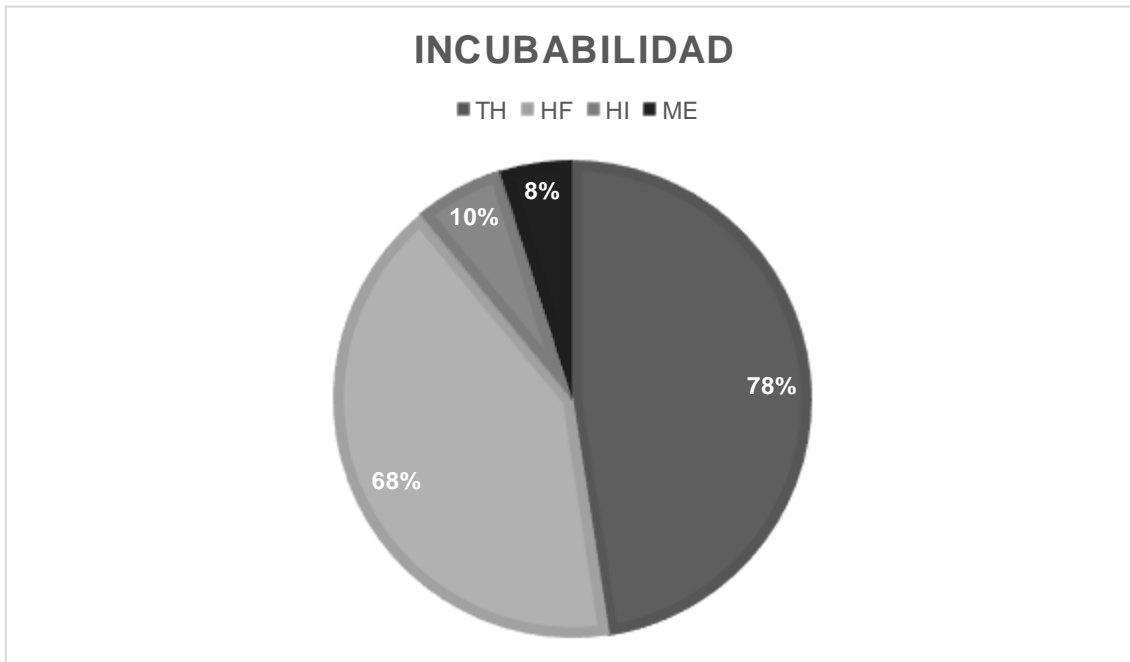


Figura 2.

TH, Total de huevos; HF, Huevos fértiles; H.Inf, huevos infértiles; ME, muerte embrionaria; N, N valido (por lista). Se indica los resultados de los parámetros de las variables. Un total de 78 huevos y el 68% de los huevos lograron tener incubabilidad, mencionando los 8% huevos con muerte embrionaria y los 10% huevos infértiles, hasta el día 18 que se realizó la última ovoscopia.

4.3.2. T1

La incubabilidad del tratamiento T1. Criopreservado se observa en la (Fig. 3) y refleja el número de huevos recolectados durante el proceso de la investigación vistos a trasluz los días 7, 14 y 18. El porcentaje infertilidad fue el 13%, y el de fertilidad del 79.41%.

Incubabilidad del tratamiento T1. Criopreservado

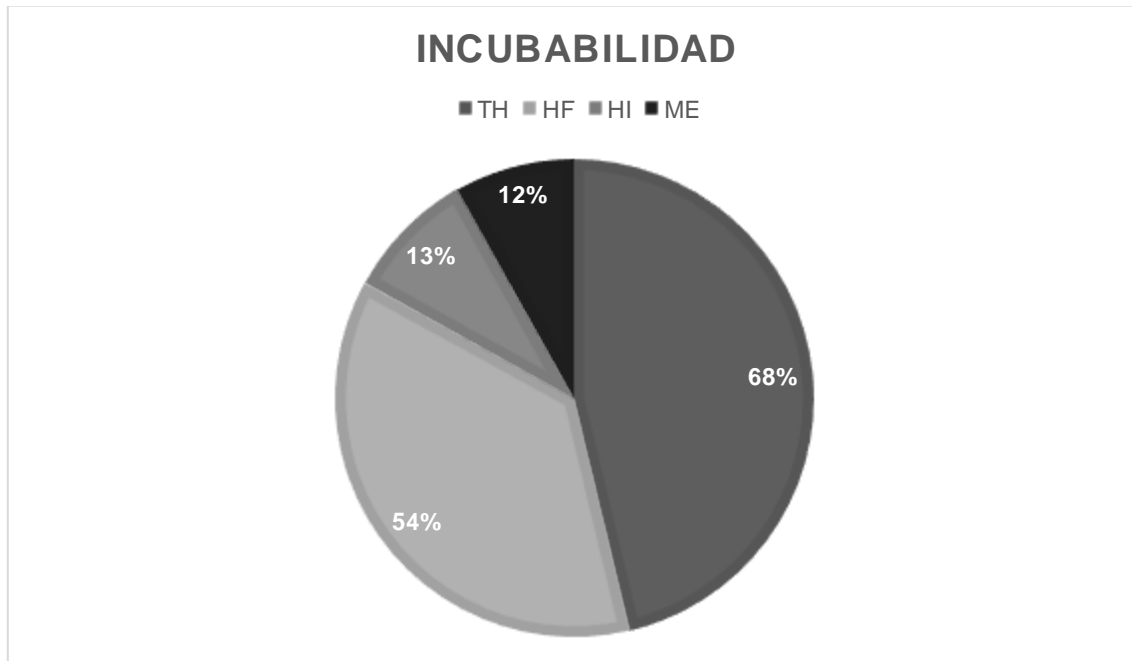


Figura 3.

TH, Total de huevos; HF, Huevos fértiles; H.Inf, huevos infértiles; ME, muerte embrionaria; N, N valido (por lista). Solo el 54% de los huevos lograron tener incubabilidad de los 68 huevos, mencionando los huevos con 12% muertes embrionarias y los 13% huevos infértiles, hasta el día 18 que se realizó la última ovoscopia.

En la Fig. 4 se observa la comparación de los tratamientos.

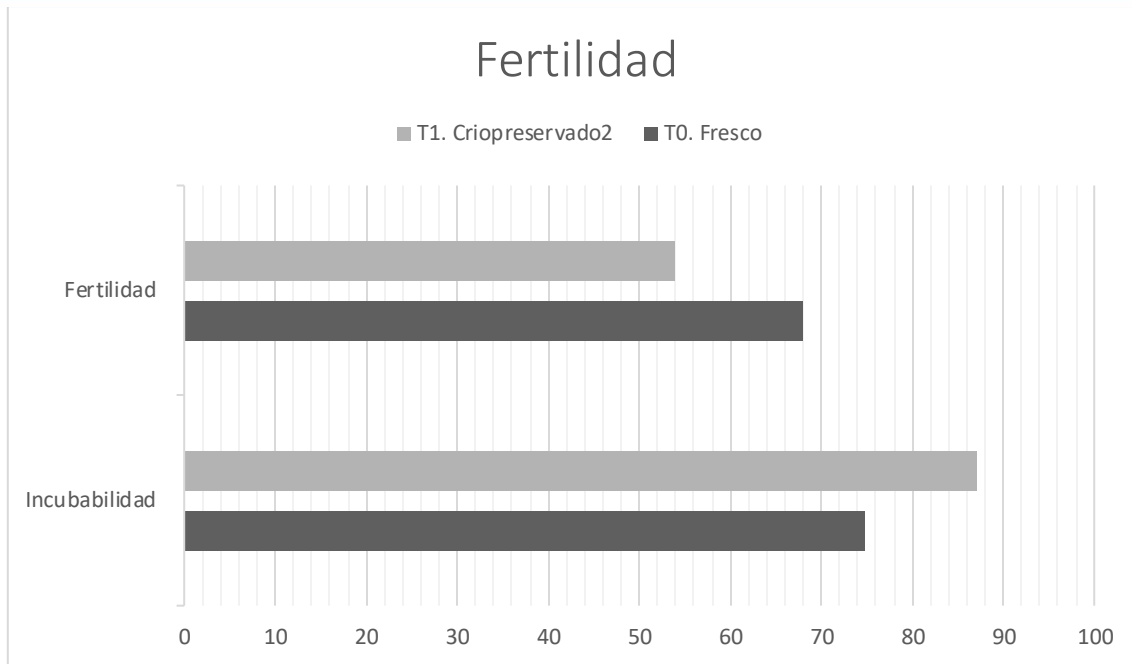


Fig.4

Se ilustran los porcentajes comparativos del T0. Fresco y T1. Criopreservado, evidenciando los resultados Fertilidad (T0. Fresco 87,18% > T1. Criopreservado 74,91%) e incubabilidad (T0. Fresco 68% > T1. Criopreservado 54%).

La incubabilidad tuvo una gran variabilidad durante el periodo de incubación por la humedad relativa que fluctúan entre 40 y 70%, con niveles óptimos de 50 y 60 %. Jugando un papel importante en el resultado de las muertes embrionarias en los 2 tratamientos, influyo en el reblandecimiento de las membranas de las *farfaras*. El número de fertilidad hizo referencia al número de huevos embrionados en relación con el número de huevos colocados en la incubadora. En comparación con los resultados los tratamientos T0. Fresco y T1. Criopreservado ($p > 0,05$) proyectando un resultado de hipótesis nula (T0. Fresco 87,18% > T1. Criopreservado 74,91%)

4.4. DESEMPEÑO DE ECLOSIÓN

En los 2 tratamientos se registró el peso de cada uno de los pollitos a las 24 horas de nacidos, que es el tiempo descrito en la literatura para que estén completamente secos y no se pierda temperatura ni humedad al momento de abrir la incubadora, afectando así a los demás huevos sin eclosionar. El promedio para T0. Fresco fue 45,1 gr y el T1. Criopreservado 43,6 gr evidenciando un resultado de 1,5 gr el cual no es mayormente significativo en los pesos, se observa en el cuadro 10. En la (Fig.4) se visualiza las medias de diferencia entre los tratamientos.

Cuadro 10. Peso total de los pollos T0. Fresco y T1. Criopreservado

Estadísticos descriptivos			
Variable dependiente: Pesos			
Tratamiento	Media	Desv. Desviación	N
T0	45,16	2,81	34
T1	43,67	2,47	27
Total	44,49	2,75	61

T0, tratamiento con semen fresco; T1, tratamiento con semen criopreservado; N, número total de pollos nacidos. Obteniendo T0. Fresco 34 pollos/ vivos y un peso de 45,16gr el T1. Criopreservado 27 pollos/vivos y un peso de 43,67gr. En promedio de 44.49 gr de los tratamientos. Un promedio de diferencia de 1.49 gr.

En comparación a la fertilidad proyectados para los tratamientos T0. Fresco 87,18% y T1. Criopreservado 74,91%, el número de pollos nacidos es baja. Estos resultados señalan los problemas de pérdida de temperatura y humedad que hubo durante el periodo de incubación.

El desempeño de eclosión se comprometió a problemas de pérdidas con la humedad y temperatura que son relativos para el resultado, en total nacieron 61 pollitos del T0. Fresco y T1. Criopreservado. El peso promedio de los tratamientos fue de 44,41gr dentro de los parámetros normales en la literatura. Dependió considerablemente de las características físicas de las gallinas criollas y el tamaño de los huevos.

5. DISCUSIÓN

La criopreservación del semen a representado el método más notorio para la conservación de los recursos genéticos de la especie aviar y la preservación de algunas razas (Yang et al, 2020). En los últimos años se han realizado varios estudios para mejorar los métodos de conservación del potencial reproductivo de los espermatozoides después de la congelación/descongelación (Segura et al , 2007).

Al usar el glicerol que es el crioprotector menos toxico para el esperma del gallo, pero sus efectos osmóticos pueden llegar a ser peligrosos y la posterior eliminación del glicerol del semen antes de la IA significa que los espermatozoides se enfrentaran a un cambio rápido en la osmolalidad. Esto expone a los espermatozoides a un estrés osmótico y provoca una ruptura irreversible de la membrana (Matsuzaki et al, 2021). La descongelación del glicerol a diferencia de otro tipo de crioprotector que se han realizado en varias investigaciones es el menos sencillo y el más costoso.

Stanishevskaya et al, (2021) indica que el método de congelación utilizado por varios investigadores (Mehaisen et al, (2020); Seigneurin et al, (2013); Dhama et al, 2014 y Cabrera et al, 2006) las características individuales y de fertilización de óvulos se encuentran en un rango de 2 a 85% y el nivel promedio de fertilidad cuando se usa semen congelado/descongelado suele ser menor del 30%.

Uno de los procesos mas criticos al trabajar con el glicerol es la eliminacion de las pajuelas criopreservadas, han ido cambiando a lo largo de los años hasta lograr una eficacia alta de fertilidad, modificando los protocolos como Fontgibell et al, (1998) que reducía la concentración del glicerol a 2000 r.p.m en la centrifuga durante 15 minutos. Kulkarni et, (2004) a realizado investigacion alternativas a la eliminacion tradicional del glicerol mediante centrifugacion a traves de una columna Accudenz discontinua, sin el proceso de dilucion escalonada. Para la investigacion realizada se uso la centrifuga a 1900 r.p.m durante 10 minutos descrita por Mehaisen et al, (2020) y se logro reducir el daño osmotico y fisico de los espermatozoides.

Para ejecutar la IA es importante realizar las dosis correctas de espermatozoides por gallina ya que hace mucho tiempo se demostro que la cantidad de espermatozoides inseminados afecta la cantidad de espermatozoides almacenados en

los tubulos de almacenamiento en el aparato reproductivo de la hembra y por lo tanto el nivel de fertilidad y duracion del periodo fertil podria llegar a ser afectado. Al inseminar con 100 millones de espermatozoides se induce una tasa de fertilidad baja y superando los 500 millones de espermatozoides por gallina, se puede producir el rechazo parcial del semen por parte de la hembra. Una dosis recomendable es la que se uso en la practica de 200 millones de espermatozoides por gallina, dieron un resultado optimo de fertilidad (Mehaisen et al, 2020).

El resultado al usar el glicerol al 8% se obtuvo una fertilidad del 79.41 %, (corresponden a las tasas de fertilidad superiores al 70% después de una inseminación artificial, Vitorino et al, 2021). Los resultados obtenidos en comparación con los espermatozoides frescos, no sufrieron reducciones de calidad, términos de motilidad y cinética espermática. Abouelezz et al, 2015; indica que al agregar cualquier crioprotector y usando diferentes tipos de métodos de criopreservación sufrieron reducciones de calidad en su investigación en términos de viabilidad y motilidad, que redujo el número de espermatozoides viables a un 40-50% de la población inicial. Se ha demostrado que los espermatozoides de gallo pueden permanecer móviles después de la descongelación y mostrar eficacia durante un largo periodo para la IA (Sol et al, 2019). Sin embargo, Purdy et al, 2009 al realizar la IA intramagnales una sola vez durante 18 días tuvo una mayor tasa de fertilidad que al realizar la IA intravaginal cada 3 a 4 días, a diferencia de Seigneurin et al, 2013 que realizo la inseminacion durante 2 dias consecutivos para lograr obtener el 70% de fertilidad.

Al trabajar con este tipo de crioprotector se podria formar un banco de semen de la especie aviar, gracias a un estudio realizado por Thelie et al, 2019 en el año 1995 criopreservo semen aviar y realizaron la inseminacion en el año 1996 y en el 2013. Las condiciones de inseminacion fueron las mismas en los 2 años, la fertilidad que obtuvieron con el semen congelado no se vio afectada significativamente por 18 años de almacenamiento en nitrogeno liquido, lograron obtener (1995/1996; 53.7% y en el año 1995/2013; 52.2% de fertilidad)

Cabe recalcar que los resultados de esta investigación se evaluó los parámetros de los espermatozoides congelados/ descongelados y la capacidad de fertilización de los espermatozoides para los tratamientos, pero no para una raza de gallo o gallina

criolla en particular al momento de inseminar. El cual ha dado buenos resultados, aunque la heterogeneidad de la reserva de semen de varios gallos pudo afectar la importancia de los resultados.

6. CONCLUSIONES

La IA en gallinas criollas usando glicerol al 8% en pajuelas de 0,25 ml han dado buenos resultados ya que no sufrieron al momento de la descongelación reducciones de calidad en la cinética espermática y motilidad total y parcial. A pesar de presentar el glicerol una toxicidad para los espermatozoides y ser un anticonceptivo para la especie aviar al momento de la IA, con la técnica adecuada y las dosis para la extracción ha dado buenos resultados en combinación con el diluyente lake-ravie-84, logrando ser una alternativa para la criopreservación y almacenamiento de espermatozoides por un largo periodo de tiempo para formar un banco de semen y mejorar o preservar la especie aviar.

Al realizar este protocolo con el semen criopreservado a largo plazo, los espermatozoides presentan eficacia a la hora de inseminar, aunque hay una disminución en la fertilidad y el peso de los pollos en comparación con el semen fresco. Los presentes resultados sugieren que la concentración del crioprotector si favorece la fertilidad sin pérdida de crioprotección.

La inseminación se puede utilizar como una herramienta importante para mejorar genéticamente a la especie aviar, ya que se considera superior al apareamiento natural en varios aspectos. Las innovaciones en la tecnología de IA en las aves se pueden lograr mediante el desarrollo de nuevos diluyentes de semen específicos para cada especie y la realización de una investigación exhaustiva sobre la biología del esperma de las aves. El cual se debe evaluar varios factores al criopreservar el semen.

7. RECOMENDACIONES

- Para mantener la eficacia de los espermatozoides a la hora de inseminar se recomienda, que el termo con nitrógeno líquido no sufra ningún tipo de

alteración con la temperatura ya que afectaría directamente a la capacidad de fecundar de los espermatozoides a los ovocitos.

- Al momento de inseminar se recomienda un lugar que tenga poca luz ya que afectan directamente a los espermatozoides, se debe tener en cuenta que cada IA se debe usar una estricta limpieza y desinfección de la zona genital. Para este tipo de investigación hay que tener en cuenta que al dividir a las gallinas en jaulas para cada tratamiento van a sufrir un estrés alterando su rendimiento de puesta, esto perjudicaría en el resultado final.
- En cuanto a las diluciones que se efectúan van de acuerdo a las aves que se van a realizar, pero al momento de ejecutar la IA en el catéter se quedan restos de espermatozoides afectando así la cantidad de dosis que le corresponde a cada gallina, por lo cual cada ave se realizara con una dosis diferente y afectara esto al resultado final.
- Para exteriorizar el orificio vaginal de las gallinas no se presenta ninguna dificultad alguna, pero en varias ocasiones presentan resistencia cuando están a punto de poner, el huevo está completamente formado en el útero y esto puede ocasionar molestias en las gallinas. Al tener una destreza en el momento de la IA no es necesario inseminar 2 veces por semana ya que la gallina puede guardar los espermatozoides aproximadamente por 20 días, dependiendo de la calidad de semen.
- Al incubar los huevos se debería esperar por lo menos máximo 5 días para tener un mejor registro del día que van a nacer, ya que al colocar diariamente los huevos en la incubadora hay variaciones en la temperatura y la humedad pudiendo afectar en el nacimiento de los pollos.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Abouelezz, F., Castano, C., Toledano, A., Estesó, M., Lopez, A., Campo, J., & Moreno, J. (2015). Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 1-7. doi:10.1111/rda.12464
- Asmarawati, W., Kustono, D., Widayati, D., Bintara, S., Aji, R., & Ismaya, R. (2019). Fertility duration of commercial laying hen inseminated with native chicken semen. *IOP Conference Series*, 387(1), 1-5. doi:10.1088/1755-1315/387/1/012063
- Bernal, B., Iglesias, N., Sánchez, U., Toledano, A., Castaño, C., Pérez, S., . . . Moreno, J. (2020). Effect of supplementation of valine to chicken extender on sperm cryoresistance and post-thaw fertilization capacity. *Poultry Science*, 1-9. doi:10.1016/j.psj.2020.09.060
- 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.
- Damaziak, K., Koznaka, L., Gozdowski, D., Golebiowska, A., & Kedziorek, E. (2021). Effects of broiler breeder strain, age, and eggs preheating profile in single-stage systems on the hatchability of eggs and quality of chicks. *Animal*, 15(1), 1-10. Obtenido de 10.1016/j.animal.2020.100057
- Dhama, K., Singh, R. P., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Wani, M. Y., & Mohan, J. (2014). Artificial Insemination in Poultry and Possible Transmission of Infectious Pathogens: A Review. *Science Alert*, 9(4), 1-9. doi:10.3923 /ajava.2014.211.228
- Eslami, M., Ghaniei, A., & Mirzaei, H. (2016). Effect of the rooster semen enrichment with oleic acid on the quality of semen. *Ciencia avícola*, 95(6), 1-7. doi:10.3382/ps/pew041

- Estienne, A., Reverchon, M., Patryka, A., Bourdon, G., Grandhaye, J., Barbe, A., . . . Dupont, J. (2020). Chemerin Impairs In Vitro Testosterone Production, Sperm Motility, and Fertility in Chicken: Possible Involvement of Its Receptor CMKLR1. *MDPI*, *9*(7), 1-10. doi:10.3390/cells9071599
- Feyisa, S., Park, Y., Kim, Y., Lee, B., Jung, K., Choi, S., . . . Han, J. (2018). Morphological defects of sperm and their association with motility, fertility, and hatchability in four Korean native chicken breeds. *Animal Bioscience*, *31*(8), 1-9. doi:10.5713/ajas.17.0626
- Feyzi, S., Sharafi, M., & Rahimi, S. (2018). Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. *Poultry Science*, *97*(7), 1-8. doi:10.3382/ps/pey067
- Fontgibell, A., & Francesch, A. (1998). Primeros resultados en el estudio de los efectos de la congelación de semen de gallo en tres razas Catalanas. *Archivos de zootecnia*, *178*(47), 7.
- Gen, A., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, L., Chang, C., Wang, H., . . . Liu, H. (2021). Effects of light regime on the hatching performance, body development and serum biochemical indexes in Beijing You Chicken. *Ciencia avícola*, *100*(8), 1-7. doi:10.1016/j.psj.2021.101270
- Geng, A., Zhang, Y., Zhang, J., Zeng, L., Chang, C., Wang, H., . . . Liu, H. (2021). Effects of light regime on the hatching performance, body development and serum biochemical indexes in Beijing You Chicken. *Poultry Science*, *100*(8), 1-7. doi:10.1016/j.psj.2021.101270
- Gu, L., Jing, R., Gong, Y., Yu, M., Elokial, A., & Li, S. (2019). Gene co-expression network analysis reveals key potential gene modules in utero-vaginal junction associated with duration of fertility trait of breeder hens. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-7. doi:10.1038/s41598-019-50148-6
- Hammerstedt, R., & Graham, J. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, *29*(1), 26-38.

- Kulkarni, G., & Long, A. (2004). An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Science*, 83(9), 1-7. Obtenido de 10.1093/ps/83.9.1594
- Li, X., Rathgeber, B., Mclean, N., & Maclasaac, J. (2021). Providing colored photoperiodic light stimulation during incubation: 2. Effects on early posthatch growth, immune response, and production performance in broiler chickens. *Poultry Science*, 100(9), 1-8. doi:10.1016/j.psj.2021.101328
- Long, J. (2006). Avian sperm cryopreservation: what are the biological challenges. *Poultry Science*, 85(6), 1-6. doi:10.1093 / ps / 85.2.232
- Lukaszewicz, E., Jerysz, A., & Kowalczyk, A. (2020). Effect of semen extenders on viability of ISA Brown and Hubbard Flex roosters' sperm stored for 24 h. *Poultry Science*, 99(5), 1-9. doi:10.1016/j.psj.2019.12.055
- Matsuzaki, M., Hirohashi, N., Tsudzuki, M., Haqani, M., Maeda, T., Mizushima, S., & Sasanami, T. (2021). Longer and faster sperm exhibit better fertilization success in Japanese quail. *Ciencia avícola*, 100(4), 1-10. doi:10.1016/j.psj.2021.01.003
- Mehaisen, G., Patryka, A., Ligocka, Z., & Nizanski, W. (2020). Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 212, 1-7. doi:10.1016/j.anireprosci.2019.106238
- Mehdipour, M., Kia, H., & Martínez, F. (2020). Poloxamer 188 exerts a cryoprotective effect on rooster sperm and allows decreasing glycerol concentration in the freezing extender. *Poultry Science*, 99(1), 1-8. doi:10.1016/j.psj.2020.08.041
- Melo, E., Araujo, I., Triginelli, M., Castro, F., Baiao, N., & Lara, L. (2021). Effect of egg storage duration and egg turning during storage on egg quality and hatching of broiler hatching eggs. *Animal*, 15(2), 1-5. doi:10.1016/j.animal.2020.100111
- Mohan, J., Sharma, S. K., Kolluri, G., & Dhama, K. (2018). History of artificial insemination in poultry, its components and significance. *Revista mundial de ciencias avícolas*, 74(3), 1-13. doi:10.1017 / S0043933918000430

- 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>.
- Moreno , J., & Blesbois, E. (2020). Functional aspects of seminal plasma in bird reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1-14. doi:10.3390/ijms21165664
- Mosca , F., Zaniboni, L., Abdel , A., Madeddu, M., Laffaldano, N., & Cerolini , S. (2019). Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *Poultry Science*, 11(98), 1-7. doi:10.3382/ps/pez303
- Ozlu, S., Ucar, A., Erkus, T., Nicholson, A., & Elibol, O. (2021). Research Note: Effects of turning and short period of incubation during long-term egg storage on embryonic development and hatchability of eggs from young and old broiler grandparent flocks. *Ciencia avícola*, 100(4), 1-6. doi:10.1016/j.psj.2021.101026
- Purdy, P., Song, Y., Silversides, F., & 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), 1-8. doi:10.3382/ps.2008-00402
- 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), 1-7.
- Segura, J., Jerez, M., Sarmiento , L., & Santos , R. (2007). Indicadores de producción de huevo de gallinas criollas en el trópico de México. *Archivos de Zootecnia*, 56(215), 1-10. doi:49521504
- Seigneurin , F., Grasseau, I., Chapuís , H., & Blesbois , E. (2013). An efficient method of guinea fowl sperm cryopreservation. *Poultry Science*, 92(11), 1-9. doi:10.3382/ps.2013-03166

- Shaheen, M., Mehmood, S., Mahmud, A., & Riaz, A. (2020). Effects of different mating strategies in broiler breeder during peak and postpeak phase on subsequent broiler performance. *Poultry Science*, 7(99), 1-9. doi:10.1016/j.psj.2020.03.038
- Sol, A., Xue, F., Li, Y., Fu, L., Bai, H., Ma, H., . . . Chen, J. (2019). Differences in semen quality, testicular histomorphology, fertility, reproductive hormone levels, and expression of candidate genes according to sperm motility in Beijing-You chickens. *Poultry Science*, 98(9), 1-8. doi:10.3382/ps/pez208
- Stanishevskaya, O., Silyukova, Y., Pleshanov, N., Kurochkin, A., Fedorova, E., Fedorova, Z., . . . Meftakh, I. (2021). Effects of saccharides supplementation in the extender of cryopreserved rooster (*Gallus domesticus*) semen on the fertility of frozen/thawed spermatozoa. *Animals*, 11(1), 1-9. doi:10.3390/ani11010189
- Tesfay, H., Sun, Y., Li, Y., Shi, L., Fan, J., Wang, P., . . . Chen, J. (2020). Comparative studies of semen quality traits and sperm kinematic parameters in relation to fertility rate between 2 genetic groups of breed lines. *Poultry Science*, 99(1), 1-8. doi:10.1016/j.psj.2020.06.088
- Thananurak, P., Chuaychu, N., Phasuk, Y., & Vongpralub, T. (2020). Comparison of TNC and standard extender on post-thaw quality and in vivo fertility of Thai native chicken sperm. *Cryobiology*, 92(1), 1-6. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.01.011
- Thelie, A., Bailliard, A., Seigneurin, F., Zerjal, T., Tixier, M., & Blesbois, E. (2019). Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poultry Science*, 98(1), 1-8. doi:10.3382/ps/pey360
- Tovar, J., Narváez, W., & Agudelo, L. (2015). Tipificación de la gallina criolla en los agroecosistemas campesinos de producción en la zona de influencia de la selva de Florencia (Caldas). *Luna Azul*, 57(41), 1-17. doi:321739268004
- Uzochukwu, I., Amaefule, B., Aba, C., Nnajifor, N., Machebe, N., & Foleng, H. (2019). Semen Characteristics and Hematology of Nigerian Local Cocks Fed Varying Dietary Levels of Ethiopian Pepper Fruit Meal. *Avícola aplicada*, 28(4), 1-8. doi:10.3382/japr/pfz073

- Villacís , G., Escudero, G., Cueva , F., & Luzuriaga, A. (2018). Características Morfométricas de las Gallinas Criollas de Comunidades Rurales del Sur del Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(2), 1-8. doi:10.15381/rivep.v27i2.11639
- Vitorino, A., Soler, L., Thélie, A., Grasseau, I., Cordeiro, L., Tomas, D., . . . Blesblois, E. (2021). Proteomic Changes Associated With Sperm Fertilizing Ability in Meat-Type Roosters. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9(65), 15. doi:10.3389/fcell.2021.655866
- Wolc, A., Arango, J., Settar, P., Fulton, J., O'Sullivan, N., & Dekkers, J. (2019). Genetics of male reproductive performance in White Leghorns. *Poultry Science*, 98(7), 1-4. doi:10.3382/ps/pez077
- Yang , L., Zheng , X., Mo, C., Li, S., Liu, Z., Yang, G., . . . Mou, C. (2020). Transcriptome analysis and identification of genes associated with chicken sperm storage duration. *Poultry Science*, 99(2), 1-10. doi:10.1016/j.psj.2019.10.021

II. ANEXOS

Anexo 1. Selección de las gallinas



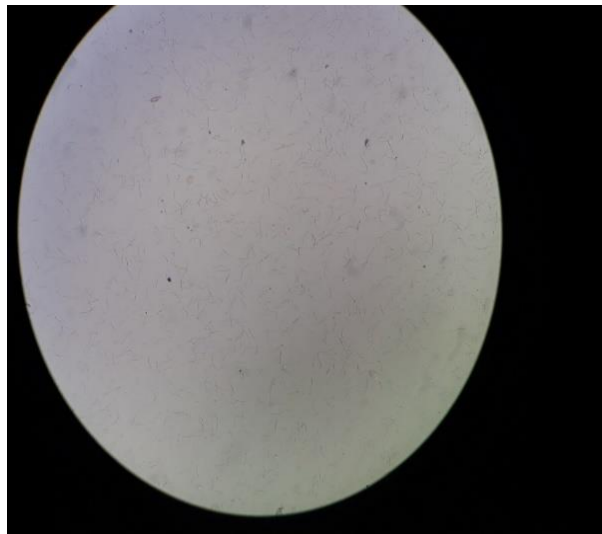
Anexo 2. División de las gallinas



Anexo 3. Extracción del semen



Anexo 4. Evaluación del semen



Anexo 5. Elección de las pajuelas



Anexo 6. Descongelación de las pajuelas



Anexo 7. Descongelación del diluyente Lake-Ravie 84



Anexo 8. Eliminación del glicerol



Anexo 9. Centrifuga de las muestras



Anexo 10. Extracción del glicerol sobrante



Anexo 11. Inseminación artificial



Anexo 12. Programación de la incubadora



Anexo 13. Colocación de los huevos



Anexo 14. Ovoscopia 18 días



Anexo 15. Muerte embrionaria



Anexo 16. peso de pollitos



Anexo 17. Autorización de publicación del repositorio institucional



Alexandra Fabiana Novillo Coronado portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0302200266**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Evaluación de la fertilidad de gallinas criollas inseminadas con espermatozoides de gallo criopreservado con 8% de glicerol**” 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, **15 de abril de 2021**

F.....

Alexandra Fabiana Novillo Coronado

C.I. **0302200266**